



Rute Isabel dos Santos Carvalho
Licenciada em Química Aplicada – Ramo de Biotecnologia

**“Uma abordagem a sistemas de crescimento celular apical: síntese
de um sensor para iões citosólicos de potássio”**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Bioorgânica

Orientação:

Professora Ana Maria Lourenço
Universidade Nova de Lisboa (UNL)
Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT)

Co - Orientação:

Professora Luísa Pinto Ferreira (UNL/FCT)

Júri:

Presidente: Prof. Paula Branco (UNL/FCT)
Arguente: Dra. Ana Philips (UNL/FCT)
Vogal: Prof. Ana Maria Lourenço (UNL/FCT)



Rute Isabel dos Santos Carvalho

Licenciada em Química Aplicada – Ramo de Biotecnologia

**“Uma abordagem a sistemas de crescimento celular apical: síntese
de um sensor para iões citosólicos de potássio”**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Bioorgânica

Orientação:

Professora Ana Maria Lourenço
Universidade Nova de Lisboa (UNL)
Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT)

Co - Orientação:

Professora Luísa Pinto Ferreira (UNL/FCT)

Júri:

Presidente: Prof. Paula Branco (UNL/FCT)

Arguente: Dra. Ana Philips (UNL/FCT)

Vogal: Prof. Ana Maria Lourenço (UNL/FCT)



Monte da Caparica, 2011

“Uma abordagem a sistemas de crescimento celular apical: síntese de um sensor para iões citosólicos de potássio”

Rute Isabel dos Santos Carvalho, *Copyright*

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Prof. Dra. Ana Maria Lourenço e à Prof. Dra. Luísa Pinto Ferreira por aceitarem serem minhas orientadoras e co – orientadora, respectivamente, neste projecto. Foram, sem dúvida, os meus alicerces nesta caminhada. Sem as suas orientações não teria sido capaz de cumprir os objectivos propostos neste projecto.

Um agradecimento muito especial à Prof. Dra. Ana Maria Lourenço pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade e apoio constantes nos momentos mais difíceis.

Quero também agradecer à Prof. Dra. Luísa Pinto Ferreira por me ter repreendido quando necessário e por ter acreditado sempre em mim, como pessoa e como investigadora.

Gostaria também de agradecer ao Prof. Dr. António Jorge Parola e ao Prof. Dr. João Carlos Lima pela disponibilização dos equipamentos de Ultravioleta / Visível e de Fluorescência. Sem as suas colaborações este trabalho não teria sido possível. Um agradecimento especial ao João Avó pela paciência e ajuda com esses equipamentos. Agradeço ainda à equipa integrante do Laboratório Associado REQUIMTE, alocado no Departamento de Química (DQ) da FCT/UNL, pelos serviços prestados na análise de espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear e ICP-AES. Em especial, um agradecimento à Dra. Maria do Rosário Caras Altas, pela sua total disponibilidade e rapidez na análise espectroscópica de RMN de todos os meus compostos.

Como não poderia deixar de ser, quero agradecer a todos os meus colegas dos laboratórios 202 e 205 do DQ, por terem partilhado as suas experiências científicas, pela amizade e apoio constantes nos bons e nos maus momentos, bem como das aventuras, sorrisos e lágrimas que aconteceram ao longo de todos os meses que lá trabalhei. São eles: Mónica Estevão, Luísa Carvalho, Joana Gordo, Joana Romão, Filipa Siopa, Carina Crucho, Vivek Raje e Ravi Varala.

Finalmente, gostaria de agradecer à minha família e amigos por todo o apoio dado nesta caminhada. Foram muitos os momentos em que me fui abaixo, em que duvidei das minhas capacidades e em que quis desistir. Nem sempre foi fácil acreditar que seria capaz de aguentar toda a responsabilidade que este projecto exigiu, mas o apoio incondicional dos meus pais, irmã, cunhado e amigos mais próximos deu-me forças para continuar. Em especial, um grande obrigada à Inês Martins pela sua amizade, pelos seus vastos conhecimentos em química, pela sua total disponibilidade e por nunca me ter deixado desistir.

Agradeço ainda à Fundação para a Ciência e Tecnologia da FCT/UNL pelo financiamento do projecto PTDC/BIA-BCM/10844/2008, ao abrigo do qual me foi concedida uma bolsa de investigação.

Resumo

Este trabalho descreve os estudos realizados no desenvolvimento de um sensor fluorescente, solúvel em água, com potencial aplicação na quantificação de íons de potássio citosólicos. O sensor fluorescente de íons de potássio, ou PBF/Dextrano, é constituído por duas unidades estruturais: dextrano 9,000-11,000 Da (produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*) ligado, através de uma função éster, ao indicador fluorescente PBF (*Potassium - binding benzofuran isophthalate*). O PBF é um fluoroionóforo formado por duas sub - unidades de benzofuranoisofalato e pelo ionóforo 18-diazocoroa-6, obtido através da síntese convergente de uma unidade de 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetraoxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) a duas unidades de 4-metilbromo-isofalato de dimetilo por um processo de duas etapas por tratamento com carbonato de potássio em diferentes solventes. Obteve-se uma mistura de sais de carboxilatos de potássio e ésteres metílicos, com uma média de duas unidades de potássio por molécula. A sua estrutura foi determinada por ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa de MALDI-TOF e espectroscopia de emissão atómica (ICP-AES). A fluorescência do indicador foi analisada por espectroscopia de Ultravioleta / Visível. Esta última permitiu retirar informações sobre a absorção e emissão da amostra. O sensor fluorescente PBF/Dextrano foi obtido pela condensação do PBF, através do seu grupo funcional carboxilato, à unidade de dextrano por uma transformação de dois passos: activação do carboxilato através do seu derivado de benzotriazole seguido da condensação com o dextrano. Depois de determinada a estrutura do sensor, pelas técnicas mencionadas anteriormente, fez-se um estudo de fluorescência usando as mesmas condições, descritas na literatura, para o PBF. Verificou-se um máximo de emissão fluorescente a 553 nm (601 nm no caso do indicador PBF) e observou-se, através do espectro de excitação fluorescente, que a intensidade do sinal aumenta com o aumento da concentração de K^+ . O sensor mostrou ser sensível a uma gama de concentrações de soluções tampão contendo íons potássio.

Abstract

This work describes studies on the development of a new water soluble fluorescent sensor with potential application for the quantification of cytosolic potassium ions. The fluorescent sensor for cytosolic potassium ions, or PBFI/Dextran, comprises two structural units: dextran 9.000-11,000 Da (produced by *Leuconostoc mesenteroides* bacteria) connected by an ester function to the fluoroionophore PBFI (*Potassium – binding benzofuran isophthalate*). The PBFI is a fluoroionophore with two subunits of benzofuranisophthalate and the diaza[18]-crown-6 ionophore that can be obtained by a convergent synthesis of 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetraoxa-7'',16''-diazacyclooctadecane-7'',16''-diyl)bis(2-hydroxi-5-metoxybenzaldehyde) with two dimethyl 4-(bromomethyl)isophthalate units, by a two - step procedure with potassium carbonate in different solvents. This probe was obtained as a mixture of potassium carboxylate salts and methyl esters, with an average of two potassium units per molecule. Its structure was assigned by nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry of MALDI-TOF and atomic emission spectroscopy (ICP-AES). The indicator's fluorescence was analyzed by Ultraviolet / Visible spectroscopy. This last technique gave information about the absorption and emission of the sample. The fluorescent sensor PBFI/Dextran was obtained by the condensation of PBFI through its carboxylate function to the dextran unit in a two – step transformation: activation of the carboxylate by its benzotriazole derivative followed by dextran condensation. After the determination of the sensor's structure, by the same techniques mentioned above, a fluorescent study was made using the same conditions, described in literature, for the PBFI. An emission maximum at 553 nm was observed (601 nm to the probe PBFI) and, through the fluorescent excitation spectra, the intensity of the signal increases with increasing concentration of K^+ . The sensor showed to be sensitive to potassium ions concentration in buffer solution.

Índice de Matérias:

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice de Matérias:.....	xi
Índice de Figuras.....	xv
Índice de Tabelas.....	xix
Palavras - Chave.....	xxi
Lista de Abreviaturas.....	xxiii
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Nicotiana tabacum</i>	2
1.2. Iões Metálicos.....	4
1.3. Indicadores Fluorescentes.....	4
1.3.1. Éteres de coroa.....	5
1.3.2. PBFI / SBFI.....	7
1.3.3. Processo sintético do PBFI.....	8
1.4. Dextrano.....	10
2. Discussão de Resultados.....	13
2.1. Preparação do Fluoroionóforo de Benzofurano de Potássio: PBFI (3).....	14
2.1.1. Preparação da unidade 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4).....	16
2.1.1.1. Preparação do intermediário 2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6).....	17
2.1.1.2. Preparação do intermediário 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (7).....	20
2.1.1.3. Preparação do intermediário 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (8).....	23
2.1.1.4. Preparação da unidade estrutural 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4).....	26
2.1.2. Preparação da unidade 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5).....	29
2.1.2.1. Preparação do 4-metilsoftalonitrilo (10).....	30
2.1.2.2. Preparação do ácido 4-metilsoftálico (11).....	30
2.1.2.3. Preparação do 4-metilsoftalato de dimetilo (12).....	32
2.1.2.4. Preparação do 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5).....	33

2.1.3. Condensação do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4) com duas unidades de 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5) e posterior ciclização para formar o sensor fluorescente PBFI (3)	36
2.1.3.1. Preparação do intermediário 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) diisofalato de tetra-metilo (26).....	37
2.1.3.2. Preparação do Indicador PFBI ou 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'- metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio (3)	41
2.2. Preparação do Sensor Fluorescente de Potássio: PBFI / Dextrano (16).....	45
2.2.1. Ensaio de adição do Dextrano ao PBFI com recurso ao CDI	46
2.2.2. Ensaio de adição do Dextrano ao PBFI com <i>N</i> -(1-metanosulfonil)benzotriazole (14)	48
2.2.2.1. Preparação do intermediário PBFI di(benzo[1,2,3]triazole) (15).....	48
2.2.2.2. Preparação do Sensor Fluorescente de Potássio: PBFI/Dextrano (16).....	51
3. Conclusão	57
4. Parte Experimental	61
4.1. Reagentes, Solventes e Materiais	62
4.2. Métodos e Equipamentos	63
4.2.1. Espectroscopia de Infravermelho (IV)	63
4.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	63
4.2.3. Espectrometria de Massa (ME).....	63
4.2.4. Plasma Indutivamente Acoplado com Espectroscopia de Emissão Atômica (ICP-AES).....	64
4.2.5. Espectroscopia de Ultravioleta / Visível (UV-Vis).....	64
4.2.6. Espectroscopia de Fluorescência.....	64
4.3. Reacções para a síntese do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4)	65
4.3.1. Preparação do 2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6) a partir de 1,4,10,13-tetra-oxa-7,16-diazociclo-octadecano (1).....	65
4.3.2. Preparação do 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (7) a partir de 2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) diciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6).....	66
4.3.3. Preparação do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (8) a partir de 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (7).....	67
4.3.4. Preparação do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4) a partir de 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (8)	68
4.4. Reacções para a síntese do 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5)	69

4.4.1. Substituição Nucleofílica (S _N 2): Preparação do 4-metilsoftalonitrilo (10) a partir do 2,4-diclorotolueno (9).....	69
4.4.2. Hidrólise Básica: preparação do ácido 4-metilsoftálico (11) a partir do 4-metilsoftalonitrilo (10).....	69
4.4.3. Esterificação: preparação do 4-metilsoftalato de dimetilo (12) a partir do ácido 4-metilsoftálico (11).....	70
4.4.4. Bromação radicalar: preparação do 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5) a partir do 4-metilsoftalato de dimetilo (12).....	71
4.5. Preparação do Fluoroionóforo de Benzofurano de potássio: 4a,4b-6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'-metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio ou PBFi (3).....	71
4.5.1. Preparação do intermediário 4a,4b-(5,5'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno))bis(oxi)bis(metileno) di-isoftalato de tetra-metilo (26) através de uma reacção de Substituição Nucleofílica entre os compostos (4) e (5).....	71
4.5.2. Síntese do PBFi (3) por ciclização do intermediário 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,5',1,1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isoftalato de tetra-metilo (26).....	73
4.6. Síntese do 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5-metoxibenzofurano-6,2-di-il)di-isoftalato de tetra-etilo (27).....	74
4.7. Reacções para a preparação do Sensor Fluorescente de Potássio: PBFi/Dextrano (16).....	75
4.7.1. Na presença de CDI.....	75
4.7.1.1. A partir do PBFi (3).....	75
4.7.1.2. Ensaio de optimização das condições experimentais.....	75
4.7.1.2.1. Procedimento geral para uma proporção de 1:1:1.....	75
4.7.1.2.2. Procedimento geral para uma proporção de 1:3:3.....	76
4.7.2. Na presença de N-(1-metanosulfonyl)benzotriazole (14).....	76
4.7.2.1. Síntese do N-(1-metanosulfonyl)benzotriazole (14) a partir do Benzotriazole (36).....	76
4.7.2.2. Ensaio de optimização das condições experimentais.....	77
4.7.2.2.1. A partir do Ácido Tereftálico (29).....	77
4.7.2.2.2. A partir do Tereftalato de Potássio (32).....	77
4.7.2.3. A partir do PBFi (3).....	79
5. Bibliografia.....	81
6. Anexos.....	85
6.1. Análise espectroscópica do 2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6).....	86
6.2. Análise espectroscópica do 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (7).....	89
6.3. Análise espectroscópica do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (8).....	92

6.4. Análise espectroscópica do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4)	95
6.5. Análise espectroscópica do 4-metilsoftalonitrilo (10).....	97
6.6. Análise espectroscópica do ácido 4-metilsoftálico (11).....	98
6.7. Análise espectroscópica do 4-metilsoftalato de dimetilo (12)	101
6.8. Análise espectroscópica do 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5).....	104
6.9. Análise espectroscópica do 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isoftalato de tetra-metilo (26).....	105
6.10. Análise espectroscópica do 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5' - metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio ou PBFi (3)	107
6.11. Análise espectroscópica do 4,4'-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5-metoxibenzofurano-6,2-di-il)di-isoftalato de tetra-etilo (27).....	109
6.12. Análise espectroscópica do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) (33).....	110
6.13. Análise espectroscópica do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) / Dextrano (34).....	111
6.14. Análise espectroscópica do PBFi di(benzo[1,2,3]triazole) (15)	113
6.15. Análise espectroscópica do Dextrano 9,000-11,000 (13).....	115
6.16. Análise espectroscópica do Sensor Fluorescente de Potássio: PBFi/Dextrano (16)	116

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Imagem representativa da flor <i>Nicotiana tabacum</i> e a respectiva ampliação dos órgãos reprodutores feminino e masculino.	2
Figura 1.2 - Ciclo da Reprodução em Angiospermas.	3
Figura 1.3 - Exemplo de dois éteres de coroa muito utilizados na captura de iões metálicos.....	5
Figura 1.4 - Estrutura do 1,4,10,13-tetra-oxa-7,16-diazociclo-octadecano (1), ou 18-diazocoroa-6..	6
Figura 1.5 - Estruturas dos indicadores fluorescentes SBF1 (2) e PBF1 (3).....	7
Figura 1.6 - Estrutura obtida do Fluoroionóforo de Benzofurano de Potássio: PBF1 (3).	8
Figura 1.7 - Via de síntese do PBF1 (3) a partir do 18-diazocoroa-6 (1), em que (a) Adição nucleofílica a C=C-C=O; (b) Hidrogenação Catalítica seguida de Metilação com sulfato de dimetilo; (c) Formilação de Vilsmeier; (d) Desmetilação regioselectiva; (e) Adição / Eliminação; (f) – Hidrólise Básica; (g) – Esterificação; (h) – Bromação Radicalar e (i) Condensação de 4 e 5 seguida de ciclização.	9
Figura 1.8 - Parte da estrutura do Dextrano (13): esquema de algumas ligações glicosídicas α – (1 \rightarrow 6) da cadeia principal e respectivas ramificações nas posições - 2, - 3 e - 4 dos anéis de glucose. [15]	10
Figura 1.9 - Estrutura molecular do <i>N</i> (1-metanosulfonil)benzotriazole, ou Bt-MS (14).	12
Figura 1.10 - Via de Síntese do Sensor Fluorescente PBF1 / Dextrano (16) a partir do PBF1 (3), através da (i) formação de um intermediário de benzotriazole (15) e posterior (ii) condensação do dextrano (13) na presença de (iii) NaH.	12
Figura 2.1 - Esquema reaccional correspondente à preparação do Indicador Fluorescente PBF1 (3) pela síntese convergente de duas unidades estruturais: 4 e 5 . Em (i) dá-se a condensação de 4 a duas unidades de 5 e em (ii) a formação do cromóforo, isto é, do benzofurano, para obter 3	15
Figura 2.2 - Passos reaccionais envolvidos na preparação da unidade 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4), onde: (i) Adição nucleofílica a C=C-C=O, (ii) Hidrogenação Catalítica, (iii) Metilação com sulfato de dimetilo, (iv) Formilação de Vilsmeier e (v) Desmetilação regioselectiva.....	16
Figura 2.3 - Mecanismo reaccional da adição nucleofílica a C=C-C=O de 1,4,14,13-tetra-oxa-7,16-diazociclo-octadecano (1) à <i>p</i> -benzoquinona (18), numa mistura (1:1) de CHCl ₃ :MeOH.	17
Figura 2.4 - Estrutura do 2,2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6).	18
Figura 2.5 - Correlações a duas e três ligações (\curvearrowright) (HMBC) obtidas para 2,2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6), em CDCl ₃ (400 MHz).	19
Figura 2.6 - Esquema reaccional da redução do 2,2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6) a 2,2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)dibenzeno-1,4-diol (20), por Hidrogenação Catalítica..	20
Figura 2.7 - Mecanismo Reaccional da Metilação do difenol (20) com sulfato de dimetilo (21), em meio básico (hidróxido de tetrametilamónio penta - hidratado em MeOH).....	21

Figura 2.8 - Estrutura do 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (7).....	22
Figura 2.9 - Mecanismo reaccional da Formilação de Vilsmaeyer - Haak. O intermediário 7 é dissolvido em DMF (22) e adiciona-se, depois, uma solução 1:4 (v/v) de POCl ₃ (23) / DMF.....	23
Figura 2.10 - Estrutura do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (8).....	24
Figura 2.11 - Correlações a duas e três ligações (\curvearrowright) (HMBC) do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (8) em CDCl ₃ (400 MHz).	25
Figura 2.12 - Mecanismo reaccional da desmetilação regioselectiva do grupo metoxilo em posição <i>orto</i> relativamente ao grupo aldeído.....	26
Figura 2.13 - Estrutura do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4).....	27
Figura 2.14 - Correlações a uma ligação (HMQC) obtidas para 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4), em CDCl ₃ (400 MHz).	28
Figura 2.15 - Correlações a duas e três ligações (\curvearrowright) (HMBC) obtidas para 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4), em CDCl ₃ (400 MHz).	29
Figura 2.16 - Passos reaccionais envolvidos na formação da unidade estrutural 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5), onde: (i) – Adição / Eliminação, em <i>N</i> -metilpirrolidona (NMP); (ii) – Hidrólise Básica, em meio básico e na presença de Mono Etileno Glicol (MEG); (iii) – Esterificação; (iv) – Bromação Radicalar (usando o reagente <i>N</i> -bromossuccinamida (NBS)).....	29
Figura 2.17 - Esquema reaccional de formação de 4-metilsoftalonitrilo (10) a partir de 2,4-diclorotolueno (9).....	30
Figura 2.18 - Mecanismo Reaccional de hidrólise básica: NaOH em etileno glicol e umas gotas de água.	31
Figura 2.19 - Estrutura do Ácido 4-metilsoftalato (11).....	31
Figura 2.20 - Mecanismo reaccional da Esterificação catalisada por ácido (H ₂ SO ₄), na presença de metanol.....	32
Figura 2.21 - Estrutura do 4-metilsoftalato de dimetilo (12).....	33
Figura 2.22 - Mecanismo reaccional da reacção de bromação radicalar onde (a) corresponde à iniciação do radical Br, (b) passo de propagação e (c) à reacção que ocorre no meio reaccional.....	34
Figura 2.23 - Estrutura do 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5).....	35
Figura 2.24 - Passos reaccionais envolvidos na condensação de 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4) com duas unidades de 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5) e posterior ciclização para formar o sensor fluorescente PBFI (3).	36
Figura 2.25 - Condensação de 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4) com duas unidades de 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5), em meio básico (carbonato de potássio).....	37

Figura 2.26 - Estrutura do 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isoftalato de tetra-metilo (26).	38
Figura 2.27 - Correlações a uma ligação (HMQC) obtidas para 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isoftalato de tetra-metilo (26), em CDCl ₃ (400 MHz).	39
Figura 2.28 - Correlações a duas e três ligações (\curvearrowright) (HMBC) obtidas para 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isoftalato de tetra-metilo (26), em CDCl ₃ (400 MHz).	40
Figura 2.29 - Mecanismo Reaccional da ciclização de 26 a 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'- metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio ou PBFi (3), em meio básico. X corresponde a CH ₃ ou K ⁺ ...	41
Figura 2.30 - Estrutura proposta do 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'- metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio ou PBFi (3).	42
Figura 2.31 - Estrutura do 4,4'-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5-metoxibenzofurano-6,2-di-il)di-isoftalato de tetra-etilo (27).	43
Figura 2.32 - Espectro de absorção do PBFi (3).	45
Figura 2.33 - Espectro de emissão do PBFi (3) adquirido após excitação a um $\lambda_{\text{máx}} = 346,9$ nm.	45
Figura 2.34 - Passos reaccionais envolvidos na condensação de 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'- metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio ou PBFi (3) à unidade de Dextrano 9,000-11,000 (13), através da formação do intermediário PBFi di(benzo[1,2,3]triazole) (15).	46
Figura 2.35 - Procedimento experimental utilizado para a preparação do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) (33), a partir dos materiais de partida 29 (ácido tereftálico) e 32 (tereftalato de potássio).	48
Figura 2.36 - Estrutura do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) (33).	49
Figura 2.37 - Mecanismo Reaccional envolvido na formação do intermediário 15 , através de uma simples substituição nucleofílica entre 3 e 14	49
Figura 2.38 - Estrutura do PBFi di(benzo[1,2,3]triazole) (15).	50
Figura 2.39 - Estrutura proposta do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) / Dextrano (34).	51
Figura 2.40 - Mecanismo Reaccional da condensação do intermediário PBFi di(benzo[1,2,3]triazole) (15) ao dextrano (13), na presença de hidreto de sódio.	52
Figura 2.41 - Estrutura do PBFi/Dextrano (16), onde Y representa CH ₃ ou dextrano 9,000-11,000 (13).	53
Figura 2.42 - Espectros de a) ¹ H-RMN e b) ¹³ C-RMN do produto final PBFi/Dextrano (16), em D ₂ O (400 MHz). A cor – de – laranja está evidenciada a zona do espectro correspondente aos protões da unidade Benzofurano (δ 6,70 – 8,34 ppm) e a azul está evidenciada a zona do espectro correspondente aos protões do Dextrano e do éter de coroa (δ 2,69 – 3,89 ppm). A estrutura representada na figura apresenta Y = CH ₃ ou dextrano 9,000-11,000 (13).	54

Figura 2.43 - Espectros de ^1H -RMN de **a)** PBF/Dextrano (**16**), ampliação do campo δ 2,69 – 3,89 ppm e **b)** Dextrano (**13**), em D_2O (400 MHz). Comparação entre ambos: têm exactamente a mesma forma mas com integrações diferentes e um ligeiro desfasamento nos respectivos desvios químicos. 55

Figura 2.44 - Espectro de excitação fluorescente do sensor sintetizado (**16**) como uma função de soluções crescentes $[\text{K}^+]$ e decrescentes $[\text{Na}^+]$. A curva mais baixa foi obtida com 130 mM de NaCl, 10 mM de MOPS e KOH a pH 7.05. A curva mais alta foi adquirida com 130 mM de KCl, 10 mM de MOPS e KOH a pH 7,05. 56

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Raio (em Å) dos iões alcalinos e das cavidades dos éteres de coroa. ^[10]	6
Tabela 2.1 - Resultados da Análise de ICP para o PBF1 (3), em termos de teor em catiões de sódio e de potássio.....	42
Tabela 2.2 - Resultados da Análise de ICP para o PBF1 (3) após ter sido purificado por permuta catiónica, em termos de teor em catiões de potássio.	44
Tabela 2.3 - Resultados da esterificação do dextrano ou amino dextrano com Ácido Benzóico (28), Ácido Tereftálico (29), Ácido ftálico (30) e Ácido isoftálico (31), por activação do ácido carboxílico com CDI em DMSO (80 °C, 20 h).	47
Tabela 2.4 - Resultados da Análise de ICP para o PBF1/Dextrano (16), em termos de teor em catiões de potássio.....	56
Tabela 4.1 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios de optimização, efectuados na presença de CDI.	76

Palavras - Chave

Potássio

18-diazocoroa-6

Benzofuranoisofalato

PBFI

Dextrano

Fluorescência

Lista de Abreviaturas

^{13}C -RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do Carbono
^1H -RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Protão
2D	Duas dimensões ou bidimensional
1D	Uma dimensão
AES	Espectroscopia de Emissão Atômica
AGU	Unidade de Anidro Glucose
Bt	Benzotriazole
Bt-MS	<i>N</i> (1-metanosulfonyl)benzotriazole
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CDI	<i>N,N'</i> -carbonildiimidazole
CD_3OD	Metanol deuterado
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
D_2O	Óxido de deutério
DNP	2,4-dinitrofenilhidrazina
h	horas
HBT	1-hidroxibenzotriazole
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
ICP	Plasma indutivamente acoplado
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometer
MEG	Mono Etileno Glicol
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino) propanosulfônico
MS	Espectrometria de Massa
NaCl	Cloreto de sódio
NBS	<i>N</i> -bromossuccinamida
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
PBFI	<i>Potassium - binding benzofuran isophthalate</i>
Pd^0	Paládio zero
SBFI	<i>Sodium - binding benzofuran isophthalate</i>
$\text{S}_\text{N}2$	Substituição Nucleofílica de 2ª ordem
THF	Tetrahydrofurano

TLC	Cromatografia de camada fina
TMAH	Hidróxido de tetrametilamónio
UV / Vis	Ultravioleta / Visível

1. Introdução

Flutuações de concentrações intracelulares de catiões como o Ca^{2+} , K^+ e Na^+ têm um papel muito importante nas funções regulatórias de muitos processos biológicos. A avaliação do papel destes catiões requer a determinação quantitativa das concentrações dos catiões livres no citosol com elevada resolução espacial e temporal. Devido às suas propriedades inerentes, os indicadores iónicos fluorescentes são a ferramenta ideal para monitorizar as concentrações iónicas intracelulares e a sua variação. Esses indicadores consistem de um grupo quelante de metais ligado a um grupo fluorescente que sofre mudanças nas intensidades de fluorescência e / ou no comprimento de onda máximo do espectro quando ligado ao respectivo catião. ^[1]

Neste trabalho pretendeu-se sintetizar um indicador fluorescente com solubilidade e dimensão adequadas, específico para catiões de potássio e para ser usado, futuramente, no meio citosólico da planta *Nicotiana tabacum*.

1.1. *Nicotiana tabacum*

O sucesso da reprodução de plantas com flor depende da capacidade de levarem as células não – móveis do esperma a entrar em contacto com as células do óvulo que estão completamente embebidas dentro de múltiplas camadas de tecido dentro da flor. O veículo que permite a concretização desta função biológica é o pólen (que é produzido nas anteras da flor). ^[2]

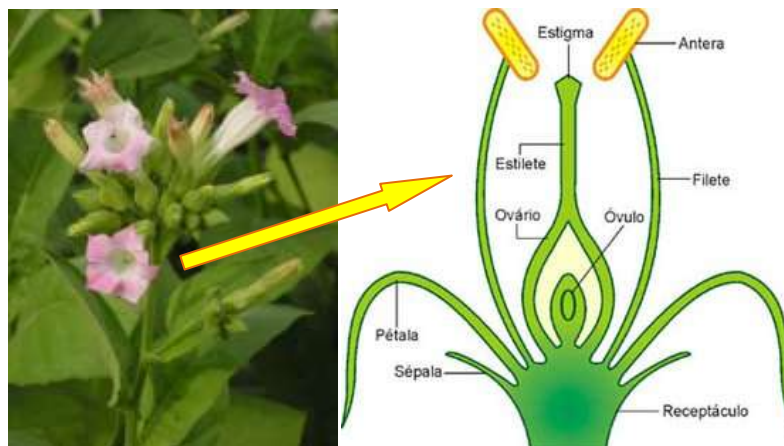


Figura 1.1 - Imagem representativa da flor *Nicotiana tabacum* e a respectiva ampliação dos órgãos reprodutores feminino e masculino.

O pólen maduro é desidratado e encontra-se metabolicamente quiescente (em repouso); depois de libertado da planta, tem de sobreviver num estado livre por um período de tempo indeterminado. Ao entrar em contacto com a superfície do estigma, as células do pólen são rapidamente hidratadas, tornando-se activas bioquimicamente e depois germinadas. ^[2]

As células germinativas do pólen secretam enzimas que rompem os tecidos e que possibilitam o crescimento do tubo polínico. Este não é mais do que o crescimento celular do grão de pólen em direcção ao óvulo possibilitando, assim, a fecundação. O tubo polínico penetra no estileto e, por fim, no saco embrionário (figura 1.2). A região apical do tubo polínico sofre um rápido, e letal, aumento de volume celular que faz a célula explodir. Essa explosão propulsiona as células a entrarem no saco embrionário e a fertilização começa.

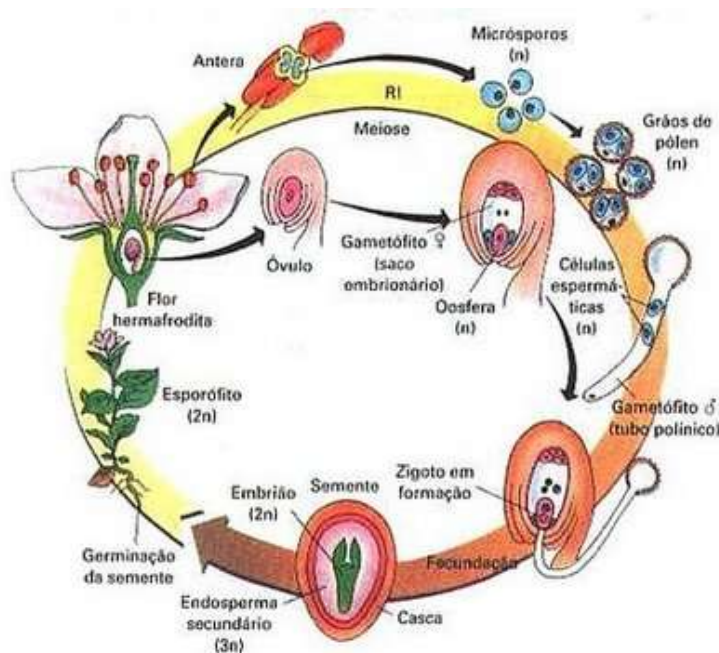


Figura 1.2 - Ciclo da Reprodução em Angiospermas.

O tubo polínico é um sistema emergente no qual a ordem é atingida rapidamente através de circuitos dinâmicos que permitem um óptimo crescimento e funções sobre condições extracelulares de variadas naturezas. Pensa-se que o crescimento oscilante envolvido na formação desse mesmo tubo está correlacionado com o influxo oscilante de Ca^{2+} , H^+ e K^+ . [2] A diferença de concentrações dos iões, dentro e fora da célula, cria um gradiente de concentrações que é utilizado para a entrada de nutrientes, transporte epitelial, regulação de outros iões intracelulares e transmissão de impulsos eléctricos. [3] Consequentemente, o estudo destas flutuações de concentrações iónicas tornou-se uma área de interesse na investigação celular, nomeadamente as flutuações correspondentes ao catião potássio.

O potássio é o catião mais abundante nas células das plantas e é um nutriente essencial tanto para o crescimento como para o desenvolvimento das plantas. [4] Por esse motivo, e por apresentar um papel muito importante tanto em processos bioquímicos como biofísicos, realizou-se a síntese de um agente para a determinação de diferenças de concentrações de K^+ no meio celular.

1.2. Iões Metálicos

Os iões metálicos desempenham um papel fundamental numa enorme diversidade de sistemas biológicos. As células utilizam iões metálicos para uma variedade de funções tais como regulação das actividades enzimáticas e sinalização celular. Consequentemente, a medição exacta das concentrações dos catiões nos compartimentos celulares e nos espaços extracelulares é essencial para os estudos biológicos moleculares e para diagnósticos clínicos. ^[5] Essas concentrações podem ser determinadas recorrendo a técnicas que se organizam em três categorias: 1) ensaios que determinam a concentração iónica total com destruição do tecido como, por exemplo, fotometria de chama, absorção atómica, activação de neutrões, entre outras. A natureza destrutiva destas técnicas é, obviamente, uma desvantagem. 2) Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) que, apesar de não serem destrutivas como a anterior, requerem grandes quantidades de tecido empacotado numa cavidade magnética de elevada densidade. 3) Técnicas baseadas em equilíbrios físico – químicos que medem as concentrações dos iões livres numa forma não destrutiva. Um exemplo para este grupo de técnicas corresponde aos indicadores fluorescentes, uma vez que proporcionam uma óptima resolução espacial e temporal, compatibilidade com células demasiado pequenas ou frágeis e aplicabilidade tanto em células isoladas como em populações inteiras. ^[3]

De entre os vários métodos de quantificação de iões, os baseados em fluorescência são os mais comuns pois beneficiam de uma elevada sensibilidade e conveniência em estudos dinâmicos, bem como da possibilidade de várias aplicações em técnicas de tomografia. ^[5]

1.3. Indicadores Fluorescentes

O reconhecimento e captura de iões e moléculas neutras estão no coração da química supramolecular. Nos últimos anos tem havido um grande interesse em desenvolver sensores fluorescentes e luminescentes e reagentes para catiões, aniões e moléculas neutras sob condições fisiológicas. Desenhar um receptor de iões tão selectivo pode ser um grande desafio do ponto de vista sintético. Para que o sensor seja eficiente tem que ter um sistema de reconhecimento reversível, selectivo e sensível às espécies a quantificar. ^[6]

Várias entidades estruturais foram sintetizadas para o reconhecimento selectivo de catiões e englobam-se nesta categoria os fluoroionóforos. Estes são constituídos por uma unidade que exhibe fluorescência e outra unidade que consiste de um ionóforo que tem a capacidade de capturar iões. Neste caso, como pretendemos capturar o catião potássio, o ionóforo adequado é o 18-diazocoroa-6. A parte fluorescente que se incluiu na estrutura foi uma unidade de benzofuranoisofalato, muito usada em sondas de potássio. ^[3]

1.3.1. Éteres de coroa

Em 1967, Charles J. Pederson sintetizou uma nova classe de compostos, chamados éteres de coroa, que na época causaram grande impacto científico e ainda hoje representam grande interesse tecnológico. Estes compostos são éteres macrocíclicos e têm a capacidade de se ligar a catiões, o que lhes dá a possibilidade de serem usados para várias finalidades. Por exemplo, do ponto de vista biológico, podem utilizar-se no estudo de processos naturais, mimetizando ionóforos e transportando catiões para o interior da célula através de membranas lipofílicas. ^[7]

Desde a sua descoberta por Pederson, os éteres de coroa (figura 1.3) provaram ser excelentes ferramentas na captura de iões alcalino e alcalino-terrosos. Os éteres de coroa são, na verdade, “bases duras” que complexam eficazmente “ácidos duros” como, por exemplo, metais iónicos dos grupos I e II. ^{[8][9]}

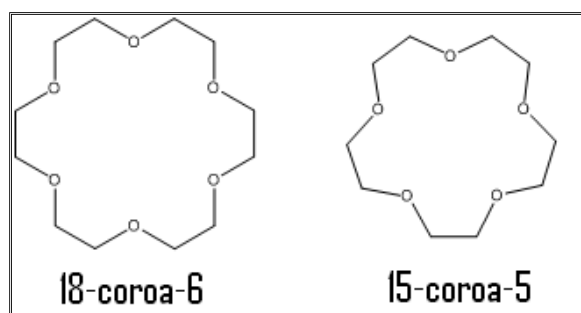


Figura 1.3 - Exemplo de dois éteres de coroa muito utilizados na captura de iões metálicos.

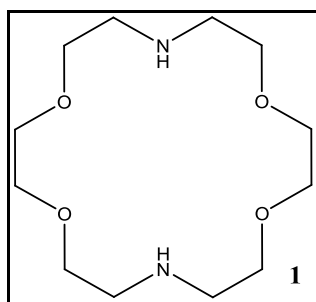
Os complexos que se formam, também designados de complexos de sal de poliéteres, são formados por interações ião – dipolo entre o catião e a carga negativa dos átomos de oxigênio que estão colocados simetricamente no anel poliéter. ^[7]

Estudos efectuados por Chien-Chung Liou e Jennifer S. Brodbelt ^[10] mostraram que o tamanho relativo do catião e da cavidade do éter de coroa são factores determinantes para a selectividade e formação de complexos ^[3]. Este estudo consistiu na determinação da ordem de afinidades relativas de iões metálicos alcalinos relativamente a éteres de coroa e análogos acíclicos usando o método cinético. Foi concluído que os éteres cíclicos têm maior afinidade para os metais do que os éteres acíclicos e os resultados mais importantes encontram-se registados na tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Raio (em Å) dos iões alcalinos e das cavidades dos éteres de coroa. ^[10]

Ião Alcalino	Raio (Å)	Éter de coroa	Raio (Å)
Li ⁺	0,76	12-coroa-4	0,6 – 0,75
Na ⁺	1,02	15-coroa-5	0,86 – 0,92
K ⁺	1,38	18-coroa-6	1,34 – 1,55
Rb ⁺	1,52	21-coroa-7	1,7 – 2,1

Através destes dados e também pelos estudos efectuados por Tsien e colaboradores ^[3] escolheu-se o composto 1,4,10,13-tetra-oxa-7,16-diazociclo-octadecano (ou 18-diazocoroa-6) (**1**) uma vez que o objectivo final do trabalho é capturar e quantificar o catião potássio e também porque este ionóforo possuiu dois azotos secundários. ^[1] Possibilitou, deste modo, a ligação de duas unidades de cromóforo nos átomos de azoto para se formar o indicador fluorescente pretendido.

**Figura 1.4** - Estrutura do 1,4,10,13-tetra-oxa-7,16-diazociclo-octadecano (**1**), ou 18-diazocoroa-6.

A incorporação de sub – unidades fluorescentes nos éteres de coroa, através de associações covalentes, originou uma nova geração de compostos. Verificou-se também que a extensão do cromóforo seria vantajosa na medida em que a intensidade da sua fluorescência iria ser superior e originar comprimentos de onda, de emissão e excitação, mais longos. ^[3] Estudos de reconhecimento catiónico usando éteres de coroa fluoroionóforos têm aumentado devido a estes exibirem grandes mudanças no seu comportamento fluorescente durante a interacção com analitos e também porque a espectrofluorometria é uma técnica muito sensível, selectiva e rápida com procedimentos muito simples de serem aplicados em misturas biológicas. ^[11]

1.3.2. PBFI / SBFI

Os fluoroionóforos mais utilizados na captura de catiões, e que se encontram disponíveis comercialmente, são o SBFI (*Sodium – binding benzofuran isophthalate*) (**2**) e o PBFI (*Potassium – binding benzofuran isophthalate*) (**3**).

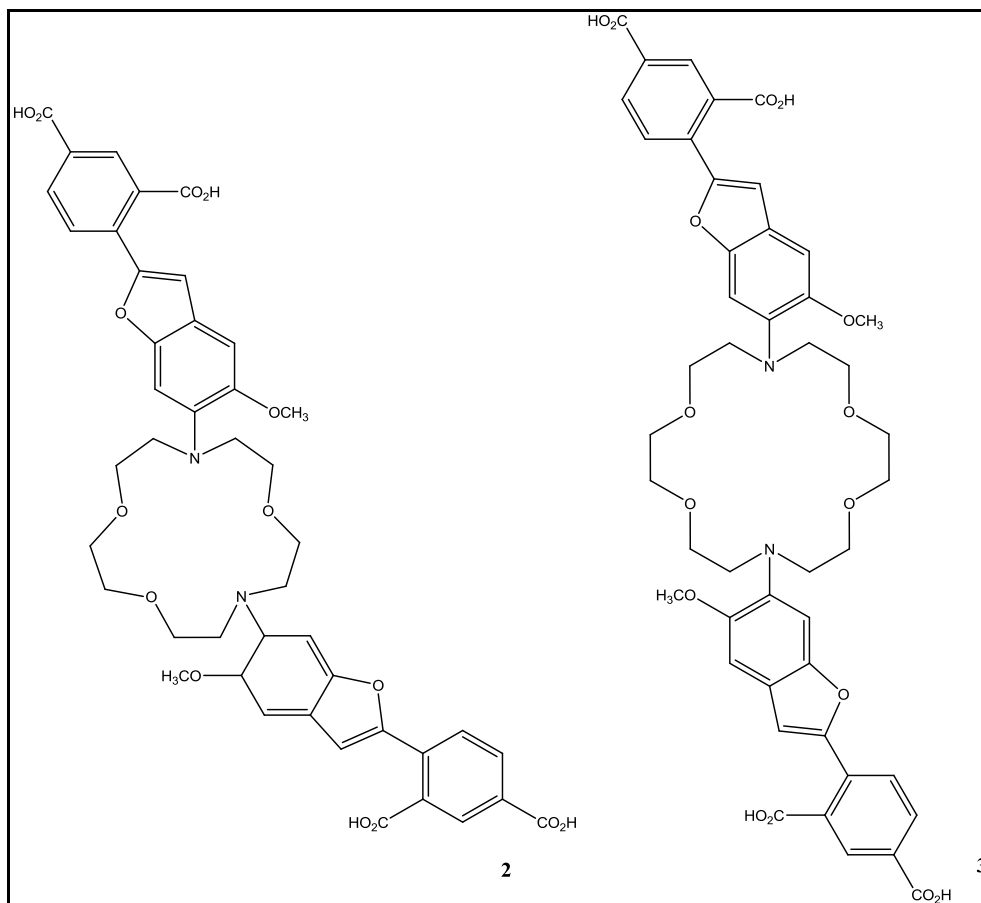


Figura 1.5 - Estruturas dos indicadores fluorescentes SBFI (**2**) e PBFI (**3**).

Como os seus próprios nomes indicam, o SBFI é específico para capturar iões de sódio enquanto o PBFI é específico para capturar iões de potássio. Apesar do fluoroionóforo PBFI ser apenas 1,5 vezes mais selectivo para K⁺ do que para Na⁺, esta é uma variação suficiente para definir a sua especificidade uma vez que existe, normalmente, 10 vezes mais K⁺ nas células do que Na⁺.^[12]

Os compostos **1** e **2** demonstraram potenciais aplicações nas áreas de medicina e análise bioquímica, biologia celular e controlo da poluição por metais pesados.^[9] Estes compostos podem ser usados como indicadores de metais iónicos, em particular sódio e potássio, permitindo não só detectar, discriminar e quantificar como também transportar iões através das membranas celulares. São muito úteis na quantificação de iões nos espaços extra-celulares, vesículas, tecido vascular de plantas e

animais, fluidos biológicos como sangue e urina, meios de cultura, amostras ambientais e em reactores químicos.^[13]

O sensor fluorescente sintetizado neste trabalho, teve como base o uso do fluoroionóforo de benzofurano de potássio (PBFI) (**3**), uma vez que é o potássio que se pretende quantificar.

1.3.3. Processo sintético do PBFI

O indicador fluorescente PBFI que se pretende sintetizar (**3**) é constituído por duas unidades estruturais: o ionóforo que complexa com o catião potássio (18-diazocoroa-6) (**1**) e duas unidades de benzofuranoisofalato que emitem fluorescência (figura 1.6).

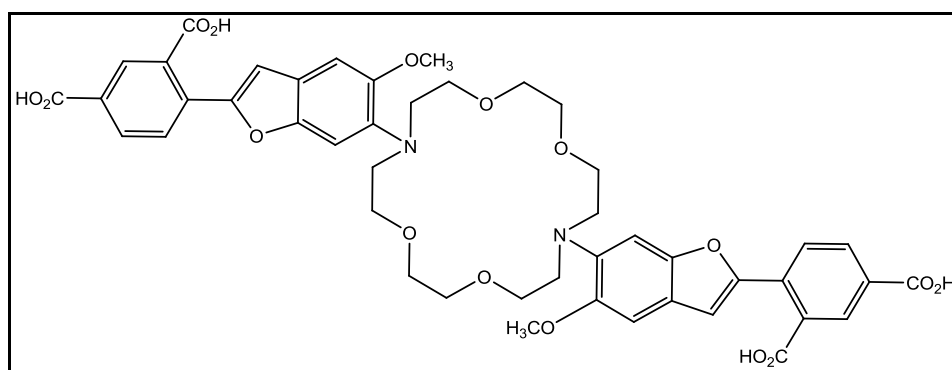


Figura 1.6 - Estrutura obtida do Fluoroionóforo de Benzofurano de Potássio: PBFI (**3**).

Como mencionado anteriormente, desenhar um receptor de iões tão selectivo e destas dimensões pode ser um grande desafio do ponto de vista sintético. Tem, de facto, alguns passos sintéticos muito sensíveis e que exigem procedimentos muito rigorosos, para além de serem processos que apresentam, na sua maioria, rendimentos baixos.

A via de síntese do PBFI é um procedimento convergente que consiste da condensação da unidade estrutural 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (**4**) a duas unidades de 4-metilbromo-isofalato de dimetilo (**5**), como se pode visualizar na figura 1.7. A preparação da unidade estrutural **4** foi descrita por Tsien e colaboradores^[3] e a síntese da unidade estrutural **5** foi baseada nos trabalhos de Anzalone^[14]. A condensação de ambas as estruturas foi efectuada também por Tsien e colaboradores^[3].

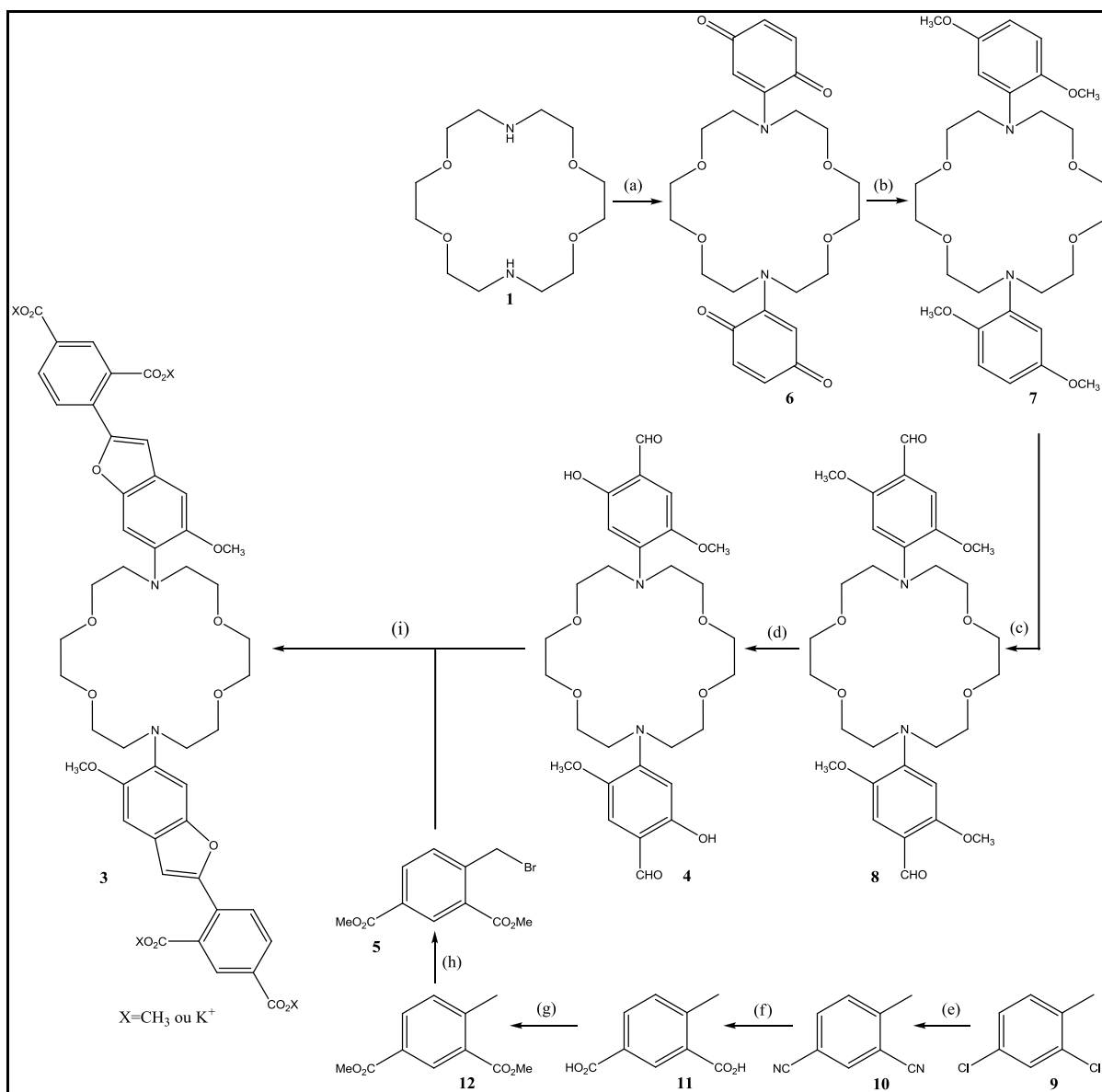


Figura 1.7 - Via de síntese do PBF1 (**3**) a partir do 18-diazocoroa-6 (**1**), em que (a) Adição nucleofílica a C=C-C=O; (b) Hidrogenação Catalítica seguida de Metilação com sulfato de dimetilo; (c) Formilação de Vilsmeier; (d) Desmetilação regiosselectiva; (e) Substituição Nucleofílica do tipo SN2; (f) – Hidrólise Básica; (g) – Esterificação; (h) – Bromação Radicalar e (i) Condensação de **4** e **5** seguida de ciclização.

No entanto, este indicador apresentou algumas limitações quando utilizado para quantificar o K^+ citosólico da flor *Nicotiana tabacum*, uma vez que fica retido nos compartimentos da mesma. Deste modo, propôs-se a síntese de um novo Indicador fluorescente de maiores dimensões e solúvel em água, mas que mantivesse as mesmas propriedades e funcionalidades de sonda fluorescente. A proposta estudada consistiu em adicionar um polissacárido ao PBF1 (**3**).

1.4. Dextrano

Os polissacáridos são macromoléculas que possuem uma grande diversidade estrutural e apresentam versatilidade funcional. ^[15] Um exemplo é o Dextrano, polissacárido hidrofílico sintetizado pela bactéria dos géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, todas pertencentes à família *Lactobacillacea*. O Dextrano ganhou grande importância depois da introdução de frações de dextrano como substitutas do plasma sanguíneo em 1940. A sua compatibilidade biológica e degradação em animais e tecidos humanos permitiram ao dextrano e seus derivados serem utilizados em Medicina. ^[16]

O Dextrano (**13**) pertence à família de polissacáridos de elevado peso molecular, neutros, solúveis em água e de baixa toxicidade (figura 1.8). ^[16] ^[17] É formado, maioritariamente, a partir da Sacarose durante o crescimento de bactérias pertencentes à espécie *Leuconostoc mesenteroides*. Consiste de unidades de D – Glucose ligadas, predominantemente, por ligações glicosídicas α – (1→6) e ramificações em diferentes posições. Essas posições resultam de ligações glicosídicas α – (1→2), α – (1→3) e α – (1→4) em percentagens que variam de 3 a 50%, consoante a origem do dextrano. ^[16]

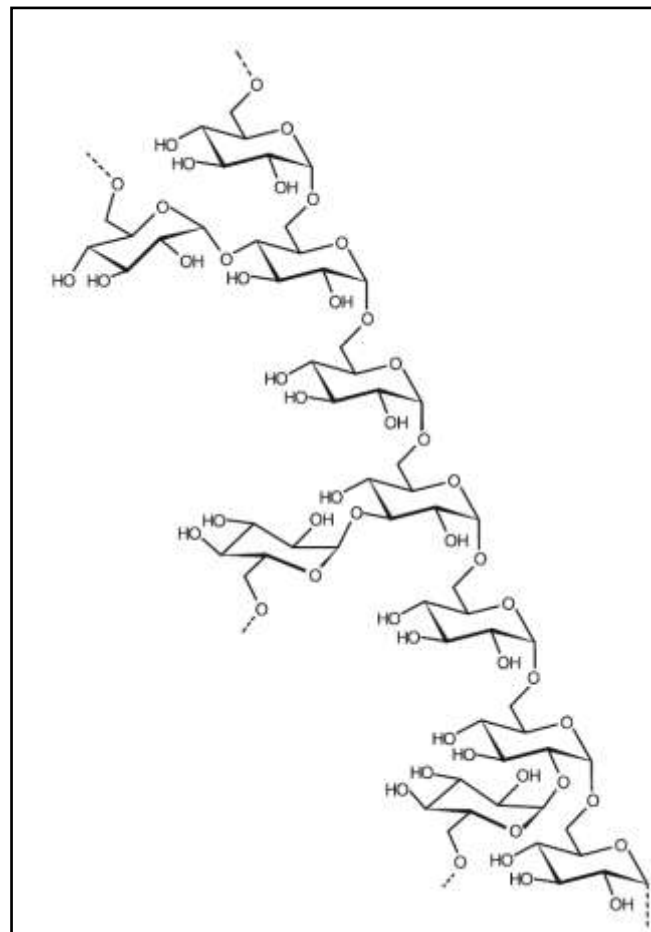


Figura 1.8 - Parte da estrutura do Dextrano (**13**): esquema de algumas ligações glicosídicas α – (1→6) da cadeia principal e respectivas ramificações nas posições - 2, - 3 e - 4 dos anéis de glucose. ^[15]

O facto de o dextrano possuir ligações glicosídicas $\alpha - (1 \rightarrow 6)$, bastante resistentes à clivagem por parte de glicosidades celulares endógenas, confere-lhe uma vasta lista de propriedades que o fazem ser um excelente candidato na preparação de agentes bioactivos de ésteres de dextrano.^[18] A esterificação do dextrano tornou-se uma ferramenta muito valiosa para introduzir várias funcionalidades no polímero.^[16] Efectuaram-se vários estudos no dextrano com a introdução de cadeias alifáticas ácidas de tamanho reduzido, resultando em produtos de elevado grau de substituição (Heinze e colaboradores^{[16][19]}). Estes produtos foram obtidos através da activação *in situ* dos grupos hidroxilo dos ácidos carboxílicos com *N,N'*-carbonildiimidazole (CDI); os derivados apresentam uma estrutura bem definida e propriedades muito próprias.^[16] Uma vez que os ésteres de dextrano apresentam limitações de solubilidade na maioria dos solventes, Heinze fez ainda reacções de perpropionilação dos derivados obtidos. Esta reacção teve como principal objectivo, eliminar possíveis interacções intra- e intermoleculares das cadeias do polímero por ligações de hidrogénio, e sobreposição de sinais de protão por parte das unidades de anidrogucose (AGU) e grupos hidroxilo. Assim, foi possível determinar as estruturas exactas dos ésteres de dextrano obtidos, através de cálculos de graus de substituição e posterior análise elementar por espectroscopia de ¹H-RMN e de Ultravioleta / Visível (UV / Vis).^[19] Heinze descobriu ainda que, tanto os ésteres de dextrano como os respectivos produtos perpropionilados poderiam formar nano - esferas dependendo do solvente orgânico a utilizar. Dependendo do éster de dextrano utilizado, o tamanho das nanopartículas formadas variou de 90 a 200 nm.^[19] Estas propriedades fazem do dextrano um excelente transportador, solúvel em água, de corantes, indicadores e grupos reactivos com uma larga variedade de aplicações.^[17]

Neste trabalho, fez-se a esterificação do dextrano com uma unidade ácida de elevada massa molecular. O Dextrano (**13**) utilizado foi produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* de peso molecular 9,000-11,000 Da e ligou-se a este polímero o indicador fluorescente PBF1 (**3**).

A abordagem adoptada inicialmente para esta esterificação foi baseada nos estudos de Heinze e colaboradores, mencionado anteriormente. Utilizou-se CDI como agente activante de modo a permitir que a ligação do dextrano ao PBF1 ocorresse com sucesso. Este procedimento exigiu ensaios preliminares com espécies ácidas mais pequenas e usaram-se dois polímeros diferentes para o efeito: o dextrano 9,000-11,000 (**13**) e o amino dextrano 10,000 (**17**). No entanto, os resultados obtidos não foram os desejados, como pode ser confirmado na descrição detalhada feita na discussão dos mesmos.

Propôs-se então uma nova abordagem para a formação do sensor. Essa abordagem seguiu duas etapas: a activação do carboxilato do PBF1 (**3**) através da formação do seu derivado de benzotriazole (**15**) seguido da condensação com dextrano (**13**) na presença de hidreto de sódio. Para isso, recorreu-se aos estudos publicados por Katritzky^[20] sobre a preparação de derivados *N*-acilbenzotriazole de ácidos carboxílicos. Estes reagentes são muito importantes para uma variedade de reacções, nomeadamente, na *O*-acilação em adições de aldeídos para formar ésteres. O uso destes reagentes

evitam a racemização, asseguram regioespecificidade e, em geral, originam produtos com rendimentos elevados. São ótimos grupos de saída e compostos muito estáveis, podendo ser armazenados à temperatura ambiente sem se decomporem. ^[20] A partir deste estudo, escolheu-se o reagente *N*(1-metanosulfonyl)benzotriazole (Bt-MS) (**14**) para formar o derivado de benzotriazole PBFI di(benzo[1,2,3]triazole) (**15**):

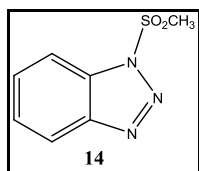


Figura 1.9 - Estrutura molecular do *N*(1-metanosulfonyl)benzotriazole, ou Bt-MS (**14**).

O processo de síntese do Sensor Fluorescente de Potássio, ou PBFI / Dextrano (**16**), encontra-se esquematizado na figura seguinte:

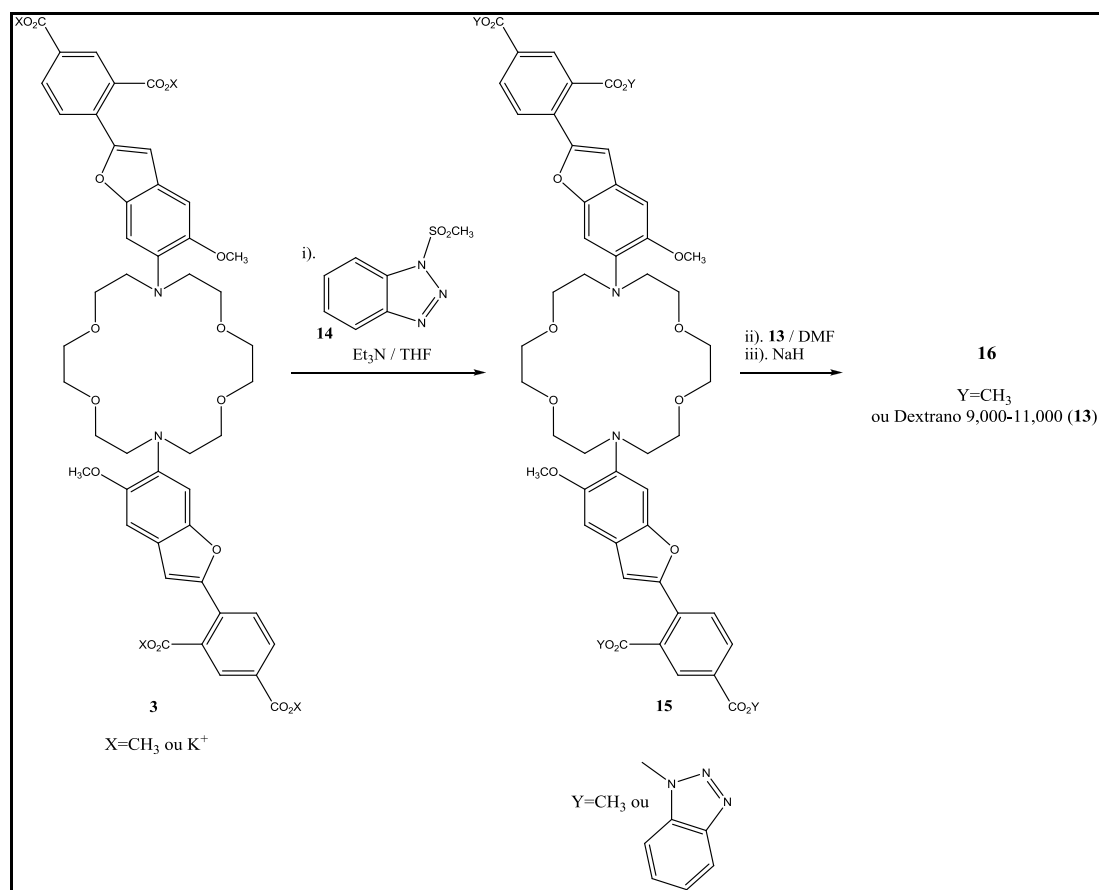


Figura 1.10 - Via de Síntese do Sensor Fluorescente PBFI / Dextrano (**16**) a partir do PBFI (**3**), através da (i) formação de um intermediário de benzotriazole (**15**) e posterior (ii) condensação do dextrano (**13**) na presença de (iii) NaH.

2. Discussão de Resultados

Para avaliar o papel do catião potássio livre no meio citosólico da planta pertencente à espécie *Nicotiana tabacum*, propôs-se a síntese de um sensor fluorescente diferente dos já publicados ao longo destes últimos anos. Este sensor é composto por duas unidades estruturais diferentes: um indicador fluorescente conhecido e que foi sintetizado de novo e um polímero de elevada massa molecular. O indicador fluorescente escolhido foi o Fluoroionóforo de Benzofurano de Potássio (PBFI) (**3**): como pretendemos capturar o catião potássio, o ionóforo adequado é o 18-diazocoroa-6 (**1**) e a parte fluorescente que se incluiu na estrutura foi uma unidade de benzofuranoisofalato, muito usada em sondas de potássio. O polímero considerado foi o Dextrano 9,000 – 11,000 Da (**13**).

A sonda PBFI, por si só, demonstrou algumas limitações, devido ao seu tamanho reduzido. Isto é, como os catiões de potássio se vão acumulando, em concentrações relativamente abundantes, nos vacúolos e em compartimentos citosólicos da planta, a estrutura PBFI fica lá retida. Para contornar este problema e garantir uma óptima especificidade para os organelos em estudo (em ensaios biológicos *in vivo*), foi delineada uma estratégia de síntese para impedir que essa mesma sonda fluorescente ficasse retida nos compartimentos mencionados. Assim, propôs-se condensar a estrutura PBFI (**3**) com uma unidade de dextrano (**13**).

A construção do Sensor Fluorescente de Potássio, ou PBFI/Dextrano (**16**), foi possível através de um processo de duas etapas: preparação do fluoroionóforo de benzofurano de potássio (**3**), através da condensação do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (**4**) a duas unidades de 4-metilbromo-isofalato de dimetilo (**5**), e a sua posterior condensação, através do seu grupo funcional carboxilato, à unidade de dextrano (**13**).

2.1. Preparação do Fluoroionóforo de Benzofurano de Potássio: PBFI (**3**)

A síntese do PBFI (**3**) é um procedimento convergente que consistiu na condensação da unidade estrutural 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (**4**) a duas unidades estruturais de 4-metilbromo-isofalato de dimetilo (**5**), através de um processo de dois passos reaccionais tratados com carbonato de potássio (figura 2.1). O composto final (**3**) foi obtido como uma mistura de sais de carboxilatos de potássio e ésteres metílicos, com uma média de duas unidades de potássio por molécula. Estes resultados foram observados através da análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e da análise por Plasma Indutivamente Acoplado com a Espectroscopia de Emissão Atómica (ICP-AES). Por fim, analisou-se a fluorescência do Indicador através da espectroscopia de Ultravioleta/Visível (UV/Vis) para se obter informação sobre a absorção e emissão da amostra.

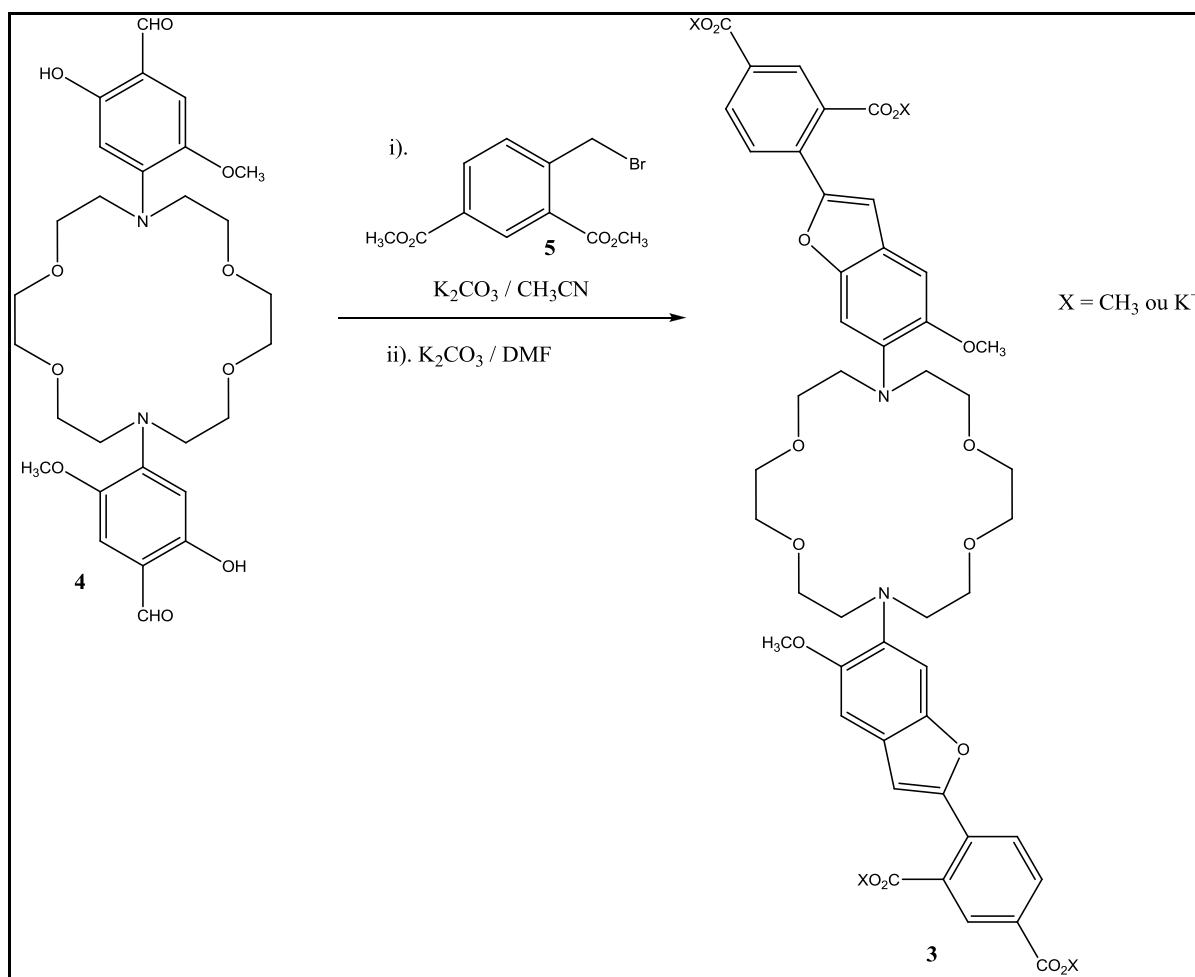


Figura 2.1 - Esquema reaccional correspondente à preparação do Indicador Fluorescente PBF1 (**3**) pela síntese convergente de duas unidades estruturais: **4** e **5**. Em (i) dá-se a condensação de **4** a duas unidades de **5** e em (ii) a formação do cromóforo, isto é, do benzofurano, para obter **3**.

As duas unidades estruturais (**4** e **5**) foram preparadas por uma metodologia conhecida da literatura. A preparação do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (**4**) foi baseada em estudos publicados por Tsien e colaboradores^[3] e a síntese do 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (**5**) foi realizada de acordo com os trabalhos de Anzalone^[14]. A condensação de ambas as unidades foi efectuada também de acordo com os estudos publicados por Tsien e colaboradores^[3].

Todos os intermediários e produtos finais formados foram identificados por técnicas espectroscópicas de diferentes naturezas. Só depois de confirmada a estrutura de cada composto, como sendo a pretendida, é que se prosseguia para a etapa seguinte de síntese. Os espectros obtidos estão ilustrados nos Anexos (capítulo 6), excepto os que são mencionados durante a discussão deste capítulo.

2.1.1. Preparação da unidade 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4)

A unidade 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4) foi sintetizada por um processo composto por cinco passos reaccionais e que estão esquematizados na figura seguinte:

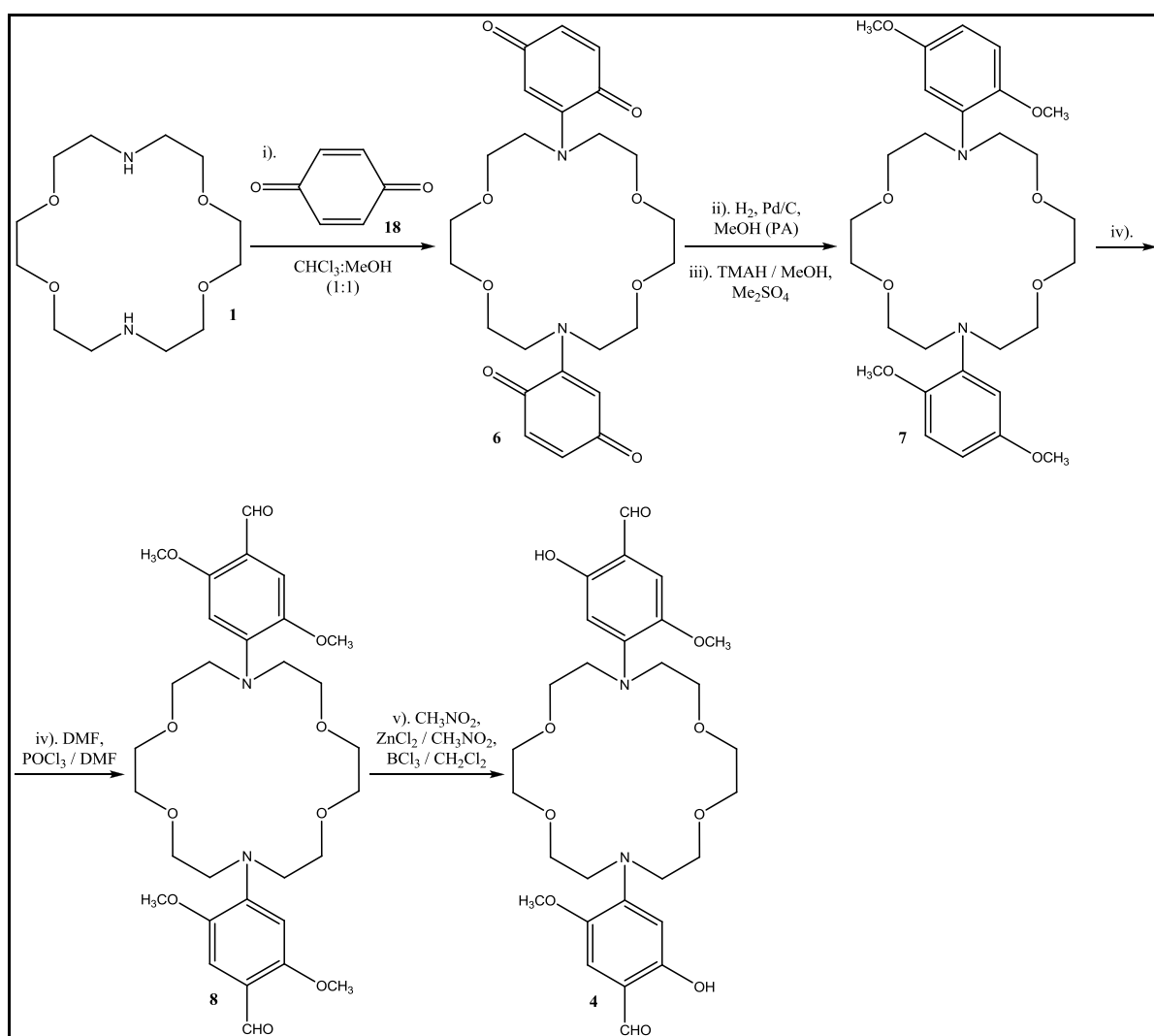


Figura 2.2 - Passos reaccionais envolvidos na preparação da unidade 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4), onde: (i) Adição nucleofílica a $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$, (ii) Hidrogenação Catalítica, (iii) Metilação com sulfato de dimetilo, (iv) Formilação de Vilsmeier e (v) Desmetilação regioselectiva.

2.1.1.1. Preparação do intermediário 2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6)

O composto **6** foi preparado através de uma reacção de Adição Nucleofílica a C=C-C=O (adição de Michael) do 1,4,10,13-tetra-oxa-7,6-diazaciclo-octadecano (**1**) com *p*-benzoquinona (**18**) em excesso, numa mistura de clorofórmio e metanol. O éter de coroa, derivado de uma amina, adiciona preferencialmente ao carbono β do composto α,β-insaturado. A reacção foi controlada por cromatografia de camada fina (TLC) (usando CH₃Cl:MeOH 10% como eluente) e assim que se observou o consumo total de material de partida (**5**) deu-se por terminada a reacção. Para além do produto pretendido observou-se a formação de um produto secundário, o 1,4-di-hidroxibenzeno (**19**). O mecanismo desta reacção pode ser visualizado na figura 2.3.

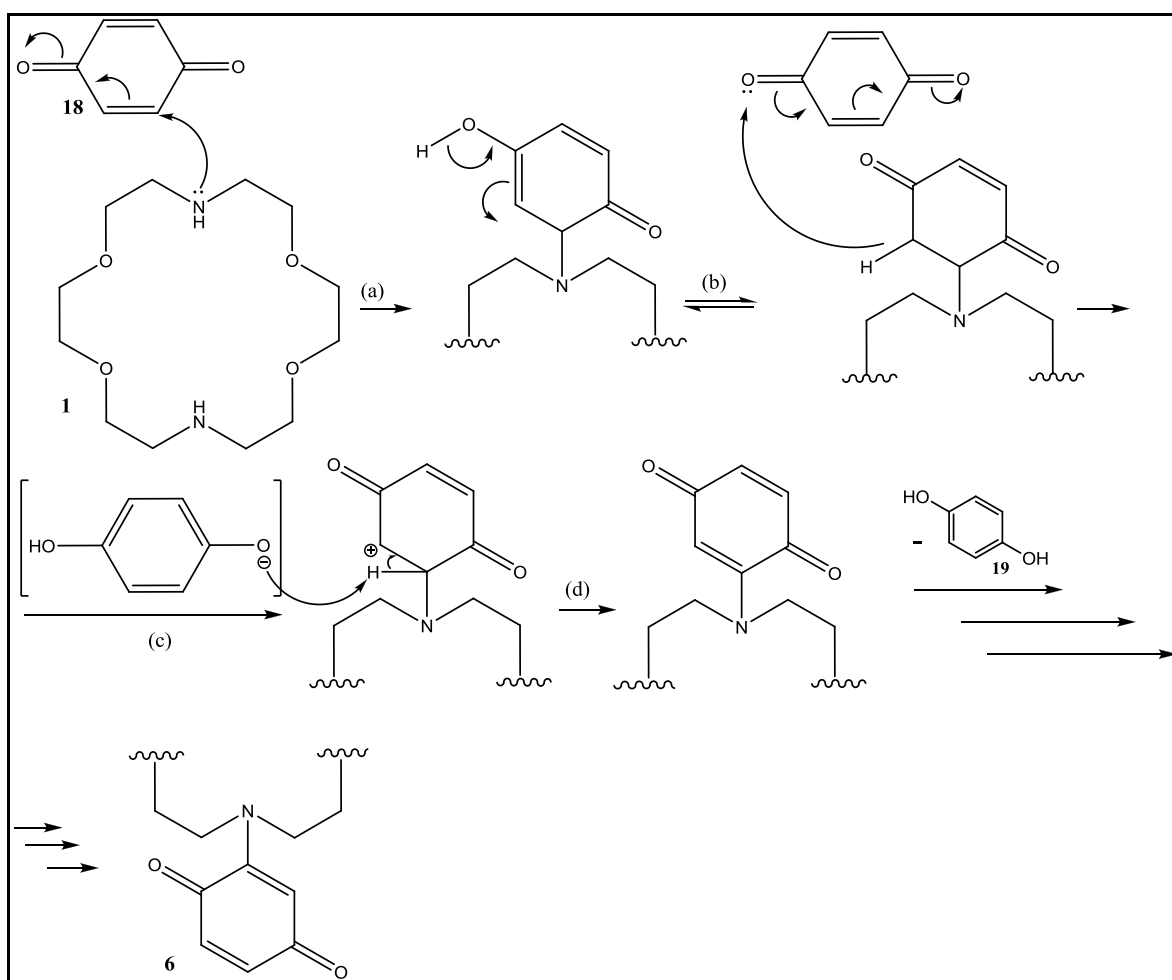


Figura 2.3 - Mecanismo reaccional da adição nucleofílica a C=C-C=O de 1,4,14,13-tetra-oxa-7,16-diazociclo-octadecano (**1**) à *p*-benzoquinona (**18**), numa mistura (1:1) de CHCl₃:MeOH.

A purificação da mistura, por cromatografia em coluna, permitiu o isolamento de **6** com um rendimento final de 89%. Comparando com os resultados obtidos na literatura ($\eta=70\%$),^[3] este foi um resultado bastante satisfatório.

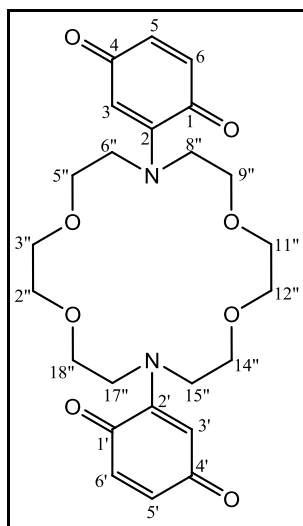


Figura 2.4 - Estrutura do 2,2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-diil)diclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (**6**).

A caracterização do intermediário **6** foi efectuada recorrendo a análises espectroscópicas de próton ($^1\text{H-RMN}$) e carbono ($^{13}\text{C-RMN}$) e que só foram possíveis com o auxílio das técnicas bidimensionais: *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence* (HMQC) e *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC).

Observando o espectro de $^1\text{H-RMN}$ (figura 6.1), pode-se dividi-lo em duas zonas distintas. A campo alto (δ 3,61-3,73 ppm) a zona correspondente aos hidrogénios ligados a átomos de carbono secundários (que são os átomos do éter de coroa), e a campo baixo (δ 5,65-6,60 ppm) a zona correspondente aos hidrogénios ligados a carbonos do anel da benzoquinona. Este efeito é causado pela presença de grupos aceptores de electrões no anel de benzoquinona ($\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{C}$) que, por efeito indutivo, desviam os sinais para campo mais baixo. Posto isto, a campo alto foram identificados dois sinais característicos de hidrogénios ligados a carbonos secundários e, tendo em conta os integrais calculados para cada um deles, verifica-se que um dos sinais tem o dobro da área do outro. Contabilizando os hidrogénios, são oito os que estão adjacentes ao átomo de azoto (δ 3,61 ppm) e dezasseis os que estão adjacentes ao átomo de oxigénio (δ 3,74 ppm). Uma vez que o composto **6** apresenta um eixo de simetria, os sinais correspondentes aos prótons da benzoquinona integram para dois. Observaram-se três sinais: um duplo de dupletos, um duplete e um singuleto. O singuleto, com desvio químico de δ 5,65 ppm, corresponde ao próton H-3 (e H-3') do anel pois é o único que não tem prótons vizinhos. Os desvios químicos de δ 6,49 ppm e δ 6,59 ppm foram atribuídos por observação da multiplicidade do sinal e por análise do espectro de HMBC (figura 2.5). Analisando o espectro de

HMBC, verifica-se que o próton correspondente ao desvio químico de δ 6,59 ppm apresenta duas correlações a três ligações: uma com o carbono C-3 (atribuído através da análise da amostra por HMQC, figura 6.3) e outra com o carbono do grupo carbonilo (com um desvio químico de δ 185,41 ppm); o próton correspondente ao desvio químico de δ 6,49 ppm também apresenta duas correlações a três ligações: uma ao carbono C-2 (também atribuído através da análise por HMQC) e outra com o carbono do grupo carbonilo. Olhando para a estrutura do intermediário **6**, verifica-se que o próton H-5 apresenta correlações do tipo J^3 com os carbonos C-3 e C-1 e que o próton H-6 apresenta correlações do tipo J^3 com os carbonos C-2 e C-4. Assim, o próton H-5 corresponde ao desvio químico de δ 6,59 ppm (duplo de dupletos, uma vez que acopla tanto com o próton H-6, como com o próton H-3) e o próton H-6 correspondente ao desvio químico de δ 6,49 ppm (duplete).

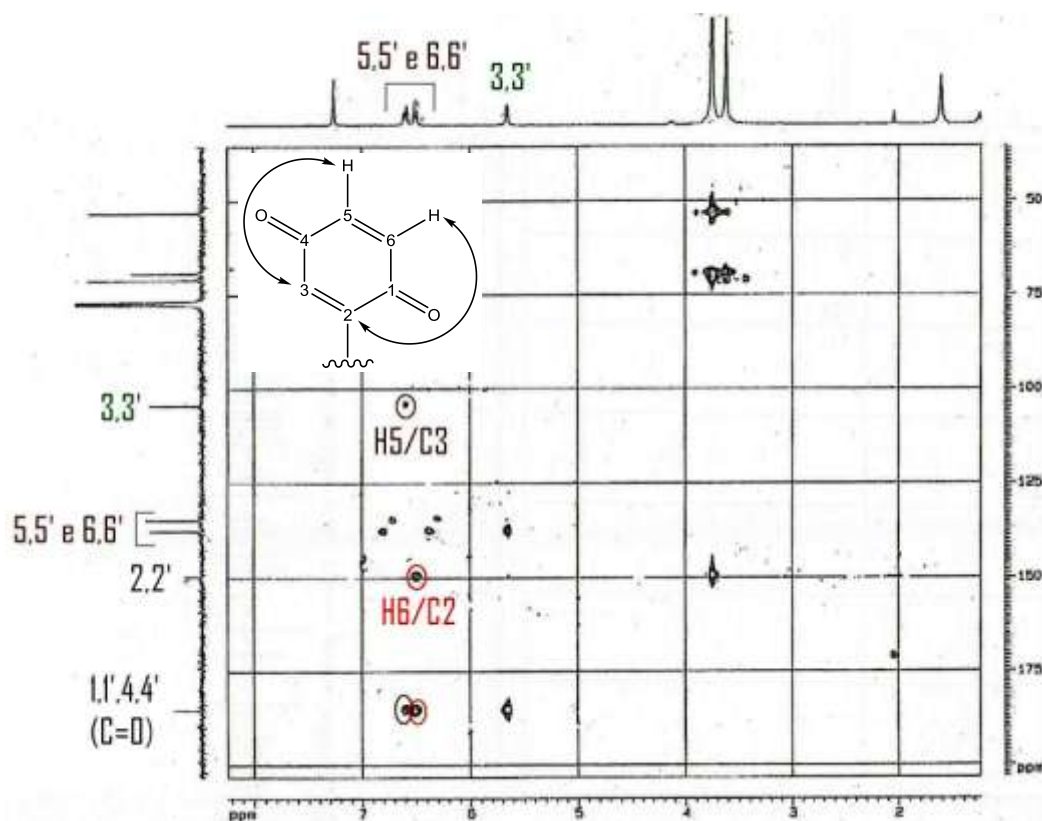


Figura 2.5 - Correlações a duas e três ligações (J^3) (HMBC) obtidas para 2,2'-(1'',4'',10'',13''-tetraoxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (**6**), em $CDCl_3$ (400 MHz).

Através do espectro de HMQC obtido (figura 6.3), atribuíram-se todos os carbonos da molécula: a δ 185,41 ppm observam-se os carbonos do grupo carbonilo, a δ 149,46 ppm o carbono que liga a benzoquinona ao éter de coroa (C-2 e C-2'), a δ 137,52 e δ 134,62 ppm os carbonos C-5 (e C-5') e C-6 (e C-6'), respectivamente, e a δ 104,25 ppm o carbono C-3 (e C-3'). A campo alto, entre δ 53,09 e δ 70,74 ppm estão representados os carbonos correspondentes ao éter de coroa.

Feita a devida caracterização do intermediário **6**, prosseguiu-se com a síntese na formação do intermediário **7**.

2.1.1.2. Preparação do intermediário 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (**7**)

A preparação do 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (**7**) deu-se em duas etapas: redução da bis-quinona (**6**) a um diol (**20**) por hidrogenação catalítica (figura 2.6) e posterior metilação, na presença de sulfato de dimetilo e Hidróxido de Tetrametilamónio (TMAH) penta - hidratado (figura 2.7). Tanto a redução como a metilação ocorreram no mesmo balão reaccional, sem interrupção, uma vez que este procedimento experimental exige um sistema que esteja sempre sob pressão positiva de hidrogénio. Várias condições experimentais foram optimizadas durante o procedimento, uma vez que ambas as etapas demonstraram ser demasiado sensíveis a um conjunto de factores: temperatura da reacção, quantidades molares de reagentes e respectivos tempos de injeção.

Na Hidrogenação Catalítica foi importante manter o sistema sob atmosfera de hidrogénio para assegurar a irreversibilidade da reacção. Usou-se o paládio (Pd^0) como catalisador e usou-se metanol como solvente. A redução de **6** a **20** foi controlada e observada apenas por TLC, onde se verificou o desaparecimento da bis-quinona e a formação do diol.

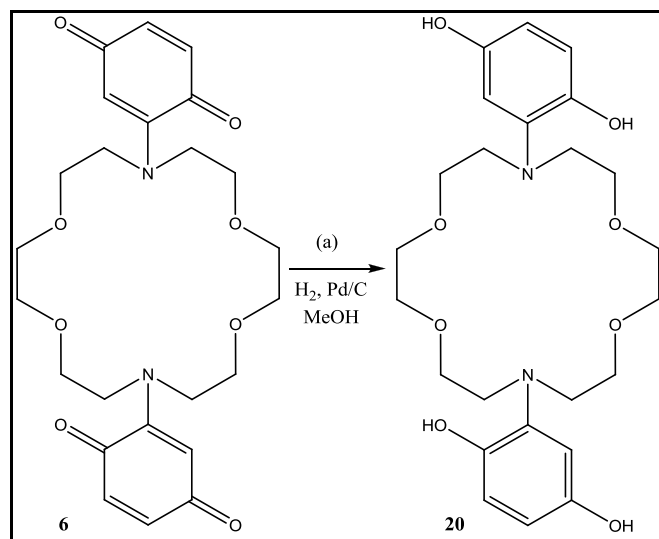


Figura 2.6 - Esquema reaccional da redução do 2,2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (**6**) a 2,2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)dibenzeno-1,4-diol (**20**), por Hidrogenação Catalítica.

Depois de se ter formado o intermediário **20**, procedeu-se à sua metilação com sulfato de dimetilo na presença de TMAH para se formar **7**. Os processos de redução / metilação foram levados a

cabo de forma extremamente meticulosa e rigorosa e consistiram de uma série de injecções alternadas de base (TMAH) e agente metilante (sulfato de dimetilo) à temperatura ambiente, para evitar que ambos reagissem entre si. Como ilustrado na figura 2.7 a base remove o protão fenólico e, de seguida, o ião fenolato ataca o sulfato de dimetilo dando-se a primeira metilação. Foi muito importante adicionar a mesma quantidade molar de base e de agente metilante, num total de dez injecções, bem como cronometrar os intervalos de tempo das injecções entre reagentes e entre cada metilação. Este sistema garantiu a remoção do protão fenólico e uma metilação eficientes, dando origem a alguns produtos secundários. Apesar da eficácia deste método, os rendimentos finais demonstraram alguma inconsistência. Após vários ensaios e por observação directa de TLC verificou-se que os produtos formados eram sempre os mesmos, mas em proporções diferentes. Chegou-se à conclusão que a temperatura do ambiente onde a reacção se dá influencia bastante o progresso da mesma. Locais onde a temperatura ambiente não é controlada obrigam o operador a ter mais cuidado com esse factor no decorrer da reacção. Ou seja, a temperaturas mais baixas (mais próximas da temperatura ambiente *standard*) dá-se, maioritariamente, a formação do composto **7** ($\eta=53\%$). Quando essa temperatura aumenta, a formação dos produtos secundários sobrepõe-se à formação de **7** ($10\% < \eta < 20\%$). Tendo este factor em conta, o rendimento final da reacção permaneceu praticamente sempre nos 50%, um valor muito aproximado ao valor referenciado na literatura. ^[3]

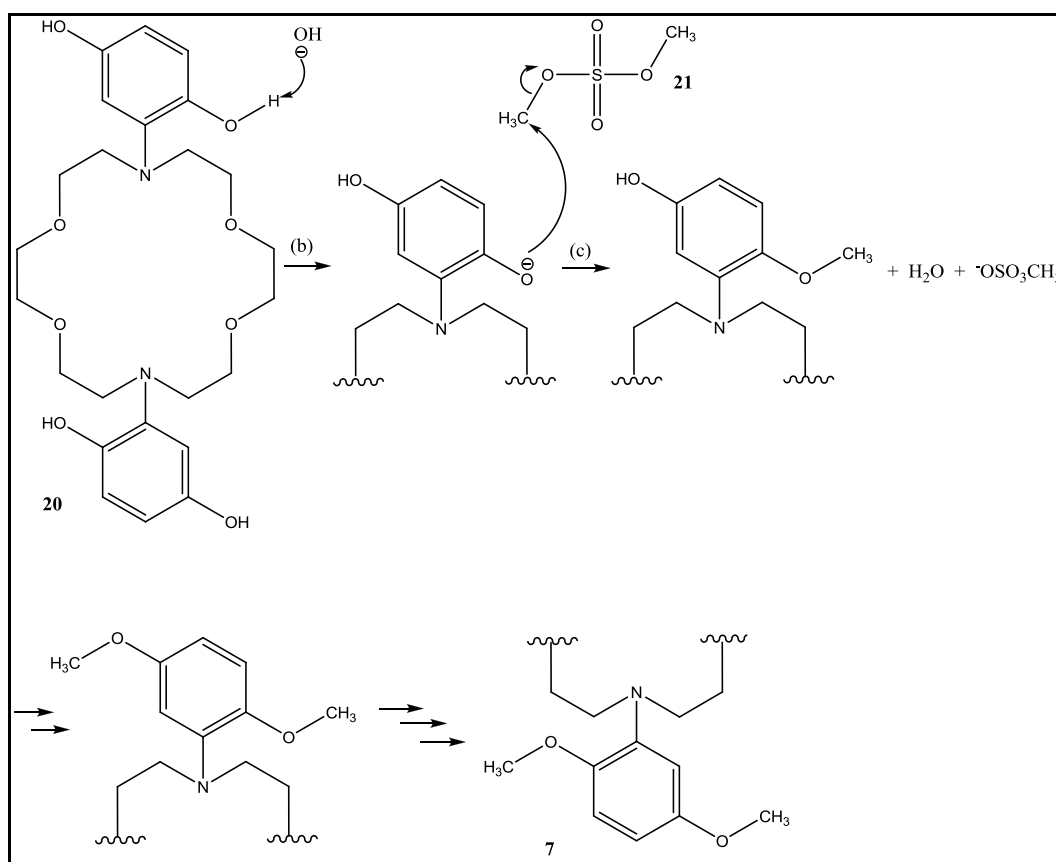


Figura 2.7 - Mecanismo Reaccional da Metilação do difenol (**20**) com sulfato de dimetilo (**21**), em meio básico (hidróxido de tetrametilamónio penta - hidratado em MeOH).

O composto **7** foi purificado da restante mistura reaccional através de cromatografia em coluna de fase reversa (RP-18). Este tipo de purificação permitiu retirar todos os sais em excesso que ficaram na solução (derivados do TMAH) com água, e depois procedeu-se à separação dos vários compostos formados com metanol. Ainda assim, o composto final não se apresentava completamente puro, apresentado quantidades vestigiais de um produto secundário que se tentou eliminar usando diferentes gradientes do eluente H₂O:MeOH, mas sempre sem sucesso.

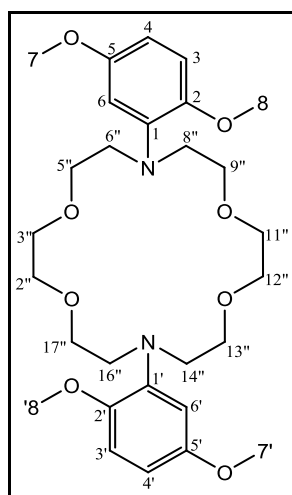


Figura 2.8 - Estrutura do 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (**7**).

A análise de **7** foi feita a partir de espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN e bidimensionais. No entanto, devido à contaminação da amostra, não foi possível fazer uma atribuição exacta de todos os sinais de **7**, devido à grande complexidade dos espectros. Com base nos integrais do espectro de ¹H-RMN, o produto secundário será o composto cuja metilação ocorreu no átomo de azoto do éter de coroa. No mesmo espectro (figura 6.4) há, a campo baixo, dois sinais pertencentes a compostos diferentes: a δ 7,03-7,36 ppm e a δ 6,51-6,75 ppm. Ambos integram para três prótons, sendo que este último corresponde à estrutura de **7** devido à multiplicidade representada. O singuleto a δ 6,61 ppm corresponde ao próton H-6 (e H-6') pois não tem correlações com mais nenhum próton da molécula; os outros dois dupletos, apresentam uma constante de acoplamento muito semelhante, significando que são prótons vizinhos, mas apresentam uma ligeira diferença na forma e intensidade do sinal. Observando a figura 2.8, verifica-se que o próton H-4 (e H-4') sente o próton H-3 (e H-3') mas também o próton H-6 (e H-6') e, como tal, terá uma constante de acoplamento ligeiramente ($J_{H_4}=8,4$ Hz) mais pequena quando comparada com a constante de acoplamento do próton H-3 (e H-3') ($J_{H_3}=8,72$ Hz). Assim, o duplete com desvio químico de δ 6,74 ppm corresponde ao próton H-3 e o duplete com desvio químico de δ 6,52 ppm corresponde ao próton H-4. A campo mais alto foram obtidos um conjunto de sinais entre δ 3,66 e δ 4,04 ppm que, por comparação com o espectro do

intermediário **6** correspondem aos prótons do éter de coroa (24H). Estão também aqui incluídos os prótons correspondentes aos grupos metoxilo (12H) uma vez que foram os resultados observados na literatura [3]. A partir desta atribuição conseguiram identificar-se, através da análise bidimensional HMQC (figura 6.6), os carbonos C-3, C-6 e C-4 com os respectivos desvios químicos a δ 112,34 ppm, δ 111,34 ppm e δ 107,12 ppm. Por comparação do espectro de carbono da estrutura **7** (figura 6.5) e o espectro de carbono da bis-quinona **6** (figura 6.2) atribuíram-se os restantes carbonos da molécula. Esta atribuição, como mencionei anteriormente, não foi rigorosa tendo servido apenas para confirmar a presença do composto **7** e poder prosseguir-se com o estudo. Para uma análise mais rigorosa, seria necessário ter o composto na sua forma pura e fazer, de novo, uma análise espectroscópica detalhada com o auxílio dos espectros de RMN.

2.1.1.3. Preparação do intermediário 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (**8**)

Para preparar o intermediário 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) **8**, utilizou-se o método de formilação de Vilsmeier - Haak, ilustrado pelo mecanismo que se segue:

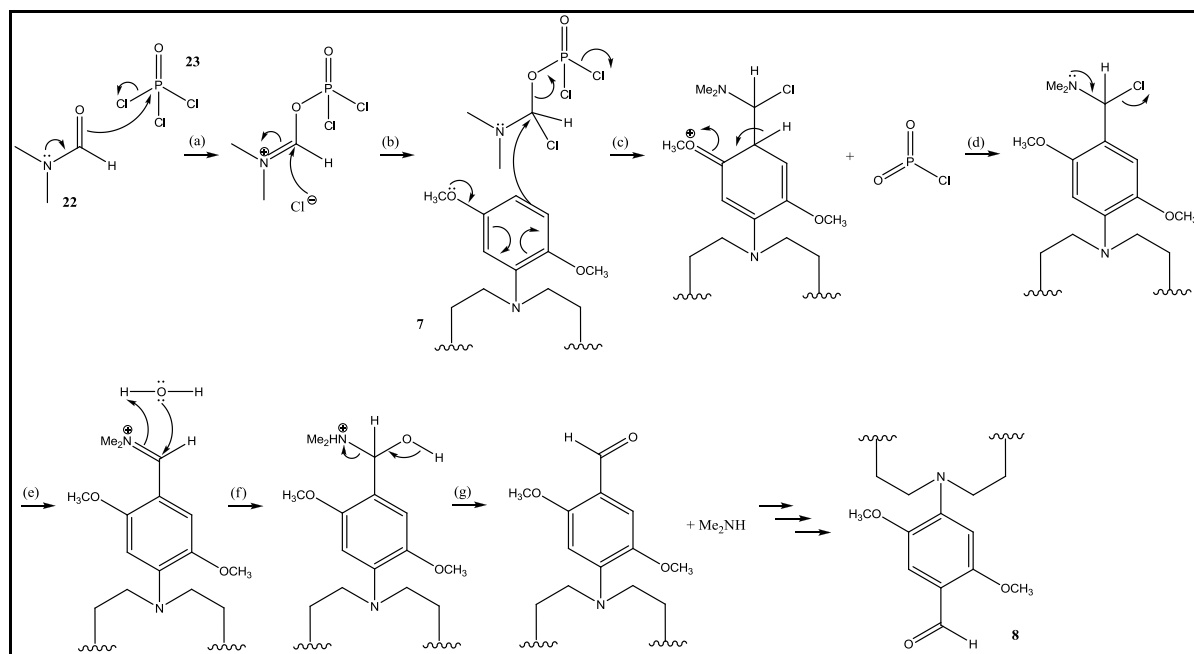


Figura 2.9 - Mecanismo reaccional da Formilação de Vilsmaeyer - Haak. O intermediário **7** é dissolvido em DMF (**22**) e adiciona-se, depois, uma solução 1:4 (v/v) de POCl₃ (**23**) / DMF.

A reacção da amida (**22**) com o oxicloreto de fósforo (**23**) dá origem a um intermediário cationico de carácter electrofílico que sofre, depois, ataque pelo composto **7**. Esta substituição electrofílica produz um sal de imina (c) que é hidrolisado para formar o grupo aldeído. Os grupos metoxilo, bem como o átomo de azoto do éter de coroa, são doadores de electrões tornando o anel aromático mais reactivo e dirigindo o ataque electrofílico para as posições *orto* e *para* do anel. As posições mais acessíveis de se dar o ataque serão as posições 3 (e 3') e 4 (e 4'). A posição 6 (e 6') encontra-se demasiado impedida estereoquimicamente para se ligar ao sal de imina que se forma. A probabilidade do grupo aldeído entrar na posição 3 ou na posição 4 é, no entanto, diferente. Os grupos dirigem o ataque electrofílico, preferencialmente, para o carbono da posição 4 do anel tornando-o mais reactivo que o outro carbono. Por análise espectroscópica, pode confirmar-se a entrada apenas na posição 4. Verificou-se a formação do composto **8** ao longo da reacção por spray de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) e foi, depois, purificado por cromatografia de coluna com um rendimento final de 63% e, depois, caracterizado. Obteve-se um rendimento um pouco mais baixo do que o registado na literatura. ^[3]

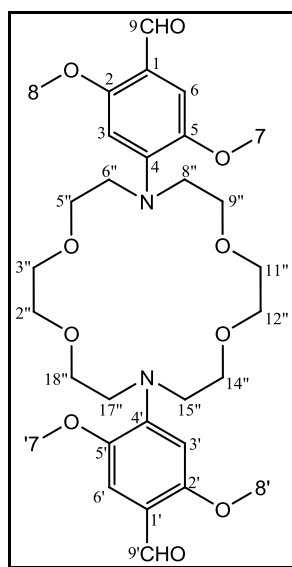


Figura 2.10 - Estrutura do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (**8**).

A caracterização foi efectuada recorrendo a análise espectroscópica de $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ e espectros bidimensionais (HMQC e HMBC). Pela observação do espectro de protão (figura 6.8), foi possível identificar o sinal com o desvio químico de δ 10,22 ppm (que integra para dois protões devido à simetria da molécula) como correspondente aos protões do grupo aldeído (-CHO). Verificou-se também, por comparação com o espectro do intermediário **7** (figura 6.4), a presença de apenas dois sinais correspondentes aos protões do anel aromático; o desaparecimento de um dos sinais confirma que a formilação ocorreu. A campo alto (δ 3,60-3,87 ppm) podem observar-se os sinais

correspondentes aos prótons do éter de coroa e aos prótons restantes dos grupos metoxilo que mantêm desvios químicos muito semelhantes quando comparados com os espectros anteriores. Para atribuir os prótons aromáticos foi necessário recorrer à espectroscopia de HMBC (figura 2.11). Se a entrada do grupo aldeído tivesse sido na posição 6 do intermediário **7**, seria de esperar o aparecimento de dois sinais com multiplicidade dois. No entanto, obtiveram-se dois sinais em forma de singuleto (a δ 5,30 ppm e a δ 6,51 ppm), o que significa que a entrada do grupo aldeído se deu na posição 3 ou na posição 4 do anel aromático. Esses prótons (que no composto **8** correspondem aos prótons H-3 e H-6) foram atribuídos do seguinte modo: o sinal com o desvio químico de δ 6,51 ppm tem duas correlações a três ligações e uma correlação a duas ligações, e o sinal com o desvio químico de δ 6,30 ppm também apresenta duas correlações a três ligações e uma correlação a duas ligações. Duas correlações são diferentes para ambos os sinais, tendo sido cruciais para distinguir os prótons H-3 (e H-3') e H-6 (e H-6'). O sinal correspondente a δ 6,51 ppm tem uma correlação J^3 com o carbono C-9 do grupo aldeído, correspondendo ao próton H-6, enquanto o sinal correspondente a δ 5,30 ppm tem uma correlação do tipo J^3 com o carbono C-1 (ligado ao grupo aldeído), correspondendo ao próton H-3. A partir daqui, pode atribuir-se os carbonos C-2 e C-5 (ligados aos grupos metoxilos) e o carbono C-4 (que estabelece a ligação do anel aromático ao éter de coroa). Posto isto, os restantes carbonos foram atribuídos com o auxílio do espectro de HMQC (figura 6.6).

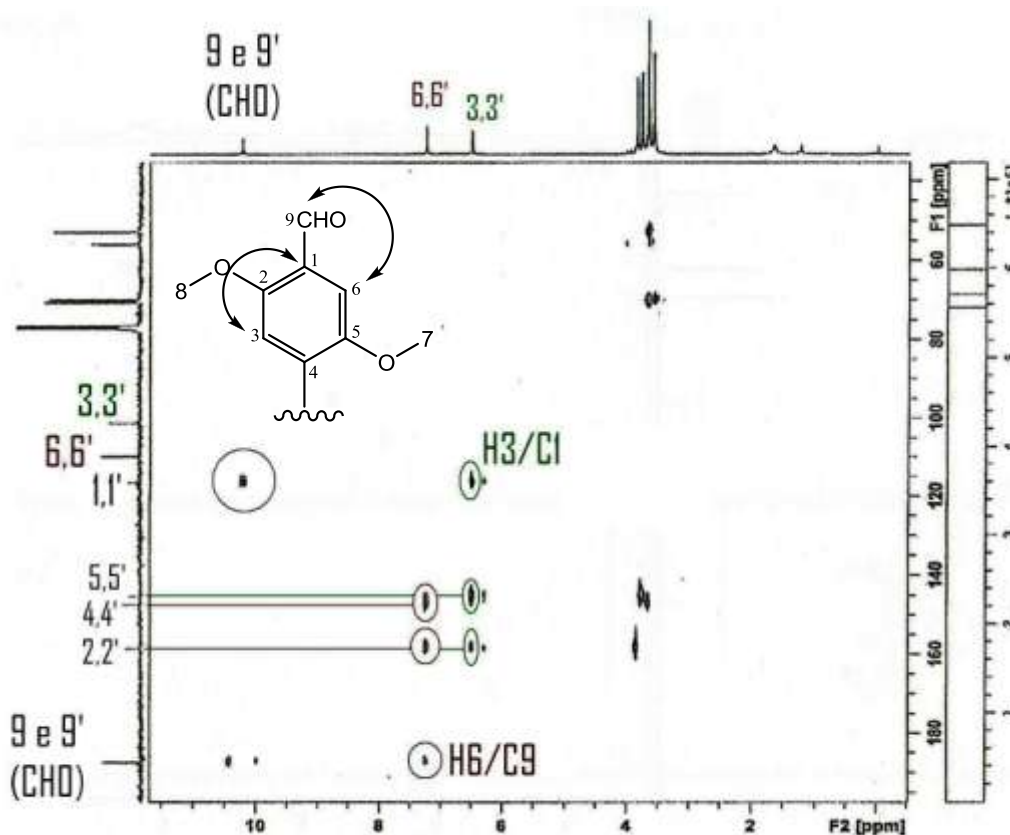


Figura 2.11 - Correlações a duas e três ligações (↷) (HMBC) do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (**8**) em CDCl₃ (400 MHz).

2.1.1.4. Preparação da unidade estrutural 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxi-benzaldeído) (4)

O último passo reaccional, para preparar a unidade estrutural 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxi-benzaldeído) (4), consistiu de uma desmetilação regioselectiva de **8**. Esta reacção é caracterizada pela eliminação de um grupo metilo da molécula. Neste caso em particular, pretendeu eliminar-se o grupo metilo da posição 8, adjacente ao grupo aldeído. Deste modo, todo o procedimento experimental obedeceu a um conjunto de passos importantes para que essa regioselectividade fosse cumprida.

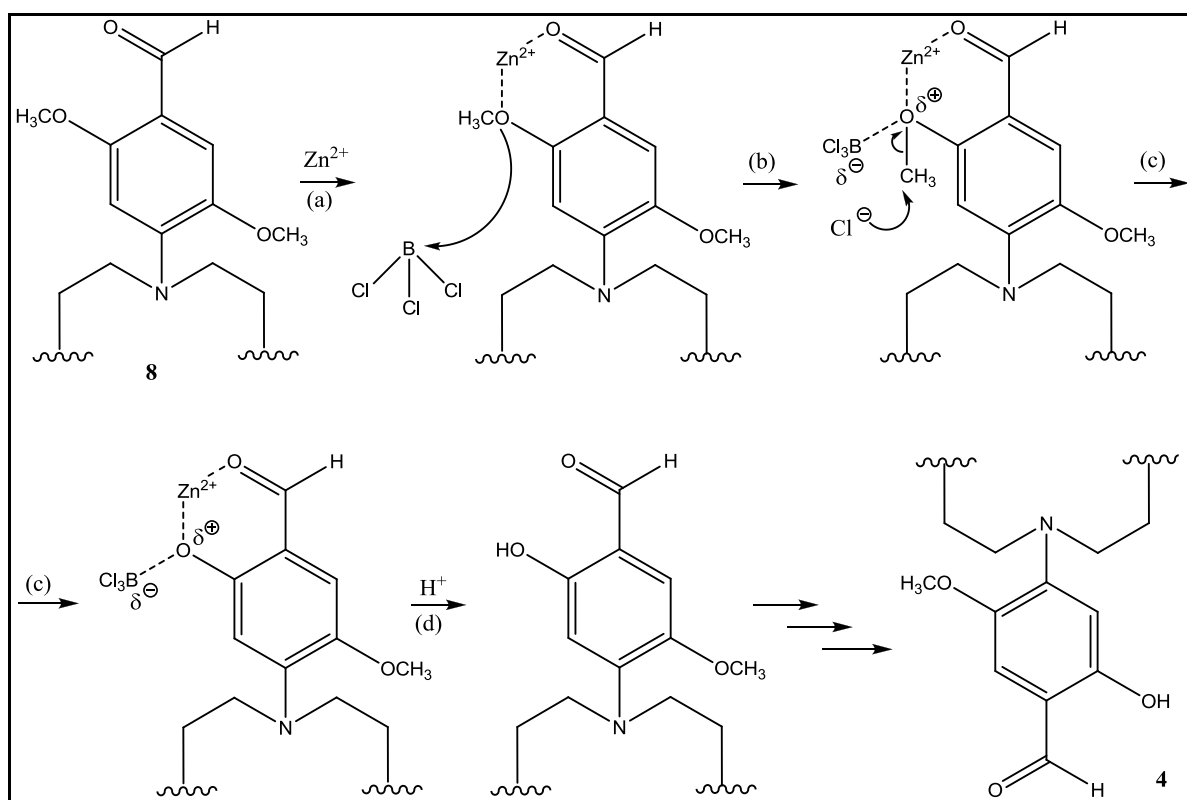


Figura 2.12 - Mecanismo reaccional da desmetilação regioselectiva do grupo metoxilo em posição *ortho* relativamente ao grupo aldeído.

Para garantir que o grupo metoxilo adjacente ao grupo aldeído seria o interveniente nesta reacção, usou-se uma solução de cloreto de zinco (em nitrometano) para formar um intermediário catiónico (a) e eliminar o metilo, devido ao ataque posterior do cloreto de boro (b), sem que a integridade do anel aromático fosse comprometida. Mais uma vez, a reacção não formou apenas o composto **4**, tendo-se isolado eficazmente por cromatografia de coluna com um rendimento final de 53%.

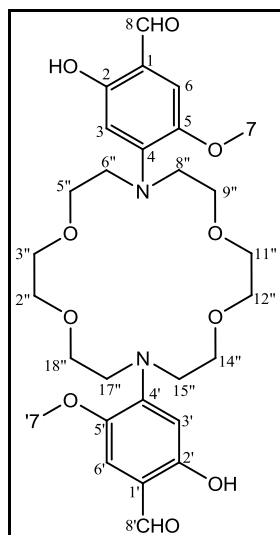


Figura 2.13 - Estrutura do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzenal) (4).

Para identificar a estrutura do produto **4** e confirmar a posição exacta onde ocorreu a desmetilação, recorreu-se à análise espectroscópica de $^1\text{H-RMN}$ (figura 6.11), $^{13}\text{C-RMN}$ (figura 6.12) e bidimensionais (HMQC e HMBC).

Pela observação do espectro de protão, verificaram-se dois sinais a campo baixo característicos dos grupos funcionais hidroxilo (δ 11,28 ppm) e aldeído (δ 9,56 ppm). A presença do grupo hidroxilo no anel provocou um ligeiro desvio no sinal do grupo aldeído. A campo um pouco mais alto observaram-se dois singletos de intensidades idênticas com desvios químicos de δ 6,33 ppm e δ 6,80 ppm que correspondem aos protões aromáticos do anel. A campo alto observou-se a presença de apenas um sinal correspondente ao grupo metoxilo (com desvio químico de δ 3,78 ppm), o que significa que a desmetilação ocorreu num deles. A δ 3,60 ppm e a δ 3,71 ppm são observados os protões correspondentes ao éter de coroa (24H).

Para determinar a posição exacta da desmetilação e identificar os sinais correspondentes aos protões H-3 e H-6 do anel aromático foi necessário, mais uma vez, recorrer à espectroscopia bidimensional a duas e três ligações:

- Verificou-se que o sinal a δ 6,80 ppm apresenta três correlações, sendo uma delas a um carbono já atribuído, através do espectro de correlação a uma ligação (HMQC, figura 2.14): C-8 do grupo aldeído. Olhando para a estrutura o protão que apresenta uma correlação a três ligações com o C-8 é o protão H-6. Posto isto, e sabendo agora que o sinal a δ 6,80 ppm corresponde ao protão H-6 e o sinal a δ 6,33 ppm corresponde ao protão H-3, voltamos ao HMQC e atribuímos os carbonos C-3 e C-6 (δ 103,49 ppm e δ 114,55 ppm, respectivamente).

- O sinal correspondente ao grupo hidroxilo apresenta um desvio químico de δ 11,28 ppm e apresenta duas correlações: a δ 158,95 ppm e a δ 103,49 ppm. Como concluído anteriormente, o sinal

a δ 103,49 ppm corresponde ao carbono C-3, o que significa que a desmetilação ocorreu no grupo metoxilo pretendido (J^3). Assim sendo, o sinal a δ 158,95 ppm só poderá corresponder ao carbono C-2 que está directamente ligado ao grupo hidroxilo.

- O sinal a δ 9,56 ppm, que corresponde ao grupo aldeído, apresenta duas correlações no espectro de HMBC: a δ 158,95 ppm já se concluiu que se trata do carbono C-2 logo, a δ 111,85 ppm será o carbono C-1 (directamente ligado ao grupo CHO).

- Voltando às correlações do próton H-6: este próton apresenta correlações a três ligações com os carbonos C-2, C-4 e C-8. A δ 192,34 ppm está representado o grupo CHO (C-8) e a δ 158,95 ppm demonstrou-se corresponder ao C-2; sobra a correlação com o carbono de desvio químico de δ 148,88 ppm que, por exclusão de partes, será o C-4.

- O próton H-3 tem correlações a três ligações com os carbonos C-1 e C-5 e tem correlações a duas ligações com o carbono C-2. Destes três carbonos o único que ainda não foi atribuído foi o carbono C-5, correspondendo, assim, ao sinal cujo desvio químico é δ 143,82 ppm.

- Por fim, pode verificar-se que os prótons do grupo metoxilo (CH_3 -7) têm duas correlações: uma correlação com o sinal cujo desvio químico a δ 143,82 ppm foi identificado como sendo o C-5 (mais uma evidência de que o grupo metoxilo a sofrer desmetilação foi o grupo em posição *orto* relativamente ao grupo aldeído) e outra correlação a δ 56,23 ppm que, pelo HMQC se tinha identificado como sendo o C-7.

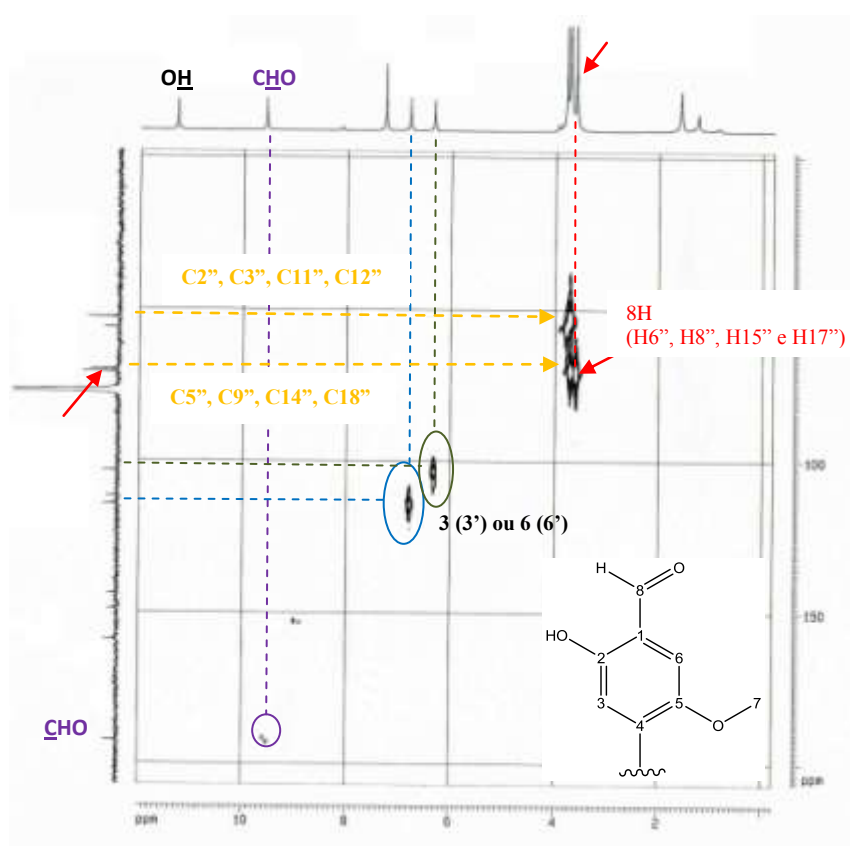


Figura 2.14 - Correlações a uma ligação (HMBC) obtidas para 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (**4**), em CDCl_3 (400 MHz).

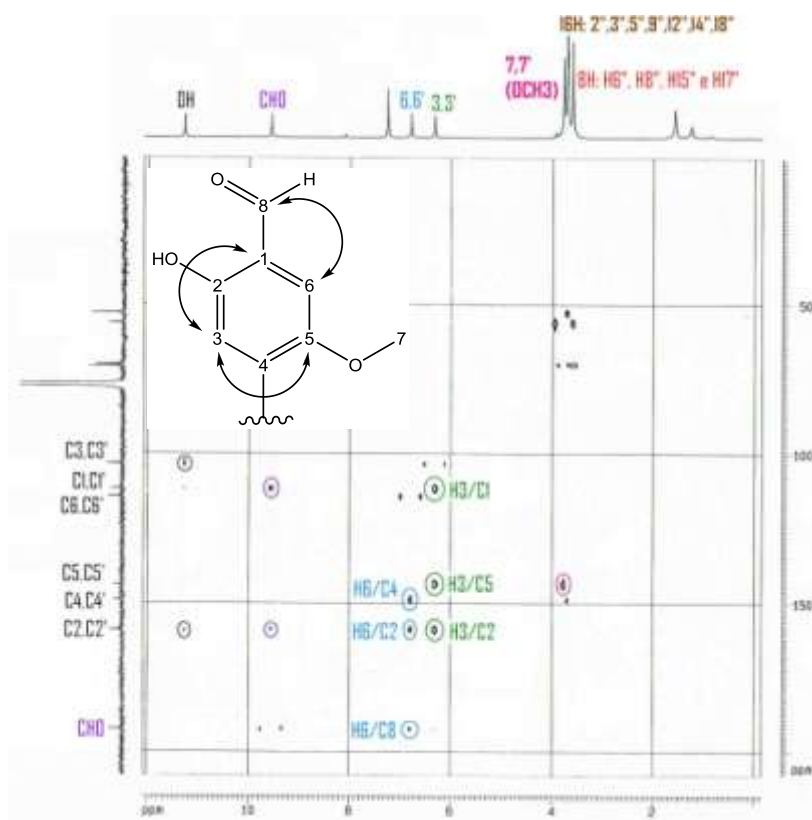


Figura 2.15 - Correlações a duas e três ligações (\curvearrowright) (HMBC) obtidas para 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxi-benzaldeído) (**4**), em CDCl_3 (400 MHz).

2.1.2. Preparação da unidade 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (**5**)

A síntese da unidade estrutural 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (**5**) deu-se em quatro etapas reaccionais, esquematizadas abaixo:

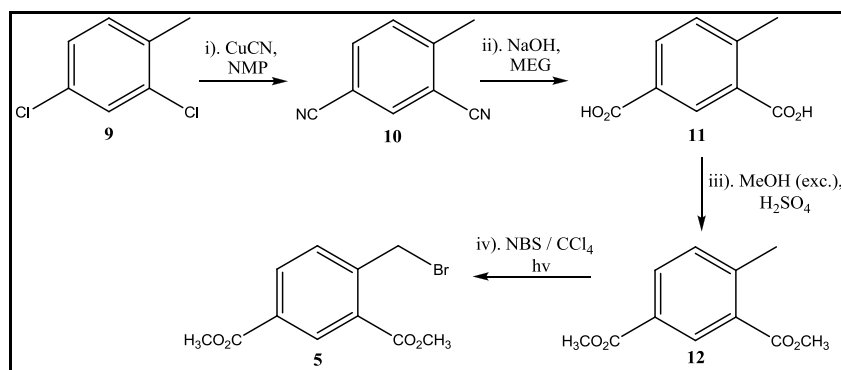


Figura 2.16 - Passos reaccionais envolvidos na formação da unidade estrutural 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (**5**), onde: (i) – Adição / Eliminação, em *N*-metilpirrolidona (NMP); (ii) – Hidrólise Básica, em meio básico e na presença de Mono Etileno Glicol (MEG); (iii) – Esterificação; (iv) – Bromação Radicalar (usando o reagente *N*-bromossuccinamida (NBS)).

2.1.2.1. Preparação do 4-metilsoftalonitrilo (10)

O 4-metilsoftalonitrilo foi preparado a partir do 2,4-diclorotolueno (**9**) usando cianeto cuproso e *N*-metilpirrolidona (NMP) como reagentes. Esta reacção denomina-se reacção de Rosenmund – von Braun e provou-se que não envolve um mecanismo do tipo S_NAr .^[21] A reacção é muito lenta, considerando-se completa após quatro dias a refluxo. Com o objectivo de reduzir o tempo de reacção e melhorar o seu rendimento final, fez-se um ensaio recorrendo a um método diferente de substituição: utilizando piridina em vez de NMP.^[22] Este procedimento experimental precisava apenas de um dia em refluxo, mas não foi bem sucedido, uma vez que o produto desejado não se formou. Deste modo, o ensaio inicial foi retomado e o composto **10** foi obtido com sucesso, na forma de um óleo laranja escuro.

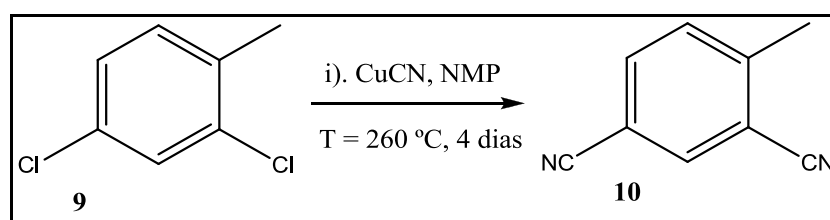


Figura 2.17 - Esquema reaccional da formação de 4-metilsoftalonitrilo (**10**) a partir de 2,4-diclorotolueno (**9**).

Não se quantificou o composto, mas foi devidamente caracterizado recorrendo à espectroscopia IV (figura 6.13). Observando o espectro, verificou-se a presença de uma banda a 2225 cm^{-1} , zona característica de grupos nitrilo ($C\equiv N$). Tendo a confirmação da estrutura do composto **10**, prosseguiu-se com a síntese do intermediário seguinte (**11**) que teve em consideração os volumes e proporções utilizadas do material de partida **9**. É importante referir que o 4-metilsoftalonitrilo não é um intermediário estável não podendo ficar em repouso durante muito tempo (pelo menos 24 horas). Isto significa que é crucial que a hidrólise básica seja efectuada assim que o composto **10** seja obtido e devidamente caracterizado.

2.1.2.2. Preparação do ácido 4-metilsoftálico (11)

Para a preparação do ácido 4-metilsoftálico (**11**), recorreu-se a uma reacção de hidrólise do grupo nitrilo, em meio básico. A amida inicial (**10**) é hidrolisada e o ácido final recuperado por acidificação com HCl 10% (figura 2.18).

O intermediário formado foi, de novo, dissolvido em hidróxido de sódio (em refluxo) e descorado com carvão activado. A purificação envolveu uma filtração a quente, seguida de

reacidificação, em banho de gelo, com HCl 10%. O ácido foi obtido completamente puro com um rendimento de 43%.

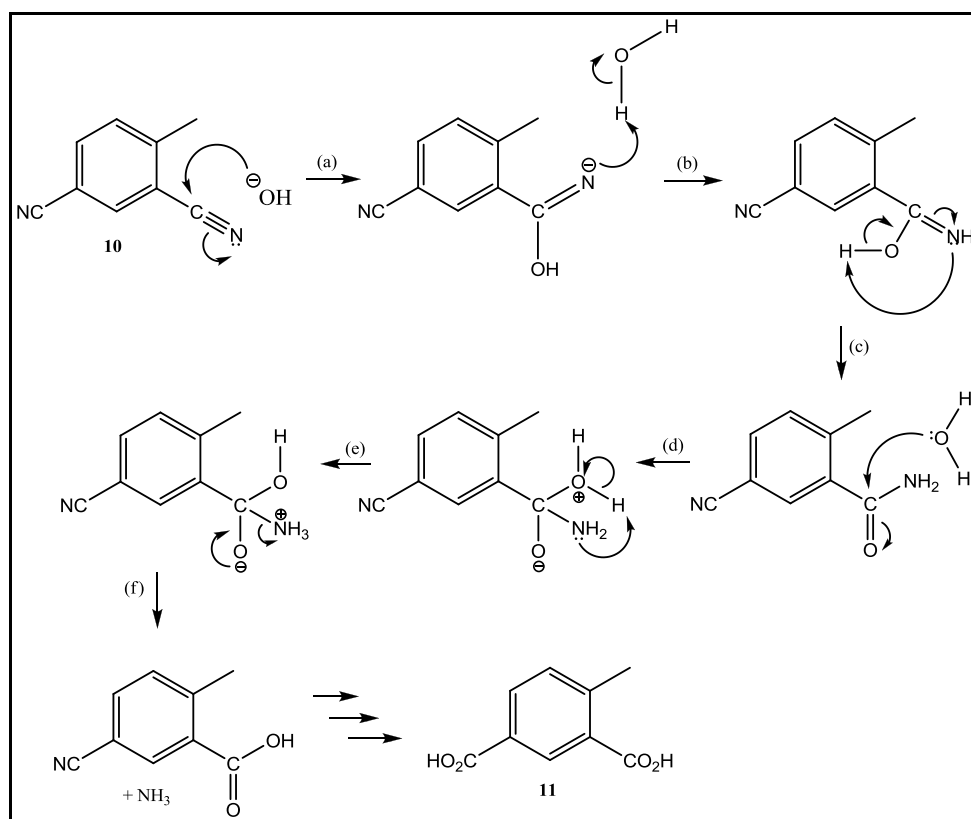


Figura 2.18 - Mecanismo Reaccional de hidrólise básica: NaOH em etileno glicol e umas gotas de água.

Através das análises espectroscópicas de IV, ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, caracterizou-se o composto **11**.

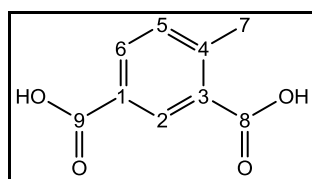


Figura 2.19 - Estrutura do Ácido 4-metilsoftalato (**11**).

No espectro de IV (figura 6.14) foram identificadas três bandas características do composto **11**: a banda de distensão O-H do ácido carboxílico (2652 cm^{-1}), a banda de distensão C=O do ácido carboxílico (1686 cm^{-1}) e a banda de distensões C=C do anel aromático (1576 cm^{-1}). A banda a 2225 cm^{-1} , característica do grupo nitrilo, desapareceu o que levou a concluir que a hidrólise ocorreu com sucesso. Para confirmar estes resultados, recorreu-se à análise espectroscópica de ^1H -RMN (figura 6.15) e ^{13}C -RMN (figura 6.16), em $\text{DMSO-}d_6$. Os espectros foram comparados com os resultados registados na literatura ^[14]. No espectro de protão detectou-se um sinal a $\delta\ 12,8\text{ ppm}$, correspondente

ao próton do grupo carboxílico (COOH) e, através do espectro de carbono, diferenciaram-se os dois carbonos: o carbono C-8 a δ 168,7 ppm e o carbono C-9 a δ 166,7 ppm. Esta diferença deve-se ao facto de o carbono C-8 estar perto do grupo metilo (com um desvio químico de δ 21,2 ppm) o que o torna mais desblindado quando comparado ao carbono C-9. Relativamente aos prótons do anel aromático, atribuiu-se o desvio químico de δ 7,41 ppm ao próton H-2, visto tratar-se de um singuleto, e os dois restantes, dupletos e com a mesma constante de acoplamento, aos prótons H-5 e H-6.

2.1.2.3. Preparação do 4-metilsoftalato de dimetilo (12)

O passo reaccional seguinte, para preparar o intermediário 4-metilsoftalato de dimetilo (12), consistiu de uma reacção de esterificação catalisada por um ácido. É uma reacção reversível na qual o ácido carboxílico reage com o álcool (em excesso), produzindo um éster e água. Por norma é uma reacção lenta à temperatura ambiente, no entanto, os reagentes podem ser aquecidos na presença de um ácido mineral para acelerar o processo. Para evitar a reversibilidade desta reacção, utilizou-se metanol seco e foi-se controlando o evoluir da reacção por TLC. O meio anidro permite o deslocamento da reacção maioritariamente no sentido de formação de produtos, como poder ser visualizado na figura 2.20.

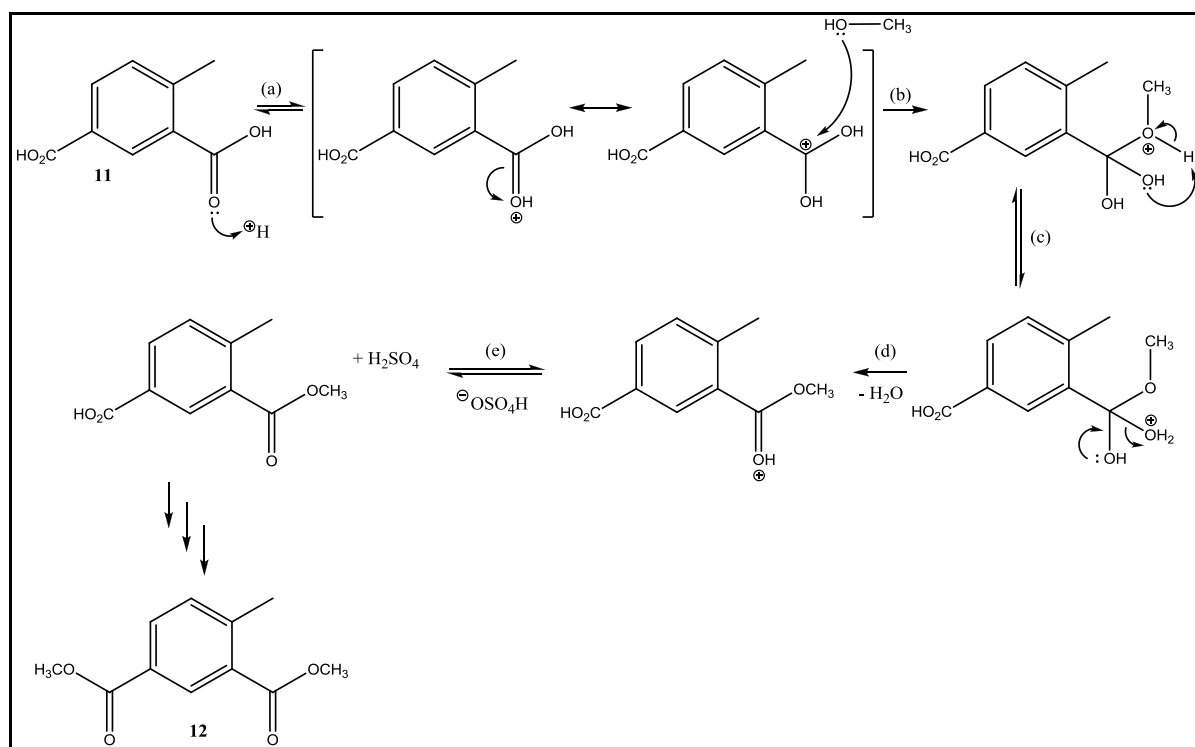


Figura 2.20 - Mecanismo reaccional da Esterificação catalisada por ácido (H_2SO_4), na presença de metanol.

O oxigénio ligado ao grupo C=O (**16**) fica protonado devido à presença de um ácido forte no meio, fazendo aumentar o carácter electrofílico do carbono do grupo carbonilo tornando mais fácil o ataque do metanol. O intermediário tetraédrico que se forma sofre uma série de desprotonações e protonações rápidas, resultando na perda de H⁺ e H₂O e na formação do éster. O produto foi purificado através de extracções com água, bicarbonato de sódio 10% e solução saturada de cloreto de sódio, obtendo-se **12** com um rendimento de 57%.

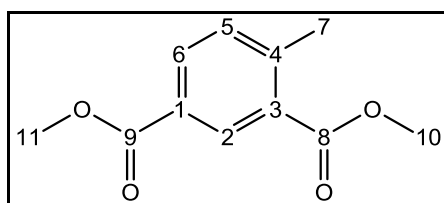


Figura 2.21 - Estrutura do 4-metilisoftalato de dimetilo (**12**).

Fez-se a caracterização do diéster por IV, ¹H-RMN e ¹³C-RMN. As atribuições foram feitas com base em dados obtidos na literatura. [14]

No espectro de infravermelho (figura 6.17) foram identificadas três bandas características de **12**: a banda de distensão C=O do éster (1722 cm⁻¹), a banda de distensões C=C (1602 cm⁻¹) e a banda de distensão C-O-C do éster (1297 cm⁻¹).

Através da análise de protão (figura 6.18), distinguiram-se os grupos metilo 10 e 11 do grupo metilo 7. Apesar de todos eles serem singuletos, os integrais de ambos os grupos são diferentes. Com base nos desvios químicos δ 3,91 ppm e δ 2,65 ppm, e respectivos integrais, foi possível atribuir o primeiro sinal aos dois grupos metilo dos grupos éster e o último ao grupo metilo sobre o anel aromático. Os restantes protões foram atribuídos de modo semelhante ao explicado para o intermediário **11**. O mesmo raciocínio foi seguido para a análise do espectro de carbono (figura 6.19), no qual estão presentes onze sinais diferentes, correspondentes aos onze carbonos da estrutura **12**. Os carbonos dos grupos metilo 10 e 11 (δ 52,15 ppm e δ 51,99 ppm, respectivamente), bem como o grupo metilo 7 (δ 21,83 ppm), aparecem em campo alto. Por comparação com o espectro de carbono obtido para o intermediário **11**, foi possível distinguir os carbonos C-8 e C-9, correspondentes ao grupo éster (C=O), com desvios químicos de δ 167,13 ppm e δ 166,29 ppm, respectivamente.

2.1.2.4. Preparação do 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (**5**)

Na última etapa reaccional, para preparar a unidade estrutural 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (**5**), recorreu-se a uma reacção radicalar para introduzir um átomo de bromo sobre o grupo metilo do intermediário **12**. Estes centros são particularmente reactivos, uma vez que qualquer dos

intermediários que aí se forme pode ser estabilizado por ressonância. Os centros alílicos são facilmente halogenados com *N*-bromossuccinamida (NBS) numa reacção radicalar, que tanto se pode dar na presença de luz ($h\nu$) como na de peróxidos. Neste caso, optou-se por uma bromação radicalar na presença de luz e tratada com NBS em tetracloreto de carbono (CCl_4).^[23]

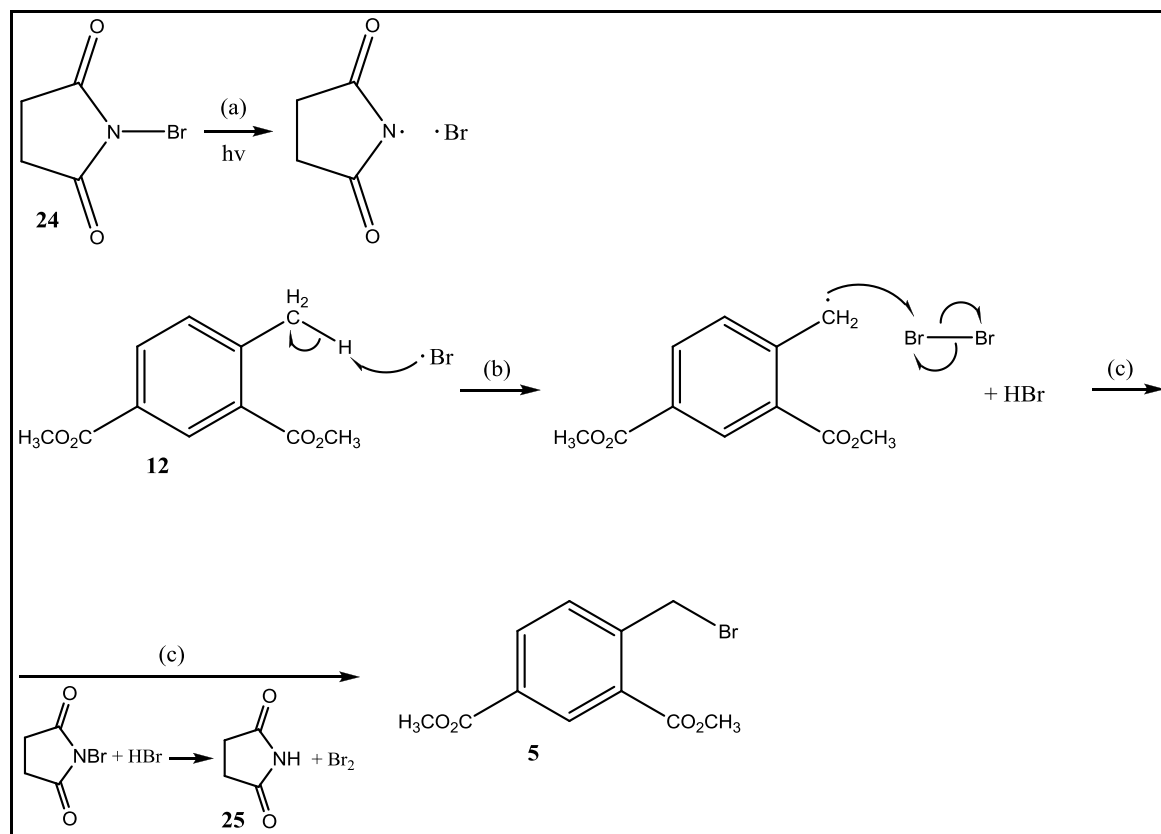


Figura 2.22 - Mecanismo reaccional da reacção de bromação radicalar onde (a) corresponde à iniciação do radical Br, (b) passo de propagação e (c) à reacção que ocorre no meio reaccional.

A reacção segue o mecanismo descrito na figura 2.22. Se tivéssemos usado um solvente em que a NBS fosse solúvel, esta seria facilmente destruída por reacção imediata com o HBr formado. Utilizou-se, deste modo, um solvente em que a NBS fosse insolúvel como, por exemplo, o tetracloreto de carbono (CCl_4) e que fornece, na mistura da reacção, uma determinada concentração de bromo constante, mas muito baixa. Cada molécula de HBr é substituída por uma molécula de bromo. No final da reacção fez-se um TLC onde foram identificados o material de partida que não reagiu e dois compostos novos com polaridades diferentes. Esses produtos foram separados por cromatografia em coluna de fase normal e, depois, analisados por espectroscopia de ^1H – RMN (figura 6.20). O menos polar identificou-se como sendo um produto secundário dibromado, o 2-metil-dibromo-isoftalato de dimetilo, e o mais polar como sendo a unidade estrutural pretendida: o 2-metilbromo-isoftalato de dimetilo (**5**), com um rendimento de 91%. Foi um método muito eficaz de halogenação radicalar e obteve-se um rendimento mais elevado do que o registado na literatura.^[14]

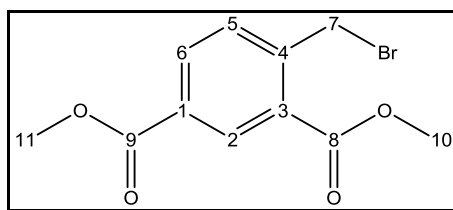


Figura 2.23 - Estrutura do 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (**5**).

Pela observação do espectro de próton da estrutura **5**, verificaram-se duas situações importantes: a ausência do sinal característico dos prótons do carbono terciário (CH_3) e a presença de um sinal com um desvio químico a δ 4,98 ppm. Apresenta, portanto, um desvio químico característico de prótons ligados a carbonos secundários e também um integral que integra para dois prótons. Verifica-se também que a entrada do bromo no carbono C-7 provocou um ligeiro desvio químico entre os prótons dos grupos metilo 10 e 11. Confirma-se, deste modo, que a bromação radicalar ocorreu no carbono alílico, como esperado.

2.1.3. Condensação do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4) com duas unidades de 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5) e posterior ciclização para formar o sensor fluorescente PBFi (3)

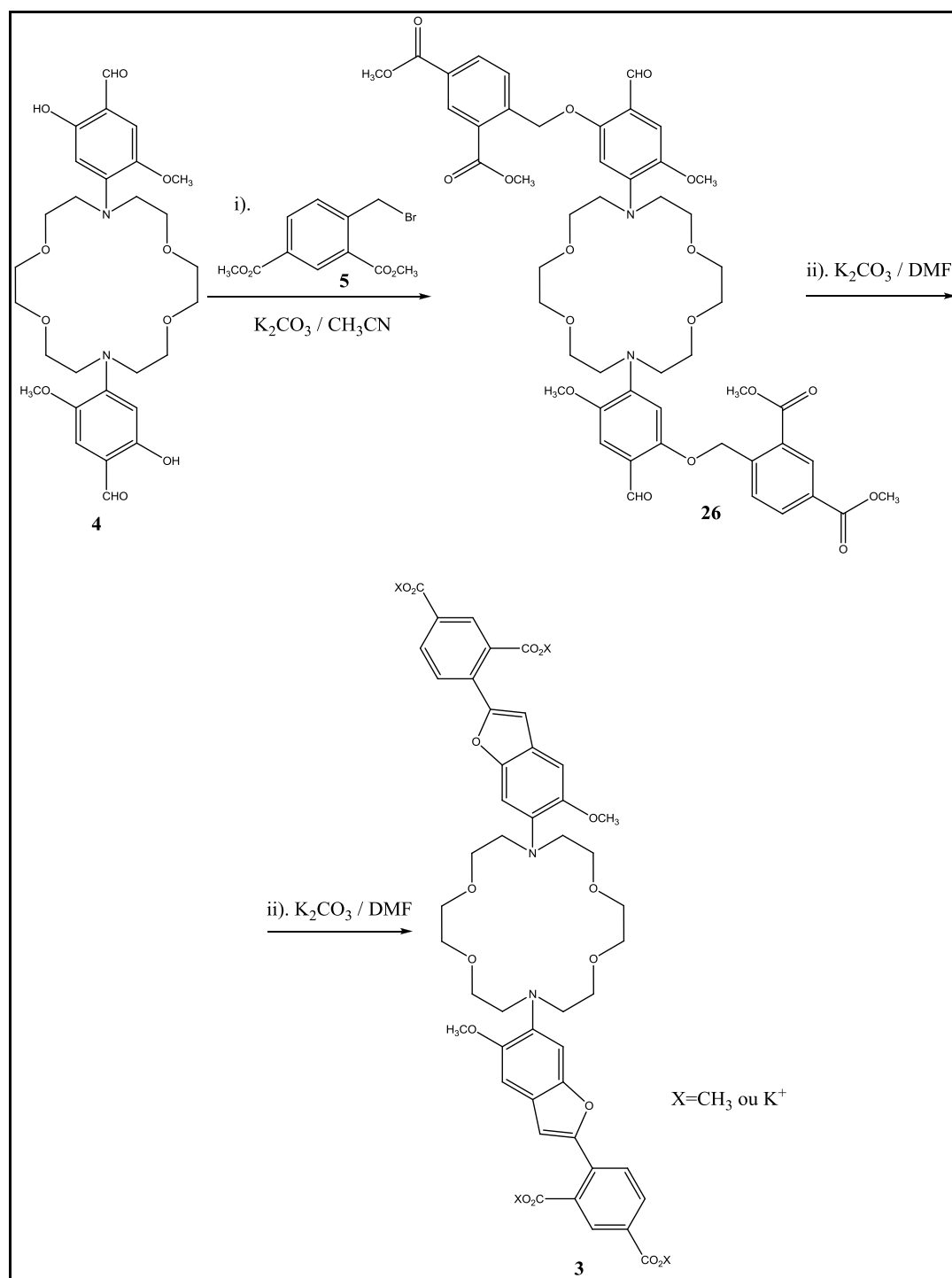


Figura 2.24 - Passos reaccionais envolvidos na condensação de 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4) com duas unidades de 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5) e posterior ciclização para formar o sensor fluorescente PBFi (3).

Depois de sintetizadas as duas unidades que são necessárias à construção do PFBI (**3**) procedeu-se à condensação de ambas, em dois passos reaccionais, tratados com carbonato de potássio.

2.1.3.1. Preparação do intermediário 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isoftalato de tetra-metilo (**26**)

O primeiro passo envolve o ataque do hidroxilo do composto **4** ao grupo metileno do composto **5**, com eliminação de HBr.

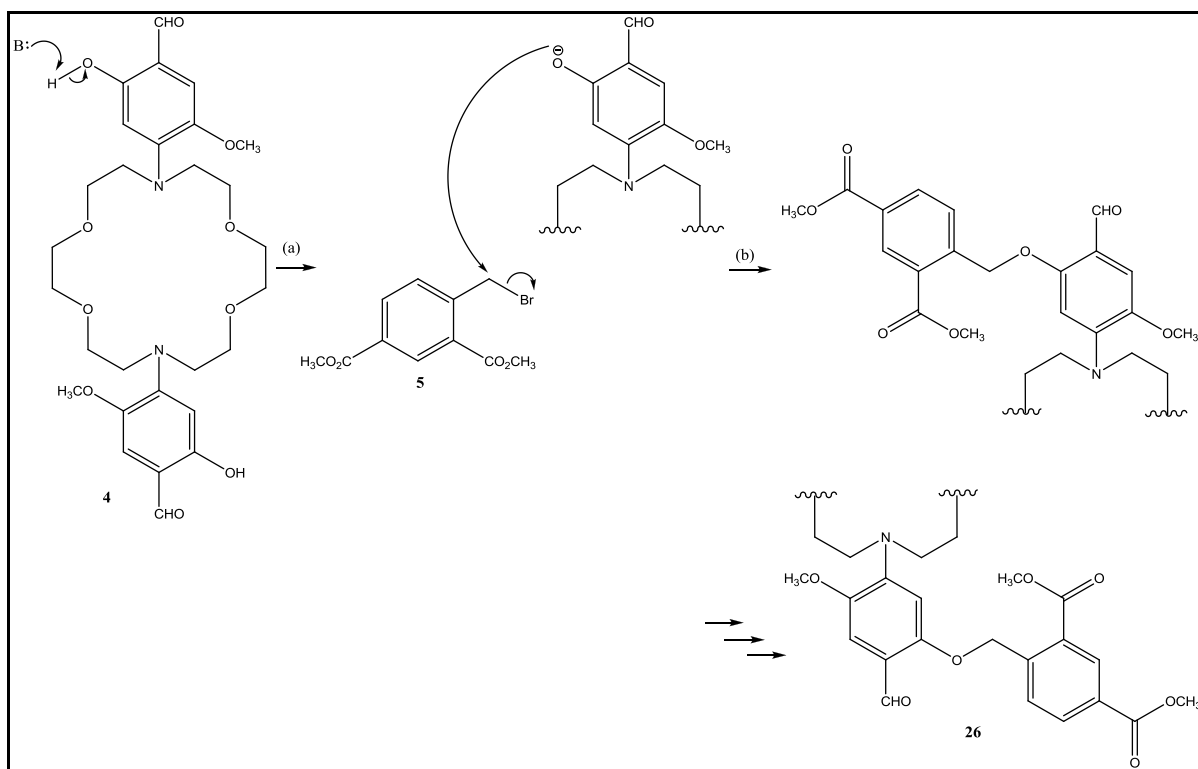


Figura 2.25 - Condensação de 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (**4**) com duas unidades de 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (**5**), em meio básico (carbonato de potássio).

Foi um procedimento experimental muito simples e eficaz, e sem formação de produtos secundários indesejáveis. Através de TLC, verificou-se a presença do composto **5** que não reagiu e que foi, posteriormente, removido com sucesso por extracção líquido – líquido: fase orgânica com o composto **26** (completamente isolado e com um rendimento de 82%) e fase aquosa com os materiais de partida (acetonitrilo e carbonato de potássio). Deste modo, após isolado e seco, o composto **26** foi

caracterizado com o auxílio de espectroscopia de ^1H -RMN (figura 6.21), ^{13}C -RMN (figura 6.22) e bidimensionais (HMQC e HMBC).

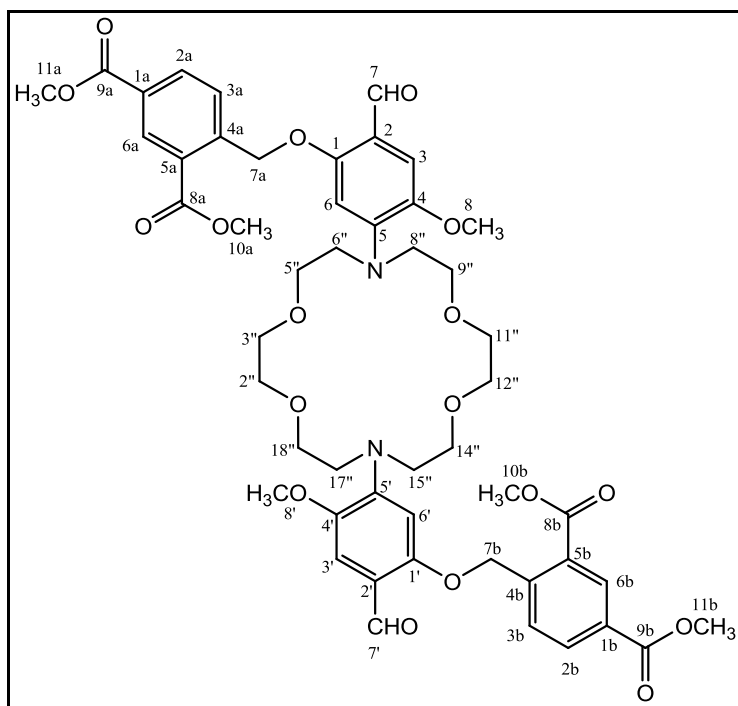


Figura 2.26 - Estrutura do 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isoftalato de tetra-metilo (**26**).

A atribuição final de todos os sinais do composto **26** só foi possível com o auxílio dos espectros bidimensionais: HMQC (figura 2.27) e HMBC (figura 2.28).

Pela observação directa do espectro de ^1H -RMN foram retiradas algumas conclusões: o desvio químico a δ 10,33 ppm corresponde ao grupo aldeído (CHO) da molécula, pois aparece na zona característica destes grupos funcionais; entre δ 7,83 e δ 8,65 ppm encontram-se os prótons do anel isoftalato (onde se atribuiu de imediato o sinal a δ 8,65 ppm ao próton H-6 (e H-6') pois é o único próton que não tem prótons vizinhos); entre δ 6,48 ppm e δ 7,26 ppm encontram-se os prótons do anel adjacente ao éter de coroa; a δ 5,57 ppm pode observar-se um singuleto característico de prótons de carbonos secundários (CH_2). Por fim, a campo alto, estão os desvios químicos característicos dos prótons do grupo metoxilo (δ 3,78 ppm), do grupo éster (δ 3,88 – 3,93 ppm) e dos prótons correspondentes ao éter de coroa (δ 3,61 ppm e 3,54 ppm). Estas primeiras observações foram feitas comparando os sinais obtidos com os sinais de espectros anteriores e tendo em conta a integração para cada um deles.

Assim, juntando a informação descrita anteriormente, com a informação obtida pelos espectros de HMQC e HMBC, atribuíram-se todos os desvios químicos observados de próton e carbono.

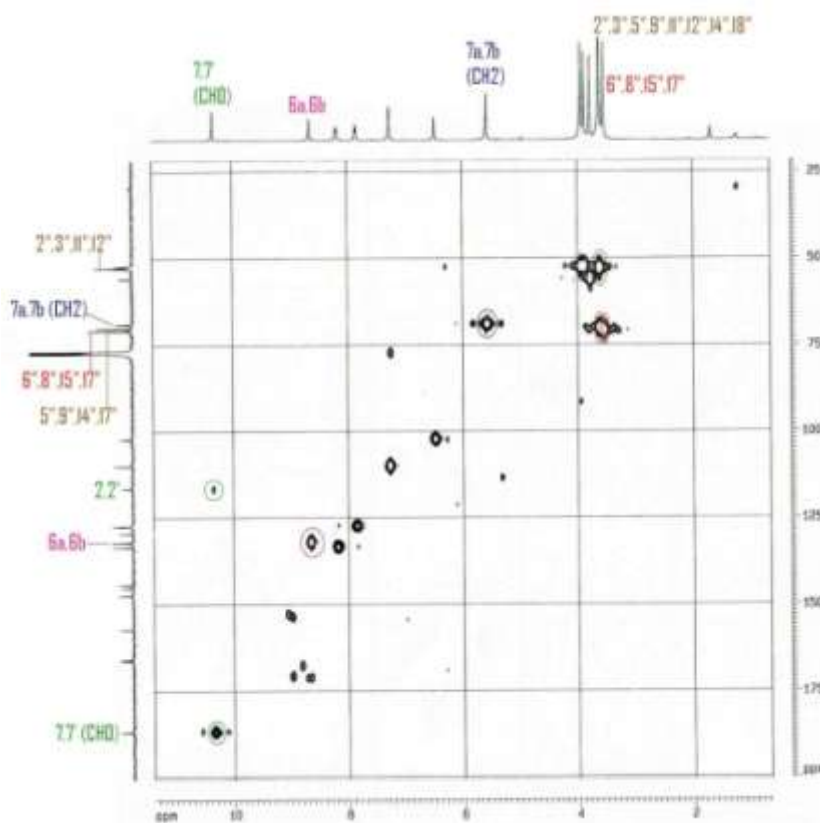


Figura 2.27 - Correlações a uma ligação (HMQC) obtidas para 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) diisofalato de tetra-metilo (**26**), em CDCl_3 (400 MHz).

Através da análise das correlações presentes nos espectros bidimensionais para a estrutura **28** a duas e três ligações foram observados os seguintes resultados:

- O duplete a δ 7,84 ppm tem uma correlação a três ligações com o carbono C-7a (CH_2) o que significa que, entre os prótons H-2a e H-3a, o único que apresenta um J^3 é o próton H-3a. Relativamente ao duplete a δ 8,18 ppm, este apresenta uma correlação a três ligações com o carbono C-6a: o único próton com um J^3 em relação a este carbono é o próton H-2a. Tendo esta atribuição feita, voltou-se ao HMQC e atribuíram-se os desvios químicos dos seus carbonos correspondentes: δ 133,42 ppm (C-2a e C-2b) e δ 127,39 ppm (C-3a e C-3b).

- O singuleto a δ 7,26 ppm uma correlação a três ligações com o carbono do grupo aldeído (CHO), que corresponde aos prótons H-3 e H-3'. Pelo HMQC vem que C-3 e C-3' correspondem ao desvio químico de δ 110,02 ppm. Voltando ao HMBC, verifica-se que este sinal tem mais duas correlações a três ligações: estes carbonos são os carbonos C-1 e C-1' e C-5 e C-5'.

- Assim sendo, o desvio químico de δ 6,48 ppm corresponde aos prótons H-6 e H-6'; os carbonos C-6 e C-6' foram atribuídos ao sinal com o desvio químico de δ 102,20 ppm. Este próton apresenta duas correlações do tipo J^3 com os carbonos C-2 (e C-2') e C-4 (e C-4') e uma correlação do tipo J^2 com o carbono C-1 (e C-1'). Através destes dados, atribuiu-se o sinal de carbono com o desvio

químico de δ 157,23 ppm ao carbono C-1 (e C-1') e, conseqüentemente, o carbono C-5 (e C-5') corresponderá ao desvio químico de δ 147,37 ppm. Como o sinal de carbono com o desvio químico de δ 116,56 ppm já foi atribuído ao carbono C-2 (e C-2') através do HMQC, sobra o carbono C-4 (e C-4') que corresponderá ao desvio químico de δ 145,30 ppm.

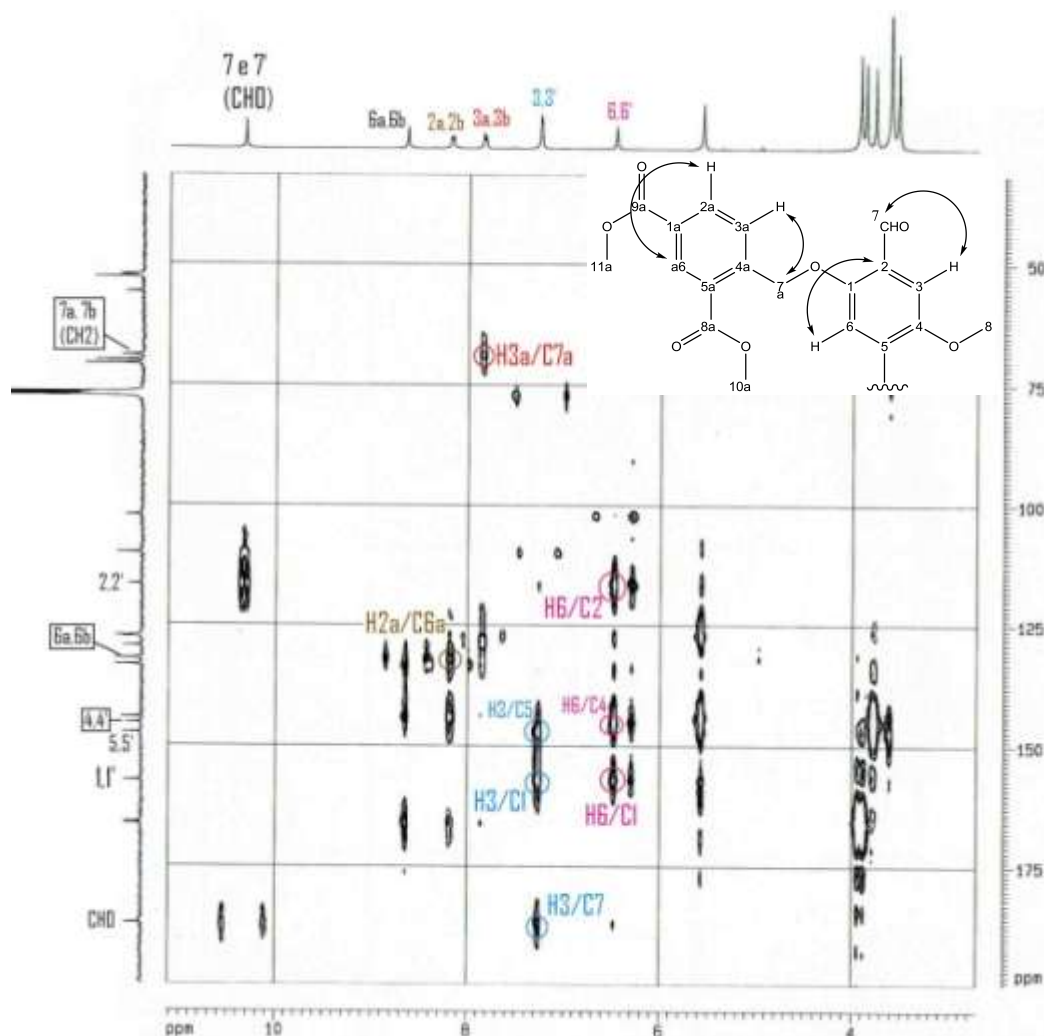


Figura 2.28 - Correlações a duas e três ligações (\curvearrowright) (HMBC) obtidas para 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isoftalato de tetra-metilo (**26**), em CDCl_3 (400 MHz).

- Visualizando as correlações a três ligações dos prótons H-2a e H-2b e dos prótons H-6a e H-6b, verificamos que H-2a e H-2b têm J^3 com um carbono a δ 165,89 ppm e H-6a e H-6b têm J^3 com dois carbonos a δ 165,89 ppm e a δ 166,26 ppm. Esta zona do espectro do carbono corresponde aos carbonos do grupo éster do anel isoftálico. Ou seja, δ 165,89 ppm corresponde a C-8a (e C-8b) e δ 166,26 ppm corresponde a C-9a (e C-9b).

- O desvio químico de δ 52,38 ppm foi atribuído, por HMQC, aos carbonos C-10a (e C-10b) e C-11a (e C-11b).

- Os sinais de carbono correspondentes aos carbonos quaternários C-4a (e C-4b) e C-5a (e C-5b) foram atribuídos tendo em conta a correlação a três ligações entre o protão H-2a com o carbono C-4a (desvio químico de δ 144,23 ppm) e a correlação a três ligações entre o protão H-3a com o carbono C-5a (desvio químico de δ 127,58 ppm).

2.1.3.2. Preparação do Indicador PFBI ou 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'- metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio (3)

A preparação do indicador PBFBI envolveu a formação do furano do cromóforo, através da ciclização do intermediário **26**. O mecanismo reaccional está representado na figura 2.29 e envolve a captura de um protão por uma base (a) dando origem a um carbanião; esse carbanião vai atacar o carbonilo do grupo aldeído e formar um anel de cinco membros (b).

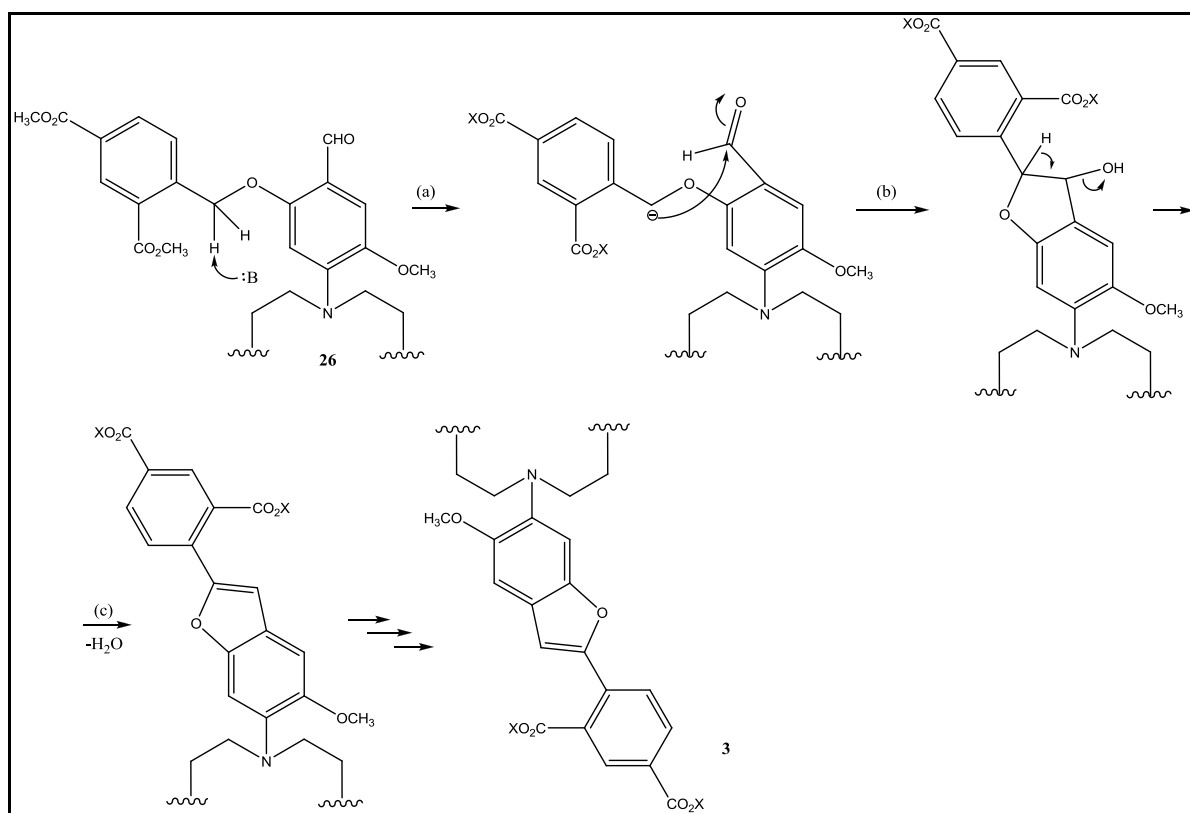


Figura 2.29 - Mecanismo Reaccional da ciclização de **26** a 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'- metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio ou PBFBI (**3**), em meio básico. X corresponde a CH_3 ou K^+ .

Esta ciclização dá-se na presença de carbonato de potássio, em acetonitrilo, e a temperatura elevada ($T=145^{\circ}\text{C}$) e forma, no final, o composto **3** e uma mistura de vários produtos secundários: sais de carboxilatos de potássio e ésteres metílicos.

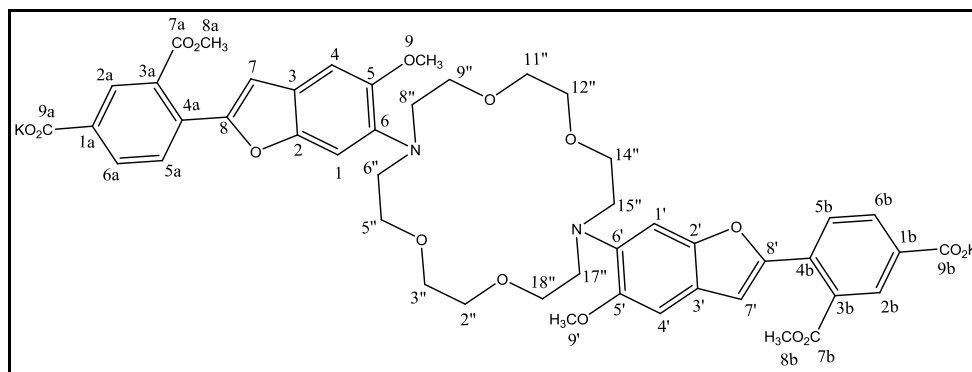


Figura 2.30 - Estrutura proposta do 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'- metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) de potássio ou PBF1 (**3**).

Esses produtos apresentavam praticamente todos fluorescência quando observados à lâmpada de UV ($\lambda = 366 \text{ nm}$). O produto **3** foi isolado através de cromatografia de fase reversa (RP-18) usando como eluentes $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (3:7) e MeOH. Voltando a observar a figura 2.29, verificou-se a ocorrência de uma permuta do grupo CH_3 do grupo funcional éster a catião potássio (a). Esta permuta foi identificada recorrendo à técnica analítica de ICP, cujo objectivo foi o de detectar a presença de potássio na molécula final (**3**), usando a espectroscopia de emissão atómica. A necessidade do uso desta técnica surgiu após a caracterização do composto por análise espectroscópica de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, uma vez que a proporção de grupos metilo não correspondia aos quatro grupos funcionais ésteres que seriam de esperar.

Na tabela 2.1 estão representados os resultados obtidos da análise de ICP ao PBF1 (**3**). Foi preparada uma amostra de PBF1 em água numa concentração de 1 mg/l e detectaram-se dois catiões potássio por molécula.

Tabela 2.1 - Resultados da Análise de ICP para o PBF1 (**3**), em termos de teor em catiões de sódio e de potássio.

Amostra	Intensidade	Na^+ (mg/l)	Intensidade	K^+ (mg/l)
Padrão: H_2O	393882	3,0	283	1,1
PBF1 (3)	260302	1,9	65117	91,9

Para confirmar a veracidade deste resultado, isto é, que a estrutura do composto **3** pudesse ter, de facto, a fórmula molecular representada na figura 2.30, fez-se ainda uma análise de massa através da técnica de MALDI-TOF/MS. Obteve-se o valor de m/z de 1025,2803 u.m.a. confirmando que o

composto sintetizado foi o pretendido: os grupos ésteres têm como grupos substituintes dois grupos metilo e dois catiões potássio. No entanto, o modo como esses grupos substituintes estão distribuídos na molécula será aleatório. Mas, como veremos mais à frente, isso não influenciou o resto do estudo.

Observando o espectro de próton (figura 6.24) e comparando-o com os espectros anteriores e os dados espectroscópicos da literatura (Tsien e colaboradores^[3]), foi possível fazer uma atribuição da estrutura **3**. A campo baixo, entre δ 7,20 e δ 7,57 ppm estão representados os prótons da unidade de benzofurano. Observando a estrutura do composto **3**, verificou-se que os prótons que apresentam multiplicidade 2 são os prótons H-5a (e H-5b) e H-6a (e H-6b). Têm, no entanto, constantes de acoplamento ligeiramente diferentes: o duplete a δ 8,03 ppm tem uma constante de acoplamento ($J=4,52$) superior à constante de acoplamento do duplete a δ 7,96 ppm ($J=4,88$). Assim sendo, o sinal correspondente ao desvio químico de δ 8,03 ppm corresponde ao próton H-6a (e H-6b) pois este acopla tanto com o seu próton vizinho H-5a (e H-5b) como com o próton H-2a (e H-2b). A δ 8,25 ppm há um singuleto correspondente ao próton H-2a (e H-2b). A atribuição feita aos prótons H-1 (e H-1'), H-4 (e H-4') e H-7 e (H-7') teve como princípio os valores conhecidos da literatura^[3]: δ 7,41 ppm, δ 7,57 ppm e δ 7,28 ppm, respectivamente. A campo alto, entre δ 3,85 ppm e δ 3,92 ppm, há um conjunto de sinais que integram para 12H, correspondentes aos prótons dos metoxilo (6H) e dos grupos ésteres (6H). Entre δ 3,25 ppm e δ 3,62 ppm encontra-se um conjunto de sinais que integram para 24H correspondentes aos prótons do éter de coroa. A atribuição feita aos carbonos pelo espectro de ¹³C-RMN seguiu o mesmo princípio utilizado anteriormente. Apenas com espectroscopia bidimensional (HMQC e HMBC) se poderia fazer uma atribuição inequívoca.

Para melhorar a resolução do espectro de ¹H-RMN do composto **3**, preparou-se o derivado tetra-etilado (**27**) com etanol, em meio ácido. Este foi analisado e caracterizado (figura 6.25) por RMN e MALDI-TOF/MS. Obteve-se um valor de m/z de 1017,4789 u.m.a. que confirmou a presença de quatro unidades etilo na estrutura **27**.

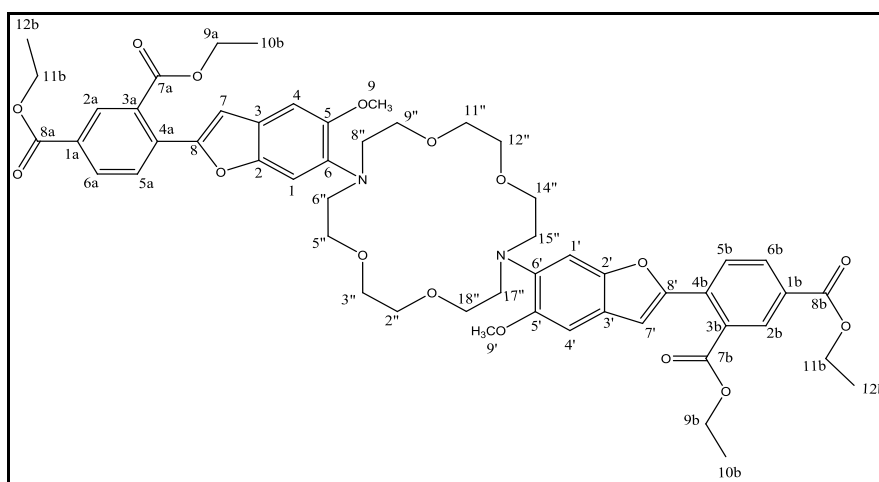


Figura 2.31 - Estrutura do 4,4'-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5-metoxibenzofurano-6,2-di-il)di-isoftalato de tetra-etilo (**27**).

Antes de prosseguir com a condensação do composto **3** à unidade de dextrano (**13**), tentou-se eliminar os catiões potássio da molécula por cromatografia de permuta iónica. O objectivo desta cromatografia foi o de permutar o catião potássio por hidrogénio, usando como resina catiónica Amberlite IRC-50 (H).^[24] Fizeram-se alguns ensaios em moléculas mais pequenas, de modo a confirmar se seria um método eficaz ou não: ácido benzóico (**28**) e ácido tereftálico (**29**). Em primeiro lugar, fez-se reagir um 1 equivalente de cada um dos ácidos com dois equivalentes de hidróxido de potássio (KOH), dando origem aos respectivos benzoato de potássio e tereftalato de potássio. De seguida, prepararam-se duas colunas cromatográficas gravíticas e empacotaram-se com a resina catiónica escolhida; o eluente usado foi a água. As fracções recolhidas foram seguidas por TLC e, em tendo recolhido toda a amostra introduzida na coluna, secaram-se as fracções que foram, por fim, caracterizadas por espectroscopia de RMN. Tendo a confirmação de que as fracções recolhidas se tratavam, de facto, do respectivo ácido inicial, prosseguiu-se com a permuta catiónica no composto **3** (PBFI). As fracções permutadas foram recolhidas e, mais uma vez, foi feita nova análise por ICP:

Tabela 2.2 - Resultados da Análise de ICP para o PBFI (**3**) após ter sido purificado por permuta catiónica, em termos de teor em catiões de potássio.

Amostra	Intensidade	K ⁺ (mg/l)
Padrão: H ₂ O	3252	0,023
PBFI (3)	33073	0,602

Como se pode observar na tabela anterior, e comparando com os resultados registados na tabela 2.1, o teor em catiões de potássio baixou drasticamente. Este procedimento ficou optimizado para ser uma via possível na ligação do composto **3** ao dextrano.

Ainda antes de avançar para a condensação de **3** com dextrano, este foi analisado quanto à sua fluorescência, por UV/Vis. Uma das características físicas deste tipo de compostos é o ser fluorescente a comprimentos de onda na gama do ultravioleta e raios – X. Foi então preparada uma solução de PBFI (**3**) em água para obter espectros de absorção e emissão. O espectro de absorção (figura 2.32) apresentou um $\lambda_{\text{máx}}=346,9$ nm. O espectro de emissão (figura 2.33) foi, depois, adquirido com uma excitação a este $\lambda_{\text{máx}}$ e obtiveram-se dois máximos: a $\lambda_{\text{em1}}=421,6$ nm e a $\lambda_{\text{em2}}=601,5$ nm. Estes dados confirmam um comportamento adequado do fluoroionóforo como sonda fluorescente, uma vez que emite fluorescência na zona de comprimentos de onda pretendidos.^[3]

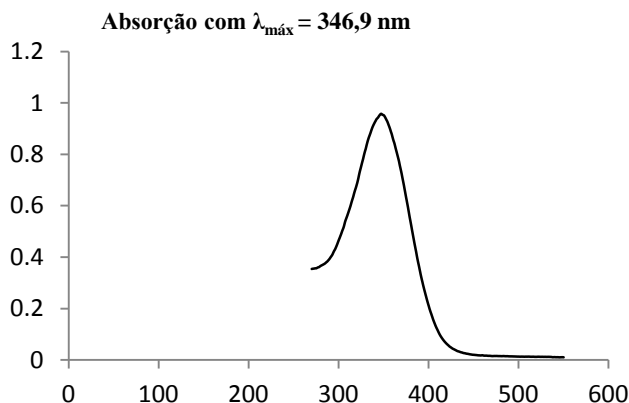


Figura 2.32 - Espectro de absorção do PBF1 (3).

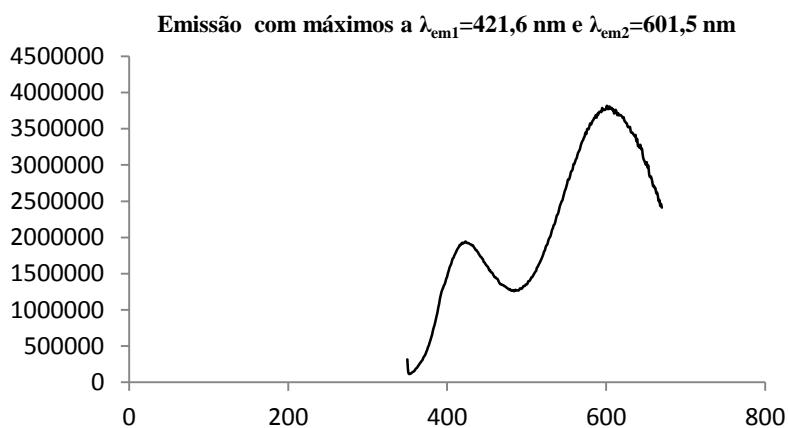


Figura 2.33 - Espectro de emissão do PBF1 (3) adquirido após excitação a um $\lambda_{\text{máx}} = 346,9 \text{ nm}$.

2.2. Preparação do Sensor Fluorescente de Potássio: PBF1 / Dextrano (16)

A condensação de **3**, através do seu grupo funcional carboxilato, à unidade de dextrano (dextrano 9,000-11,000) foi conseguida por uma transformação de dois passos: a activação do carboxilato através do seu derivado de benzotriazole (**15**) seguido da condensação com dextrano (**13**) na presença de hidreto de sódio. A estrutura do intermediário **15** foi confirmada por espectroscopia de RMN onde foi possível verificar a presença de duas unidades de benzotriazole na estrutura final.

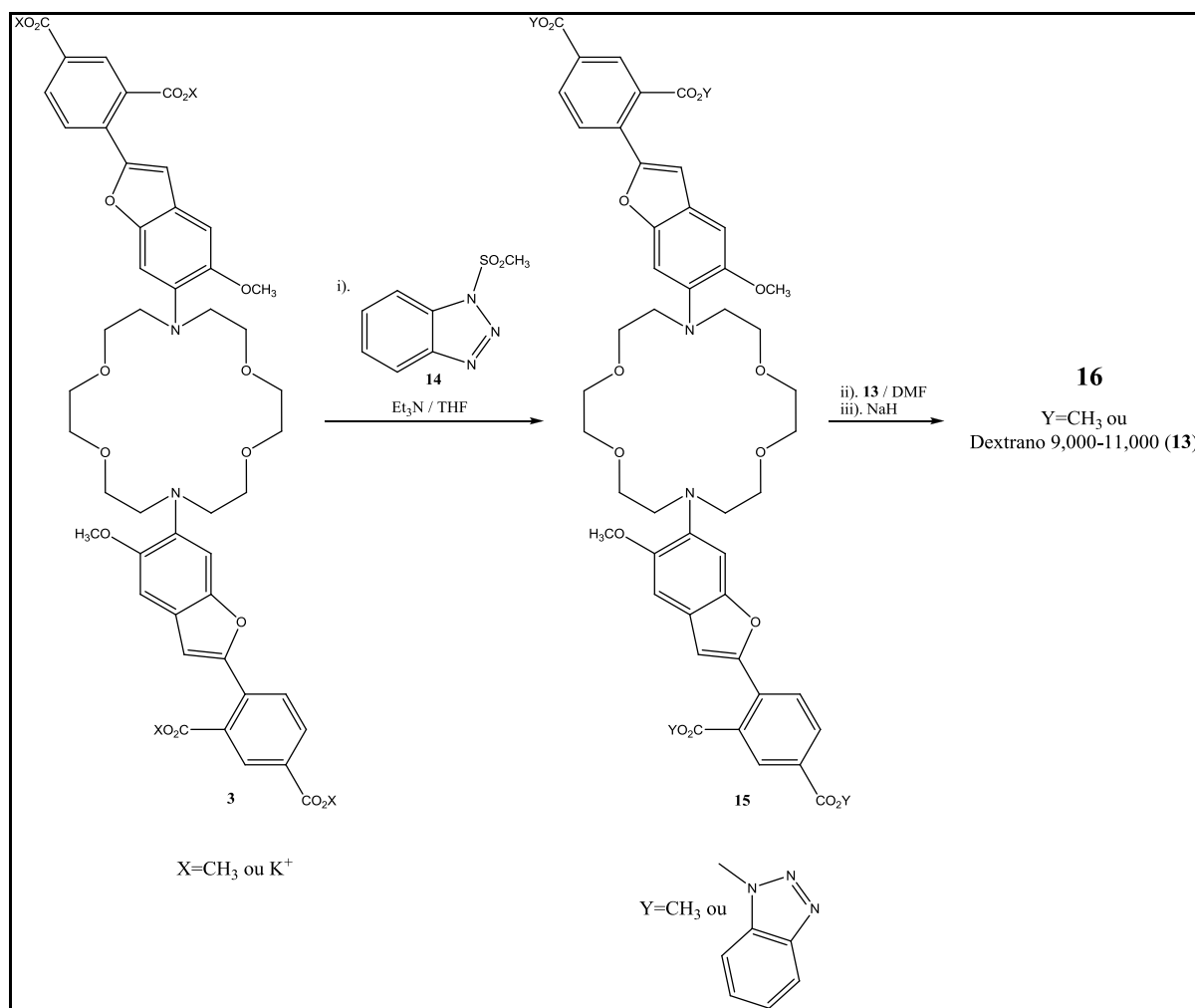


Figura 2.34 - Passos reaccionais envolvidos na condensação de 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'- metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio ou PBFI (3) à unidade de Dextrano 9,000-11,000 (13), através da formação do intermediário PBFI di(benzo[1,2,3]triazole) (15).

O composto final, PBFI/Dextrano (16) é solúvel em água, fluorescente e, por análise de ICP, não foram detectados iões de potássio na sua estrutura. O comportamento fluorescente do produto final foi estudado do mesmo modo que o PBFI (Tsien).^[3]

2.2.1. Ensaio de adição do Dextrano ao PBFI com recurso ao CDI

Para preparar o Sensor Fluorescente de Potássio: PBFI/Dextrano (16) foi abordada, inicialmente, uma metodologia diferente da demonstrada na figura 2.34. Foi utilizado o método de Heinze^[19], que consiste de uma reacção de esterificação do dextrano com o PBFI na presença de *N,N'*-carbonildiimidazole (CDI). O CDI é um óptimo agente de activação dos grupos carboxílicos dos ácidos e, por isso, foi utilizado este método. Fez-se um primeiro ensaio com o PBFI sintetizado (3),

usando uma proporção de AGU:CDI:PBFI de 1:1:1 (sendo que AGU corresponde a Unidade de Glucose Anidra). Para garantir a activação do CDI, isto é, para garantir que o CDI iria atacar o ácido carboxílico removendo o protão do –OH, adicionou-se uma quantidade muito pequena de ácido trifluoroacético (CF₃COOH). O resíduo obtido foi analisado por espectroscopia de RMN e verificou-se que a reacção não foi bem sucedida, pois não ocorreu ligação do dextrano ao PBFI. Foram então elaborados alguns ensaios na tentativa de otimizar as condições experimentais e averiguar se este método seria, ou não, o método ideal para sintetizar o sensor fluorescente de potássio (PBFI/Dextrano). Ensaaiaram-se reacções de esterificação em ácidos carboxílicos (**28** - **31**) mais simples, recorrendo ao uso de Dextrano 9,000-11,000 (**13**) e Amino Dextrano 10,000 (**17**), em proporções diferentes, como se pode visualizar na tabela seguinte.

Tabela 2.3 - Resultados da esterificação do dextrano ou amino dextrano com Ácido Benzoico (**28**), Ácido Tereftálico (**29**), Ácido ftálico (**30**) e Ácido isoftálico (**31**), por activação do ácido carboxílico com CDI em DMSO (80 °C, 20 h).

Ácido	AGU:CDI:Ác.Carboxílico	AGU	Resultado
Carboxílico			
28	1:1:1	Dextrano	NO ^{a)}
28	1:3:3	Dextrano	FP ^{b)} NO ^{a)}
29	1:1:1	Dextrano	FP ^{b)}
29	1:1:1	Amino Dextrano	FP ^{b)}
29	1:1:1	Dextrano	FP ^{b)}
29	1:1:1	Amino Dextrano	NO ^{a)}
30	1:1:1	Amino Dextrano	FP ^{b)}
31	1:3:3	Dextrano	FP ^{b)}

^{a)} Nenhuma Observação; ^{b)} Formação de Precipitado. Na segunda linha estão representados dois resultados diferentes, uma vez que foram usados diferentes solventes de precipitação em cada ensaio: apenas houve formação de precipitado no composto **28** quando usado metanol.

Os precipitados foram devidamente analisados e estudados por espectroscopia de ¹H-RMN e ¹³C-RMN. Verificou-se, por exemplo, que nos ensaios realizados com Amino Dextrano, os precipitados formados perderam a sua solubilidade em solventes aquosos, sendo apenas possível a sua caracterização por RMN usando DMSO-*d*₆ como solvente. Este facto pode estar relacionado com a facilidade com que a cadeia polimérica do Amino Dextrano tem em fazer crosslinking. ^[15] Nos ensaios realizados com Dextrano foi observado o mesmo fenómeno mostrando, no entanto, melhores resultados na formação de precipitado. Como o objectivo final é sintetizar um sensor fluorescente que

seja solúvel em meio aquoso, este método foi abandonado e foram propostas outras condições de condensação ao dextrano.

2.2.2. Ensaio de adição do Dextrano ao PBFi com *N*-(1-metanosulfonyl)benzotriazole (14)

2.2.2.1. Preparação do intermediário PBFi di(benzo[1,2,3]triazole) (15)

O primeiro passo envolvido na condensação do composto **3** com o dextrano 9,000-11,000 (**13**) consistiu na activação do carboxilato através da formação do seu derivado de benzotriazole (**15**), pelo Método B descrito por Katritzky.^[20] Para este procedimento ser possível, foi necessário sintetizar o reagente **14**^[25] pelo método de síntese devidamente descrito no capítulo 3. Como foi explicado em secções anteriores, a presença de cationes potássio na molécula suscitaram algumas dúvidas em termos de eficiência das reacções seguintes. Como tal, antes de iniciarmos o procedimento exemplificado na figura 2.37, fizeram-se ensaios em dois tipos de material de partida: a partir do ácido tereftálico (**29**) e a partir do tereftalato de potássio (**32**).

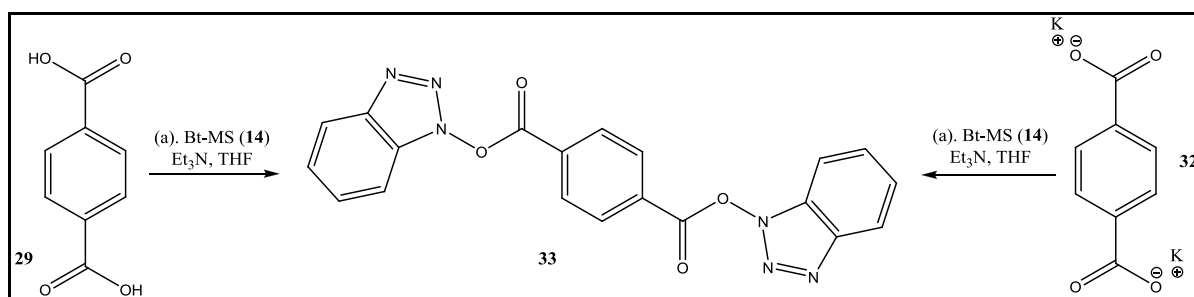


Figura 2.35 - Procedimento experimental utilizado para a preparação do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) (**33**), a partir dos materiais de partida **29** (ácido tereftálico) e **32** (tereftalato de potássio).

O procedimento experimental adoptado em cada um dos casos foi exactamente o mesmo que se utilizou no material de partida **3**. O produto formado em cada caso, demonstrado através de análises espectroscópicas de ¹H-RMN e ¹³C-RMN, foi exactamente o mesmo (**33**).

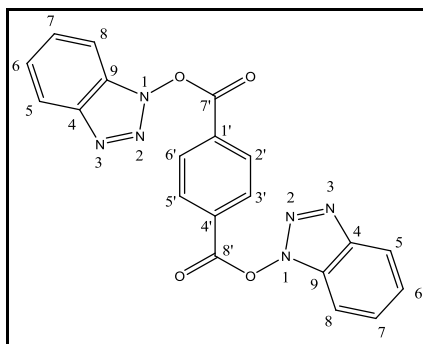


Figura 2.36 - Estrutura do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) (33).

Por observação dos espectros de próton de ambos os ensaios (figura 6.26), verificamos que ambos apresentam sinais com o mesmo comportamento e cujos desvios químicos são muito semelhantes, ou mesmo iguais. A δ 8,42 ppm, está representado um singuleto com integração de quatro prótons correspondentes aos prótons H-2', H-3', H-5' e H-6' do anel aromático tereftálico; os sinais seguintes, representados como dupletos, correspondem aos prótons H-5 e H-8 da unidade de benzotriazole (δ 8,21 ppm e δ 8,26 ppm, respectivamente). Como o próton H-8 está mais próximo do grupo éster, encontra-se ligeiramente mais desblindado que o próton H-5 e, por esse motivo, apresenta um desvio químico superior. Por fim, os sinais correspondentes aos prótons H-6 e H-7, obtidos na forma de tripletos, aparecem com desvios químicos de δ 7,76 ppm e δ 7,60 ppm, respectivamente. Estes sinais, tanto no procedimento (a) como no procedimento (b), têm exactamente o mesmo desvio químico mas com constantes de acoplamento ligeiramente diferentes.

A activação do grupo carboxilato através da formação de um intermediário de benzotriazole, partindo tanto do ácido carboxílico como do seu derivado de sal de potássio, mostrou ser bastante eficaz e, como tal, foi efectuada no composto **3** na sua forma bruta (mistura de sais carboxilatos de potássio e metil ésteres). O mecanismo reaccional encontra-se na figura seguinte:

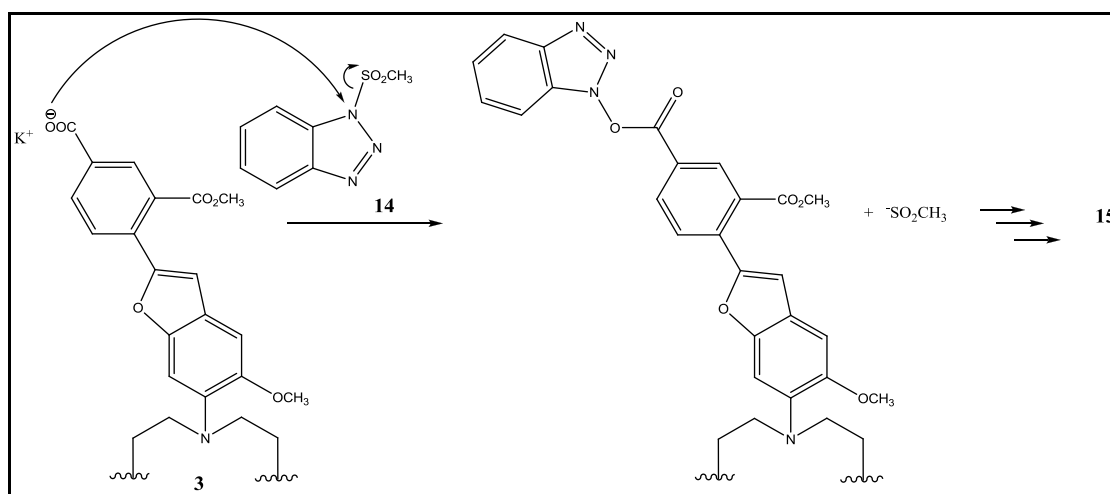


Figura 2.37 - Mecanismo Reaccional envolvido na formação do intermediário **15**, através de uma simples substituição nucleofílica entre **3** e **14**.

A escolha de *N*-(1-metanosulfonil)benzotriazole (**14**) como reagente activante teve a sua importância por ser um bom grupo de saída e por ter sido utilizado como reagente nos estudos efectuados por Katritzky ^[20] nos ácidos tereftálico (**29**) e isoftálico (**31**). O produto obtido (**15**) foi isolado por cromatografia líquida com um rendimento de 23%. Apesar de ser um rendimento baixo, este método mostrou ser bastante eficaz na formação do intermediário pretendido e, por esse motivo, foi o método adoptado neste estudo.

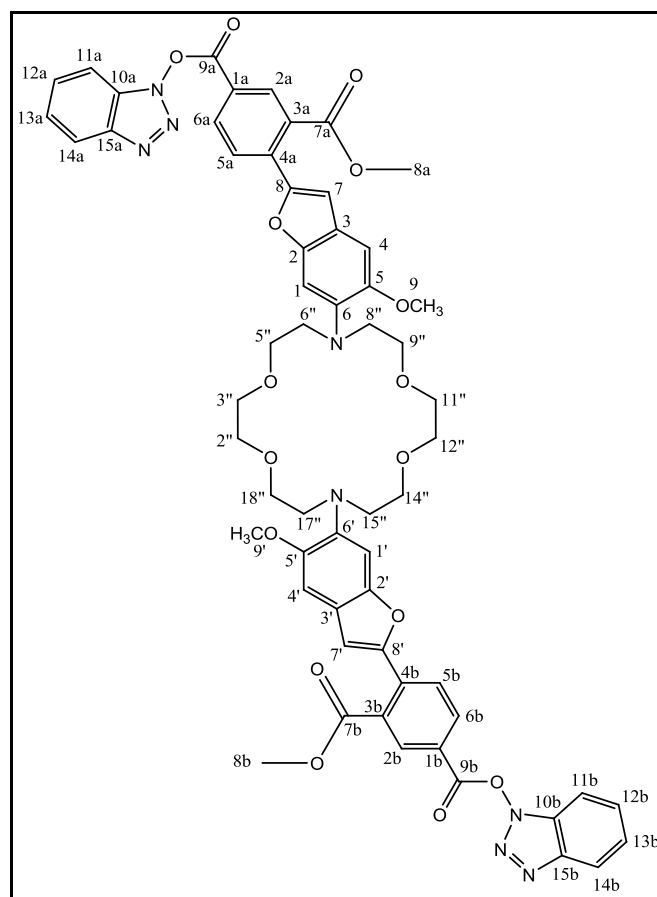


Figura 2.38 - Estrutura do PBFi di(benzo[1,2,3]triazole) (**15**).

A caracterização da estrutura molecular sintetizada foi efectuada através de análises espectroscópicas de ¹H-RMN (figura 6.29) e ¹³C-RMN (figura 6.30). Os prótons e carbonos não foram atribuídos um a um, uma vez que só por espectroscopia 1D não foi possível. Teria de se ter feito análises espectroscópicas mais aprofundadas como, por exemplo, espectroscopia 2D (HMQC e HMBC). Mas, observando os resultados da espectroscopia 1D, foi possível verificar a presença do composto pretendido. No espectro de próton são nítidos dois conjuntos de sinais de partes diferentes da molécula: a campo baixo (δ 6,51-8,53 ppm) temos um conjunto de sinais correspondentes aos 16H do cromóforo e a campo alto (δ 2,93-3,96 ppm) um conjunto de sinais correspondentes aos 24H do éter de coroa. Isto porque apresentam desvios químicos característicos desses grupos. Estes dados

foram adquiridos ao longo da interpretação dos espectros anteriores e com os resultados obtidos na literatura. [20]

2.2.2.2. Preparação do Sensor Fluorescente de Potássio: PBF1/Dextrano (16)

O segundo, e último, passo consistiu na condensação do intermediário de benzotriazole (15) com dextrano 9,000-11,000 (13), na presença de hidreto de sódio. Também nesta parte foi efectuado um ensaio numa molécula mais pequena antes de prosseguir com o estudo no intermediário 15. Para o ensaio preliminar aproveitou-se o produto 33, obtido anteriormente, e a condensação com o dextrano ocorreu com sucesso. O produto obtido (34) foi isolado através de algumas lavagens com etanol (seco) e foi, posteriormente, caracterizado por espectroscopia de ^1H -RMN (figura 6.27) e ^{13}C -RMN (figura 6.28).

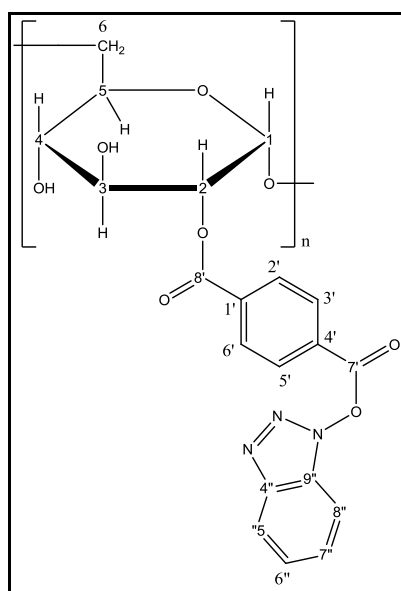


Figura 2.39 - Estrutura proposta do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) / Dextrano (34).

Mais uma vez, recorreu-se apenas a espectroscopia 1D para confirmar se estaríamos na presença do produto pretendido. Nesta fase, não foi necessária uma atribuição muito rigorosa da estrutura final do composto, visto tratar-se de um ensaio de optimização. Observando o espectro de protão consegue visualizar-se duas zonas distintas de desvios químicos: a δ 7,21 – 8,34 ppm estão representados os protões correspondentes à unidade de benzotriazole e a δ 3,41 – 4,87 ppm estão representados os protões correspondentes à unidade de dextrano (sendo que a δ 4,87 ppm está representado um sinal em forma de singuleto característico do protão anomérico de cada uma das unidades de glucose do dextrano). Comparando os espectros de carbono do composto 33 e agora do

produto **34**, verificou-se um desvio significativo no sinal do carbono do grupo éster: de δ 165,79 ppm para δ 175,66 ppm e δ 171,43 ppm. O facto de se diferenciarem dois sinais de carbonos na zona característica dos grupos ésteres, significou que a ligação do dextrano ao composto **33** ocorreu e deu-se apenas num dos lados da molécula.

Apesar do reagente **14** ser um bom agente activante e um bom grupo de saída, revelou algumas desvantagens no seu uso: o facto de ser um composto muito difícil de eliminar. No entanto, este ensaio foi adoptado e prosseguiu-se com a reacção no intermediário **15**.

Aplicou-se o mesmo procedimento experimental ao intermediário **15** e o mecanismo reaccional proposto encontra-se descrito na figura 2.40. É um mecanismo reaccional proposto, uma vez que não se sabe a estrutura completa do dextrano e porque através de espectroscopia de RMN não foi possível identificar a estrutura do produto final **16**. Sabe-se apenas que ocorreu ligação entre o dextrano e o intermediário **15**, com eliminação de 1-hidroxibenzotriazole (HBT) (**35**).

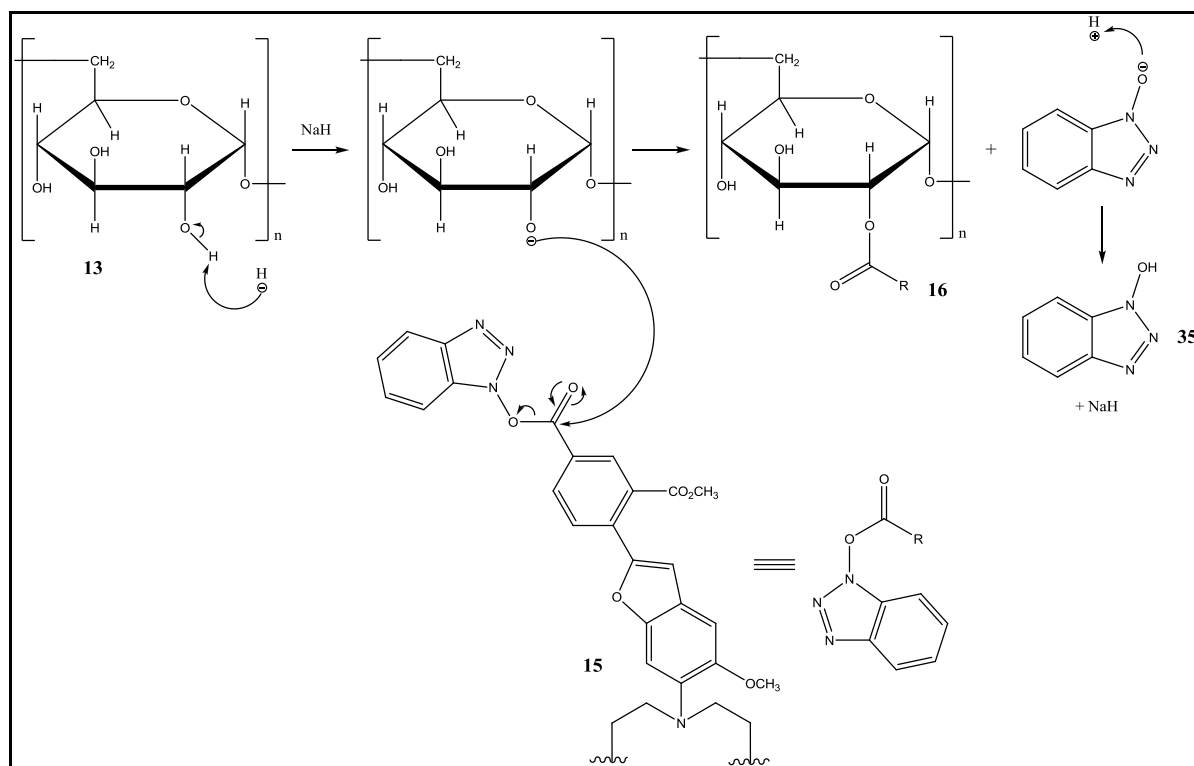


Figura 2.40 - Mecanismo Reaccional da condensação do intermediário PBFi di(benzo[1,2,3]triazole) (**15**) ao dextrano (**13**), na presença de hidreto de sódio.

Estudos efectuados em reacções de esterificação entre ácidos carboxílicos bioactivos e o dextrano mostraram diferentes reactividades nos grupos hidroxilo das posições C-2, C-3 e C-4 da unidade de glucose anidra (AGU).^[18] A reactividade destas três posições decresce na ordem:

C2>C4>C3. Assim sendo, no mecanismo proposto, o anião hidreto abstrai preferencialmente o protão do grupo hidroxilo da posição C-2 e o nucleófilo formado ataca o carbono do grupo carbonilo do intermediário **15**, com saída de HBT (**35**). O produto foi purificado através de algumas lavagens com etanol seco: o etanol, não sendo um solvente aquoso, não dissolve o dextrano mas consegue dissolver todos os outros componentes da amostra (como o HBT).

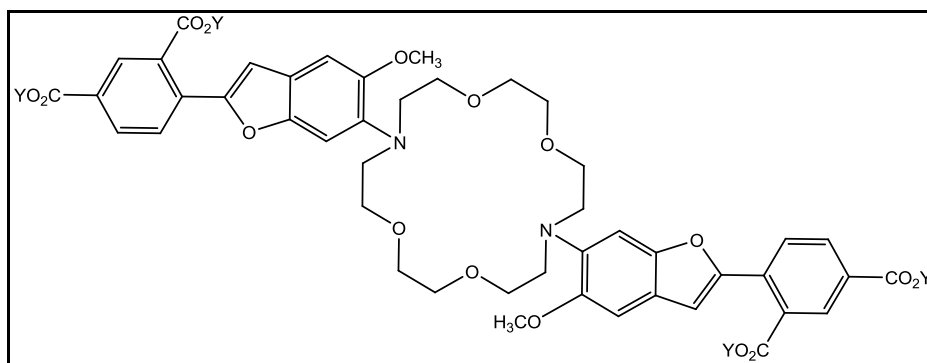


Figura 2.41 - Estrutura do PBFI/Dextrano (**16**), onde Y representa CH₃ ou dextrano 9,000-11,000 (**13**).

Por TLC controlou-se o número de lavagens necessárias e o produto final, já isolado e devidamente seco, foi caracterizado através de espectroscopia de ¹H-RMN e ¹³C-RMN, UV/Vis e ICP.

Pela análise espectroscópica de ¹H-RMN (figura 2.42-a) e ¹³C-RMN (figura 2.42-b) observaram-se vários aspectos importantes que levaram a uma conclusão favorável ao objectivo deste estudo. Pelo espectro do protão foi possível distinguir duas zonas no campo referentes a duas unidades integrantes do composto **16**: no rectângulo cor-de-laranja estão representados os protões da unidade de benzofurano (δ 6,70-8,34 ppm) e no rectângulo azul estão representados os protões do dextrano e do éter de coroa (δ 2,69-3,89 ppm) (é de salientar que os sinais a δ 3,87 (d; J=7,1) e δ 3,81 (d; J=9,3) correspondem a benzotriazole ainda presente na amostra, após as lavagens com etanol). Estas observações foram efectuadas com base nas integrações dos sinais e nos espectros obtidos para os compostos sintetizados anteriormente. A δ 4,87 ppm está representado o sinal característico do protão anomérico (C1-H) das várias unidades de glucose que constituem o dextrano.

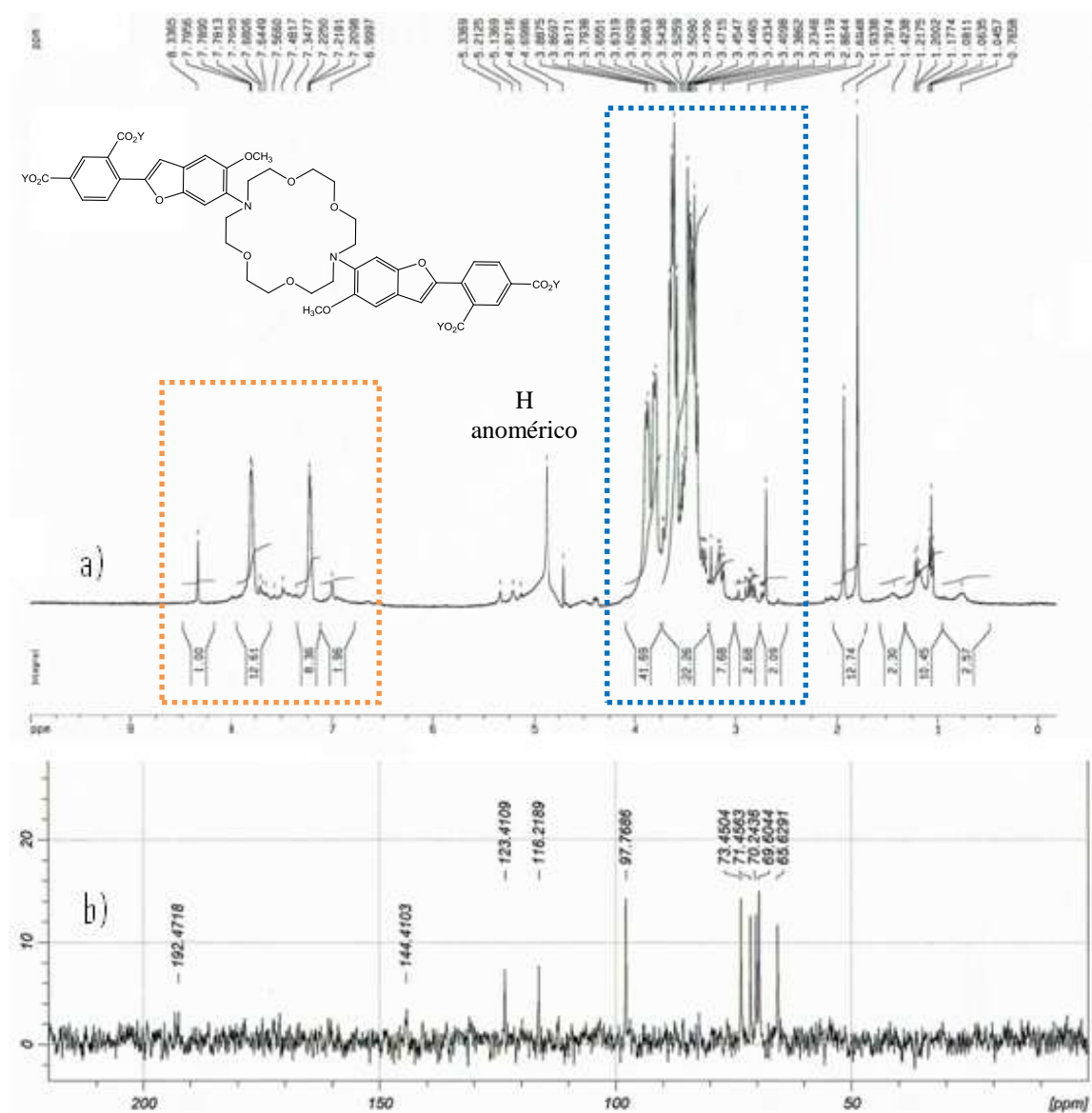


Figura 2.42 - Espectros de a) ^1H -RMN e b) ^{13}C -RMN do produto final PBFI/Dextrano (**16**), em D_2O (400 MHz). A cor – de – laranja está evidenciada a zona do espectro correspondente aos prótons da unidade Benzofurano (δ 6,70 – 8,34 ppm) e a azul está evidenciada a zona do espectro correspondente aos prótons do Dextrano e do éter de coroa (δ 2,69 – 3,89 ppm). A estrutura representada na figura apresenta $\text{Y} = \text{CH}_3$ ou dextrano 9,000-11,000 (**13**).

Para ter a certeza de que esta atribuição foi a correcta, foi obtido, nas mesmas condições de análise, o espectro de ^1H -RMN do dextrano 9,000-11,000 (**13**). Na figura seguinte estão representados a expansão da zona azul da figura 2.42-a e o espectro do dextrano (figura 2.43-b): a forma dos sinais é exactamente a mesma mas com uma diferença considerável na integração.

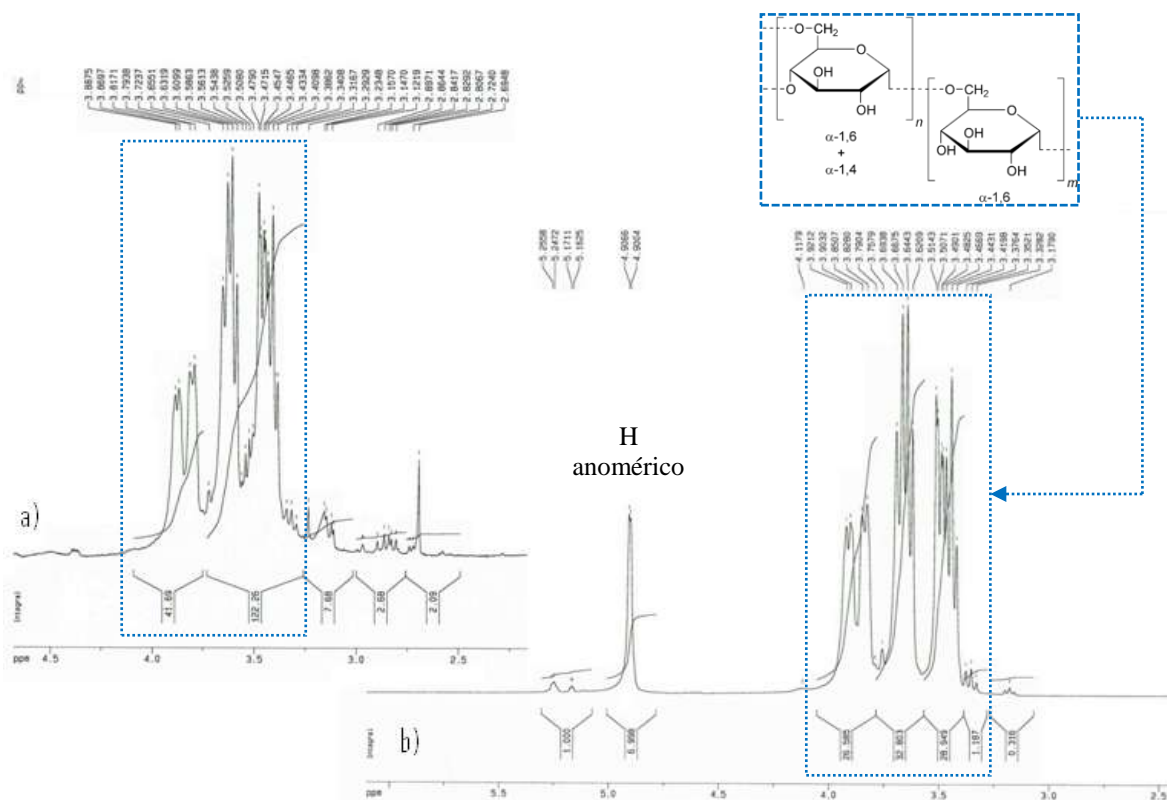


Figura 2.43 - Espectros de ^1H -RMN de a) PBFI/Dextrano (**16**), expansão do campo δ 2,69 – 3,89 ppm e b) Dextrano (**13**), em D_2O (400 MHz). Comparação entre ambos: têm exactamente a mesma forma mas com integrações diferentes e um ligeiro desfasamento nos respectivos desvios químicos.

Esta diferença na integração dos sinais é mais uma evidência de que outros prótons se encontram na mesma zona de desvios químicos: os 24H do éter de coroa. Mas, apenas por observação dos espectros de próton não se consegue afirmar que ocorreu ligação entre as duas unidades estruturais: o PBFI (**3**) e o dextrano (**13**). Recorreu-se, então, ao espectro de carbono (figura 2.42 – b) onde se pode visualizar um sinal a campo baixo com um desvio químico de δ 192,47 ppm. Ocorreu um grande desvio químico quando se fez reagir o dextrano com o intermediário **15**, cujos grupos ésteres se encontravam entre δ 168,19 – 165,67 ppm. A condensação ocorreu com sucesso mas, no entanto, não foi possível identificar por nenhuma técnica analítica a estrutura molecular exacta do PBFI/Dextrano (**16**). Através da análise por MALDI-TOF/MS, em conjugação com a análise feita no dextrano de partida, foi apenas possível concluir que a taxa de incorporação do fluoroionóforo ao dextrano foi baixa.

Depois de sintetizado, o composto **16** foi sujeito a dois tipos de análise cujos resultados são essenciais para o seu posterior uso *in vivo* em organelos biológicos vegetais: ICP e Fluorescência. Na tabela seguinte podem ser observados os resultados obtidos da análise de ICP, que mostram a ausência de catiões potássio no composto final.

Tabela 2.4 - Resultados da Análise de ICP para o PBF/Dextrano (**16**), em termos de teor em cátions de potássio.

Amostra	Intensidade	K ⁺ (mg/l)
Padrão: H ₂ O	285	0,056
PBF/Dextrano (16)	3238	0,638

De seguida, foi estudado o comportamento fluorescente do composto **16**, usando as condições descritas para o PBF, um dos cromóforos de potássio descrito na literatura.^[3] O composto **16** é fluorescente, como o composto de partida **3**, com um máximo de emissão fluorescente a 553 nm (601 nm no caso do composto **3**). A intensidade do espectro de excitação fluorescente aumenta com o aumento da concentração de K⁺ numa solução tampão de força iónica constante. Esta variação pode ser observada no espectro de excitação fluorescente do composto **16** (figura 2.44) como uma função crescente [K⁺] e decrescente [Na⁺] em soluções de 10 mM de MOPS e KOH a pH 7.05. A curva mais baixa foi obtida com 130 mM de NaCl e a curva mais alta foi adquirida em 130 mM de KCl. As curvas intermédias com 32,5 – 97,5 mM [K⁺] foram obtidas substituindo 25, 50 e 75% da menor [K⁺] pela mesma quantidade da solução de 130 mM de KCl do composto **16**. Este comportamento é o adequado para atingir uma boa especificidade para os organelos em estudo e, nomeadamente, no estudo de ensaios biológicos *in vivo*.

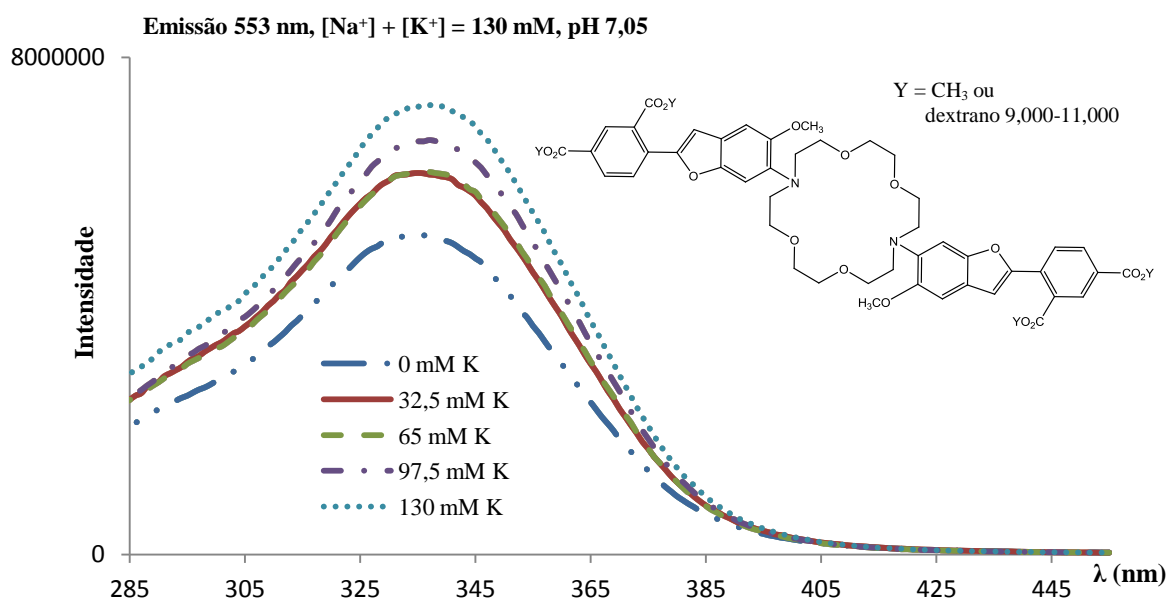


Figura 2.44 - Espectro de excitação fluorescente do sensor sintetizado (**16**) como uma função de soluções crescentes [K⁺] e decrescentes [Na⁺]. A curva mais baixa foi obtida com 130 mM de NaCl, 10 mM de MOPS e KOH a pH 7.05. A curva mais alta foi adquirida com 130 mM de KCl, 10 mM de MOPS e KOH a pH 7,05.

3. Conclusão

O principal objectivo deste estudo foi sintetizar o sensor fluorescente PBFI/Dextrano (**16**) de modo a poder-se quantificar iões de potássio citosólicos em sistemas biológicos. Esta síntese deu-se em duas etapas: preparação do fluoroionóforo de benzofuranoisofalato de potássio (PBFI) (**3**) e posterior condensação, através do seu grupo funcional carboxilato, à unidade de dextrano 9,000-11,000 (**13**). Escolheu-se o PBFI por ser um indicador fluorescente conhecido da literatura, comercial e específico para capturar iões de potássio. Mas, como mencionado no trabalho, este indicador, por si só, demonstrou algumas limitações por, aparentemente, apresentar um tamanho reduzido. Este fica retido nos vacúolos e em compartimentos citosólicos da planta. Para contornar este problema, condensou-se o fluoroionóforo a uma unidade de dextrano. A escolha deste polissacárido surgiu de estudos efectuados na formação de ésteres de dextrano bioactivos e pelas suas características inerentes, tais como: ser hidrofílico, ter um peso molecular elevado, boa solubilidade em água, baixa toxicidade e ser inerte.

A primeira parte deste trabalho consistiu na preparação do PBFI (**3**) através da condensação da unidade estrutural 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (**4**) a duas unidades de estruturais de 4-metilbromo-isofalato de dimetilo (**5**). Este processo convergente foi baseado nos estudos publicados por Tsien e colaboradores. O procedimento experimental usado na preparação de **4** teve um rendimento muito baixo de, aproximadamente, 16% tendo sido difícil reproduzir em grande escala. Partiu-se do 18-diazocoroa-6 (**1**) e da *p*-benzoquinona (**18**) para formar o intermediário 2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (**6**), através de uma adição nucleofílica a C=C-C=O. Para metilar **6**, procedeu-se a uma hidrogenação catalítica seguida de metilação com sulfato de dimetilo, mantendo o sistema sempre em atmosfera de hidrogénio e a temperatura próxima da temperatura ambiente. Estes dois factores foram muito importantes na formação do 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (**7**) que, no entanto, não foi isolado na sua totalidade. O método de purificação ainda não está optimizado sendo portanto necessárias novas abordagens para se conseguir o produto puro e, consequentemente, uma melhor resolução dos espectros de ressonância magnética nuclear. O intermediário seguinte, o 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (**8**), foi preparado utilizando o método de formilação de Vilsmeier - Haak e, por fim, através de uma desmetilação regioselectiva obteve-se o **4**. Paralelamente sintetizou-se o **5**, de acordo com os trabalhos realizados por Anzalone. Usou-se 2,4-diclorotolueno (**9**) como material de partida e obteve-se o composto monobromado com um rendimento global de 22%. Depois de sintetizadas as duas unidades que são necessárias à construção do PBFI, procedeu-se à condensação de ambas, em dois passos reaccionais, tratados com carbonato de potássio. O fluoroionóforo foi obtido como uma mistura de sais de carboxilatos de potássio e ésteres metílicos. Foi purificado por cromatografia de fase reversa com 19% de rendimento e foram detectados dois iões de potássio por molécula, através da técnica de ICP. Esses catiões podem ser permutados por hidrogénio, por

cromatografia catiónica, como foi testado neste trabalho. No entanto, não mostrou ser um passo importante para o seguimento do estudo e, uma vez que faz baixar o rendimento do produto, desprezou-se este procedimento. A fluorescência do PBFI foi analisada por espectroscopia de Ultravioleta / Visível e verificaram-se dois máximos de emissão a $\lambda_{em1}=421,6$ nm e a $\lambda_{em2}=601,5$ nm. Estes dados confirmaram um comportamento adequado do fluoroionóforo como sonda fluorescente, uma vez que emite fluorescência na zona de comprimentos de onda pretendidos.

A segunda parte do trabalho consistiu na condensação de **3**, através do seu grupo funcional carboxilato, à unidade de dextrano por dois passos reaccionais: activação do carboxilato através do seu derivado de benzotriazole (**15**) seguido da condensação com dextrano (**13**) na presença de hidreto de sódio. O método de Heinze, primeiro método testado, que usa *N,N'*-carbonildiimidazole (CDI) para activar o grupo carboxílico dos ácidos, não foi eficaz uma vez que os produtos formados não apresentaram a principal propriedade requerida: ser solúvel em água. Optou-se por um novo método, o método de Katritzky, que utiliza **14** para activar os grupos. Apesar de eficaz, originou um produto com baixo rendimento (23%). A condensação com o dextrano foi feita sempre a baixas temperaturas (0 °C), tendo-se formado com sucesso o sensor fluorescente **16** e também um produto secundário (**35**) muito difícil de se eliminar pelo procedimento de purificação adoptado. É pois, outro método de purificação que necessita ser optimizado. O produto final (**16**) foi caracterizado por espectroscopia de RMN e MALDI-TOF/MS e analisado pelas técnicas de ICP-AES e Fluorescência. Não foi possível fazer uma atribuição detalhada da estrutura, devido à sua complexidade, mas foi possível concluir que se formou uma função éster entre o fluoroionóforo e o dextrano. O sensor está ausente de qualquer vestígio de iões potássio, é solúvel em água e apresenta elevada massa molecular. Por análise de fluorescência, verificou-se que o sensor é fluorescente e apresenta um máximo de emissão fluorescente a 553 nm. A intensidade do espectro de excitação fluorescente aumentou com o aumento da concentração de K^+ numa solução tampão de força iónica constante. Este comportamento é o adequado para atingir uma boa especificidade para os organelos em estudo e, nomeadamente, no estudo de ensaios biológicos *in vivo*.

4. Parte Experimental

4.1. Reagentes, Solventes e Materiais

Utilizaram-se reagentes comerciais e p.a. (*pro analysis*) de diferentes marcas comerciais (Sigma Aldrich, Fluka e Merck) e usados como recebidos, com a exceção do *N,N'*-carbonildiimidazole (CDI), que foi recristalizado, e do Dextrano e Amino Dextrano, que foram secos numa pistola de secagem a 80°C. O Dextrano utilizado neste estudo foi o dextrano produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* de peso molecular 9,000-11,000 Da (Sigma Aldrich) e usou-se o Amino Dextrano 10,000 Da (4 moles de amina/mole) da Invitrogen. O reagente *N*(1-metanosulfonil)benzotriazole (Bt-MS) foi preparado no laboratório de acordo com o método descrito na literatura ^[25] e que se encontra no ponto 4.7.2.1.

Os solventes utilizados foram adquiridos à Sigma Aldrich, Aga, Valente e Ribeiro e Panreac. Sempre que necessário, os solventes foram purificados e secos de acordo com os métodos descritos por Perrin. ^[26]

Para a realização das cromatografias de camada fina (c.c.f. ou TLC) foram utilizadas placas de sílica gel 60 F₂₅₄ de 0,2 mm de espessura (Merck, Art 5554), placas de alumínio óxido 60 F₂₅₄ de 0,2 mm de espessura (Merck, Art 5550) e placas de sílica gel 60 RP-18 F₂₅₄S de 0,2 mm de espessura (Merck, Art 5559). As placas foram eluídas nos seguintes solventes: CH₂Cl₂; CH₂Cl₂/*n*-hexano (7:3); CHCl₃/MeOH (4% e 10%), AcOEt/MeOH (4%); CH₂Cl₂/EtOH (10% e 12%). Cada TLC foi visualizada à luz ultravioleta a comprimentos de onda de 254 nm e /ou 366 nm. Estas foram reveladas maioritariamente pelos seguintes reveladores: Iodo, DNP (2,4-dinitrofenilhidrazina) e Ácido Sulfúrico:Metanol (1:1). ^[27] A utilização de qualquer outro revelador será indicada para cada caso.

Nas cromatografias líquidas em coluna de fase normal foi utilizada sílica gel 60, 70-230 “mesh” (Merck, Art 7734) e alumina neutra de 0,063-0,200 mm de espessura (Aluminium oxide 90 active, neutral – activity I, Merck Art 1077). Nas cromatografias líquidas em coluna de fase reversa utilizou-se sílica LiChroprep[®] RP-18, 40-63 µm (Merck, Art 13900). Todas as amostras purificadas foram adsorvidas em celite imediatamente antes de serem introduzidas na coluna (caso não seja dito nada em contrário). Cromatografias por permuta iónica foram realizadas sobre Amberlite Resin IRC-50 (H) como resina catiónica. Todas as cromatografias líquidas foram seguidas por TLC.

Os compostos sintetizados foram devidamente identificados e caracterizados através de técnicas espectroscópicas de Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massa (ME). A presença e / ou ausência de iões potássio no Indicador PBF1 (**3**) e no Sensor Fluorescente de Potássio: PBF1/Dextrano (**16**) foi observada recorrendo à Espectroscopia de Emissão Atómica por ICP (Plasma Indutivamente Acoplado). A propriedade de fluorescência destes compostos foi estudada pela técnica espectroscópica de UV (ultravioleta) a um comprimento de onde emissão na gama de 550-555 nm.

4.2. Métodos e Equipamentos

4.2.1. Espectroscopia de Infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos num espectrómetro de transformada de Fourier, Perkin Elmer, modelo Spectrum 1000. Os dados foram descritos da seguinte forma: suporte para a amostra (KBr – pastilha de brometo de potássio ou NaCl – discos de cloreto de sódio), número de onda de absorção máxima ($\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}), intensidade de banda (F – forte, M – média, f – fraca) e atribuição do grupo funcional envolvido na ligação.

4.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN foi obtida através do espectrómetro Bruker ARX (400 MHz). Os espectros de ^1H -RMN foram traçados a 400 MHz e os espectros de ^{13}C -RMN a 100,61 MHz. Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os espectros foram calibrados pelo sinal residual do solvente: CDCl_3 – δ 7,26 ppm ou δ 77,0 ppm; CD_3OD – δ 3,30 ppm ou δ 49,0 ppm e D_2O – δ 4,80 ppm. A análise dos dados é feita do seguinte modo: solvente, desvio químico (δ , ppm), intensidade relativa, multiplicidade de spin (s – singuleto, sl – singuleto largo, d – duplete, t – tripleto, dd – duplo de dupletos, m – multiplete), constante de acoplamento (J, MHz) e atribuição na estrutura. Os tubos de RMN (Sigma – Aldrich, Wilmad[®] NMR tubes) foram preparados com os seguintes solventes deuterados: CDCl_3 , CD_3OD , $\text{DMSO-}d_6$ e D_2O .

As experiências de *heteronuclear multiple quantum coherence* (HMQC) e *heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC) foram efectuadas usando os programas de pulso standard da Bruker.

4.2.3. Espectrometria de Massa (ME)

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro de massa Voyager DE PRO[™] Biospectrometry Workstation com analisador de tempo de voo e ionização por dessorção de matriz assistida a laser (MALDI). O dispositivo é equipado com laser de azoto (337 nm) e o analisador TOF permite trabalhar em modo linear e reflector. A marca do equipamento MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry) é a Applied Biosystems. Na análise MALDI-TOF-MS as amostras foram previamente dissolvidas e dispersas numa matriz (geralmente um ácido orgânico), colocadas numa placa MALDI e, após evaporação do solvente,

introduzida na fonte MALDI onde os dados espectrais amostra – matriz são irradiados por um feixe laser.

Os dados espectrais serão referidos pela seguinte ordem: razão massa/carga (m/z), atribuição do ião ou fragmento e intensidade do pico relativamente à do pico base (%).

4.2.4. Plasma Indutivamente Acoplado com Espectroscopia de Emissão Atômica (ICP-AES)

Dois compostos sintetizados (**3** e **16**) foram analisados por espectroscopia de Emissão Atômica (ICP – Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometer) com o objectivo de detectar a presença ou ausência do ião potássio em solução, e a respectiva proporcionalidade em relação à estrutura molecular em causa. Para tal, foi utilizado o espectrómetro Horiba Jobin-Yvon (França), modelo Ultima, equipado com gerador RF de 40,68 MHz, monocromador Czerny-Turner com 1,00 m (sequencial), amostrador automático AS500 e dispositivo CMA (Concomitant Metals Analyser). As amostras foram analisadas em solução aquosa: 1 mg de composto num volume total de 10 ml de água. Os resultados foram afectados do valor de concentração de potássio analisado na água da solução.

4.2.5. Espectroscopia de Ultravioleta / Visível (UV-Vis)

Os espectros de absorção foram obtidos através do espectrofotómetro UV-2501 PC de UV-Vis de Shimadzu.

4.2.6. Espectroscopia de Fluorescência

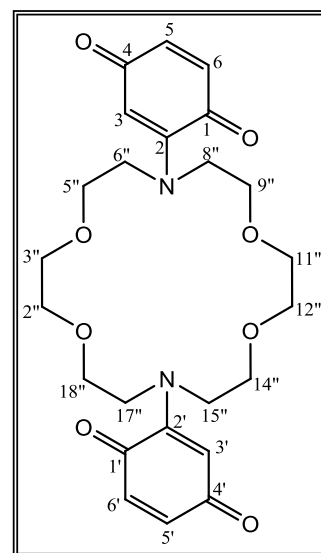
A análise de fluorescência do produto final (**16**) foi efectuada usando o espectrofluorómetro Fluorolog[®] da Horiba.

4.3. Reacções para a síntese do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4)

4.3.1. Preparação do 2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6) a partir de 1,4,10,13-tetra-oxa-7,16-diazaciclo-octadecano (1)

Preparou-se uma mistura de *p* – benzoquinona (**18**) (2,55 g; 23,6 mmol) e 1,4,10,13-tetra-oxa-7,16-diazaciclo-octadecano (**1**) (608,5 mg; 2,32 mmol) em 17 ml de uma solução 1:1 de CHCl₃ e MeOH. Deixou-se a agitar durante a noite a refluxo, em banho de areia. Evaporou-se a mistura reaccional à secura no evaporador rotativo e secou-se na bomba de vácuo. Dissolveu-se o sólido cor de vinho em CHCl₃ e umas gotas de MeOH e adsorveu-se em celite para posterior purificação em cromatografia de coluna, usando sílica gel como fase estacionária e AcOEt:MeOH (4%) como fase móvel. O composto isolado e devidamente seco na bomba de vácuo apresentou as seguintes características:

2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6), na forma de um sólido fino e electrostático, cor de vinho escuro com um rendimento de 89% (979,1 mg). ¹H-RMN (CDCl₃): δ (ppm) 6,59 (2H; dd; J₁=9,8 e J₂=1,9; H5 e H5'); 6,49 (2H; d; J=9,9; H6 e H6'); 5,65 (2H; sl; H3 e H3'); 3,74 (16H; s; H2'', H3'', H5'', H9'', H11'', H12'', H14'' e H18''), 3,61 (8H, s, H6'', H8'', H15'' e H17'') ¹³C-RMN (CDCl₃): δ (ppm) 185,41 (C1, C1', C4 e C4'); 149,46 (C2 e C2'); 137,52 (C5 e C5'); 134,62 (C6 e C6'); 104,25 (C3 e C3'); 70,74 (C6'', C8'', C15'' e C17''); 69,02 (C2'', C3'', C11'' e C12''); 53,09 (C5'', C9'', C14'' e C18'').

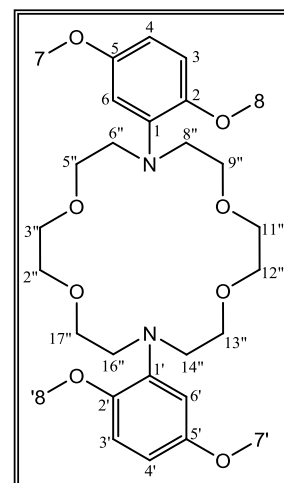


4.3.2. Preparação do 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (7) a partir de 2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) dicitclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6)

A bis – quinona (6) (532,8 mg; 1,123 mmol) foi dissolvida em 4,6 ml de MeOH (p.a.) e reduzida sob atmosfera de hidrogénio com 75,6 mg de paládio sob carvão (10%) como catalisador. A reacção deu-se à temperatura ambiente, sob agitação e durante, aproximadamente, três horas. A mistura mudou de cor de vinho para um castanho pardo, dando a redução (da cetona a álcool) por terminada. Renovou-se a atmosfera de H₂ e procedeu-se à metilação da mistura reduzida (sempre com o cuidado de manter a atmosfera de hidrogénio). A metilação ocorreu por adições alternadas de base (solução 4 M de hidróxido de tetrametilamónio penta - hidratado em MeOH p.a.) e de metilante (sulfato de dimetilo), espaçadas de 15 minutos. Em cada adição adicionaram-se 2 equivalentes e fizeram-se, no total, 10 adições espaçadas. Testes anteriores mostraram que este processo de desprotonação – metilação teve melhores resultados quando as adições eram feitas alternadamente ao invés de se adicionarem em simultâneo. Após terminada a metilação, a mistura reaccional encontrava-se estável para ser exposta ao ar, filtrando-a para um balão e evaporando todo o MeOH existente. Dissolveu-se o resíduo em água (52 ml) e verificou-se o pH. Como estava ácido (pH 1,0) adicionaram-se umas gotas de NH₃ 25% até pH neutro e extraiu-se com CHCl₃ (3x50 ml). Lavou-se a fase orgânica com água, secou-se com sulfato de sódio anidro e concentrou-se. Obteve-se um resíduo sólido castanho - escuro pegajoso que foi purificado por cromatografia de coluna de fase reversa usando sílica RP-18 como fase estacionária. Para remover os sais usou-se H₂O como fase móvel, seguida de MeOH para separar os vários produtos formados e isolar o composto pretendido:

7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (7)

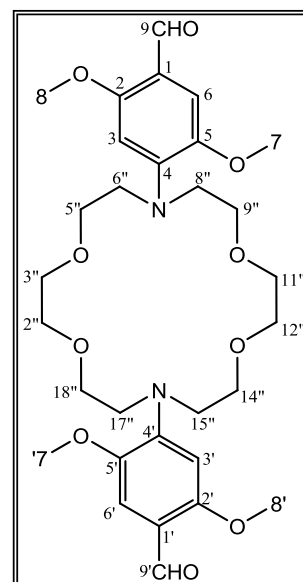
um sólido fino dourado, com um rendimento de 53% (318,7 mg). ¹H-RMN (CDCl₃): δ (ppm) 6,74 (2H, d, J=8.7, H3 e H3'); 6,61 (2H, s, H6 e H6'), 6,52 (2H, d, J=8.4, H4 e H4'); 3,66-4,04 (36H, m, 24H e 12H) ¹³C-RMN (CDCl₃): δ (ppm) 153,85 (C5 e C5'); 148,85 (C1 e C1'); 145,44 (C2 e C2'); 112,34 (C3 e C3'); 111,34 (C6 e C6'); 107,12 (C4 e C4'); 70,25 (C6'', C8'', C15'' e C17''); 66,26 (C2'', C3'', C11'' e C12''); 56,20-56,69 (C7, C7', C8 e C8'); 53,52 (C5'', C9'', C14'' e C18'').



4.3.3. Preparação do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (8) a partir de 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (7)

O produto dimetoxilo (7) (341,9 mg; 0,64 mmol) foi dissolvido em dimetilformamida (DMF) (2,2 ml), mantida a 0°C e sob atmosfera inerte, mantendo-se a agitação durante 30 minutos. Adicionou-se, de seguida, e nas mesmas condições reaccionais, uma solução 1:4 (v/v) de POCl₃ e DMF (5,4 ml) e a mistura ficou a agitar, à temperatura ambiente, durante 2,5 h. Através de placas de TLC (eluídas em CHCl₃:MeOH 4%) e reveladas pelo revelador de DNP, verificou-se a presença de grupo –CHO. Deu-se a reacção por terminada e adicionou-se, em banho de gelo, 22 ml de água. Como a mistura se encontrava ácida (pH 1,0), adicionou-se uma solução de carbonato de potássio saturado até a solução se encontrar básica (pH 10). A adição de base foi feita lentamente uma vez que em cada pequena adição se formava uma espuma amarela (libertação de CO₂) bastante intensa. Retirou-se o banho de gelo e transferiu-se o preparado para uma ampola de decantação onde se extraiu a mistura com CHCl₃ (3x80 ml) e lavou-se a fase orgânica com água, secou-se com sulfato de sódio anidro e concentrou-se. Obteve-se um resíduo amarelo - torrado que foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel e eluída com CHCl₃:MeOH 6%. Obteve-se o dimetoxibenzaldeído seguinte:

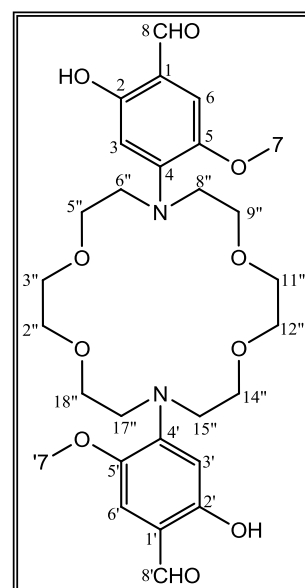
4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (8) na forma de um sólido amarelado e com 63% de rendimento (239,5 mg). ¹H-RMN (CDCl₃): δ (ppm) 10,22 (2H, s, CHO); 6,51 (2H, s, H6 e H6'); 5,30 (2H, s, H3 e H3'); 3,87 (6H, s, H8 e H8'); 3,80 (6H, s, H7 e H7'); 3,69 (16H, s, H2'', H3'', H5'', H9'', H11'', H12'', H14'' e H18''); 3,60 (8H, s, H6'', H8'', H15'' e H17'') ¹³C-RMN (CDCl₃): δ (ppm) 187,51 (C9 e C9'); 158,48 (C2 e C2'); 147,33 (C4 e C4'); 145,19 (C5 e C5'); 116,58 (C1 e C1'); 109,99 (C6 e C6'); 101,22 (C3 e C3'); 70,74 (C6'', C8'', C15'' e C17''); 70,16 (C2'', C3'', C11'' e C12''); 56,06 (C8 e C8'); 55,94 (C7 e C7'); 53,49 (C5'', C9'', C14'' e C18'').



4.3.4. Preparação do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4) a partir de 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (8)

O dimetoxialdeído (8) (236,7 mg; 0,40 mmol) foi dissolvido em nitrometano 25% (30 ml), à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se uma solução saturada de cloreto de zinco em nitrometano 25% (15 ml) e 30 ml da solução 1.0M BCl_3 (em diclorometano). Ficou a reagir durante 1,6 h e adicionou-se uma mistura 1:1 de água e metanol (30 ml). Ficou 40 minutos a agitar e adicionou-se, por fim, uma solução aquosa de carbonato de cézio / EDTA (1,20 g / 270 mg). Ao fim de 30 minutos de agitação vigorosa, prosseguiu-se com as extracções: extraiu-se a mistura com clorofórmio (3x80 ml), seguido por acetato de etilo (1x80 ml). As fases orgânicas foram reunidas e lavadas com água. Secou-se com sulfato de sódio anidro e concentrou-se: obteve-se um resíduo castanho. Purificou-se o resíduo por cromatografia de coluna em sílica gel e eluída com CHCl_3 :MeOH 6%. Foi isolado o seguinte produto:

4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4), sólido amarelo obtido com 53% de rendimento (120,2 mg). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): δ (ppm) 11,28 (2H, s, OH); 9,56 (2H, s, CHO); 6,80 (2H, s, H6 e H6'); 6,33 (2H, s, H3 e H3'); 3,78 (6H, s, H7 e H7'); 3,71 (16H, s, H2'', H3'', H5'', H9'', H11'', H12'', H14'' e H18''); 3,60 (8H, s, H6'', H8'', H15'' e H17'') $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3): δ (ppm) 192,34 (C8 e C8'); 158,95 (C2 e C2'); 148,88 (C4 e C4'); 143,82 (C5 e C5'); 114,55 (C6 e C6'); 111,85 (C1 e C1'); 103,49 (C3 e C3'); 70,79 (C6'', C8'', C15'' e C17''); 70,00 (C5'', C9'', C14'' e C18''); 56,23 (C7 e C7'); 52,85 (C2'', C3'', C11'' e C12'').

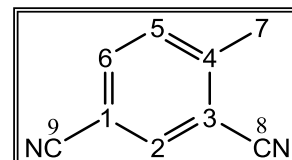


4.4. Reacções para a síntese do 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5)

4.4.1. Adição / Eliminação: Preparação do 4-metilsoftalonitrilo (10) a partir do 2,4-diclorotolueno (9)

Preparou-se uma mistura de 2,4-diclorotolueno (2,49 g; 15,5 mmol) e cianeto cuproso (5,1 g; 56,7 mmol) em 13 ml de *N*-metilpirrolidona. A mistura reaccional foi aquecida, a refluxo (260°C), durante 4 dias. Baixou-se a temperatura até, aproximadamente, 100°C e adicionou-se à mistura uma solução de NH₄OH 25% (40 ml) e tolueno (10 ml). Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e adicionou-se éter dietílico (10 ml). Ocorreu formação de precipitado (azul escuro) que foi isolado por filtração sob vácuo. O filtrado obtido foi lavado com uma mistura (1:1) de éter dietílico e clorofórmio (20 ml) e transferido para uma ampola de decantação. Adicionaram-se mais 10 ml de éter dietílico: formaram-se de duas fases. Guardou-se a fase orgânica e a fase aquosa foi extraída com uma solução (1:1) de éter dietílico e clorofórmio (4x50 ml). Foram recolhidas as fases orgânicas e, juntamente com a fase orgânica guardada, foram lavadas com NH₄OH (4x50 ml), H₂O (10 ml) e NaCl saturado (10 ml). Juntaram-se as fases orgânicas e secaram-se com sulfato de magnésio anidro. Concentrou-se a fase orgânica e obteve-se o seguinte composto:

4-metilsoftalonitrilo (10) na forma de óleo laranja escuro. **IV**
(NaCl): 2225 cm⁻¹ (M, distensão CN).

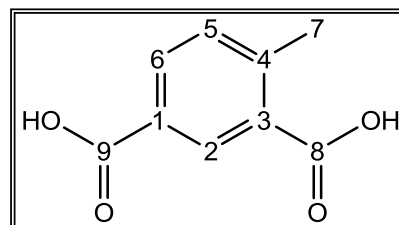


4.4.2. Hidrólise Básica: preparação do ácido 4-metilsoftálico (11) a partir do 4-metilsoftalonitrilo (10)

Ao **10** obtido anteriormente, foi adicionado NaOH (2,44 g; 61,1 mmol), etileno glicol (27 ml) e umas gotas de água. A mistura reaccional foi aquecida a 260°C e em refluxo, durante a noite. Deixou-se arrefecer a mistura até atingir a temperatura ambiente, diluiu-se com água (22 ml) e transferiu-se tudo para um erlenmeyer. Acidificou-se a mistura, em banho de gelo, até atingir pH 1 (HCl 10%). Deixou-se em repouso até cessar a precipitação, filtrou-se a suspensão e lavou-se o precipitado com água. O sólido (cinzento) foi dissolvido, totalmente, em NaOH (10%); manteve-se a refluxo durante uns minutos e, de seguida, juntou-se carvão activado para remover impurezas coradas

do sólido e deixou-se a agitar por mais 30 minutos. Filtrou-se a solução a quente e arrefeceu-se o filtrado em banho de gelo. Reacidificou-se com HCl 36% (11 ml) e obteve-se uma solução de tonalidade bege que ficou a repousar (em banho de gelo) até precipitar. Filtrou-se a suspensão para um balão e o sólido recolhido foi depois isolado e seco na bomba de vácuo.

Ácido 4-metilsoftálico (11) na forma de um resíduo sólido branco sujo com um rendimento de 43% (1,2044 g). **IV (KBr):** 2969 cm^{-1} (M, C-H), 2800-2900 cm^{-1} (M, CH_3), 2652 cm^{-1} (M, OH), 1686 cm^{-1} (F, C=O), 1576 cm^{-1} (f, C=C). **$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6):** δ (ppm) 12,82 (1H, s, COOH); 7,80 (1H, d, $J=7.2$, H-6); 7,41 (1H, s, H-2); 7,26 (1H, d, $J=7.2$, H-5); 2,50 (3H, s, H-7). **$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6):** δ (ppm) 168,68 (C8); 166,65 (C9); 138,98 (C4); 131,68 (C2); 131,48 (C6); 130,47 (C5); 130,17 (C3); 125,81 (C1); 21,22 (C7).

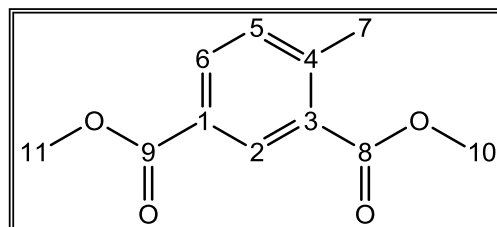


4.4.3. Esterificação: preparação do 4-metilsoftalato de dimetilo (12) a partir do ácido 4-metilsoftálico (11)

Ao ácido 4-metilsoftálico (11) (1,18 g; 6,56 mmol) foram adicionados 50 ml de MeOH e 0,5 ml de H_2SO_4 . A mistura reaccional ficou a agitar, em banho de areia e em refluxo, durante a noite. Deixou-se a mistura arrefecer, concentrou-se e adicionaram-se 40 ml de CH_2Cl_2 e 30 ml de água. Transferiu-se tudo para uma ampola e desprezou-se a fase aquosa. A fase orgânica foi lavada sucessivamente com água (30 ml), NaHCO_3 10% (30 ml) e NaCl saturado (30 ml). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e evaporada à securo. O produto foi seco a vácuo.

4-metilsoftalato de dimetilo (12) obtido na forma de um sólido cristalino com um tom amarelado e com um rendimento de 57% (778,6 mg).

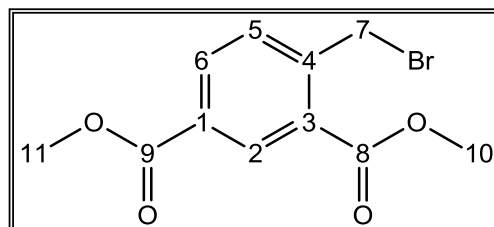
IV (KBr): 3000-3100 cm^{-1} (f, C-H), 2949 cm^{-1} (f, C^7H_3), 1722 cm^{-1} (F, C=O), 1602 cm^{-1} (f, C=C), 1297 cm^{-1} (F, C-O-C). **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3):** δ (ppm) 8,55 (1H; s; H-2); 8,03 (1H; d; $J=7,9$; H-6); 7,31 (1H; $J=8,0$; H-5); 3,91 (6H; $J=2,9$; OCH_3); 2,65 (3H; s; H-7). **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3):** δ (ppm) 167,13 (C8); 166,29 (C9); 145,53 (C4); 132,59 (C6); 131,92 (C3); 131,85 (C2); 129,71 (C5); 127,92 (C1); 52,15 (C10); 51,99 (C11); 21,83 (C7).



4.4.4. Bromação radicalar: preparação do 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5) a partir do 4-metilisoftalato de dimetilo (12)

Ao 4-metilisoftalato de dimetilo (12) (778,6 mg; 3,74 mmol) foi adicionada uma mistura de NBS (789,7 mg; 4,44 mmol) e CCl₄ (19 ml). Deixou-se a agitar, em banho de areia e em refluxo, durante 21,5 h sob a acção de radiação branca (lâmpada colocada à distância de 2 cm do balão da reacção). Arrefeceu-se a mistura à temperatura ambiente e lavou-se com água (15 ml) e NaCl saturado (15 ml). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada à secura. Obteve-se uma mistura sólida de cor bege escura e formada, principalmente, pelos produtos monobromado e dibromado. O produto pretendido, o monobromado, foi isolado por cromatografia de coluna em fase normal usando sílica gel como fase estacionária e CH₂Cl₂ como fase móvel.

4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5) obtido como um sólido cristalino de cor branca e com um rendimento de 91% (973,7 mg). ¹H-RMN (CDCl₃): δ (ppm) 8,61 (1H; d; J=1,3; H-2); 8,14 (1H; dd; J₁=8,0 e J₂=1,5; H-6); 7,56 (1H; d; J=8,0; H-5); 4,97 (2H, s, CH₂); 3,96 (6H; d; J=10,0; OCH₃).



4.5. Preparação do Fluoroionóforo de Benzofurano de potássio: 4a,4b-6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'-metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio ou PBF1 (3)

4.5.1. Preparação do intermediário 4a,4b-(5,5'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno))bis(oxi)bis(metileno) di-isoftalato de tetra-metilo (26) através de uma reacção de Substituição Nucleofílica entre os compostos (4) e (5)

O salicilaldeído (4) (84,5 mg; 0,15 mmol) foi suspenso em carbonato de potássio seco (452 mg) e 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5) (106,8 mg; 0,37 mmol) e dissolvido em 1,34 ml de

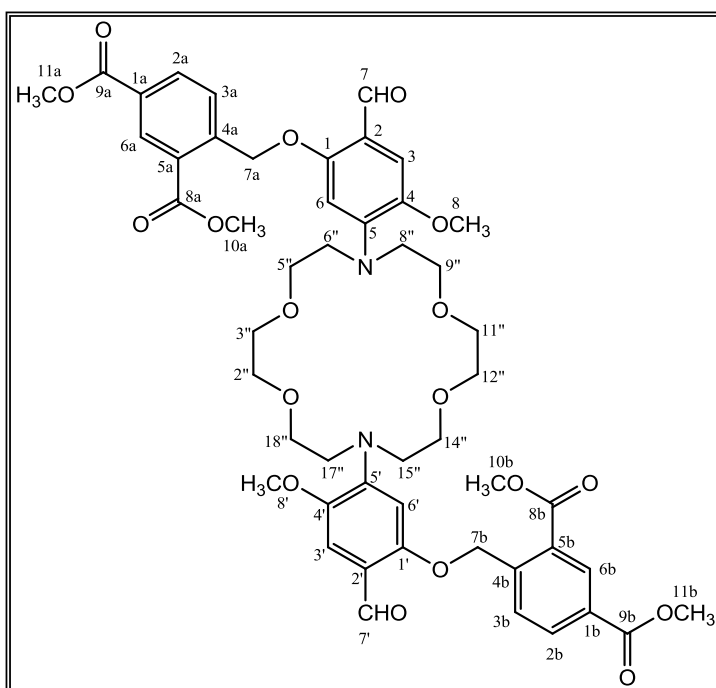
acetonitrilo. A mistura reaccional ficou em refluxo durante 5 horas e guardou-se no escuro, durante a noite, à temperatura ambiente. Verificou-se a formação de um sólido salmão envolto num líquido alaranjado. Filtrou-se a mistura reaccional e desprezou-se o filtrado (restos de monobromado que não reagiu e o acetonitrilo usado na reacção). O sólido foi dissolvido com clorofórmio e voltou a filtrar-se para remover o carbonato de potássio. O filtrado foi lavado com água, secou-se com sulfato de sódio anidro e concentrou-se à secura. Obteve-se o composto desejado, puro:

4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isoftalato de tetra-metilo (26) na forma de um sólido cor – de – laranja, com um rendimento de 82% (120,5 mg). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): δ

(ppm) 10,33 (2H, s, CHO); 8,65 (2H, s, H-6a e H-6b); 8,18 (2H, d; $J=6,8$; H-2a e H-2b); 7,84 (2H, d; $J=8,0$; H-3a e H-3b); 7,26 (2H, s, H3 e H3'); 6,48 (2H, s, H6 e H6'); 5,57 (4H, s, H-7a e H-7b); 3,93 (6H, s, H-10a e H-10b); 3,88 (6H, s, H-11a e H-11b); 3,78 (6H, s, H8 e H8'); 3,61 (16H, s, H2'', H3'', H5'', H9'', H11'', H12'' e H14''); 3,54 (8H, s, H6'', H8'', H15'' e H17'').

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3): δ (ppm) 187,02 (C7 e C7'); 166,26 (C-8a e C-8b); 165,89 (C-9a e C-9b); 157,23 (C1 e C1'); 147,37 (C5 e C5'); 145,30 (C4 e C4');

144,23 (C-4a e C-4-b); 133,42 (C-2a e C-2b); 132,05 (C-6a e C-6b); 129,50 (C-1a e C-1b); 127,58 (C-5a e C-5b); 127,39 (C-3a e C-3b); 116,56 (C2 e C2'); 110,02 (C3 e C3'); 102,20 (C6 e C6'); 70,74 (C6'', C8'', C15'' e C17''); 70,03 (C5'', C9'', C14'', C18''); 68,93 (C-7a e C-7b); 55,90 (C8 e C8'); 52,81 (C2'', C3'', C11'' e C12''); 52,38 (C-10a, C-10b, C-11a, C-11b).

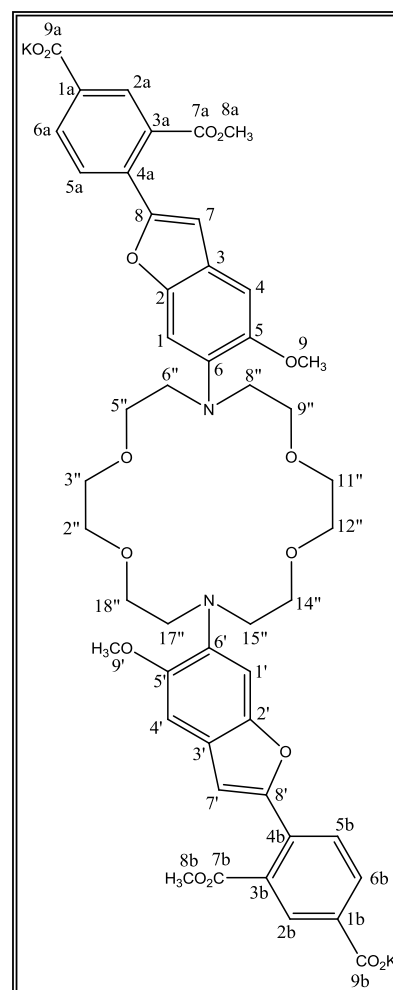


4.5.2. Síntese do PBF1 (3) por ciclização do intermediário 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,5',1,1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isoftalato de tetra-metilo (26)

O éter (26) (206,3 mg; 0,22 mmol) foi dissolvido em dimetilformamida seca (3,4 ml). Adicionou-se carbonato de potássio seco (145 mg) e a mistura reaccional foi aquecida a 145°C durante 3 h. Por cromatografia de camada fina, verificou-se a formação de uma mistura de ácidos livres e ésteres. Filtrou-se a mistura para remover o carbonato de potássio e lavou-se o sólido com a solução de CHCl₃:MeOH 10% (20 ml). O filtrado foi evaporado até à secura e obteve-se uma mistura bruta na forma de um sólido castanho (230 mg). Purificaram-se cerca de 92,1 mg desta mistura por cromatografia de coluna de fase reversa com sílica RP-18 para uma caracterização mais rigorosa do composto de interesse e o restante guardou-se. Obteve-se o seguinte produto puro:

4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'-metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio ou PBF1 (3)

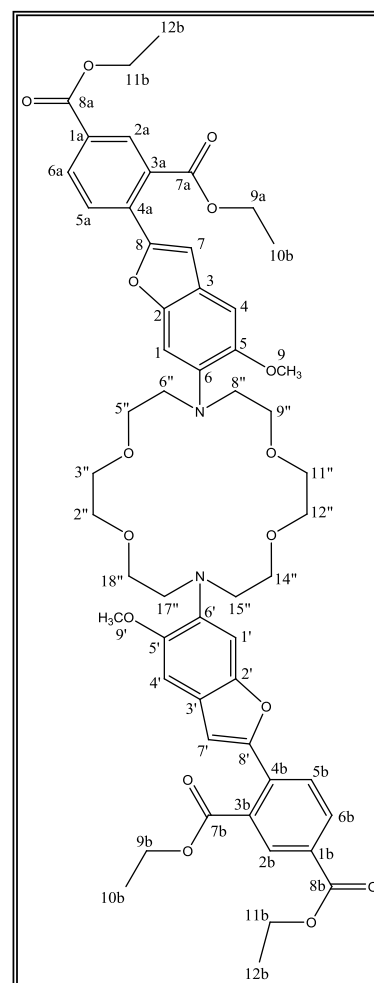
na forma de um sólido amarelo escuro, com um rendimento de 19% (15,8 mg de mistura bruta). ¹H-RMN (CD₃OD): δ (ppm) 8,25 (2H, s, H-2a e H-2b); 8,03 (2H; d; J=4,52; H-6a e H-6b); 7,96 (2H; d; J=4.9; H-5a e H-5b); 7,57 (2H, s, H4 e H4'); 7,41 (2H, s, H1 e H1'); 7,28 (2H, s, H7 e H7'); 3,85-3,92 (12H, m, CH₃); 3,25-3,62 (24H, m, 2'', 3'', 5'', 6'', 8'', 9'', 11'', 12'', 14'', 15'', 17'' e 18''). ¹³C-RMN (CD₃OD): δ (ppm) 177,53; 167,96; 164,83; 151,37; 141,68; 132,75; 131,08; 130,50; 129,23; 127,58; 108,49; 107,13; 103,67; 71,30; 69,37; 57,82; 56,46; 52,73. MALDI-TOF – m/z: [M+K]⁺ 1025,2803 calculado para C₄₈H₄₈K₂N₂O₁₆: 1025,19.



4.6. Síntese do 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5-metoxibenzofurano-6,2-di-il)di-isoftalato de tetra-etilo (27)

A mistura bruta cristalina e impura obtida anteriormente (3) (51,5 mg) foi dissolvida em etanol seco (10 ml) e 0,4 ml de ácido sulfúrico, e deixado a refluxo durante a noite. A mistura reaccional arrefeceu à temperatura ambiente e, em banho de gelo, basificou-se com amónia (25%) até pH 9,0. Evaporou-se o solvente até à secura e secou-se o resíduo. Como se verificou a presença de muitos sais, lavou-se o resíduo com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 5% e formou-se um precipitado de sais no fundo do balão. Separou-se o sobrenadante para outro balão e desprezaram-se os sais. Evaporou-se o sobrenadante até à secura e o resíduo foi purificado por cromatografia de camada fina com placas de sílica gel de 0,5 mm de espessura (foram usadas 2 placas para o efeito) e eluída em $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 10%. O produto purificado apresentou propriedades fluorescentes quando sujeito à lâmpada UV a 320 nm.

4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5-metoxibenzofurano-6,2-di-il)di-isoftalato de tetra-etilo (27) na forma de um sólido muito fininho e de cor amarelo claro (10,4 mg). **$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD):** δ (ppm) 8,29 (2H, sl, H-2a e H-2b); 8,14 (2H; d; $J=7,7$; H-6a e H-6b); 7,82 (2H; d; $J=8,0$; H-5a e H-5b); 7,32 (2H, s, H7 e H7'); 6,98 (4H; d; $J=9,4$; H1, H1', H4 e H4'); 4,39 (8H, m, H-9a, H-9b, H-11a e H-11b); 3,89 (6H, sl, H9 e H9'); 3,62 (24H, m, 2'', 3'', 5'', 6'', 8'', 9'', 11'', 12'', 14'', 15'', 17'' e 18''); 1,40 (6H; t; $J=7,0$; H-12a e H-12b); 1,26 (6H; t; $J=7,1$, H-10a e H-10b). **MALDI-TOF** – m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1017,4789 calculado para $\text{C}_{54}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{NaO}_{16}$: 1017,3998.



4.7. Reacções para a preparação do Sensor Fluorescente de Potássio: PBFi/Dextrano (16)

4.7.1. Na presença de CDI

4.7.1.1. A partir do PBFi (3)

A um balão reaccional com CDI (7,8 mg; 0,05 mmol) e DMSO seco (0,5 ml), foram adicionados 3,7 µl de CF₃COOH (seco). Ficou a agitar, à temperatura ambiente e em atmosfera inerte, durante 10 minutos. Ainda à temperatura ambiente, adicionou-se a mistura bruta cristalina e impura (obtida em 4.5.2.) (50,3 mg) e ficou mais 40 minutos a agitar. Por fim, foi adicionado Amino Dextrano seco (7,9 mg; 0,05 mmol) e a mistura reaccional ficou em refluxo (banho de areia a 80°C) durante 46 h. O progresso da reacção foi sempre controlado por cromatografia de camada fina em sílica RP-18. Deixou-se a mistura reaccional arrefecer até à temperatura ambiente e, em banho de gelo, adicionaram-se 3,2 ml de etanol seco para formar precipitado. A mistura foi filtrada e o sólido (castanho) foi lavado com 12 ml de etanol seco antes da secagem a vácuo. Obteve-se um resíduo castanho claro (13,3 mg). Após análise do resíduo por espectroscopia de RMN, verificou-se que o produto pretendido não foi formado. Abandonou-se este ensaio.

4.7.1.2. Ensaio de optimização das condições experimentais

4.7.1.2.1. Procedimento geral para uma proporção de 1:1:1

A uma solução de Dextrano (1 eq.) em 2 ml de DMSO, foram adicionados 1 eq. de ácido carboxílico (**28**, **29** e **30**) e 1 eq. de CDI. A mistura manteve-se a 80 °C durante, no mínimo, 20 horas e foi, subsequentemente, precipitada com etanol. O produto foi isolado por filtração de vácuo e lavado três vezes com etanol (25 ml) e depois seco numa pistola de secagem a 80 °C, sob vácuo.

Foram efectuadas análises espectroscópicas de todos os precipitados obtidos (¹H e ¹³C RMN) e nenhum deles revelou a presença do produto pretendido, ou seja, não se observou a ligação de pelo menos uma das sub - unidades do Dextrano (ou Amino Dextrano) ao grupo –COOH de cada um dos ácidos carboxílicos. Este procedimento foi, por isso, abandonado.

4.7.1.2.2. Procedimento geral para uma proporção de 1:3:3

A uma solução de Dextrano (1 eq.) em 2 ml de DMSO, foram adicionados 3 eq. de ácido carboxílico (**28** e **31**) e 3 eq. de CDI. A mistura manteve-se a 80 °C durante, no mínimo, 20 horas e foi, subsequentemente, precipitada com etanol. O produto foi isolado por filtração de vácuo e lavado três vezes com etanol (25 ml) e depois seco numa pistola de secagem a 80 °C, sob vácuo.

Foram efectuadas análises espectroscópicas de todos os precipitados obtidos (¹H e ¹³C RMN) e nenhum deles revelou a presença do produto pretendido, ou seja, não se observou a ligação de pelo menos uma das sub - unidades do Dextrano (ou Amino Dextrano) ao grupo –COOH de cada um dos ácidos carboxílicos. Este procedimento também foi abandonado e prosseguiu-se com uma abordagem diferente.

Tabela 4.1 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios de optimização, efectuados na presença de CDI.

Ensaio	Material de Partida	Proporção Relativa AGU:CDI:ác.carboxílico	AGU	CDI	Solvente de precipitação	Resultado
1	28 ^a	1:1:1	Dextrano	N ^e	EtOH MeOH	NO ^h
2	28 ^a	1:3:3	Dextrano	N ^e	EtOH MeOH Isopropanol	FP ^g NO ^h NO ^h
5	29 ^b	1:1:1	Dextrano	N ^e	EtOH	FP ^g
6	29 ^b	1:1:1	Amino Dextrano	N ^e	EtOH	FP ^g
7	29 ^b	1:1:1	Dextrano	R ^f	EtOH	FP ^g
8	29 ^b	1:1:1	Amino Dextrano	R ^f	EtOH	NO ^h
3	30 ^c	1:1:1	Amino Dextrano	N ^e	EtOH	FP ^g
4	31 ^d	1:3:3	Dextrano	N ^e	EtOH	FP ^g

^aÁcido Benzoico (**28**); ^bÁcido tereftálico (**29**); ^cÁcido ftálico (**30**); ^dÁcido isoftálico (**31**); ^eNão - Recristalizado (N); ^fRecristalizado (R); ^gFormação de precipitado (FP); ^hNenhuma observação (NO).

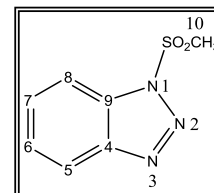
4.7.2. Na presença de *N*-(1-metanosulfonyl)benzotriazole (**14**)

4.7.2.1. Síntese do *N*-(1-metanosulfonyl)benzotriazole (**14**) a partir do Benzotriazole (**36**)

A uma solução gelada de benzotriazole (**36**) (1,00 g; 8,42 mmol) e piridina (1,1 ml), em tolueno (10,1 ml), foi adicionado, gota a gota, uma mistura de cloreto de metilsulfonylo (0,8 ml) em tolueno (2,5 ml). Deixou-se a mistura a reagir durante a noite, à temperatura ambiente. Foram

adicionados à mistura reaccional acetato de etilo (13 ml) e água (9 ml). A fase orgânica foi separada e lavada duas vezes com água e seca com sulfato de magnésio anidro. Depois de filtrado, removeram-se os solventes por evaporação sob vácuo e secou-se o sólido na bomba de vácuo. Esse sólido foi, posteriormente, recristalizado com benzeno para dar o seguinte produto:

N-(1-metanosulfonyl)benzotriazole (14), um sólido branco cristalino com um rendimento de 65% (1,0693) e um p.f. de 110-111 °C. ¹H-RMN (CDCl₃): δ (ppm) 8,16 (1H; d; J=8,0; H-8); 8,02 (1H; d; J=8,1; H-5); 7,69 (1H; t; J=7,3; H-7); 7,54 (1H; t; J=7,3; H-6); 3,51 (3H, s, H-10).



4.7.2.2. Ensaios de otimização das condições experimentais

4.7.2.2.1. A partir do Ácido Tereftálico (29)

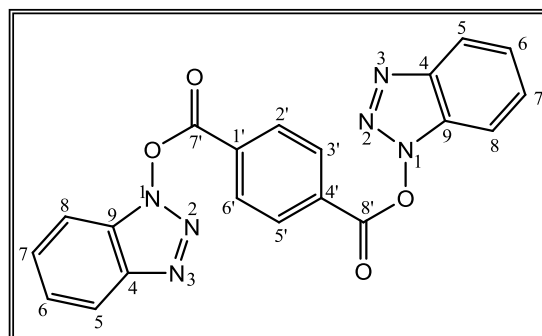
Uma mistura de *N*-(1-metanosulfonyl)benzotriazole (**14**) (236 mg; 1,20 mmol), ácido tereftálico (**29**) (50 mg; 0,30 mmol) e trietilamina (0,13 ml) em THF (1,2 ml) foi aquecida a refluxo, durante 24 h. O solvente foi evaporado até à secura e o resíduo dissolvido num volume grande de clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com água e com uma solução saturada de NaCl. Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se, e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo. Obteve-se uma mistura bruta esbranquiçada (133,9 mg) que foi purificada por cromatografia de coluna em sílica gel (CHCl₃:MeOH 10% como fase móvel).

Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) (33), na forma de um sólido branco com um rendimento de 46% (55,6 mg).

4.7.2.2.2. A partir do Tereftalato de Potássio (32)

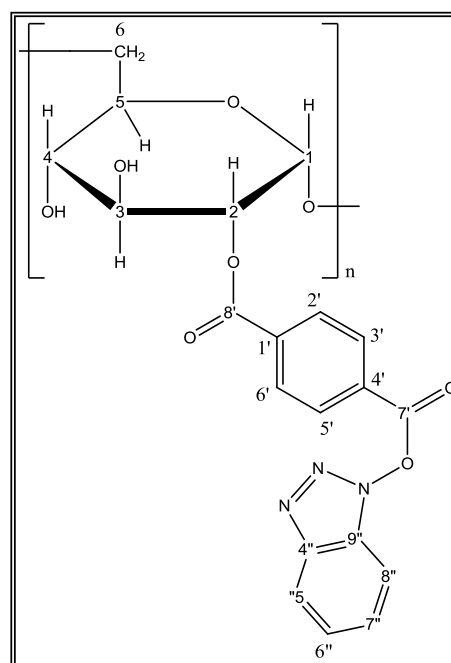
Uma mistura de *N*-(1-metanosulfonyl)benzotriazole (**14**) (162 mg; 0,82 mmol), tereftalato de potássio (**32**) (50,2 mg; 0,21 mmol) e trietilamina (0,09 ml) em THF (2,4 ml) foi aquecida em refluxo, durante 24 h. O solvente foi evaporado até à secura e o resíduo dissolvido num volume grande de clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com água e com uma solução saturada de NaCl. Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se, e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo. Obteve-se uma mistura bruta esbranquiçada (139,8 mg) que foi purificada por cromatografia de coluna em sílica gel (CHCl₃:MeOH 10% como fase móvel) para se obter o produto seguinte:

Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) (33), sólido branco na forma mais pura possível, e com um rendimento de 57% (47,7 mg). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): δ (ppm) 8,42 (4H, s, H2', H3', H5' e H6'); 8,26 (2H; d; J=6,9; H8); 8,21 (2H; d; J=8,4; H5); 7,77 (2H; t; J=7,3; H6); 7,60 (2H; t; J=7,3; H7). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3): δ (ppm) 165,79 (C7' e C8'); 145,87 (C4); 135,65 (C1' e C4'); 132,15 (C9); 130,75 (C2', C3', C5' e C6'); 126,69 (C6 e C7); 120,40 (C5); 114,81 (C8).



Num balão de duas tubuladuras, foi preparada uma solução de Dextrano/DMF 1.0M que ficou a agitar até atingir 0°C (atmosfera inerte). Ao fim de 10 minutos, adicionou-se NaH (7 mg; 0.29 mmol) e ficou a reagir durante 30 minutos (ainda a 0°C). Em paralelo, num outro balão reaccional, arrefeceu-se, também a 0°C, o produto **33** (47,7 mg; 0.12 mmol) em DMF. Adicionou-se esta solução fria ao balão reaccional de duas tubuladuras e ficou a agitar, sob as mesmas condições reaccionais, durante 2 minutos. Deixou-se a mistura atingir a temperatura ambiente, evaporou-se o solvente na sua totalidade e secou-se o resíduo obtido na bomba de vácuo. Já sem DMF, lavou-se o sólido com CH_2Cl_2 quente até se obter o produto pretendido.

Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) / Dextrano (34), na forma de um sólido muito fino de cor bege escura (84,1 mg). $^1\text{H-RMN}$ (D_2O): δ (ppm) 7,76 (8H, s); 4,87 (s, H anomérico), 3,23-3,88 (m, C-H de AGU). $^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O): δ (ppm) 175,66 (-COOR); 171,43 (-COOR); 139,01-116,58 (C7); 98,07 (C1); 73,77 (C3); 71,77 (C2); 70,55 (C4); 69,90 (C5); 65,90 (C6).

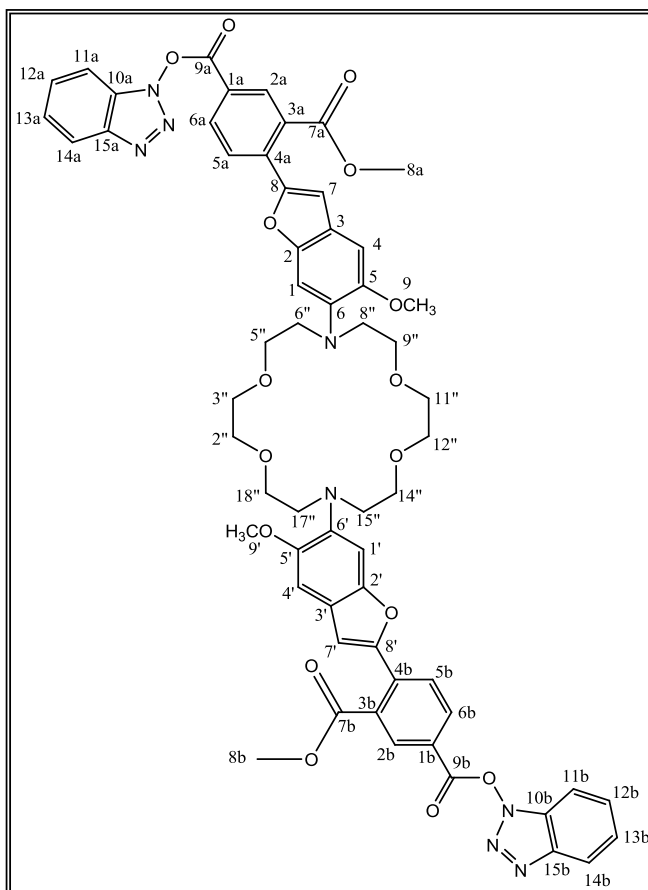


4.7.2.3. A partir do PBFI (3)

Uma mistura de *N*-(1-metanosulfonil)benzotriazole (**14**) (22 mg; 0,11 mmol), PBFI (**3**) (50,4 mg) e trietilamina (22 µl) em THF (2 ml) foi aquecida em refluxo, durante 24 h. A mistura apresentava cor de ferrugem e absorção à lâmpada de ultravioleta laranja escura. O solvente foi, depois, evaporado até à secura e o resíduo dissolvido em clorofórmio (10 ml). A fase orgânica foi lavada com água e solução saturada de NaCl. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se, e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo. Obteve-se uma mistura bruta cor-de-laranja (54,9 mg) que foi purificada por cromatografia de coluna em sílica gel (CHCl₃:MeOH 10% como fase móvel) para se obter o intermediário de benzotriazole puro.

1a,1b-di(1H-benzo[1,2,3]triazole-1-il)-3a,3b-dimetil-4,4'-(6,6'-(1'',4'',10'',13'')-tetra-oxa-7'',16'')-diazociclo-octadecano-7'',16'')-di-il)bis(5,5'-metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il) di-isoftalato ou PBFI di(benzo[1,2,3]triazole) (15**),**

obtido como um sólido laranja e com um rendimento de 23% (11,9 mg). ¹H-RMN (CDCl₃): δ (ppm) 6,51-8,53 (16H, m); 2,93-3,96 (24H, m). ¹³C-RMN (CDCl₃): δ (ppm) 168,19 (C-9a e C-9b); 165,67 (C-7a e C-7b); 102,77-151,55 (20C); 70,56 (6'', 8'', 15'' e 17''); 69,77 (5'', 9'', 14'' e 18''); 55,87 (C9 e C9'); 55,04 (2'', 3'', 11'', 12''); 52,63 (C-8a e C-8b).



5. Bibliografia

1. Heyen, K. V.; Cielen, E.; Tahri, A.; Saleh, A.; Boens, N. e Hoornaert, G. J., "Synthesis and Characterisation of New Fluorescent Na⁺ and K⁺ Indicators". *Tetrahedron*, **1999**. 55: 5207-5226.
2. Zonia, L. e Feijó, J. A., "State and Spectral Properties of Chloride Oscillations in Pollen". *Biophys. J.*, **2003**. 84(2): 1387-1398.
3. Minta, A. e Tsien, R.Y., "Fluorescent Indicators for Cytosolic Sodium". *J. Biol. Chem.*, **1989**. 264(32): 19449-19457.
4. Szczerba, M.W.; Britto, D.T. e Kronzucker, H.J., "K⁺ transport in plants: Physiology and molecular biology". *J. Plant Physiol.*, **2009**. 166: 447-466.
5. Martin, V. V.; Rothe, A.; Diwu, Z. e Gee, K. R., "Fluorescent sodium ion indicators based on the 1,7-diaza-15-crown-5 system". *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**. 14: 5313-5316.
6. Gunnlaugsson, T.; Gunaratne, H. Q. N.; Nieuwenhuyzen, M. e Leonard, J. P., "Synthesis of functionalized macrocyclic compounds as Na⁺ and K⁺ receptors: a mild and high yielding nitration in water of mono and bis 2-methoxyaniline functionalized crown ethers". *J. Chem. Soc., Perkin Trans*, **2002**. 1: 1954-1962.
7. Pederson, C.J., "Cyclic Polyethers and Their Complexes with Metal Salts". *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**. 89(26): 7017-7036.
8. Pearson, R. G., "Hard and Soft Acids and Bases". *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**. 85(22): 3533-3539.
9. Forgues, S. F. e Ali, F. Al., "Bis(azacrown ether) and bis(benzocrown ether) dyes: butterflies, tweezers and rodes in cation binding". *J. Photochem. Photobiol.*, **2004**. 5: 139-153.
10. Liou, C. C. e Brodbelt, J. S., "Determination of Orders of Relative Alkali Metal Ion Affinities of Crown Ethers and Acyclic Analogs by the Kinetic Method". *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, **1992**. 3: 543-548.
11. Huszthy, P.; Köntös, Z.; Vermes, B. e Pintér, Á., "Synthesis of novel fluorescent acridono- and thioacridono-18-crown-6 ligands". *Tetrahedron*, **2001**. 57: 4967-4975.
12. Molecular Probes, "SBFI and PBFI". Product information MP 01262, Revised: **2003**.
13. Martin, V. V.; Gee, K. R.; Haugland, R. P. e Diwu, Z., "Metal Chelating crown ether derivatives with an attached dye, reactive group or conjugated substance". *M. P. Inc.*, **2002**. GB 2372749 A.
14. Anzalone, L. e Hirsch, J. A., "Substituent Effects on Hydrogenation of Aromatic Rings: Hydrogenation vs. Hydrogenolysis in Cyclic Analogues of Benzyl Ethers". *J. Org. Chem.*, **1985**. 50: 2128-2133.
15. Heinze, T.; Liebert, T.; Heublein, B. e Hornig, S., "Functional Polymers Based on Dextran". *Adv. Polym. Sci.*, **2006**. 205: 199-291.
16. Hornig, S.; Liebert. T. e Heinze, T., "Structure Design of Multifunctional Furoate and Pyroglutamate Esters of Dextran by Polymer-Analogous Reactions". *Macromol. Biosci.*, **2007**. 7: 297-306.
17. Molecular Probes, "Dextran Conjugates". Product information MP 01800, Revised: **2006**.

18. Chaves, M. S. e Arranz, F., “Preparation of dextran-bioactive compound adducts by the direct esterification of dextran with bioactive carboxylic acids”. *Polymer*, **1997**. 38(19): 2501-2505.
19. Wondraczek, H. e Heinze, T., “Efficient Synthesis and Characterization of New Photoactive Dextran Esters Showing Nanosphere Formation”. *Macromol. Biosci.*, **2008**. 8: 606-614.
20. Katritzky, A. R.; Meher, N. K.; Cai, C. e Singh, S. K., “Preparation of N-Acylbenzotriazole Derivatives of Dicarboxylic Acids”. *Rev. Soc. Quím. Méx.*, **2004**. 48: 275-278.
21. March, J., “Advanced Organic Chemistry – Reactions, Mechanisms, and Structure”, 4^a Ed, **1992**, *John Wiley and Sons*.
22. Stollar, H. e Becker, A., “Process for the preparation and the isolation of aromatic nitriles”. *US Patent* 4925642, **1990**.
23. Solomons, T. W. G., “Organic Chemistry”, **2000**, University of South Florida: *John Wiley & Sons, Inc.*
24. Rohm and Haas Company, “Amberlite[®] IRC50: Synthetic Cation Exchange Resin”. PDS 0504, **2000**.
25. Katritzky, A. R.; He, H. Y. e Suzuki, K., “N-Acylbenzotriazoles: Neutral Acylating Reagents for the Preparation of Primary, Secondary, and Tertiary Amides”. *J. Org. Chem.*, **2000**. 65: 8210-8213.
26. Perrin, D. D. e Aramarego, W. L. F. and Perrin, D. R., “Purification of Laboratory Chemicals”. **1980**, Oxford: *Pergamon Press*.
27. Sthal, E., “Thin-layer Chromatography”. **1969**, Berlin: *Springer - Verlag*.
28. Martin, V. V.; Rothe, A. e Gee, K. R., “Fluorescent metal ion indicators based on benzoannelated crown system: a green fluorescent indicator for intracellular sodium ions”. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**. 15: 1851-1855.
29. Alantos Pharmaceuticals, Inc., Patent WO2006/116157, **2006**.
30. Lehn, J. M., “Cryptates: The Chemistry of Macropolycyclic Inclusion Complexes”. *Acc. Chem. Res.*, **1978**. 11(2): 49-57.
31. Lamb, J. D.; Izatt, R. M.; Swain, C. S.; Bradshaw, J. S. e Christensen, J. J., “Cation Complexes of Crown Ether Diesters. Stabilities, Selectivities, Enthalpies and Entropies of Reaction at 25 °C in Methanol”. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**. 102(2): 479-482.
32. Buschmann, H. J., “Stability Constants and Thermodynamic Data for Complexes of 12-Crown-4 with Alkali Metal and Alkaline – Earth Cations in Methanol Solutions”. *J. Solution Chem.*, **1987**. 16(3): 181-190.
33. Brock, R.; Hink, M. A. e Jovin, T. M., “Fluorescent Correlation Microscopy of Cells in the Presence of Autofluorescence”. *Biophys. J.*, **1998**. 75: 2547-2557.
34. Meislich, H.; Nechamkin, H. e Sharefkin, J., “Organic Chemistry”. **2000**, New York: *McGraw – Hill Companies, Inc.*
35. Silverstein, R. M.; Webster, F. X. e Kiemle, D. J., “Spectrometric Identification of Organic Compounds”. **2005**, New York: *John Wiley & Sons, Inc.*

6. Anexos

6.1. Análise espectroscópica do 2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6)

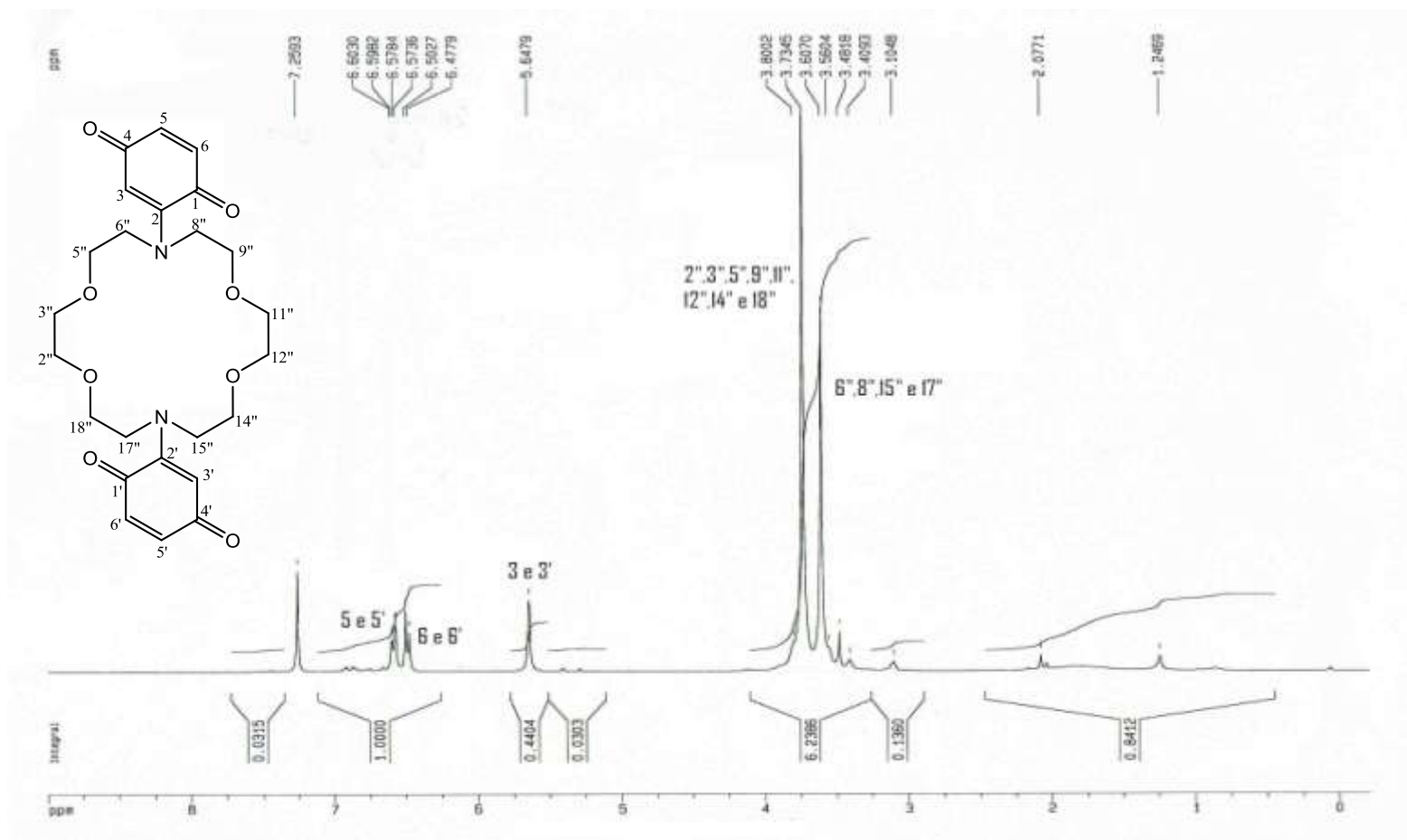


Figura 6.1 – Espectros de ¹H-RMN do 2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (6) em CDCl₃ (400 MHz).

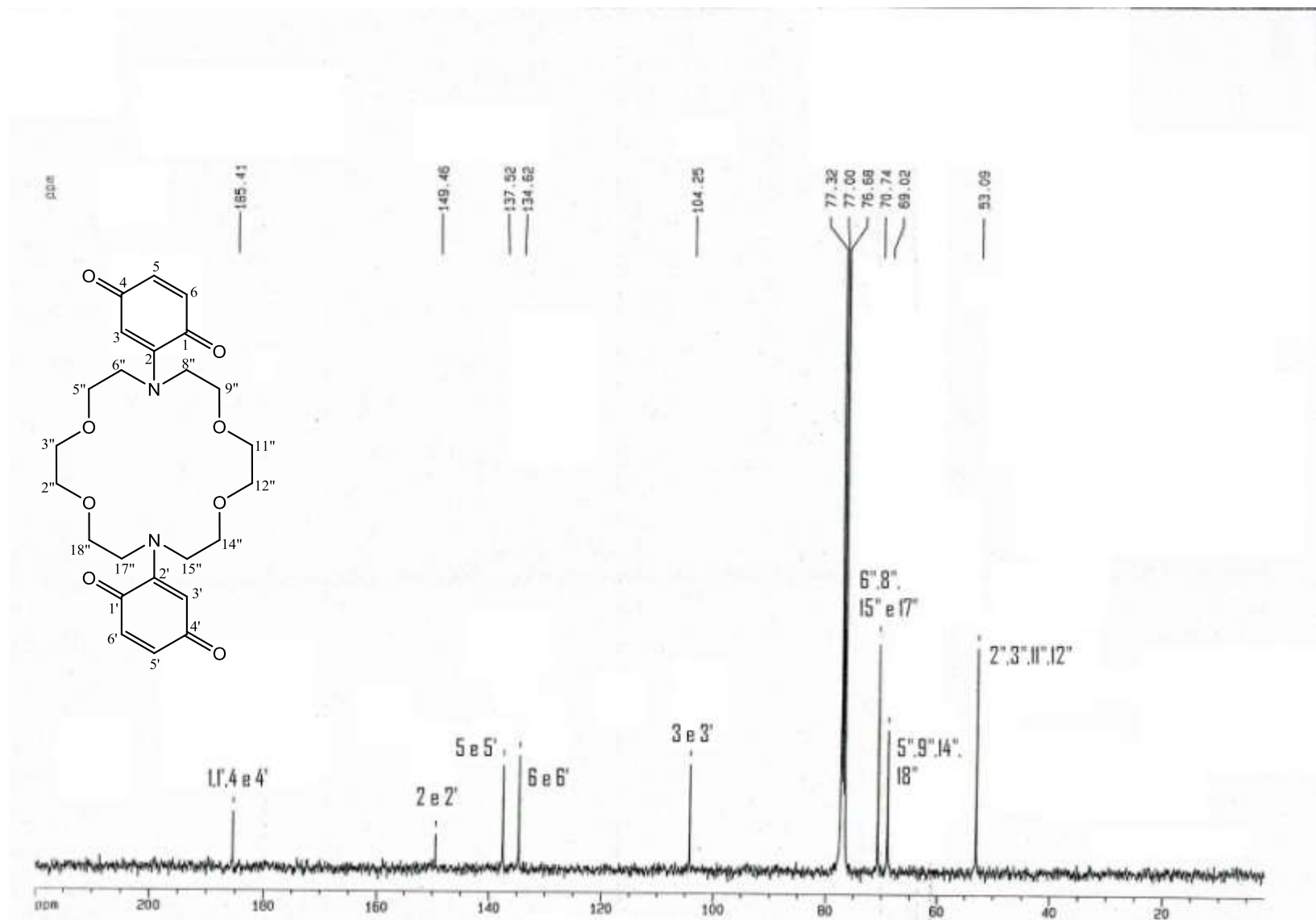


Figura 6.2 – Espectros de ¹³C-RMN do 2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (**6**), em CDCl₃ (400 MHz).

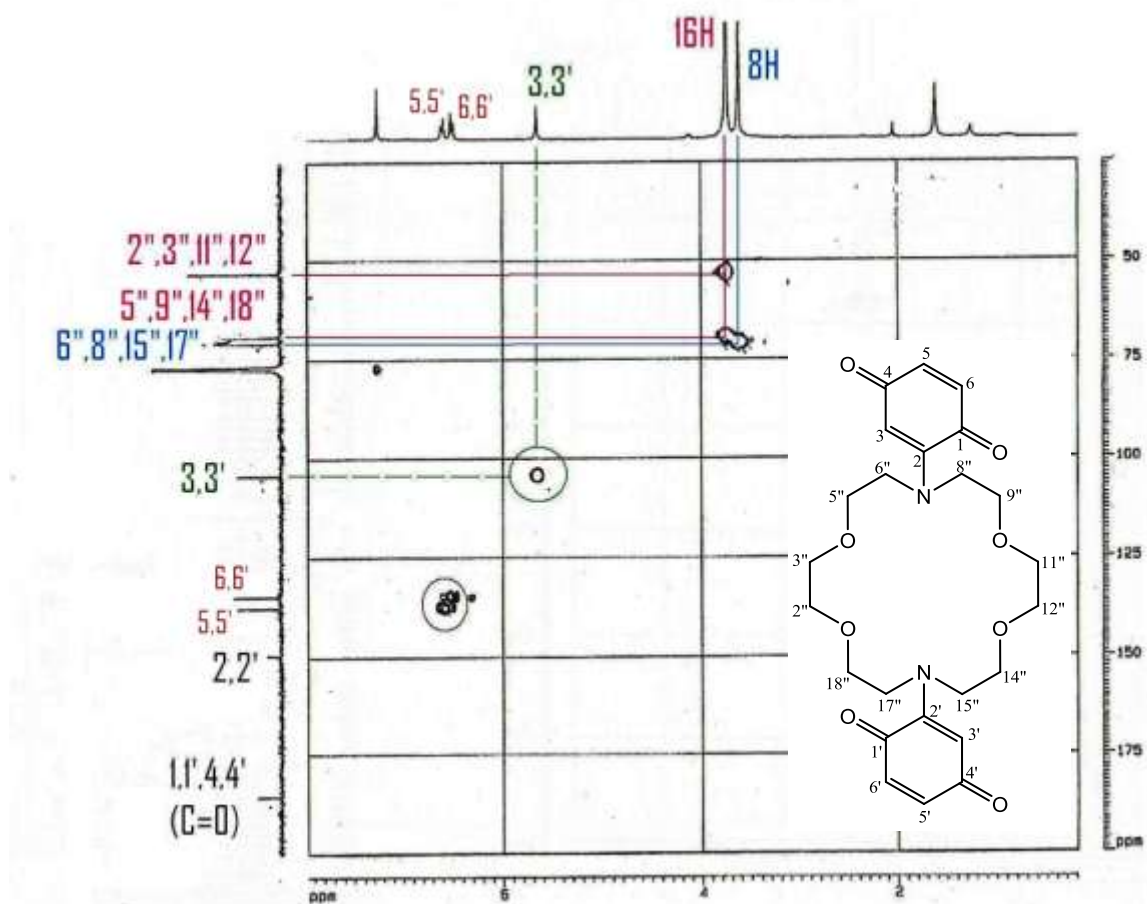


Figura 6.3 - Correlações a uma ligação (HMQC) obtidas para 2'2'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)diclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (**6**), em CDCl₃ (400 MHz).

6.2. Análise espectroscópica do 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (7)

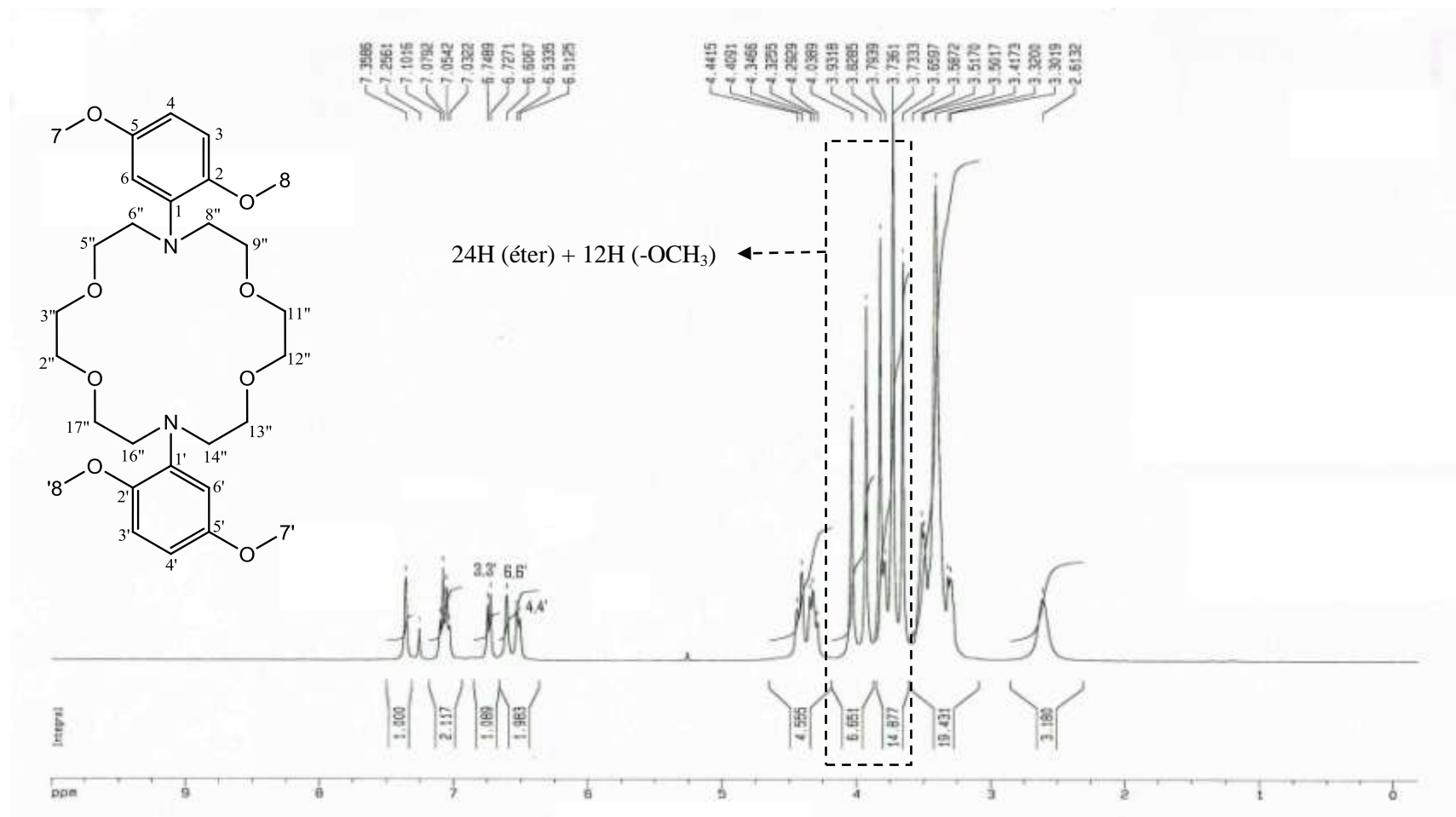


Figura 6.4 – Espectros de ¹H-RMN do 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (7), em CDCl₃ (400 MHz).

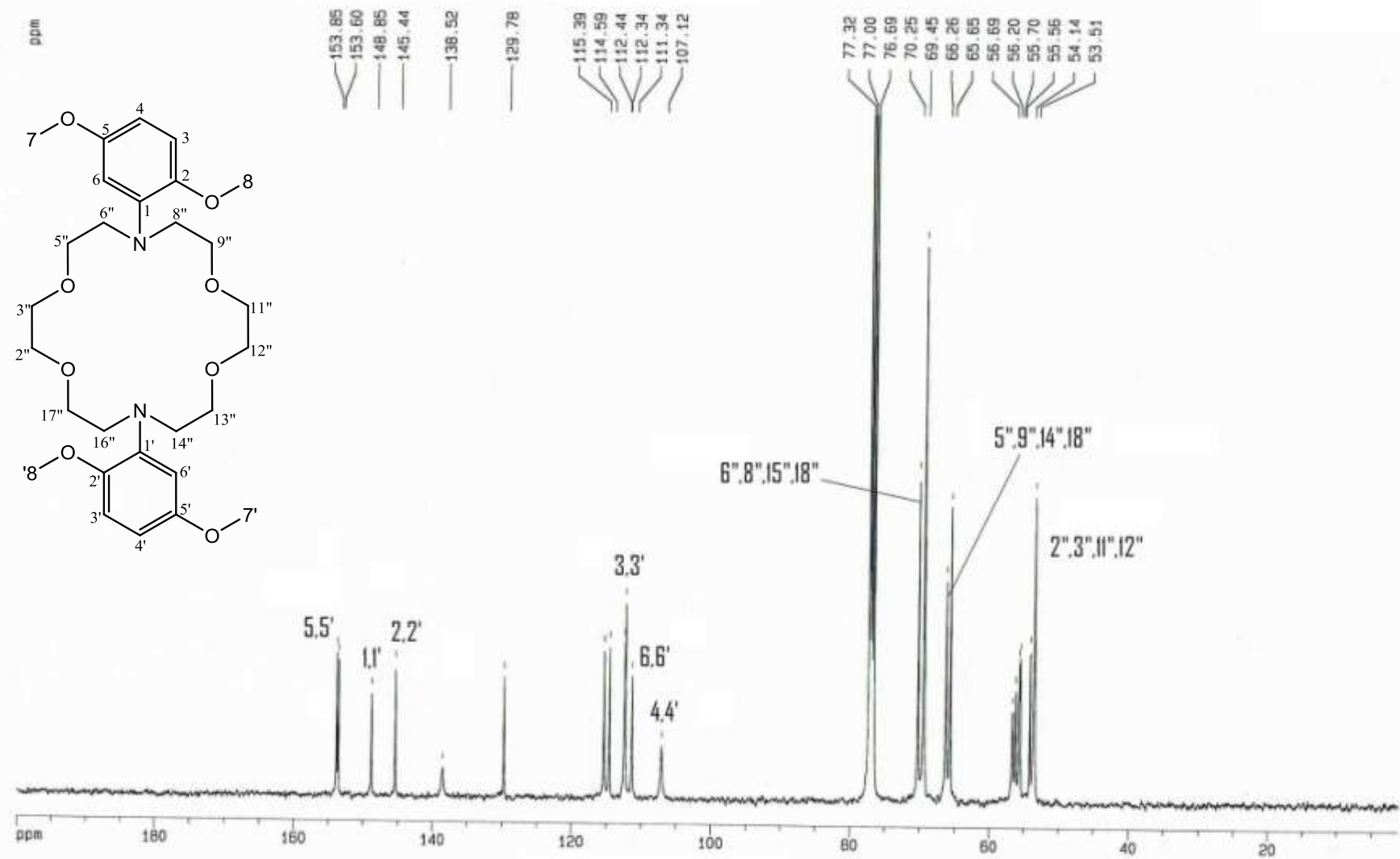


Figura 6.5 – Espectros de ¹³C-RMN do 7''',16'''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1''',4''',10''',13'''-tetra-oxa-7''',16'''-diazociclo-octadecano (7), em CDCl₃ (400 MHz).

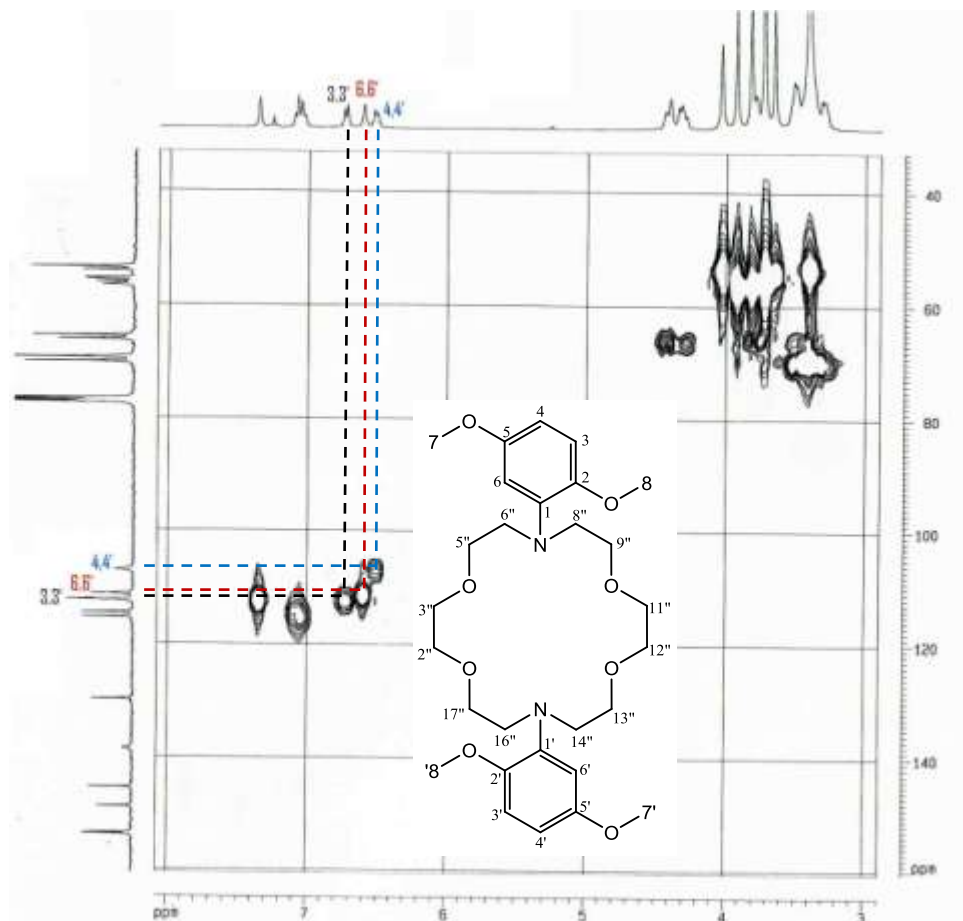


Figura 6.6 - Correlações a uma ligação (HMQC) obtidas para o 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (**7**), em CDCl₃ (400 MHz).

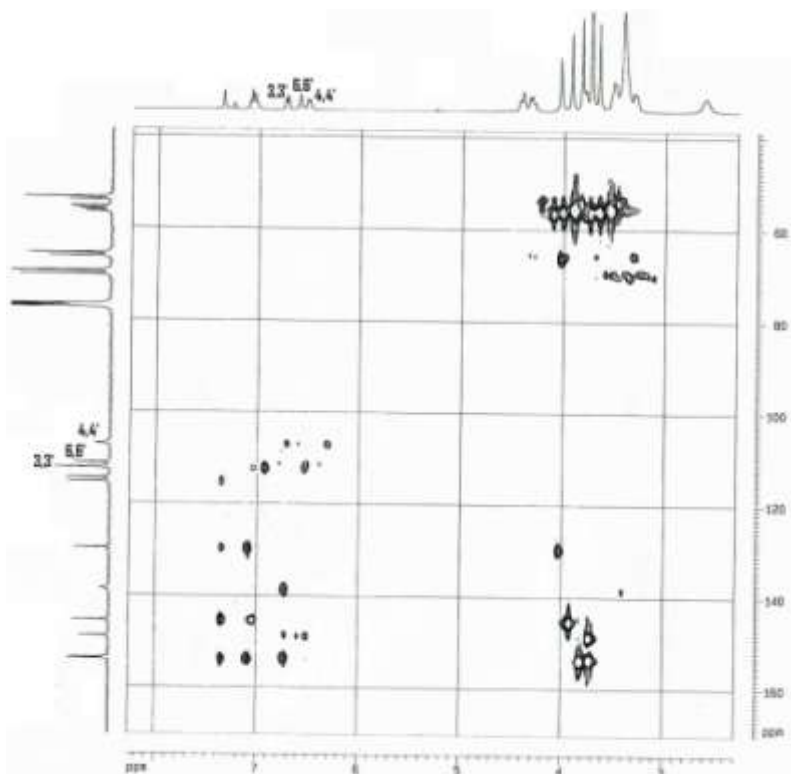


Figura 6.7 - Correlações a duas e três ligações (HMBC) obtidas para o 7'',16''-bis(2,5-dimetoxifenil)-1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano (**7**), em CDCl₃ (400 MHz).

6.3. Análise espectroscópica do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (8)

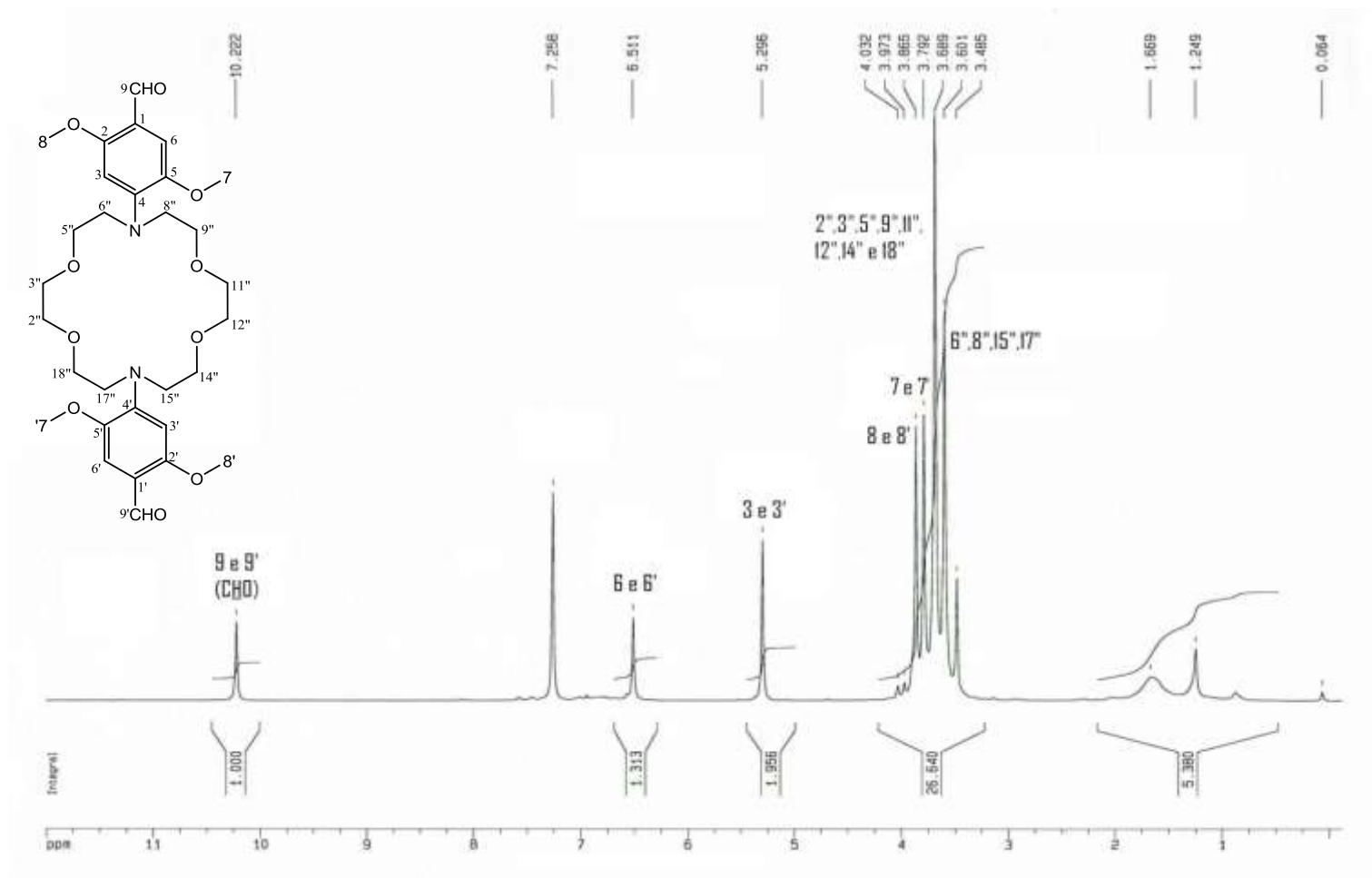


Figura 6.8 – Espectro de ¹H-RMN do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (8), em CDCl₃ (400 MHz).

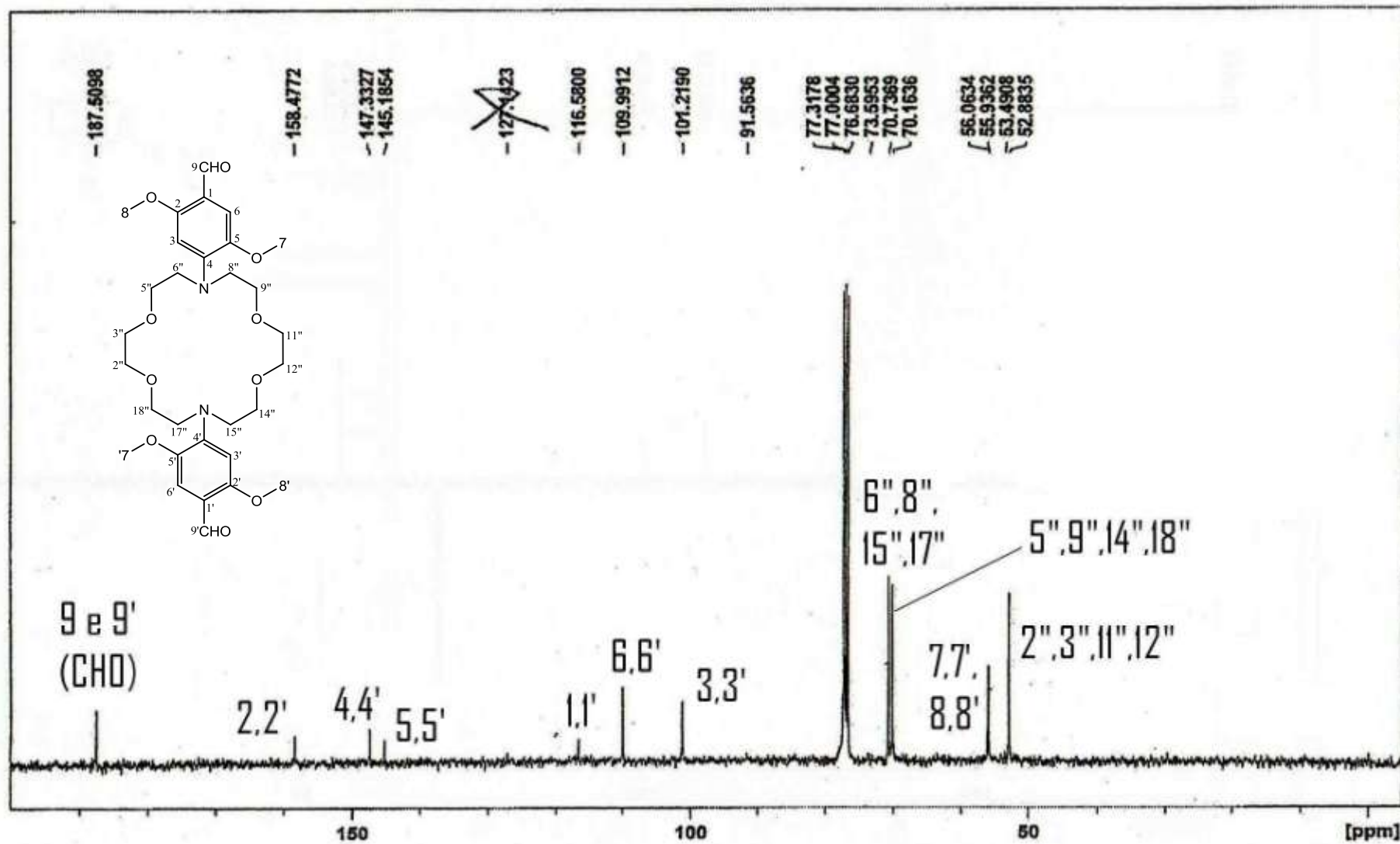


Figura 6.9 – Espectro de ^{13}C -RMN do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (8), em CDCl_3 (400 MHz).

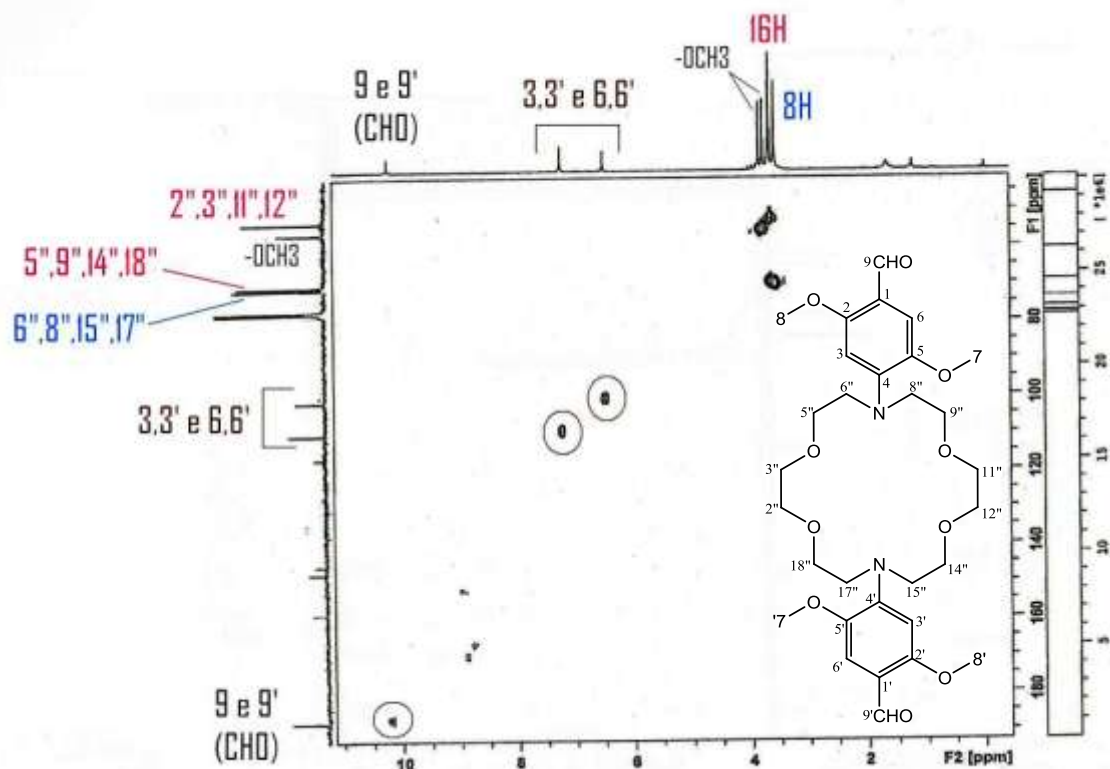


Figura 6.10 - Correlações a uma ligação (HMBC) obtidas para o 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(2,5-dimetoxibenzaldeído) (**8**), em CDCl_3 (400 MHz).

6.4. Análise espectroscópica do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4)

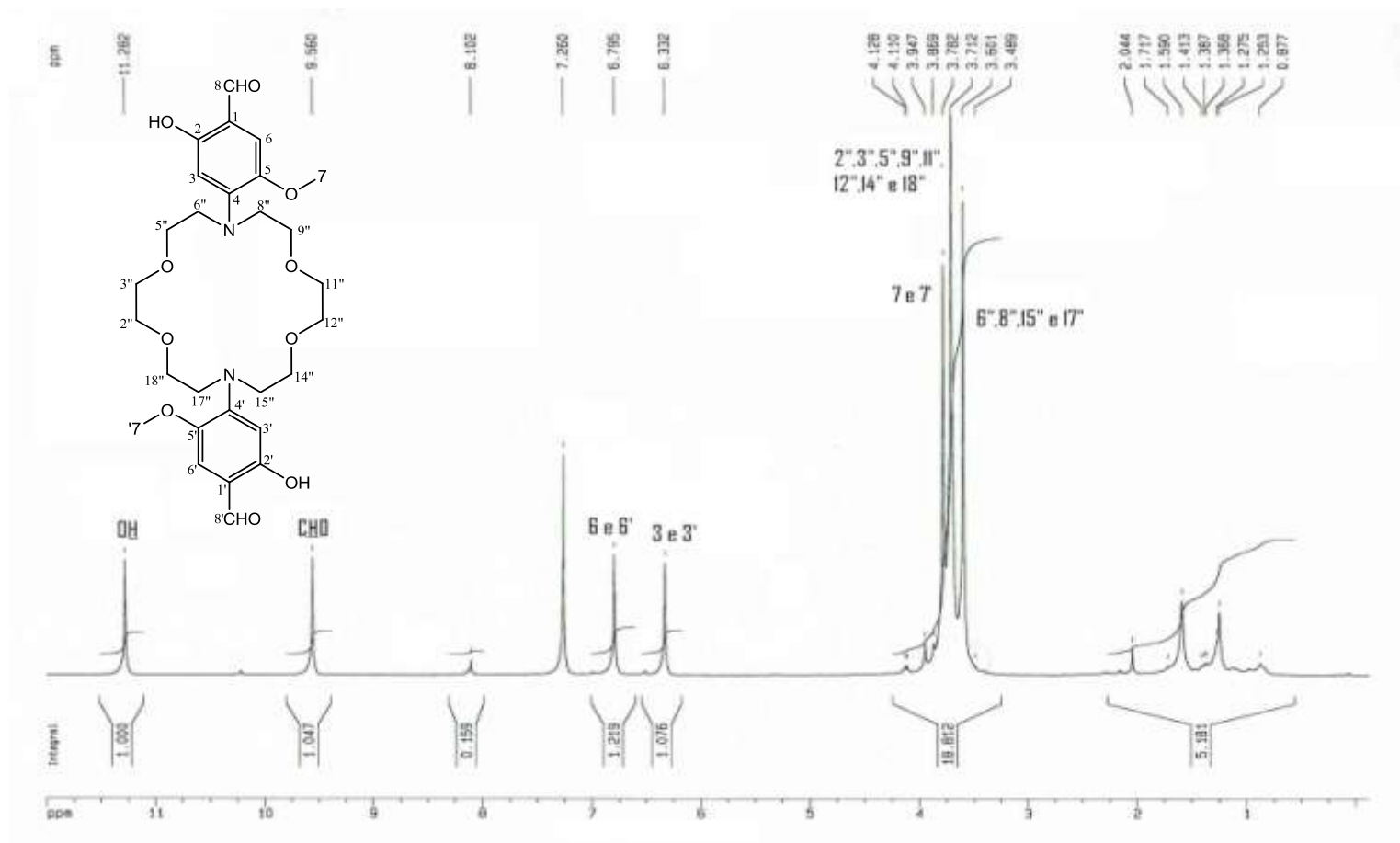


Figura 6.11 – Espectros de ¹H-RMN do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxibenzaldeído) (4), em CDCl₃ (400 MHz).

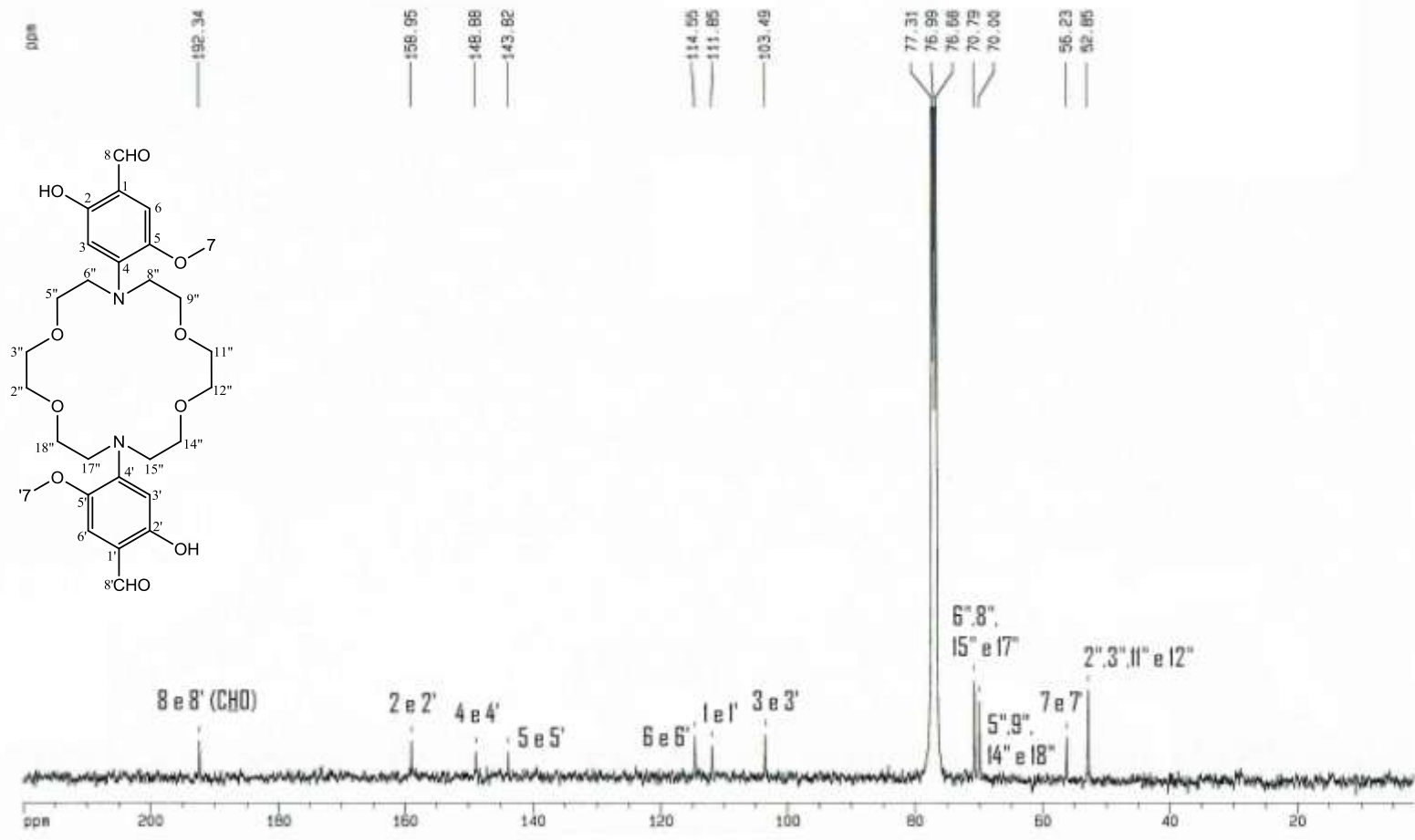


Figura 6.12 – Espectros de ^{13}C -RMN do 4,4'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il) bis(5-metoxi-2-hidroxi-benzaldeído) (**4**), em CDCl_3 (400 MHz).

6.5. Análise espectroscópica do 4-metilsoftalonitrilo (10)

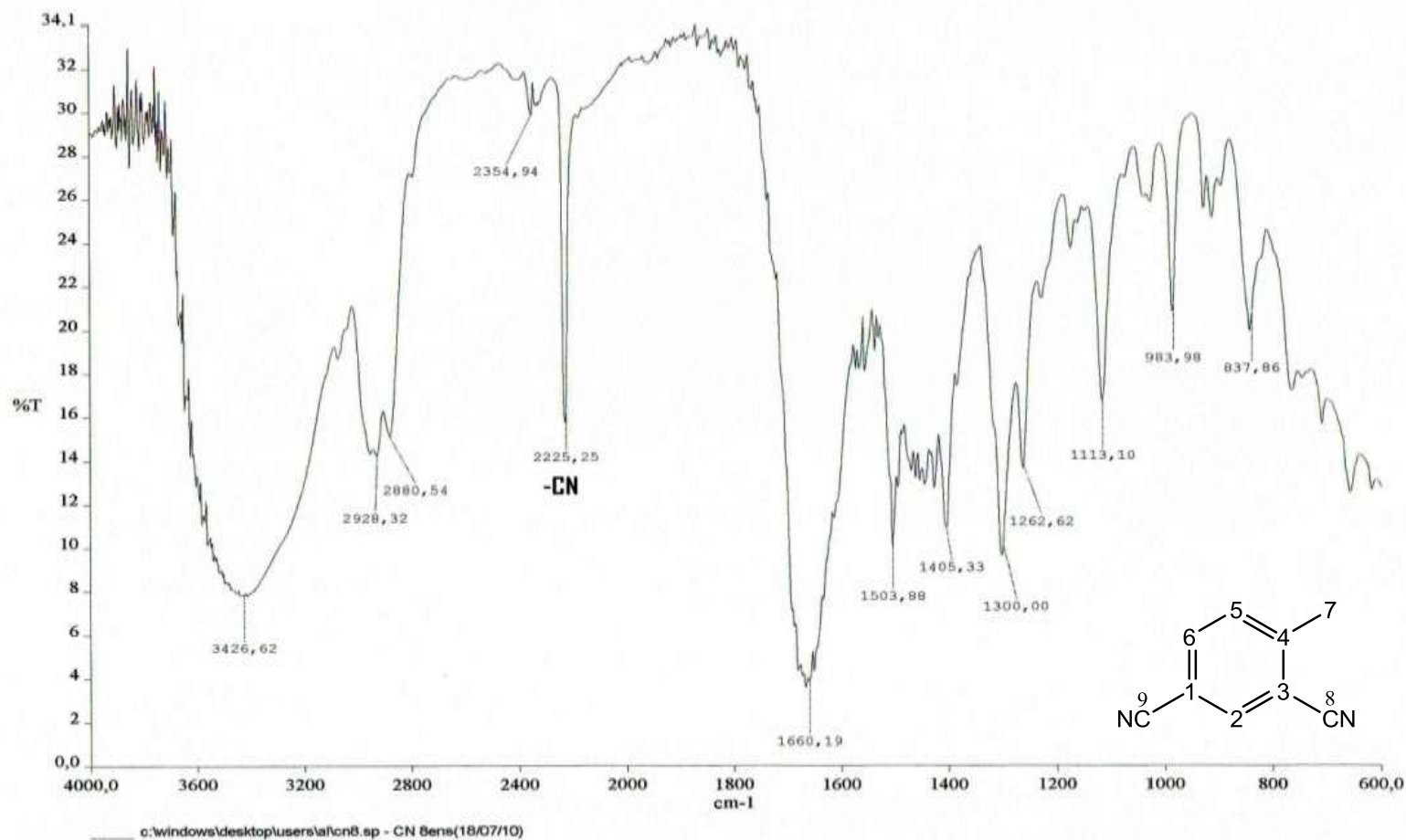


Figura 6.13 – Espectro de IV do 4-metilsoftalonitrilo (10), em discos de NaCl.

6.6. Análise espectroscópica do ácido 4-metilsoftálico (11)

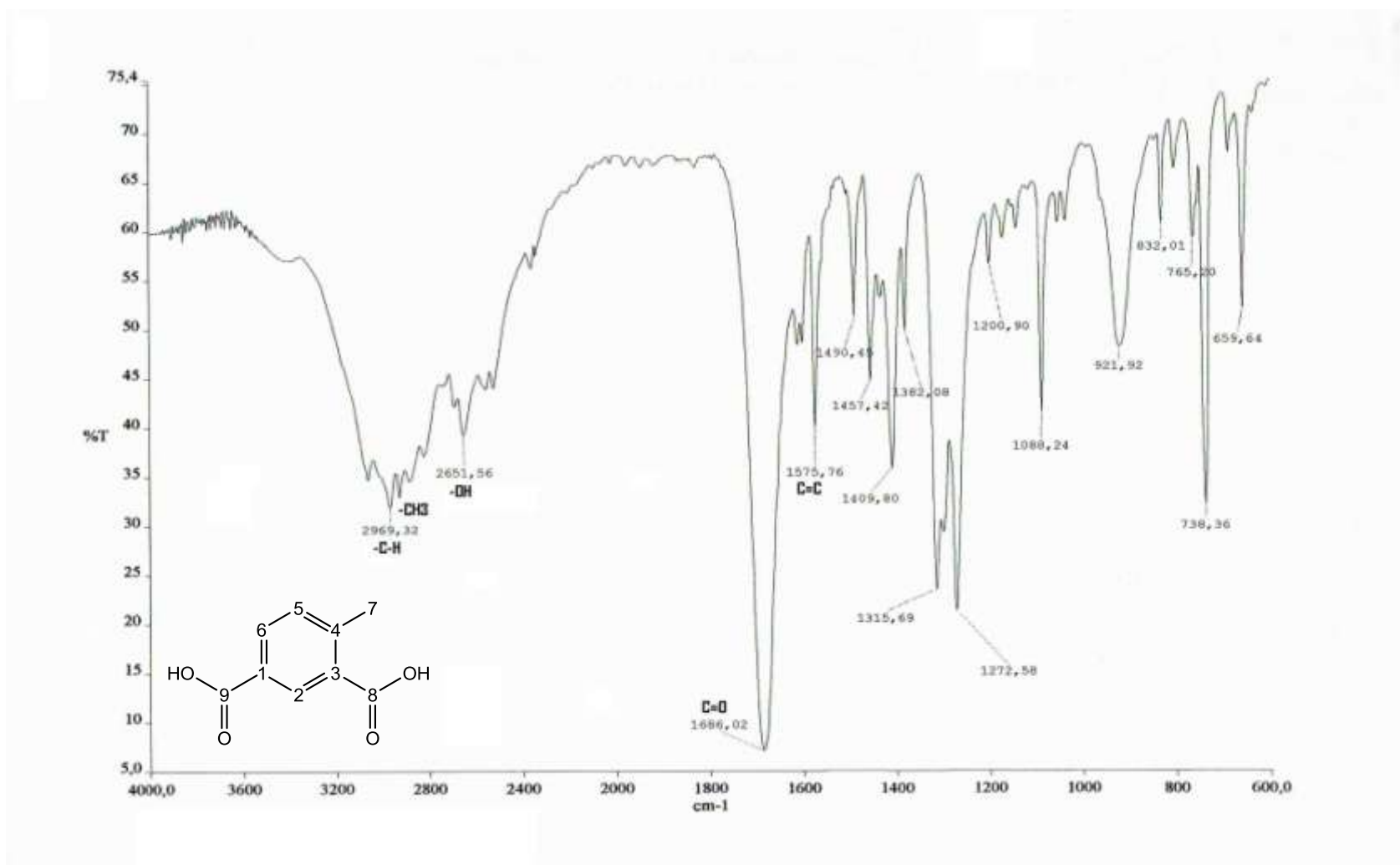


Figura 6.14 – Espectro de IV do ácido 4-metilsoftálico (11), em pastilhas de KBr.

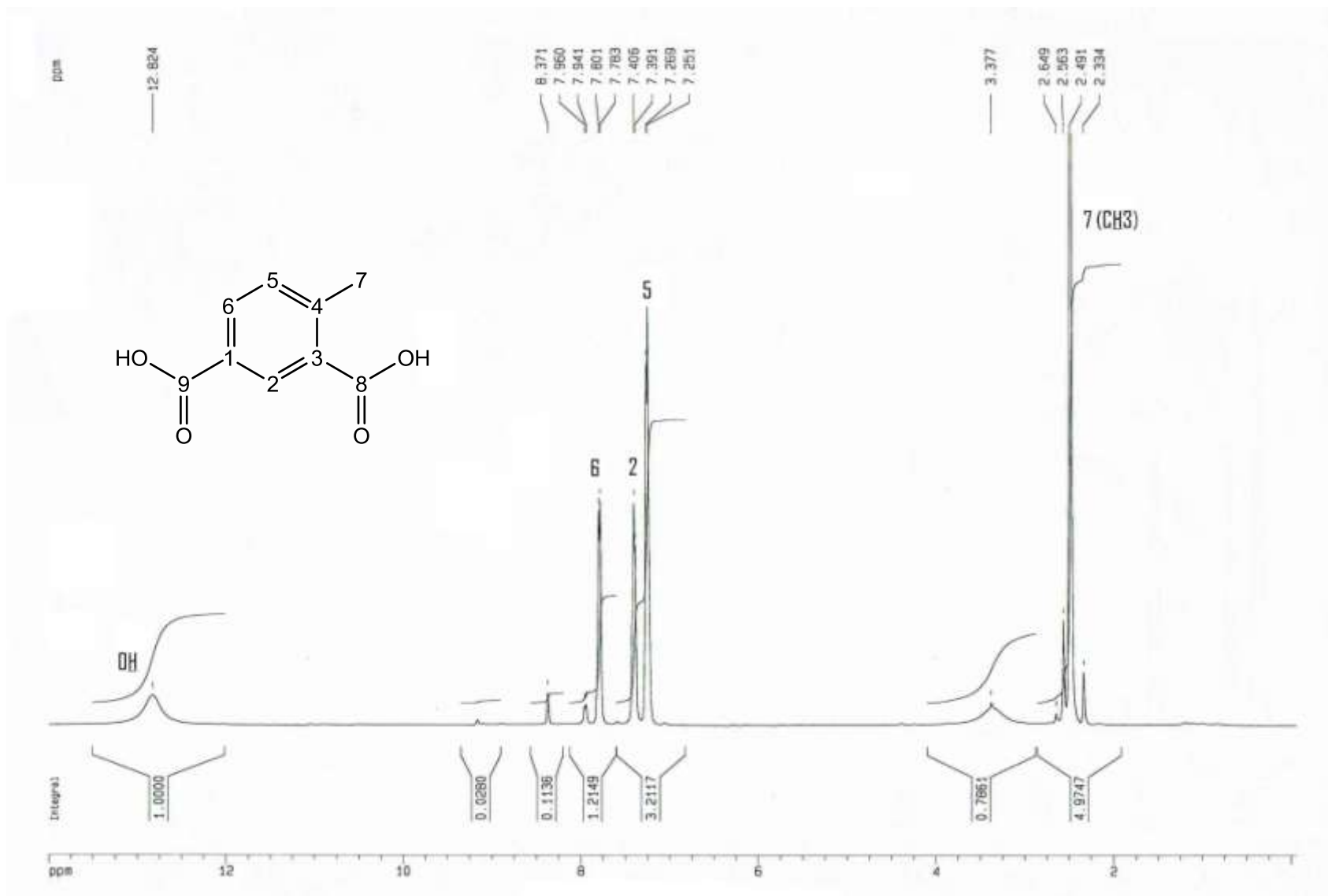


Figura 6.15 – Espectros de ¹H-RMN do ácido 4-metilsoftálico (11), em DMSO-d₆ (400 MHz).

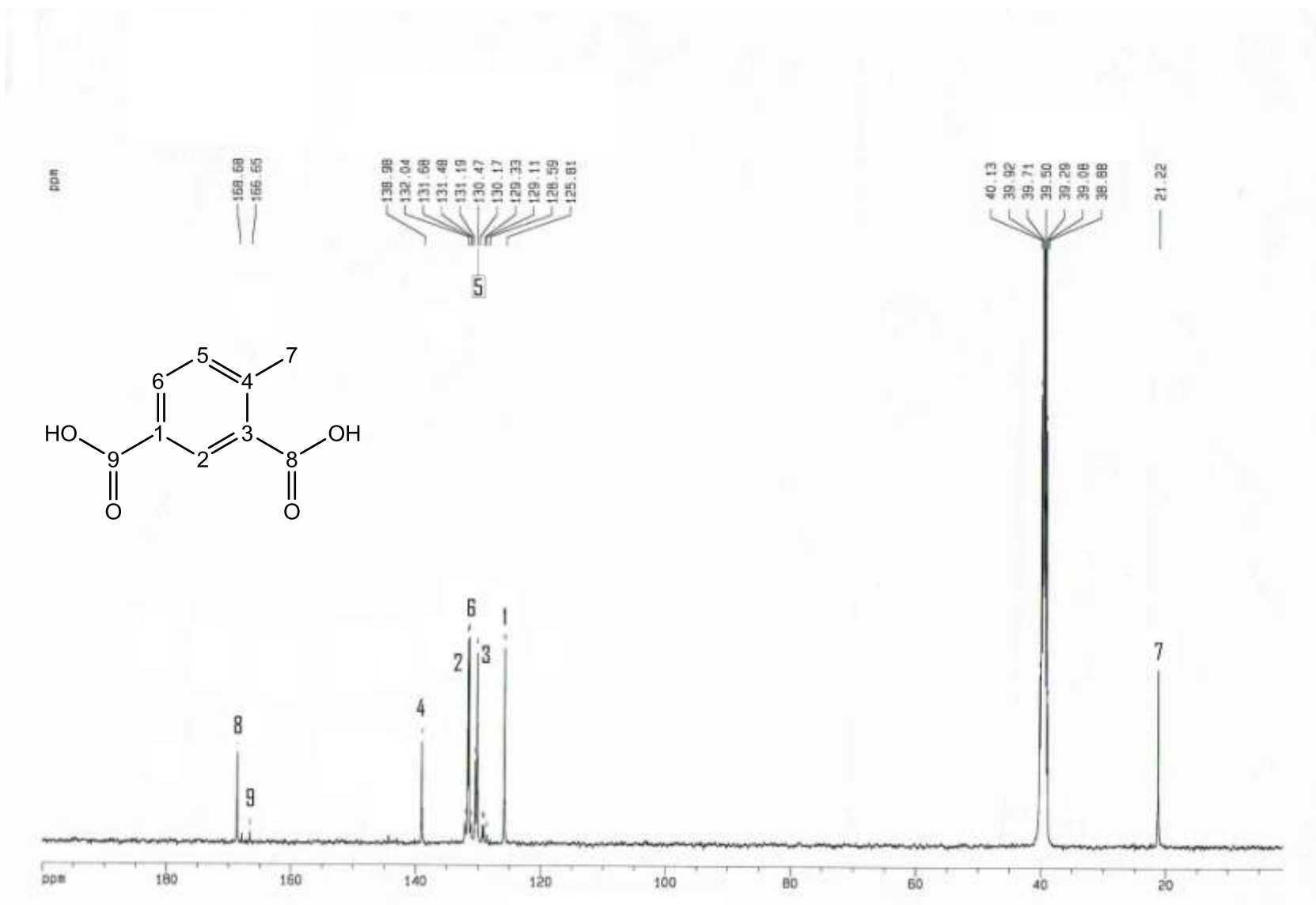


Figura 6.16 – Espectros de ^{13}C -RMN do ácido 4-metilsoftálico (11), em DMSO-d_6 (400 MHz).

6.7. Análise espectroscópica do 4-metilsoftalato de dimetilo (12)

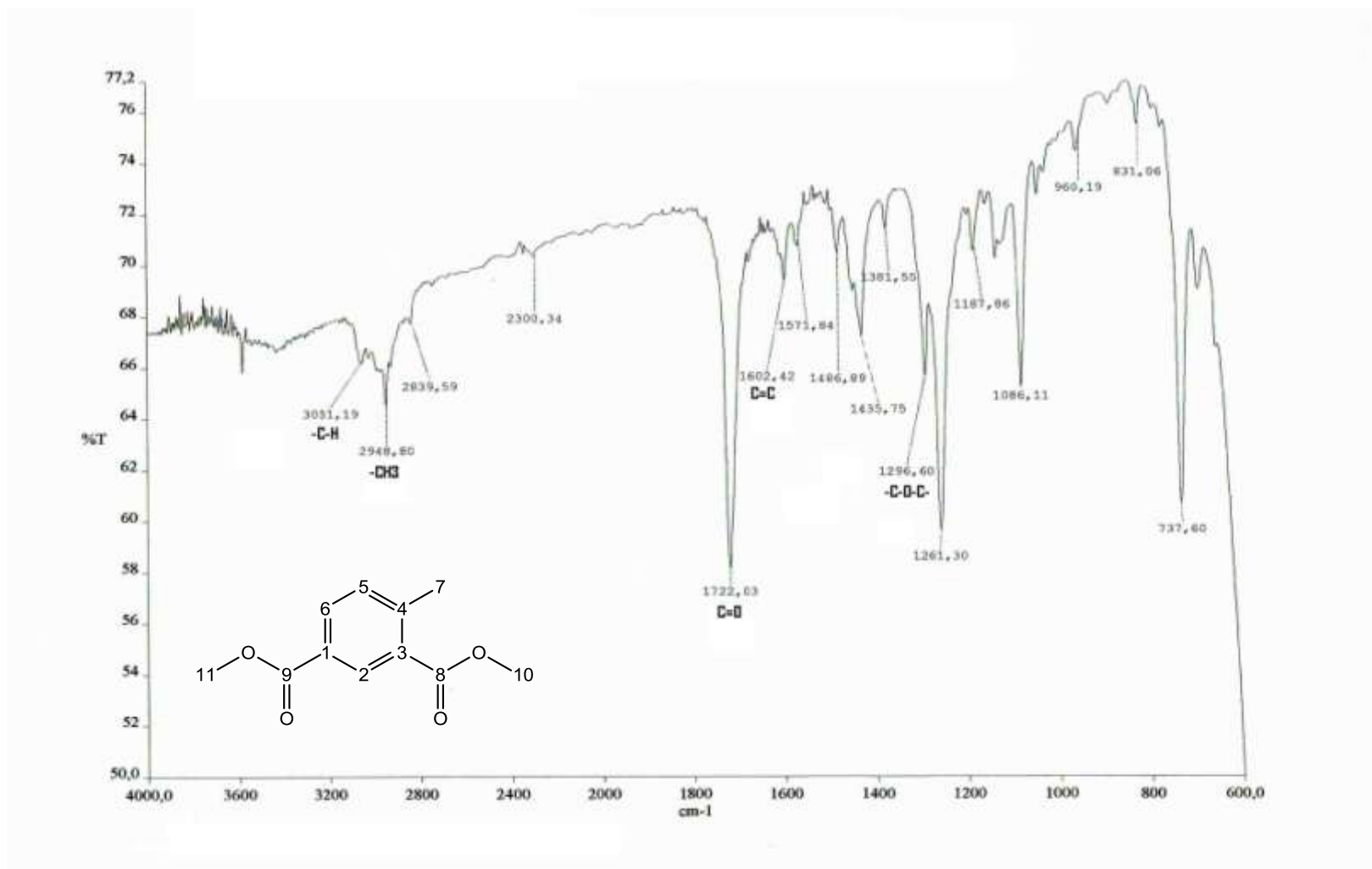


Figura 6.17 - Espectro de IV do 4-metilsoftalato de dimetilo (12), em pastilhas de KBr.

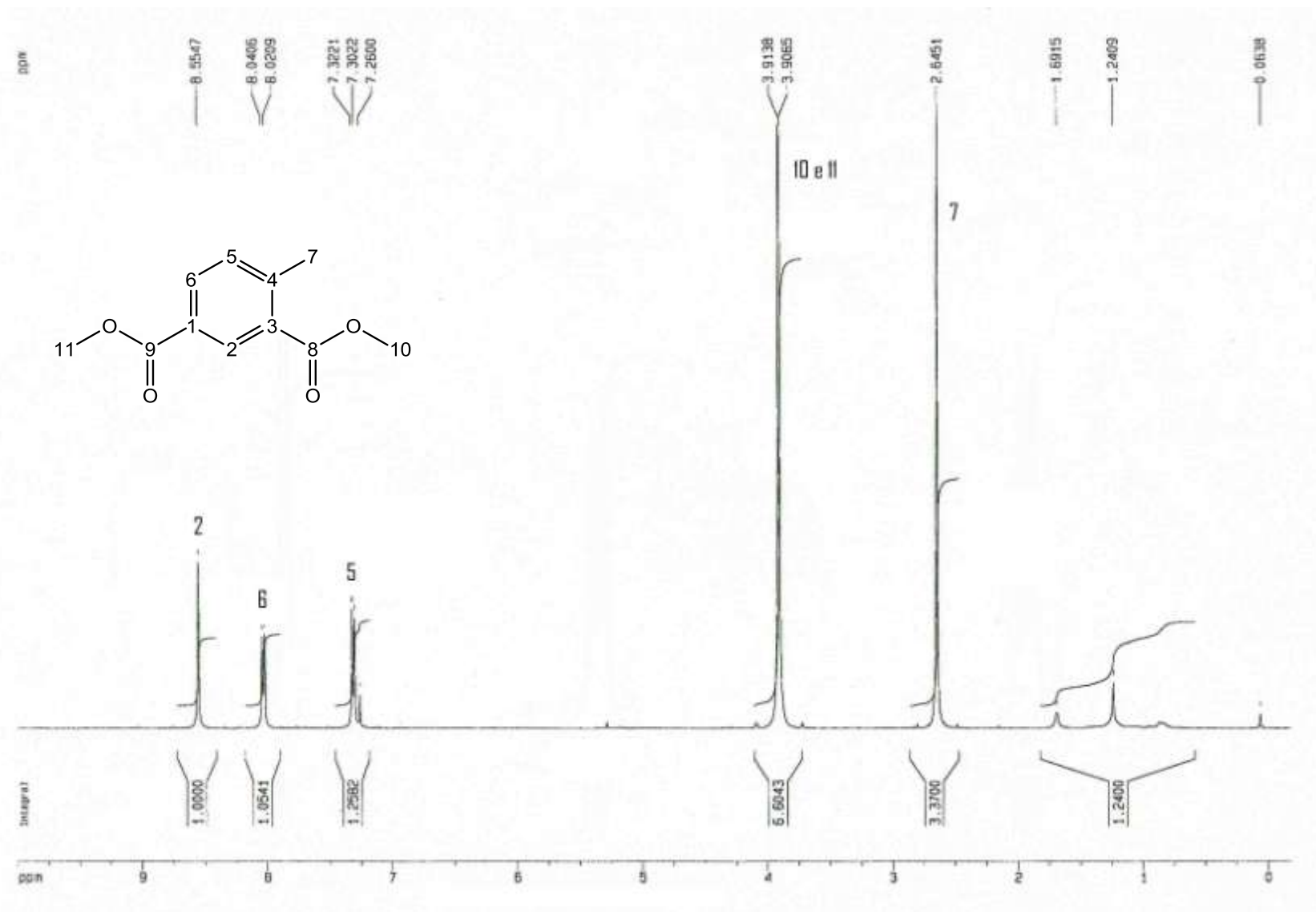


Figura 6.18 - Espectros de ¹H-RMN do 4-metilisofthalato de dimetilo (12), em CDCl₃ (400 MHz).

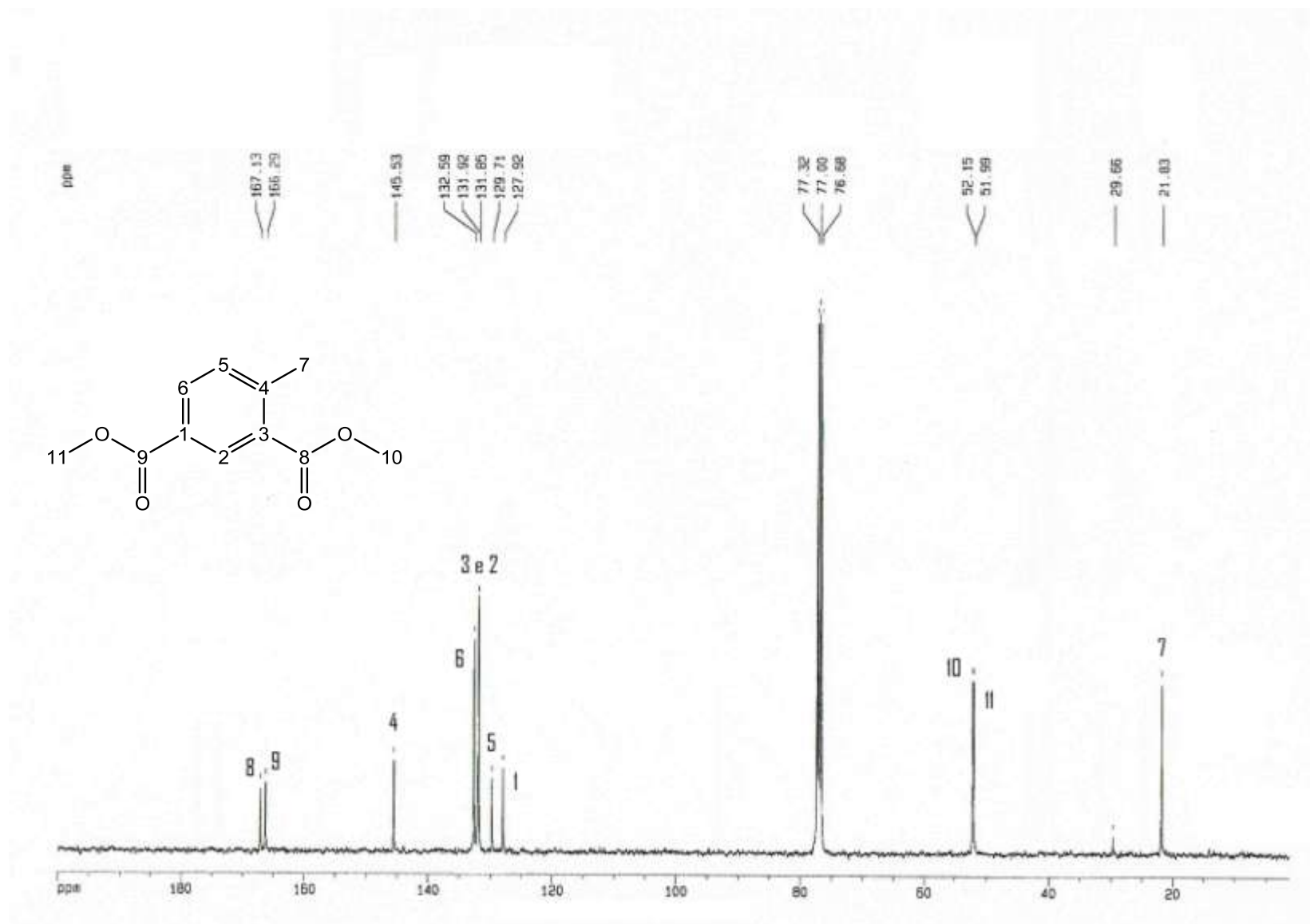


Figura 6.19 - Espectros de ¹³C-RMN do 4-metilsoftalato de dimetilo (12), em CDCl₃ (400 MHz).

6.8. Análise espectroscópica do 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5)

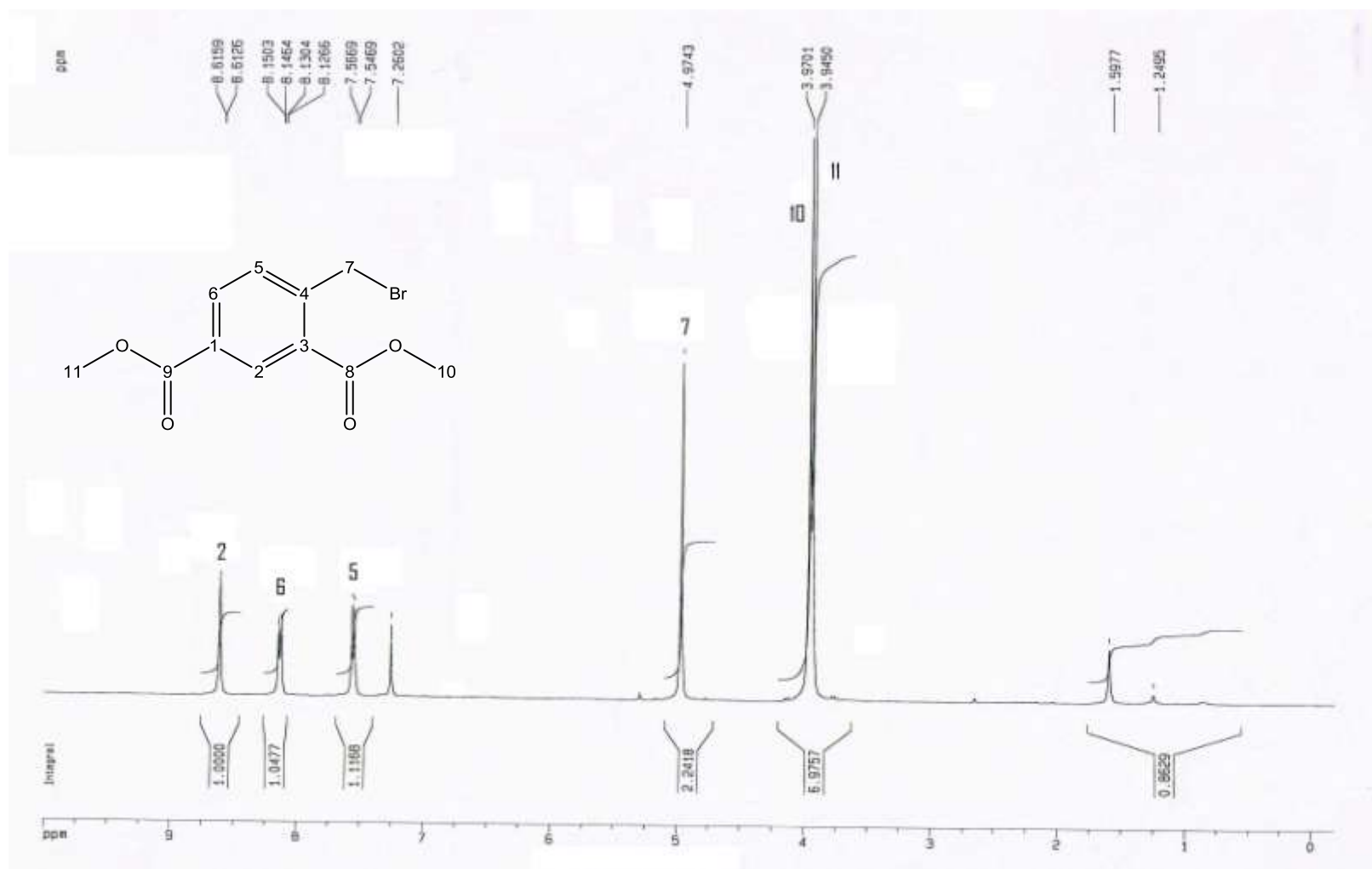


Figura 6.20 – Espectro de ¹H-RMN do 4-metilbromo-isoftalato de dimetilo (5), em CDCl₃ (400 MHz).

6.9. Análise espectroscópica do 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isoftalato de tetra-metilo (26)

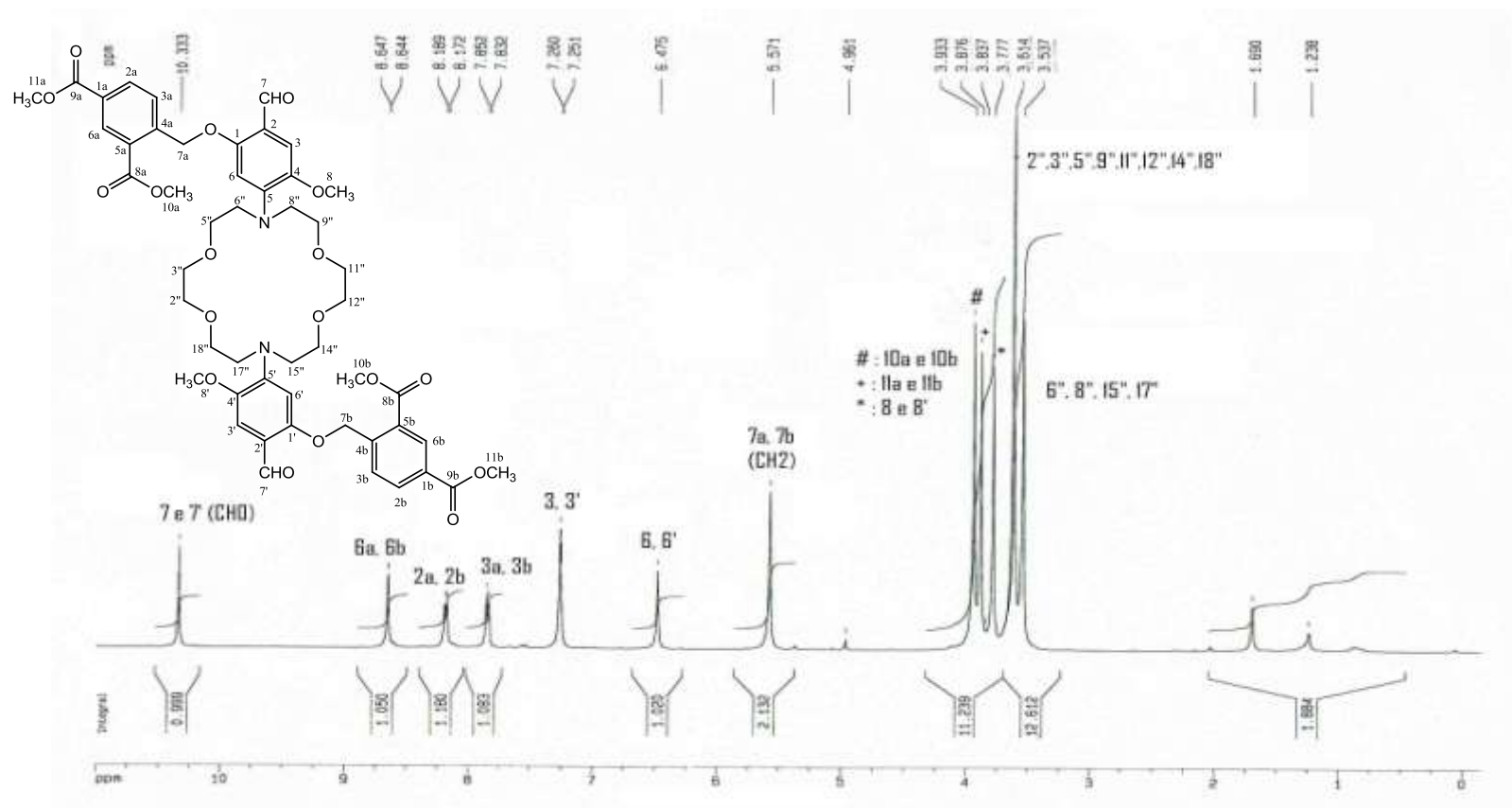


Figura 6.21 - Espectros de ¹H-RMN do 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isoftalato de tetra-metilo (26), em CDCl₃ (400 MHz).

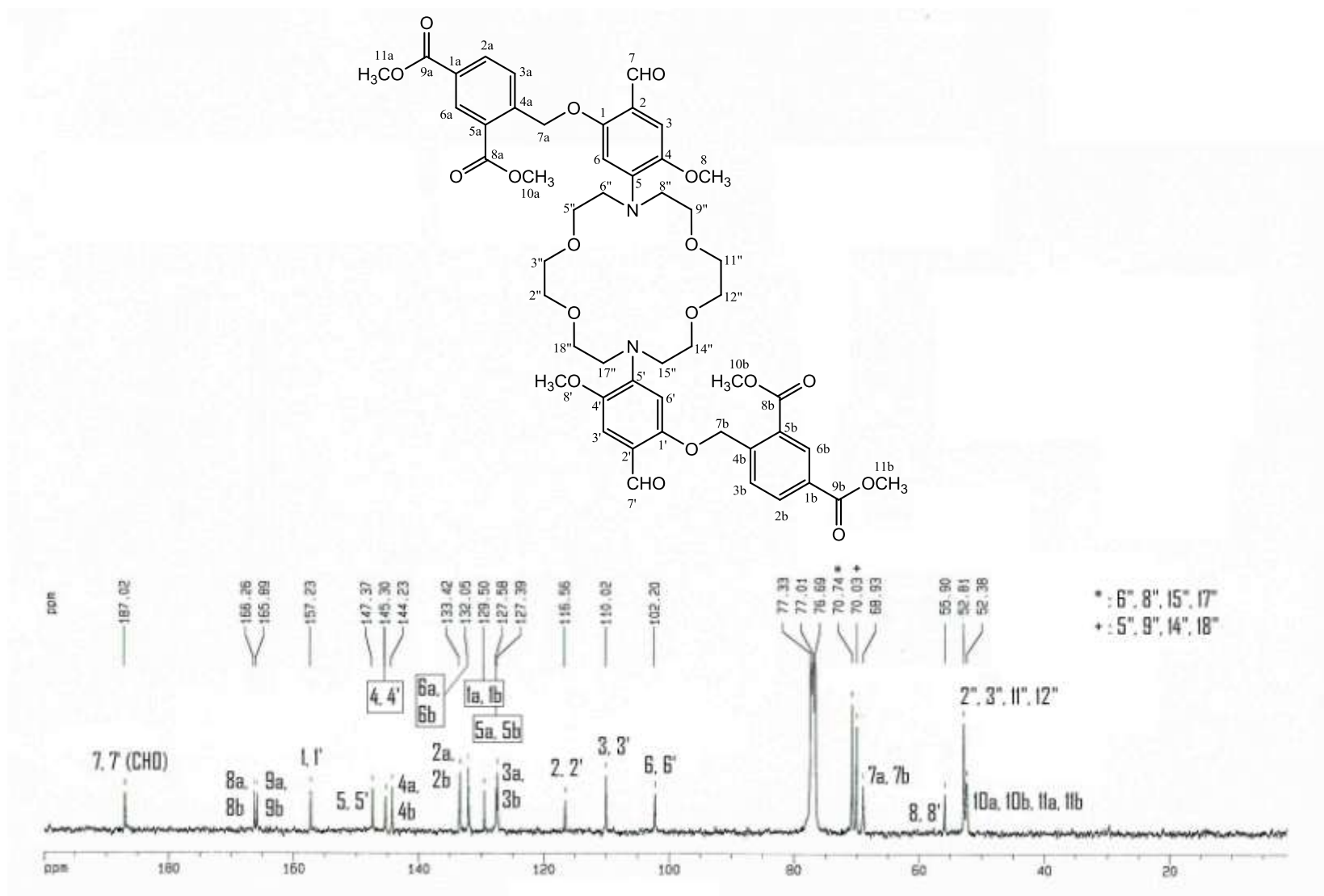


Figura 6.22 - Espectros de ^{13}C -RMN do 4a,4b - (5,5' - (1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(2,2'-formil-4,4'-metoxi-5,1,5',1'-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)) di-isofalato de tetra-metilo (**26**), em CDCl₃ (400 MHz).

6.10. Análise espectroscópica do 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'- metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio ou PBF1 (3)

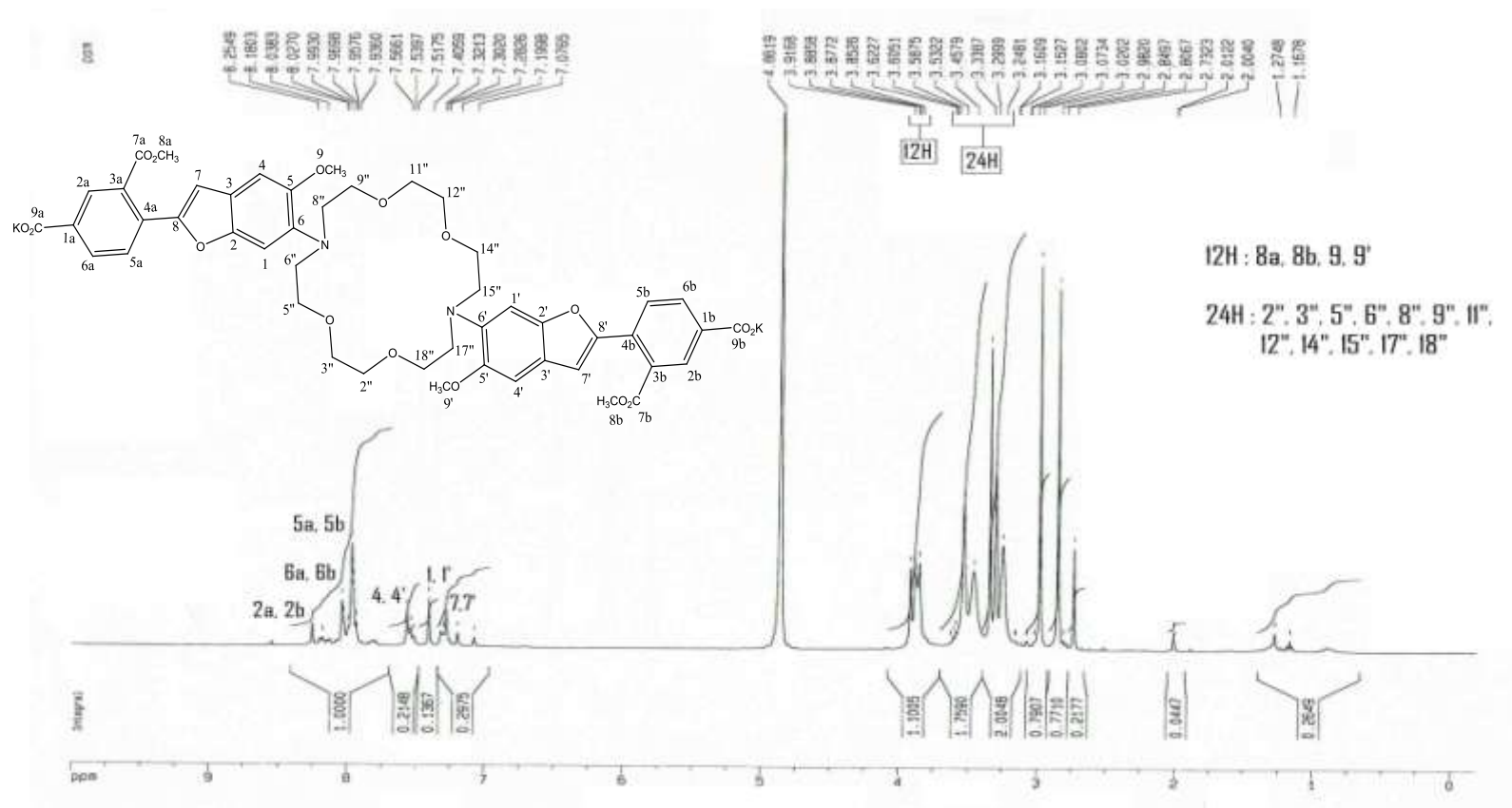


Figura 6.23 - Espectro de ^1H -RMN do 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'- metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio ou PBF1 (3), em CD_3OD (400 MHz).

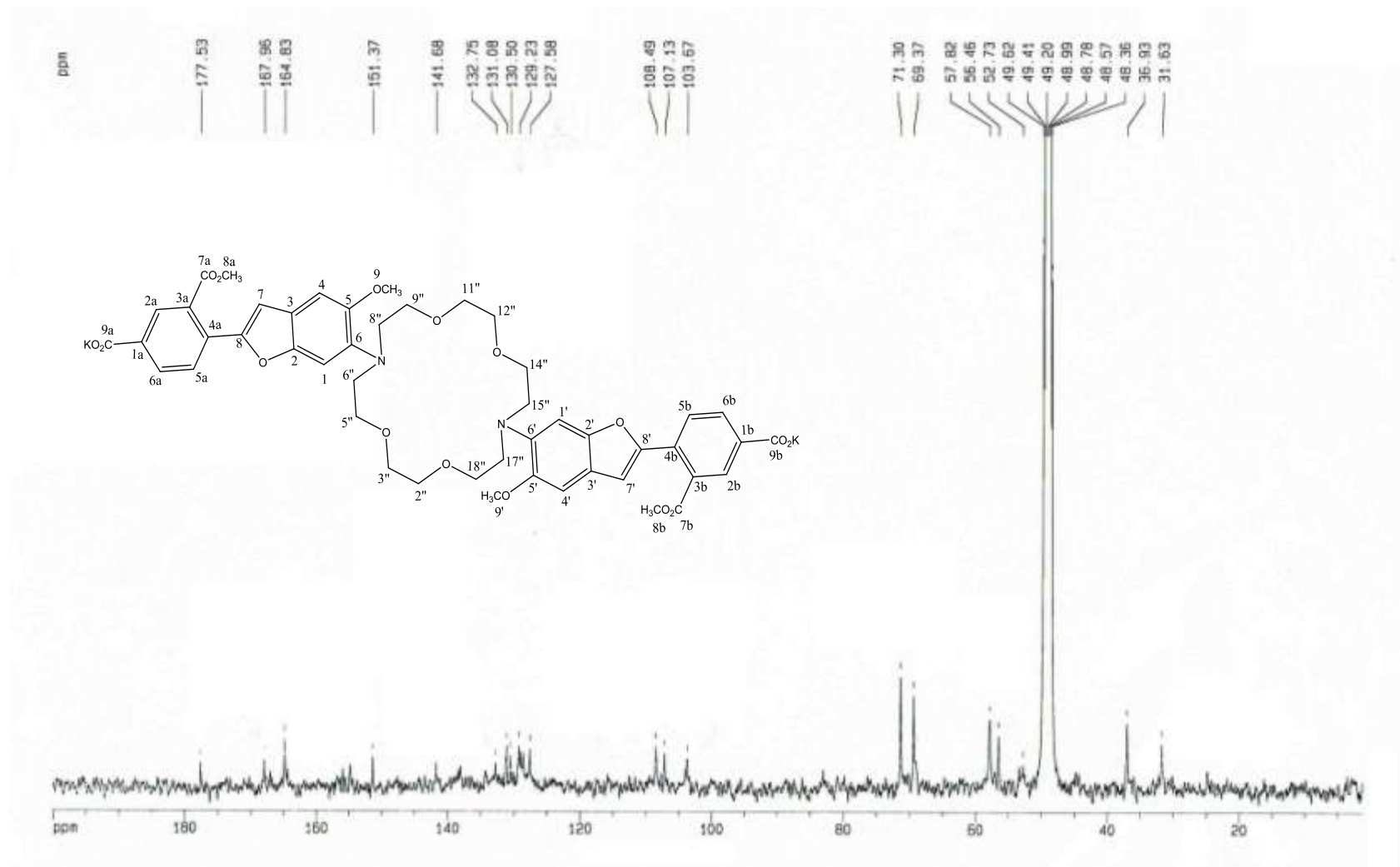


Figura 6.24 - Espectro de ¹³C-RMN do 4a,4b-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'- metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il)bis(3a,3b-metoxicarbonilo) benzoato) de potássio ou PBF1 (**3**), em CD₃OD (400 MHz).

6.11. Análise espectroscópica do 4,4'-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5-metoxibenzofurano-6,2-di-il)di-isoftalato de tetra-etilo (27)

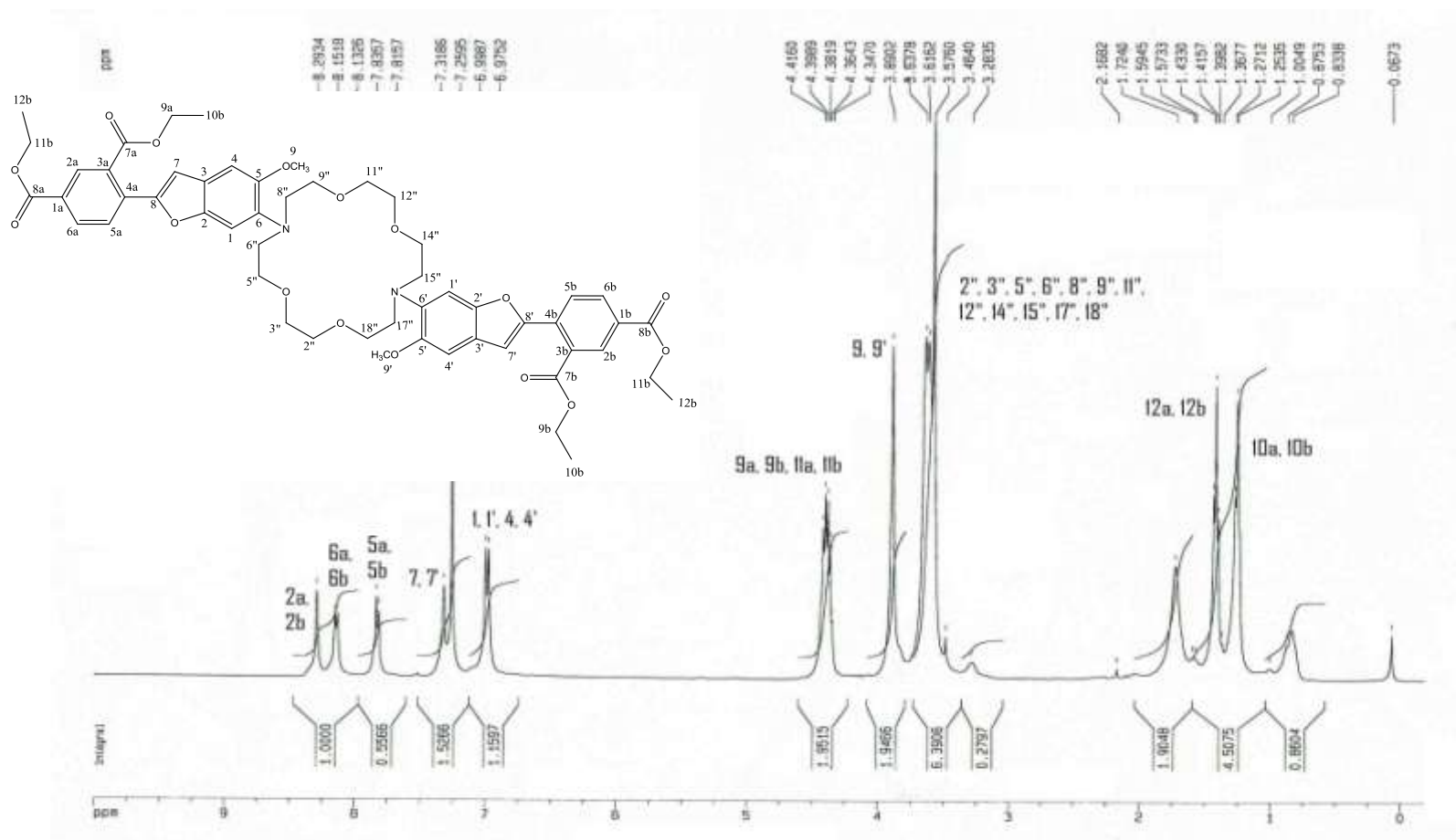
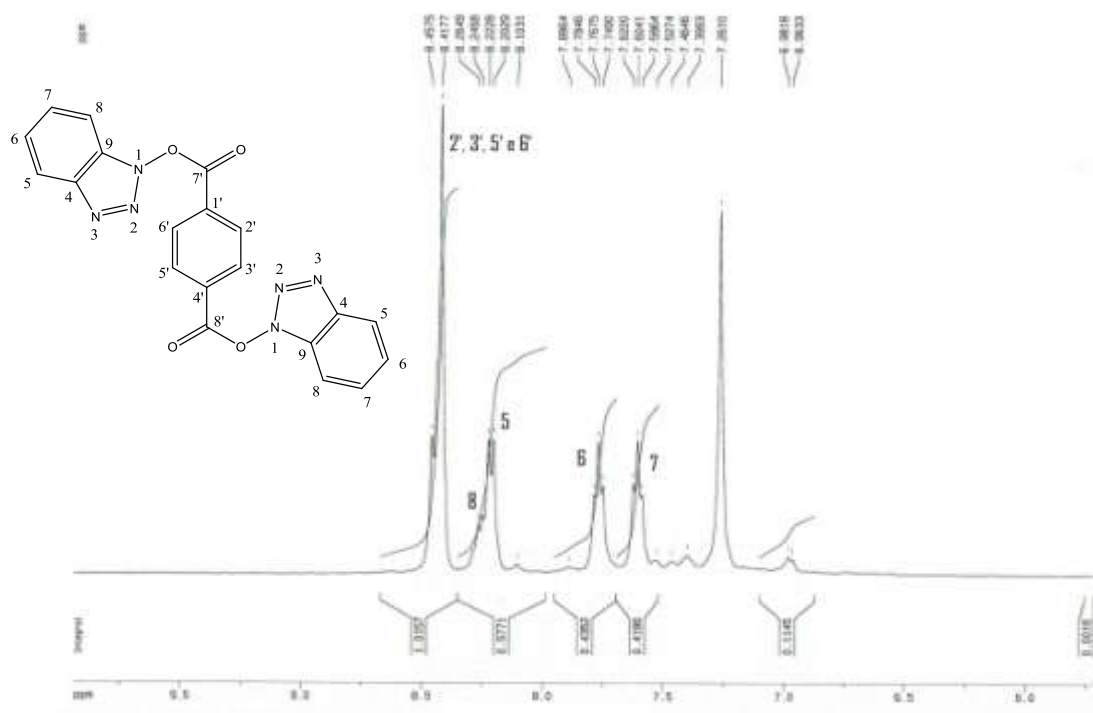


Figura 6.25 - Espectro de ¹H-RMN do 4,4'-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5-metoxibenzofurano-6,2-di-il)di-isoftalato de tetra-etilo (27), em CD₃OD (400 MHz).

6.12. Análise espectroscópica do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) (33)

a).



b).

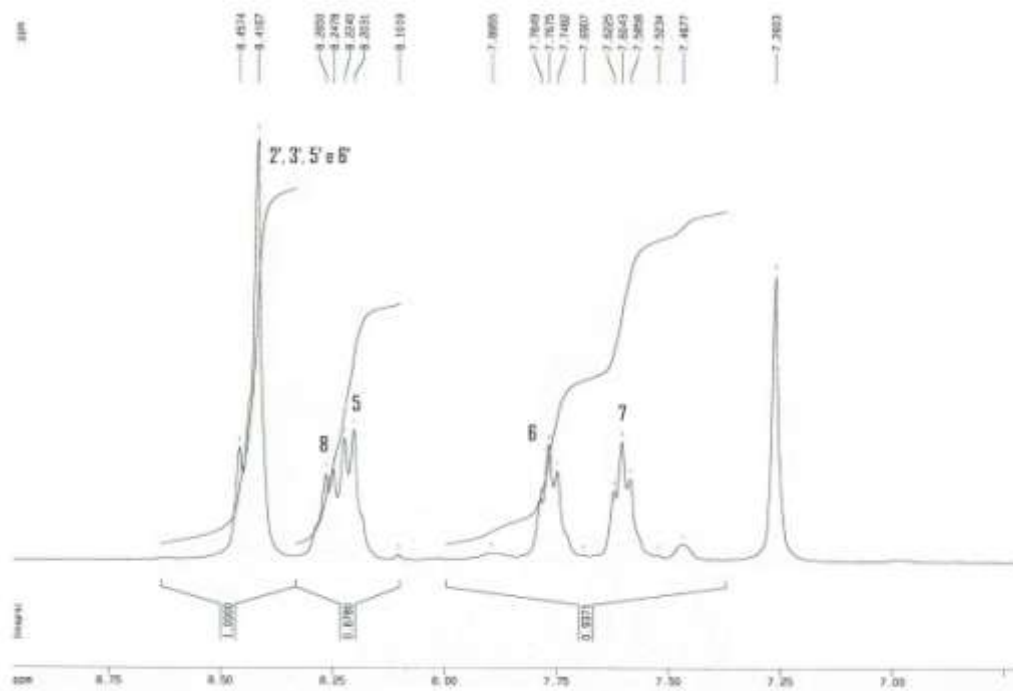


Figura 6.26 – Espectros de ^1H -RMN do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) (33) a partir dos reagentes a) Ácido Tereftálico (29) e b) Tereftalato de Potássio (32), em CDCl_3 (400 MHz).

6.13. Análise espectroscópica do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) / Dextrano (34).

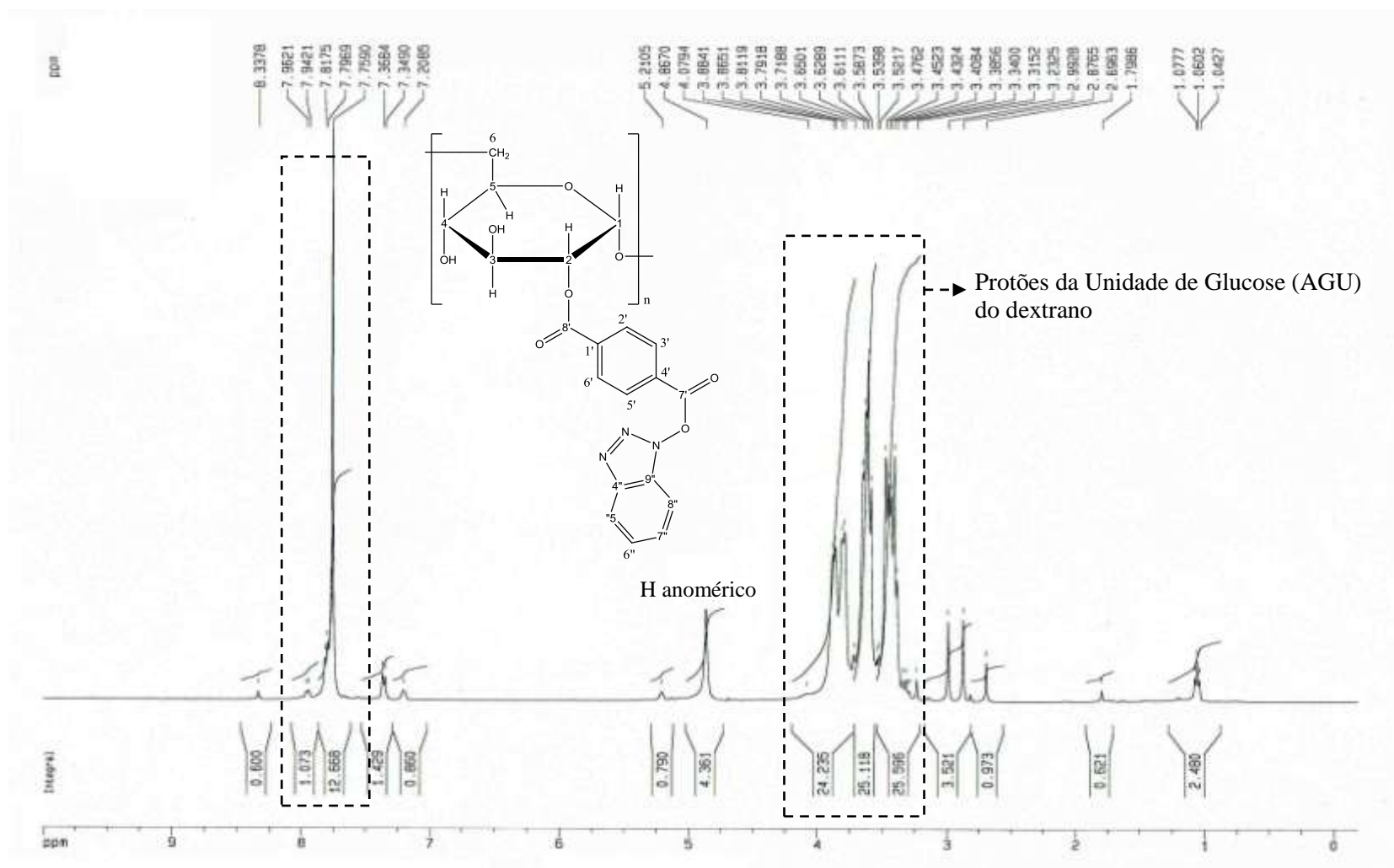


Figura 6.27 – Espectro de ¹H-RMN do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) / Dextrano (34), em D₂O (400 MHz).

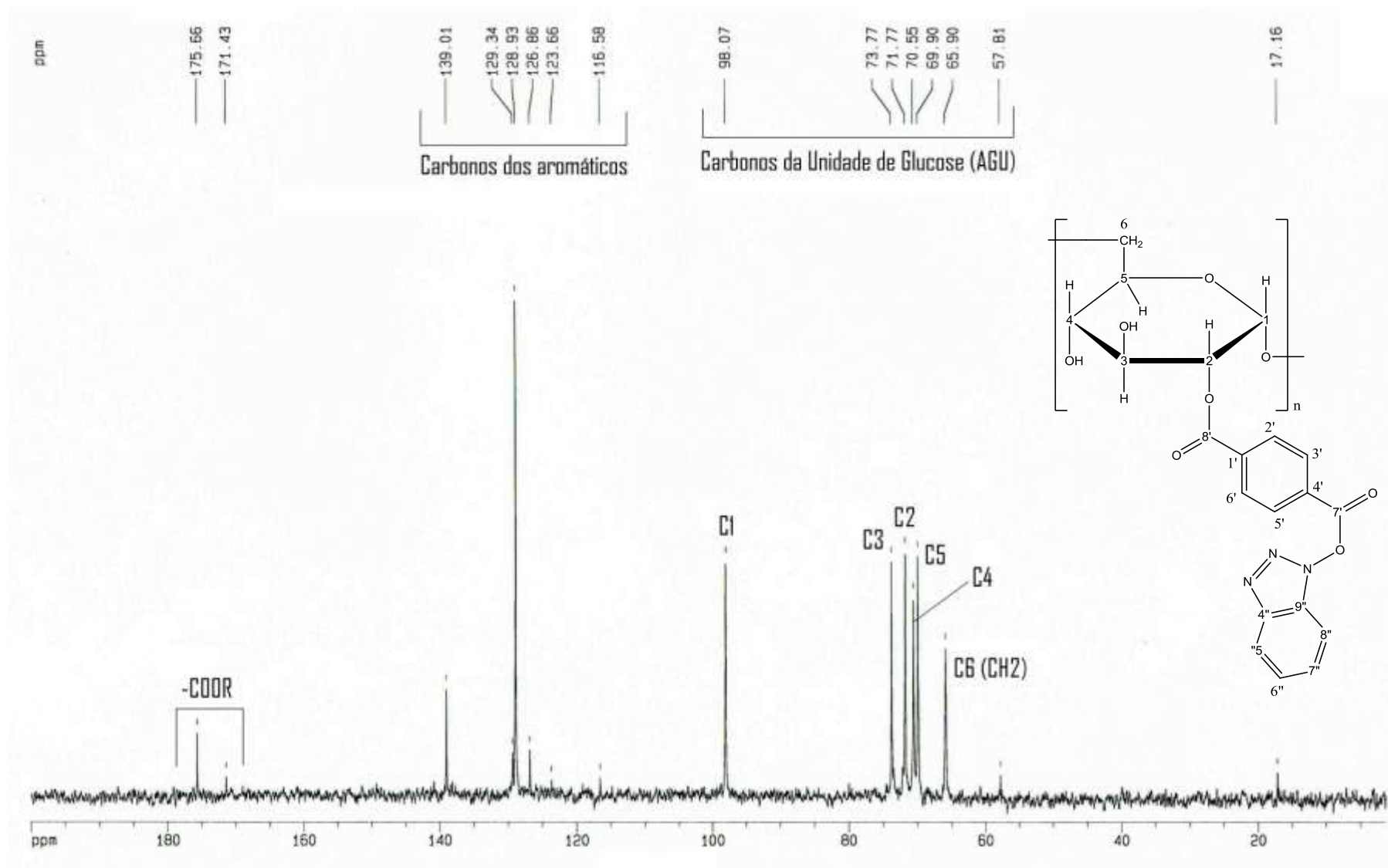


Figura 6.28 – Espectro de ^{13}C -RMN do Tereftalato de di(benzo[1,2,3]triazole) / Dextrano (**34**), em D_2O (400 MHz).

6.14. Análise espectroscópica do PBFi di(benzo[1,2,3]triazole) (15)

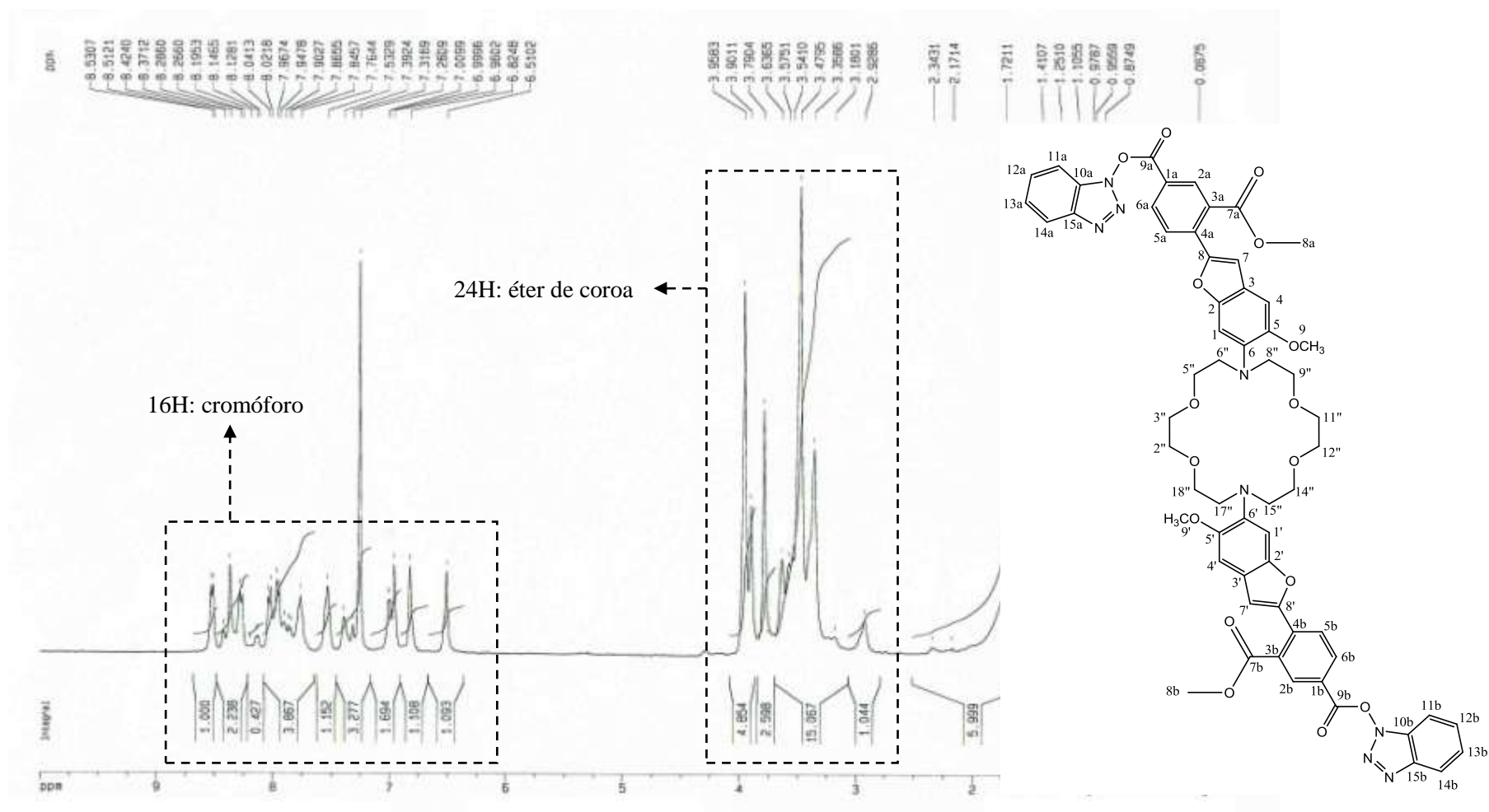


Figura 6.29 – Espectro de ¹H-RMN do 1a,1b-di(1H-benzo[1,2,3]triazole-1-il)-3a,3b-dimetil-4,4'-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclooctadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'-metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il) di-isoftalato ou PBFi di(benzo[1,2,3]triazole) (15), em CDCl₃ (400 MHz).

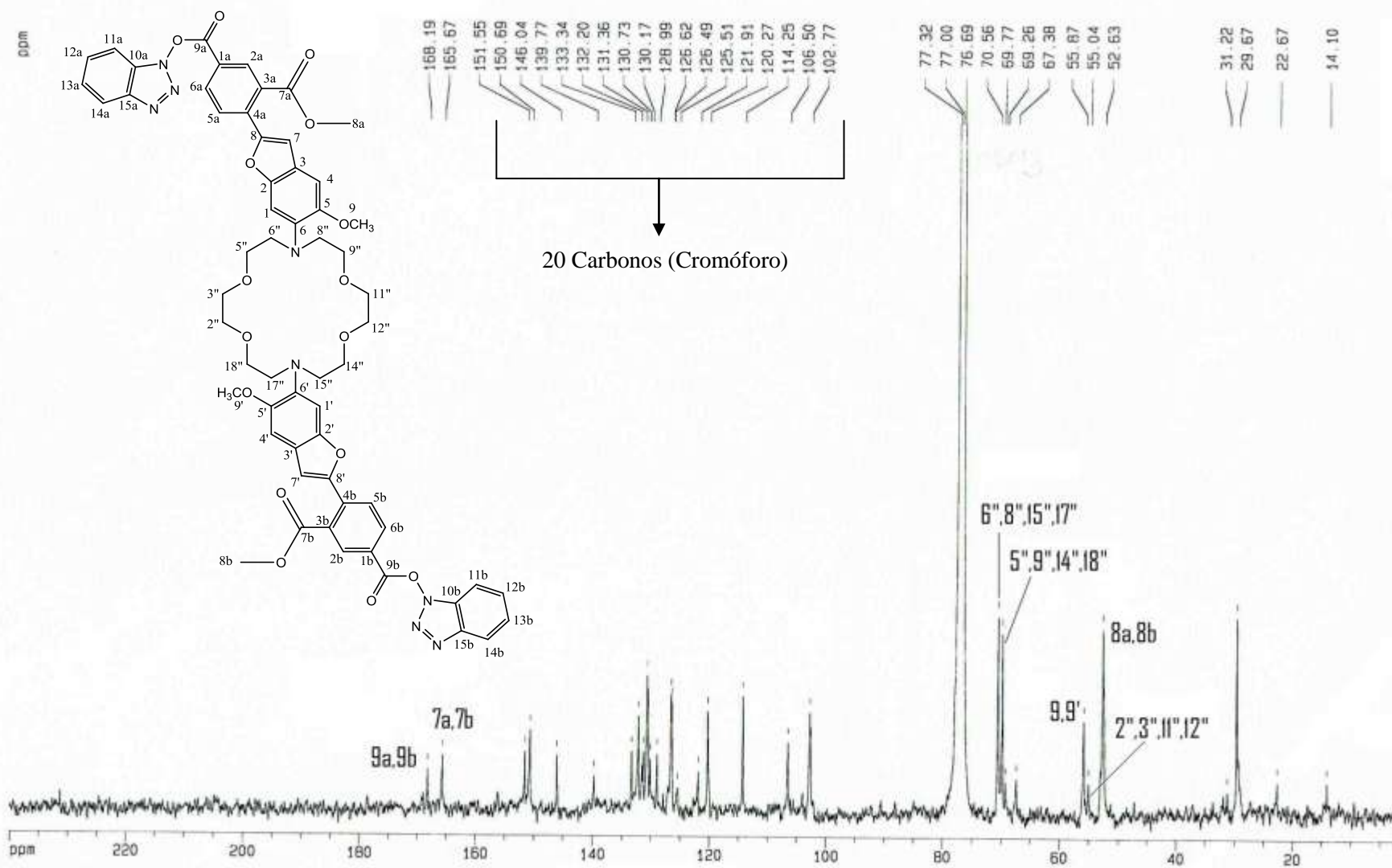


Figura 6.30 – Espectro de ¹³C-RMN do 1a,1b-di(1H-benzo[1,2,3]triazole-1-il)-3a,3b-dimetil-4,4'-(6,6'-(1'',4'',10'',13''-tetra-oxa-7'',16''-diazociclociclo-octadecano-7'',16''-di-il)bis(5,5'-metoxibenzofurano-6,6',2,2'-di-il) di-isoftalato ou PBFi di(benzo[1,2,3]triazole) (**15**), em CDCl₃ (400 MHz).

6.15. Análise espectroscópica do Dextrano 9,000-11,000 (13)

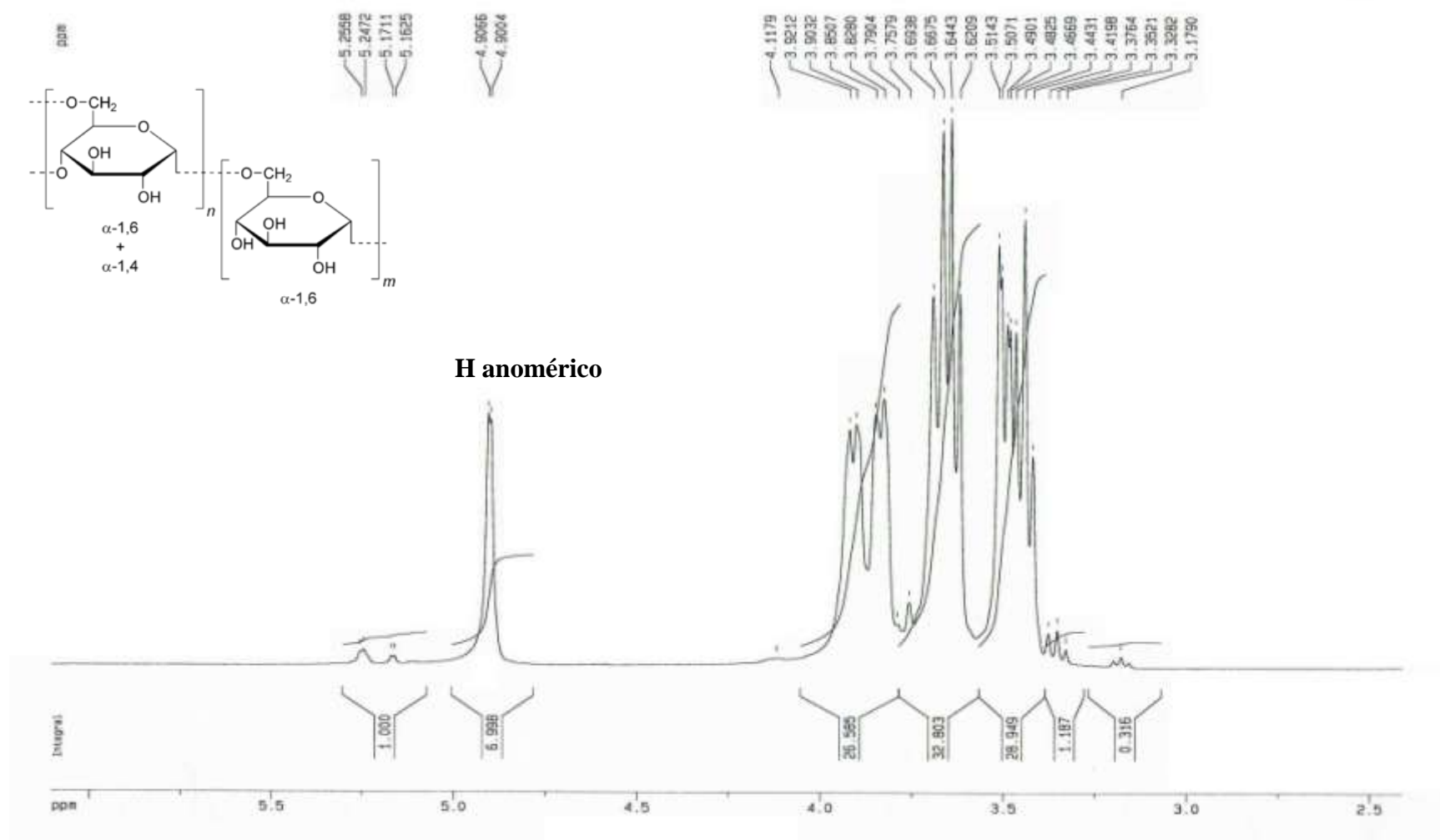


Figura 6.31 - Espectros de $^1\text{H-NMR}$ do Dextrano 9,000-11,000 (13), em D_2O (400 MHz).

6.16. Análise espectroscópica do Sensor Fluorescente de Potássio: PBF1/Dextrano (16)

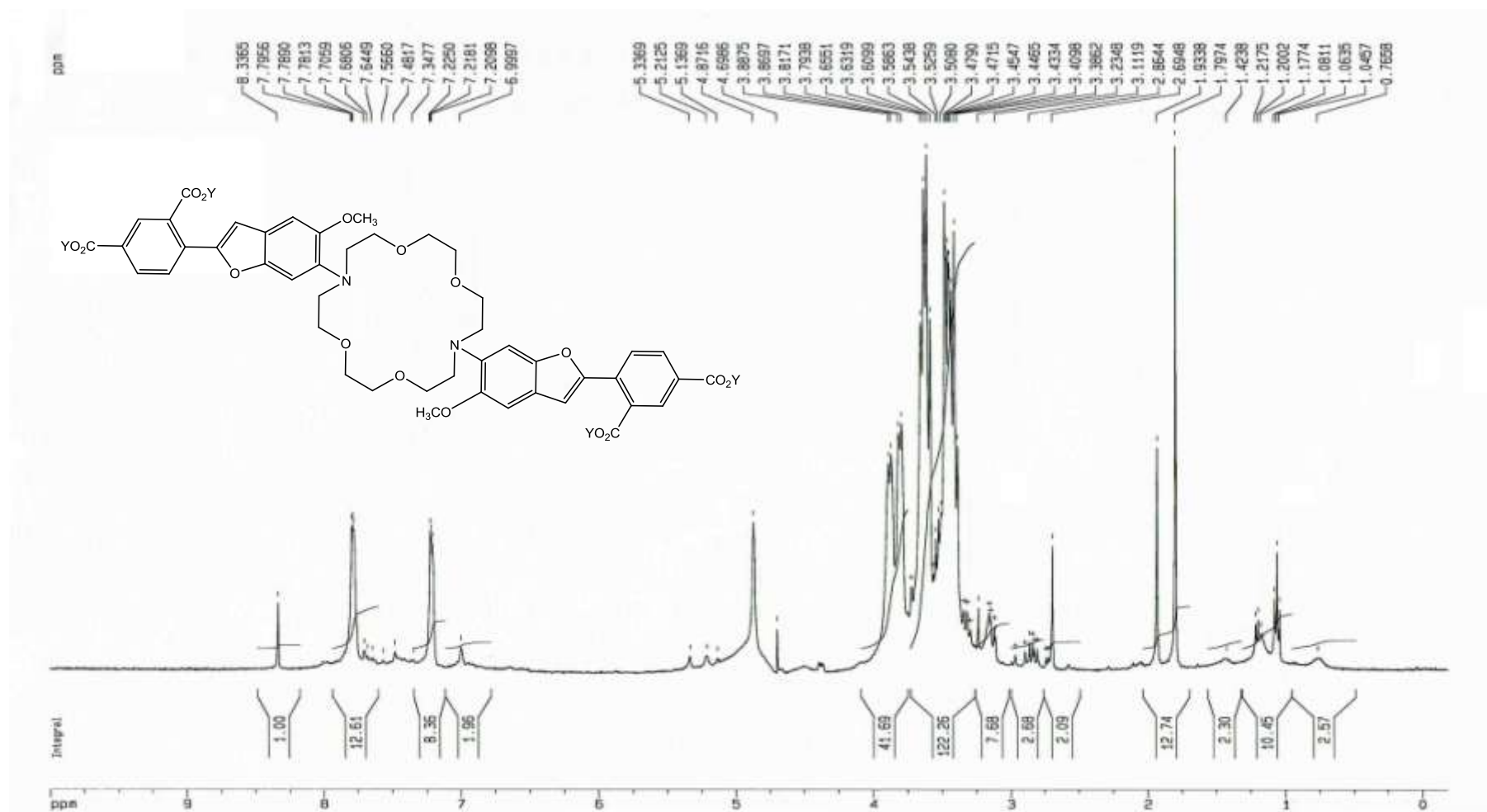


Figura 6.32 - Espectros de ¹H-RMN do produto final PBF1/Dextrano (16). A estrutura representada na figura apresenta Y = CH₃ ou dextrano 9,000-11,000, em D₂O (400 MHz).

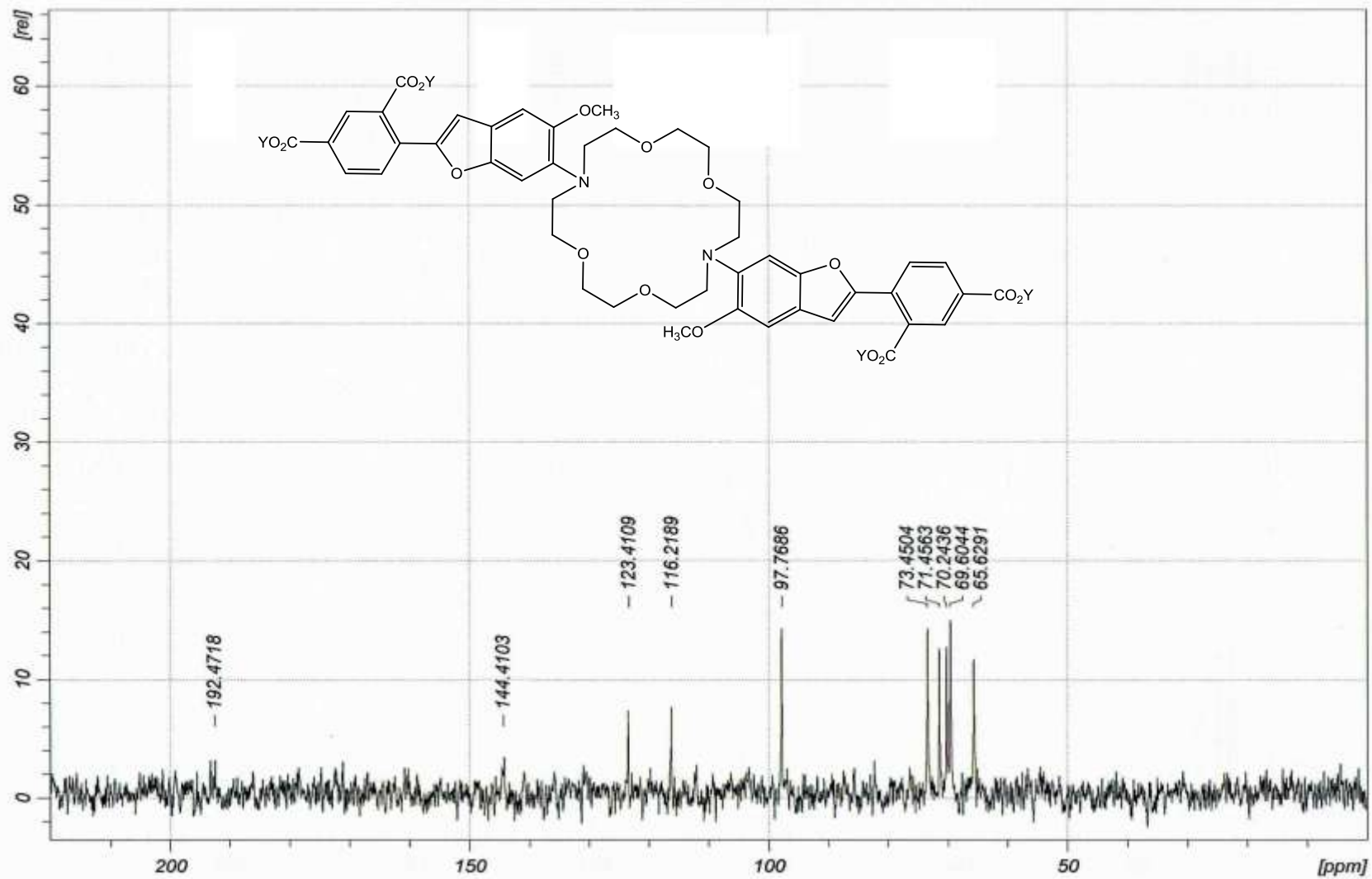


Figura 6.33- Espectros de ¹³C-RMN do produto final PBFI/Dextrano (**16**). A estrutura representada na figura apresenta Y = CH₃ ou dextrano 9,000-11,000, em D₂O (400 MHz).