

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

**AUGUSTO CESAR GONÇALVES**

**Síntese e Aplicação de Sondas Fluorescentes na  
Detecção de Cátions e Ânions**

Versão original da tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

**25/07/2018**

AUGUSTO CESAR GONÇALVES

**Síntese e Aplicação de Sondas Fluorescentes na  
Detecção de Cátions e Ânions**

Tese apresentada ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências (Programa de  
Química)

Orientador: Prof. Dr. Alcindo Aparecido Dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Lodeiro Espiño

São Paulo

2018



Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

GG635s      Gonçalves, Augusto Cesar  
              Síntese e Aplicação de Sondas Fluorescentes na  
              Detecção de Cátions e Ânions / Augusto Cesar  
              Gonçalves. - São Paulo, 2018.  
              121 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Química  
Fundamental.  
Orientador: Dos Santos, Alcindo Aparecido  
Coorientador: Lodeiro, Carlos

1. Fluoresceína. 2. Cumarina. 3. Pireno. 4.  
Detecção. 5. Fluorescência. I. T. II. Dos Santos,  
Alcindo Aparecido, orientador. III. Lodeiro,  
Carlos, coorientador.



# AGRADECIMENTOS

---

Agradeço primeiramente ao IQ-USP por ter fornecido a estrutura física e ofertar os cursos de pós-graduação que hoje me possibilitaram concluir o presente documento. Agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Alcindo Aparecido Dos Santos pelos ensinamentos, discussões sempre construtivas, amizade e acima de tudo pelo exemplo de profissional e ser humano que sempre me foi, desde o início de sua orientação durante o mestrado. Agradeço também ao Prof. Dr. Carlos Lodeiro pela coorientação, e que além de participar de modo muito direto e ativo no desenvolvimento dos trabalhos, me recebeu em Portugal, na Universidade Nova de Lisboa, de maneira que não poderia ter sido mais acolhedora e atenciosa. Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sem o qual não seria possível ser um estudante de pós-graduação dedicado em tempo integral. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), agência de fomento importante que provê boa parte dos equipamentos, reagentes, verbas de projeto e estrutura que utilizamos durante os estudos. Agradeço ao programa “Ciência sem fronteiras” do Governo Federal e CNPq, que me possibilitou passar uma temporada fora do país, junto do grupo do professor Carlos, e cujo investimento está justificado em cada página dessa tese. À Universidade Nova de Lisboa – FCT e ao grupo BIOSCOPE, onde foram desenvolvidos os estudos fotofísicos do trabalho. Agradecimento especial a todos os coautores das publicações realizadas durante o período de 2013 até 2018, pois sem a colaboração de todos não seria possível tornar esse conteúdo disponível publicamente.

Por fim agradeço e dedico essa tese à todos os professores, amigos, colegas de trabalho e de convívio, através dos quais foi possível desenvolver um trabalho colaborativo e produtivo, contando com o trato humano que nos é necessário para conduzir nossos planos pessoais e profissionais.

# Resumo

---

Gonçalves, A. C. **Síntese e Aplicação de Sondas Fluorescentes na Detecção de Cátions e Ânions**. 2018. 121 p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O presente trabalho trata da síntese de sondas fluorescentes visando a detecção e quantificação de íons metálicos e ânions de toxicidade relevante para humanos e meio ambiente. Utilizamos os núcleos fluorescentes da fluoresceína, cumarina e pireno nos processos de síntese, aos quais foram estrategicamente acopladas estruturas capazes de interagir seletivamente com os analitos em questão. Devido às características distintas das sondas, dividimos o trabalho em três capítulos onde cada um abordará uma classe de núcleo fluorescente. No primeiro deles, trataremos de dois derivados de cumarina, onde um deles é capaz de identificar e quantificar o ânion fluoreto, e o outro o íon cobre (II). No segundo capítulo trataremos de dois derivados de fluoresceína homologados à estrutura de aminoácidos, que se mostraram úteis na detecção de íons trivalentes ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{3+}$ ) e também  $\text{Hg}^{2+}$ . No terceiro capítulo apresentaremos um derivado de pireno seletivo ao  $\text{Hg}^{2+}$  tanto em meio aquoso quanto orgânico. Nos três capítulos utilizamos da técnica de espectrofluorimetria como principal ferramenta de estudo e aplicação dos sistemas. Durante as caracterizações e investigações dos mecanismos de detecção, utilizamos de maneira integrada as técnicas de espectrofluorimetria resolvida no tempo, espectroscopia de absorção no UV-vis, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massas. A união de técnicas espectroscópicas complementares nos permitiu a completa caracterização estrutural dos compostos sintetizados e também um maior aprofundamento das propostas dos mecanismo de detecção dos analitos. De modo geral, o trabalho aborda áreas distintas dentro da química e da física, resultando em um conjunto de interfaces científicas com bom entrelace. Serão discutidas estratégias de síntese orgânica, caracterizações fotofísicas, estudos de mecanismo de detecção e aplicação analítica para cada uma das moléculas apresentadas nesta tese.

**Palavras-chave:** fluoresceína, cumarina, pireno, detecção, fluoreto, mercúrio (II).

# Abstract

---

Gonçalves, A. C. **Synthesis and Application of Fluorescent Probes Applied in the Detection of Cations and Anions**. 2018. 121 p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The present work deals with the synthesis of fluorescent probes towards the detection and quantification of metal ions and anions of relevant toxicity for humans and the environment. We used as building blocks the fluorescent cores of fluorescein, coumarin and pyrene, to which were coupled structures capable to interact selectively with analytes. Due to the distinct characteristics of the probes, we split the work into three chapters where each will address a core class. In the first one, we will deal with two coumarin derivatives, where one is able to identify and quantify the fluoride anion, and other the copper (II) ion. At the second chapter, we will describe two fluorescein derivatives attached to amino acids, which proved useful in the detection of trivalent ions ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{3+}$ ) and  $\text{Hg}^{2+}$ . In the last chapter, we will introduce a derivative of pyrene selective to  $\text{Hg}^{2+}$  detection in both aqueous and organic solvents. In all the three chapters, the spectrofluorimetry technique was the primary tool of study and application of the systems. During the structural characterizations and mechanism investigations, we used also time resolved spectrofluorimetry, UV-Vis absorption spectroscopy,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and mass spectrometry. The integration of spectroscopic techniques allowed us to a complete structural characterization of the synthesized compounds and the discussion of detection mechanism proposals. In general, the work deals with different areas within the chemistry and physics, resulting in a set of interfaces with good scientific interlace. Strategies in organic synthesis, structural and photo-physics characterizations, detection mechanisms and analytical application were the objective and the achievement of the present thesis.

**Keywords:** fluorescein, coumarin, pyrene, detection, fluoride, mercury (II).

# Sumário

---

AGRADECIMENTOS .....	i
Resumo .....	ii
Abstract .....	iii
Capítulo 1 .....	6
Funcionalização de cumarinas e aplicação como sensores fluorescentes: planejamento estrutural do ligante na busca por alvos analíticos .....	6
1.1. Introdução .....	7
1.1.1. Em busca do azul: Ensaio sobre uma sonda seletiva a fluoretos preparada a partir de um aminoácido e uma cumarina .....	9
1.1.2. Uma seleno-cumarina como sonda fluorescente para a detecção de íon cobre (II) em meio aprótico .....	12
1.2. Objetivos .....	15
1.3. Resultados e discussão .....	16
1.3.1. Planejamento e síntese das sondas baseadas no núcleo cumarínico .....	16
1.3.2. Propriedades fotofísicas e analíticas da sonda para fluoreto .....	22
1.3.3. Estudos do mecanismo de detecção de fluoreto .....	28
1.3.4. Propriedades fotofísicas e analíticas da sonda para Cu <sup>2+</sup> .....	31
1.3.5. Estudos analíticos .....	35
1.4. Conclusões .....	41
Capítulo 2 .....	42
2.1. Introdução .....	43
2.2. Objetivos .....	48
2.3. Resultados e discussão .....	49
2.3.1. Planejamento e síntese dos derivados de fluoresceína .....	49
2.3.2. Caracterização fotofísica .....	54
2.3.3. Sensibilidade à cátions .....	56
2.4. Conclusões .....	70
Capítulo 3 .....	71
Uma sonda fluorogênica baseada na estrutura do pireno para detecção de Hg <sup>2+</sup> em sistemas aquosos e orgânicos .....	71
3.1. Introdução .....	72
3.1.1. Formação de excímeros e exciplexos de pireno .....	73
3.2. Objetivos .....	75
3.3. Resultados e discussão .....	76

3.3.1. Planejamento e síntese do seleno-derivado de pireno .....	76
3.3.2. Caracterização fotofísica e propriedades em água e acetonitrila .....	79
3.3.3. Aplicação como sonda na detecção de Hg <sup>2+</sup> .....	85
3.4. Conclusões .....	95
Capítulo 4 .....	96
4.1. Instrumentação e reagentes .....	97
4.2. Medidas espectrofotométricas e espectrofluorimétricas .....	98
4.3. Cálculos teóricos.....	100
4.4. Procedimentos de síntese .....	101
4.4. Espectros selecionados. ....	107
5. Referências Bibliográficas.....	114
6. Anexos.....	121

# Capítulo 1

---

Funcionalização de cumarinas e aplicação como sensores fluorescentes: planejamento estrutural do ligante na busca por alvos analíticos

## 1.1. Introdução

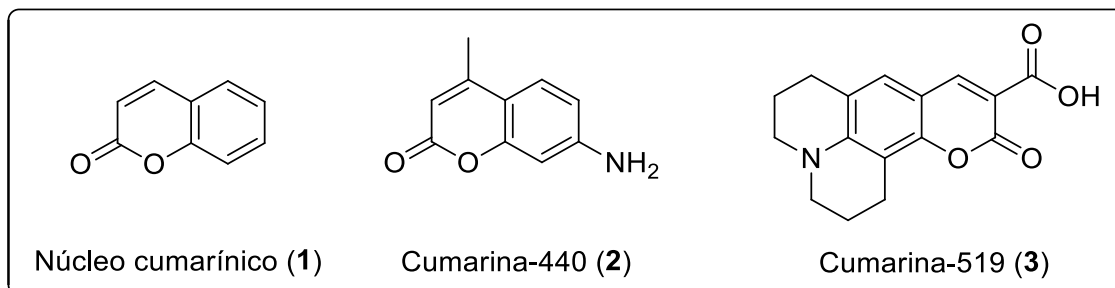
O núcleo cumarínico pertencente à classe das benzopironas. Sua forma molecular mais simples trata-se de uma lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada fundida à um anel benzênico, apresentada como o composto **1** (Figura 1). O composto **1** foi isolado há mais de 200 anos, e seu nome foi atribuído em analogia ao nome científico da árvore da qual foi isolada, a *Coumarouna odorata* Aubl., conhecida popularmente como cumaru. Esta árvore de porte médio alcança entre 25 e 30 metros de altura e cerca de 1 metro de diâmetro de tronco; a semente de seus frutos apresentam teores médios de cumarinas que variam entre 1 e 3 %, podendo chegar a 10 % em massa em alguns casos.<sup>1</sup>

Em concentrações elevadas a cumarina apresenta algum grau de toxicidade à maioria dos organismos vivos. Acredita-se que a planta tenha se adaptado a produzir maiores quantidades de cumarinas como forma de autodefesa às pragas. Estudos de datação de <sup>14</sup>C apontaram que a *Dipteryx odorata* faz parte de um restrito grupo de cerca de cem espécies de árvores capazes de viver por mais de mil anos. Acredita-se que sua longevidade está atrelada à produção de cumarinas, que atuariam como defensivos químicos endógenos.<sup>2</sup> Devido ao aroma agradável, as sementes da *Dipteryx odorata* são utilizadas em perfumaria e misturas de tabaco.

Como classe de produtos naturais, as cumarinas são encontradas em plantas como uma grande variedade de estruturas e metabólitos que partilham o mesmo núcleo estrutural. Como substância biologicamente ativa, as cumarinas encontram aplicação como agente antimicrobiano, moluscicida, antiviral, anticarcinogênico, anti-inflamatório e anticoagulante.<sup>3</sup> Do ponto de vista fotofísico, devido à estrutura planar e eletronicamente deslocalizada do sistema  $\pi$ , as cumarinas apresentam altos coeficientes de absorção de radiação na regiões do ultravioleta próximo e do visível, onde a faixa de comprimentos de onda depende dos grupos funcionais ligados ao núcleo.

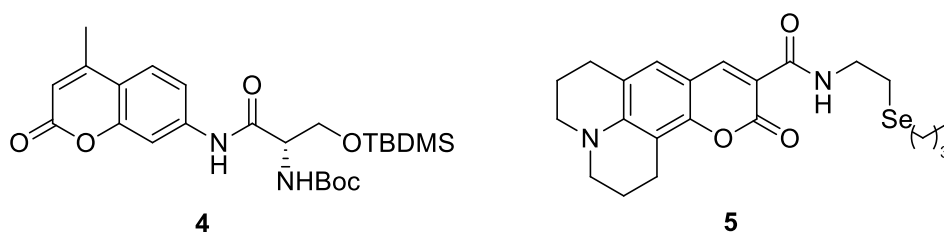
Neste capítulo abordaremos estratégias de síntese de sondas fluorescentes a partir da cumarina-440 (**2**) e a cumarina-519 (**3**) como blocos construtores. As estruturas moleculares de **2** e **3** estão apresentadas na Figura 1. Apesar de partilharem do mesmo

núcleo base, as cumarinas **2** e **3** foram estrategicamente selecionadas por apresentarem características ópticas e de reatividade distintas, conferindo versatilidade nas estratégias de síntese e janelas espectrais de aplicação. A cumarina **2** contém um grupo anilina, de caráter nucleófilo. Adicionalmente, o composto **3** contém uma carboxila, de natureza eletrofílica. Dessa maneira, proporcionamos versatilidade na escolha de ligantes moleculares aptos a interagir com um dado alvo analítico.



**Figura 1.** Estrutura das cumarinas-440 e 519.

Apresentaremos um derivado da cumarina **2**, obtido pelo acoplamento de sua anilina com a carboxila de um derivado da *L*-Serina, que resultou no composto **4** (Figura 2), cuja habilidade sensorial é voltada para detecção do ânion fluoreto. Em paralelo trataremos de estudos visando a detecção do íon cobre (II) pela sonda **5** (Figura 2), resultado do acoplamento entre a cumarina **3** e um amino-alquil seleneto orgânico. Em cada caso discutiremos os mecanismos de detecção envolvidos, com base em um conjunto de estudos espectroscópicos.



**Figura 2.** Estrutura molecular das sondas **4** e **5**, derivadas dos compostos **2** e **3**, respectivamente.



### 1.1.1. Em busca do azul: Ensaios sobre uma sonda seletiva a fluoretos preparada a partir de um aminoácido e uma cumarina

A busca por metodologias analíticas com foco em ânions potencialmente perigosos é sempre uma demanda de pesquisa em química, seja na busca por maior seletividade, diminuição dos limites de detecção ou mesmo para fornecer versatilidade de métodos instrumentais, alcançando maior aplicabilidade em laboratórios de estruturas diversas. Além disso, é importante o desenvolvimento de métodos aplicáveis em diferentes matrizes amostrais, dando suporte às demandas ambientais, biológicas e biomédicas.<sup>4</sup> Tratando especificamente do ânion fluoreto, devido à sua presença constante em produtos dentários, água de abastecimento urbano ou mesmo ocorrência natural, existe a necessidade de técnicas reprodutíveis para o seu monitoramento analítico. O fluoreto pode ser benéfico ou maléfico aos organismos vivos, o que depende da sua concentração. Por isso, este ânion é classificado com potencialmente perigoso.<sup>5</sup> Em seres humanos, o fluoreto desempenha papel importante associado ao crescimento e manutenção dos tecidos ósseos. Sua principal forma de suprimento ocorre através da água da rede de abastecimento, onde é adicionado na concentração recomendada. A quantidade ingerida e o período de exposição determinam o grau de toxicidade, tipo de desordem e extensão do dano causado em humanos. Nas doses adequadas, da ordem de  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , o ânion auxilia na prevenção da perda de dentes e desmineralização do esmalte dentário.<sup>6</sup> No entanto, quando ingerido em concentrações superiores a  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  continuamente, resulta em problemas crônicos, como fluorose dental, fluorose óssea e alterações nefrotóxicas, podendo levar a morte.<sup>7</sup> É a Organização Mundial da Saúde (OMS) o órgão responsável por definir os limites seguros de ingestão supracitados. A OMS recomenda a adição de fluoreto à rede de abastecimento em localidades com baixa incidência natural, garantindo a demanda fisiológica.<sup>8</sup> Por isso, o monitoramento da concentração do fluoreto é uma necessidade. Demandas pelo monitoramento em matrizes não aquosas também podem existir, dependendo do tipo de processo onde o ânion é empregado.

Nos últimos anos, muitos trabalhos têm sido publicados envolvendo sondas moleculares fluorogênicas cujo mecanismo de reconhecimento se baseia em reações quimiosseletivas com o próprio alvo analítico. A grande afinidade do fluoreto pelo átomo

de silício, aliada à fácil inserção de funções sililadas à hidroxilas sugerem um bom modelo no planejamento de sondas fluorogênicas para o ânion. Nesse modelo de sonda, o mecanismo de detecção baseia-se na alteração do padrão fotofísico de um fluoróforo sililado promovido pelo ataque nucleofílico do fluoreto ao átomo de silício, que resulta na clivagem da ligação O-Si. A reação entre o fluoreto e um éter de silício se dá através de uma substituição nucleofílica de segunda ordem, favorecida energeticamente, uma vez que a força de ligação F-Si é 30 kcal/mol maior do que a força de ligação O-Si.<sup>9</sup> Contribui o fato do fluoreto ser pequeno, permitindo-o acessar o átomo de silício, mesmo que acompanhado de grupamentos volumosos.

Éteres de silício, de estrutura geral R-O-Si-R<sub>3</sub>, são os grupos de proteção mais aplicados às hidroxilas em rotas de síntese. Um atributo valioso encontrado nos éteres de silício é o fato de que os mesmos podem ser instalados e removidos quimiosseletivamente de uma determinada hidroxila em detrimento de outra em compostos poli funcionalizados. A seleção se dá por fatores estéricos e eletrônicos, que são modulados pelo volume dos substituintes que acompanham o átomo de silício, ou pelas vizinhanças e reatividade do álcool. Estes mesmos atributos definem a robustez do grupo protegido frente às condições reacionais às quais será submetido. Quando se planeja a clivagem seletiva dentre mais de uma possibilidade em uma mesma molécula, ambos os substituintes do átomo de silício e da cadeia carbônica adjacente ao álcool devem ser considerados. Aspectos eletrônicos também possuem papel igualmente importante sobre a reatividade. Enquanto éteres de silício fenólicos são mais susceptíveis à clivagem em condições ácidas, éteres de silício alquílicos são mais susceptíveis à clivagem em meio básico. Substituintes retiradores de elétrons ligados ao átomo de silício aumentam seu caráter positivo (eletrofílico), portanto, o torna mais susceptível ao ataque por bases de caráter nucleofílico. O contrário é verdadeiro, sendo que grupos retiradores de elétrons ligados ao silício os tornam mais resistentes aos ácidos.

Os reagentes de silício mais populares em química de proteção de álcoois são o *tert*-butildimetilsilano (TBDMS), cloreto de trimetilsilano (TMS) e o cloreto de triisopropilsilano (TIPS).<sup>9</sup> A estabilidade relativa dos respectivos éteres frente à bases segue a seguinte sequência: TMS<TBDMS<TIPS. Desse modo, quando se planeja a

construção de um éter de silício como sítio ativo de uma determinada sonda para detecção de um analito básico/nucleofílico, deve-se buscar um balanço adequado da reatividade com o alvo. O mesmo não deve ser demasiado reativo, pois perde-se seletividade, podendo reagir com qualquer base presente na amostra. Ao mesmo tempo, não se pode escolher um éter demasiado robusto frente às bases, pois assim a sensibilidade ficaria comprometida.

Quando o átomo de silício encontra-se conectado diretamente ou nas proximidades de um núcleo fluorescente, o mesmo exerce forte efeito sobre as propriedades fotofísicas do fluoróforo. Dentre essas alterações estão o deslocamento do máximo de absorção, máximo de emissão e brusca diminuição do rendimento quântico de fluorescência. A supressão de fluorescência decorre do efeito do átomo pesado imputado pelo silício, que promove o acoplamento spin-órbita, resultando em processos não radiativos de transição do estado excitado para o estado fundamental.<sup>10</sup>

Muitos trabalhos publicados recentemente reportam a síntese de éteres de silício em hidróxicumarinas visando a detecção de fluoreto. No entanto, os exemplos encontrados até o momento do desenvolvimento do nosso trabalho, estavam restritos à estruturas que continham o grupo hidroxila ligado diretamente ao núcleo cumarínico.<sup>11-</sup>

17

Visando estender a estratégia de preparação de sondas fluorescentes para fluoreto a amino-fluoróforos, nesta seção apresentaremos a utilização da amino-cumarina **2** acoplada à um aminoácido sililado. A estratégia a ser apresentada pode ser adaptada a outros núcleos fluorescentes aminados, como rodaminas, aminoantracenos ou azul do Nilo, permitindo selecionar a região do espectro eletromagnético no UV-Vis em que se pretende aplicar.

### 1.1.2. Uma seleno-cumarina como sonda fluorescente para a detecção de íon cobre (II) em meio aprótico

Como ocorre com todos os demais núcleos moleculares fluorescentes, após atingir o estado excitado pela absorção de fótons de comprimentos de onda adequados, as cumarinas são capazes de liberar energia através de decaimentos radiativos ou não radiativos. A relação entre o número de fótons que decai radiativamente pelo número de fótons absorvidos, irá estabelecer a eficiência ou rendimento quântico do composto fluorescente. Quando o elétron que ocupa o estado excitado decai por via radiativa, tal fenômeno é observado por emissão de um fóton de energia ligeiramente inferior à do fóton absorvido. Quando o decaimento entre os estados excitado e fundamental se dá por via não radiativa, a emissão de fótons não ocorre, pois, a energia absorvida é dissipada através de outros mecanismos (vibracionais, rotacionais, transferência de energia, etc.). Uma das maneiras de induzir os decaimentos não radiativos e consequentemente extinguir total ou parcialmente a emissão, pode ser alcançada através da introdução de um desativador de fluorescência, seja intramolecularmente, fazendo parte da estrutura da molécula, ou pela simples presença nas suas proximidades. Dessa maneira, a diminuição da intensidade de emissão de um determinado composto pela presença de um desativador em suas proximidades é um parâmetro físico que pode ser monitorado por fluorescência. Assim, podemos tratar tal composto como uma sonda, pois este é sensível e responde fisicamente pela da presença de elemento desativador, que por sua vez, podemos denominar como analito. Tendo estabelecido os conceitos de sonda e analito, podemos estudar parâmetros como seletividade, limites de detecção, determinar os meios ou matrizes onde há melhor interação e, por fim, estabelecer uma metodologia analítica, baseada na extinção de fluorescência da sonda.

Devido à ocorrência natural da cumarina, podemos planejar sondas bio-inspiradas, visando melhor compatibilidade nas aplicação aos sistemas biológicos. A cumarina **3** apresenta características estruturais interessantes e que refletem diretamente em suas propriedades fotofísicas. O núcleo contém ambas as funções doadora e retiradora de elétrons, nas posições 7 (grupo amina) e 3 (ácido carboxílico)/ 2 (carbonila da lactona), respectivamente. Esse padrão de substituintes resulta em um sistema  $\pi$  rico em elétrons circulantes, o que contribui para uma pequena barreira

energética entre os orbitais de fronteira, permitindo a absorção e emissão na região visível, diferente do observado na maioria das cumarinas, cujas transições costumam situar-se no ultravioleta.<sup>18</sup>

O cobre tem papel importante na natureza, porém, assim como o  $F^-$ , pode ser tóxico dependendo das concentrações às quais são submetidas os organismos vivos. Em humanos, o íon  $Cu^{2+}$  atua em importantes funções bioquímicas, como respiração celular, amidação de peptídeos, biossíntese de neurotransmissores, biossíntese de pigmentos, além de conferir coesão e resistência aos tecidos. O  $Cu^{2+}$  atua também como co-fator de muitas enzimas e participa de processos do sistema nervoso central.<sup>19</sup> Entretanto, há indícios da participação do  $Cu^{2+}$  na agregação de proteínas  $\alpha\beta$  do tecido cerebral, o que está associado à doença de Alzheimer.<sup>20</sup> Além disso, o  $Cu^{2+}$  potencializa a neurotoxicidade apresentada pelas proteínas  $\alpha\beta$  em culturas de células.<sup>21</sup>

Uma porção de diferentes classes de núcleos fluorofóricos vem sendo aplicados no desenvolvimento de sondas com objetivo de colher informação analítica sobre a presença do  $Cu^{2+}$ , especialmente em meio aquoso.<sup>22-27</sup> Apesar disso, sistemas desenvolvidos com o objetivo de atuarem em meios puramente orgânicos podem encontrar aplicações interessantes. Considerando aplicações em química orgânica, o cobre, nas suas mais variadas formas, é um dos catalisadores mais versáteis à disposição dos químicos. Acoplamentos C-C e C-N, funcionalização C-H, adições à conjugada, alquilação alílica, funcionalização de alquenos, síntese de heterocíclis, ciclopropanação, são alguns dos exemplos das reações mediadas pela catálise de reagentes de cobre. Além disso, o cobre é um elemento bastante abundante e com tecnologia de extração já dominada pelo homem há milhares de anos, o que o torna uma ótima opção em termos de suprimento e custo quando comparado à elementos mais nobres de utilização sintética similar.<sup>28</sup>

A teoria de Pearson sobre ácidos e bases duros e moles fornece alguma previsibilidade sobre a afinidade entre os pares cátion/receptor. De acordo com a teoria, o  $Cu^{2+}$  é um ácido de Lewis com características intermediárias entre duro e mole. Essa análise se faz pela relação carga/raio iônico, que define a densidade da carga positiva do íon. Por isso, um receptor de sonda deverá sempre ser planejado visando conter sítios ligantes de características similares, o que resultará em maiores valores de constantes de

estabilidade e menores limites de detecção.

Considerando a importante função do  $\text{Cu}^{2+}$  em sistemas biológicos e organocatálise, buscamos a junção entre as expertises em síntese orgânica de compostos de selênio (LocSin, IQ-USP) e fotofísica de sondas fluorescentes (BIOSCOPE, FCT-Universidade NOVA de Lisboa) na busca de um novo sensor fluorescente seletivo para detecção do íon  $\text{Cu}^{2+}$ .<sup>29-31</sup>

## 1.2. Objetivos

O objetivo dessa fase do projeto foi o de utilizar o núcleo cumarínico como estrutura em comum na síntese de duas novas sondas fluorescentes. Foi também objetivo o planejamento estrutural e estratégias de síntese na preparação dos receptores, buscando seletividade aos alvos analíticos estabelecidos. Por fim, objetivou-se a aplicação das sondas na quantificação do fluoreto e do íon cobre (II).

## 1.3. Resultados e discussão

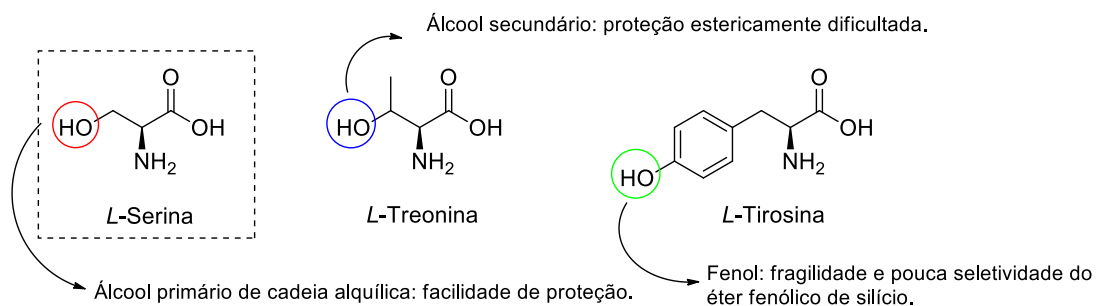
### 1.3.1. Planejamento e síntese das sondas baseadas no núcleo cumarínico

Considerando o alvo analítico fluoreto, propusemos a preparação de um receptor ao analito que contivesse um aminoácido acoplado à estrutura de uma aminocumarina. A abordagem de inserção de uma biomolécula, como um aminoácido sempre nos atraiu, pois, a utilização de moléculas de origem natural pode favorecer aplicações biológicas pela similaridade estrutural com os compostos produzidos pela própria natureza.

Propusemos a utilização de um aminoácido capaz de ser transformado em um éter de silício, o sítio sensível e seletivo ao fluoreto. Para tanto, buscamos um aminoácido que contivesse uma hidroxila em sua cadeia lateral. Dentre todos os aminoácidos naturais, apenas três contêm a função álcool: *L*-Treonina, *L*-Tirosina e *L*-Serina, conforme apresentado na Figura 3. Quando se trata da proteção de hidroxilas na forma de éteres de silício, por questões estéricas, a instalação do grupo protetor é sempre preferencial às hidroxilas primárias frente às secundárias, principalmente se tratando reagentes de silício volumosos, como TBDMS ou TIPS.<sup>32</sup> Por isso, a utilização da *L*-Treonina, que contém um álcool secundário, foi descartada mediante a dificuldade na etapa de instalação do receptor ao fluoreto. Analisando a possibilidade de utilização da *L*-Tirosina, cuja cadeia lateral possui um fenol, apesar de muitos dos métodos de instalação e remoção de éteres de silício sejam similares aos dos álcoois alquílicos, éteres fenólicos de TBDMS, por exemplo, são menos susceptíveis à hidrólise ácida, devido à menor basicidade do oxigênio. No entanto, são muito susceptíveis à reagentes básicos, pois o grupo fenol é um grupo abandonador muito melhor do que álcoois de cadeia alquílica.<sup>33</sup> Por isso, a utilização da *L*-Tirosina não nos forneceu uma estratégia conveniente na construção da sonda para fluoreto, pois outros ânions fatalmente atacariam o éter fenólico de silício, reduzindo a seletividade.

Diante disso, o melhor candidato a compor a sonda seria a *L*-Serina, pois cumpre os pré-requisitos estruturais que buscávamos: função álcool primária na cadeia lateral e estabilidade satisfatória de alguns dos seus éteres de silício frente à ácidos e bases.



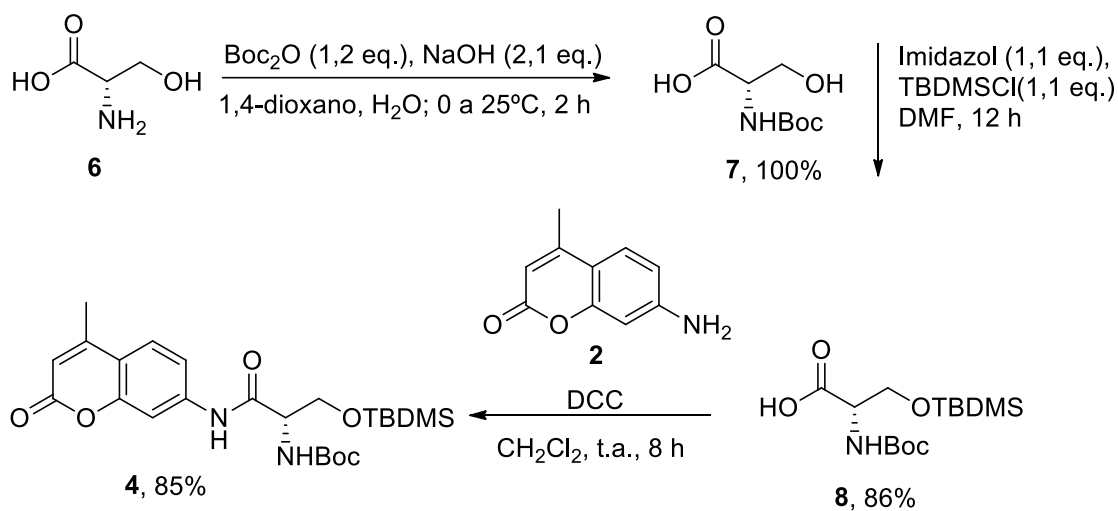


**Figura 3.** Aminoácidos naturais munidos da hidroxila nas cadeias laterais.

Nosso planejamento sintético fundamentou-se em promover as transformações na cadeia lateral da *L*-Serina, seguido do acoplamento com a cumarina **2**. Uma das etapas-chave da construção da sonda consiste da reação de formação do éter de silício junto à hidroxila alcoólica presente na cadeia lateral do aminoácido. Na escolha do éter de silício, buscamos por algum que fosse intermediário em termos de reatividade frente a bases. Dentre os mais populares e os mais rotineiramente utilizados em nosso grupo de pesquisa, tínhamos as opções TMS, TBDMS e TIPS. O TMS, o menos volumoso e impedido dos três, é extremamente sensível ao ataque de bases, portanto não traria a seletividade adequada. O TIPS, por ser muito volumoso e impedido, é bastante robusto, portanto poderia não oferecer boa sensibilidade. Portanto, o TBDMS seria a escolha com o balanço adequado entre seletividade e sensibilidade, sendo o TBDMSCl o reagente de escolha na preparação da sonda.

A *L*-Serina, como todo aminoácido, contém um grupo amina, cuja nucleofilicidade é suficiente para competir (e governar) com a hidroxila pela reação junto ao átomo de silício do organoclorosilano, o que fatalmente levaria à uma mistura de produtos organosililados. Por isso, previamente à instalação do éter de silício, foi necessário realizar a proteção da amina; onde o N-Boc foi o grupo de escolha, devido à robustez frente a ácidos, bases e agentes redutores, o que gerou o composto **7**, com conversão quantitativa.<sup>34</sup> Em seguida, a instalação do éter de silício pôde ser realizada a partir do TBDMSCl, utilizando o imidazol como base auxiliar, resultando em **8**, com 86% de rendimento.<sup>35</sup> Na sequência realizamos o acoplamento mediado pela N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) entre o aminoácido e a aminocumarina, resultando na

sonda **4** na forma de um sólido branco, com 85% de rendimento desta última etapa e 73% de rendimento global, como apresentado no Esquema 1. Os espectros de caracterização de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão apresentados no Capítulo 4, item 4.5 (Espectros selecionados).



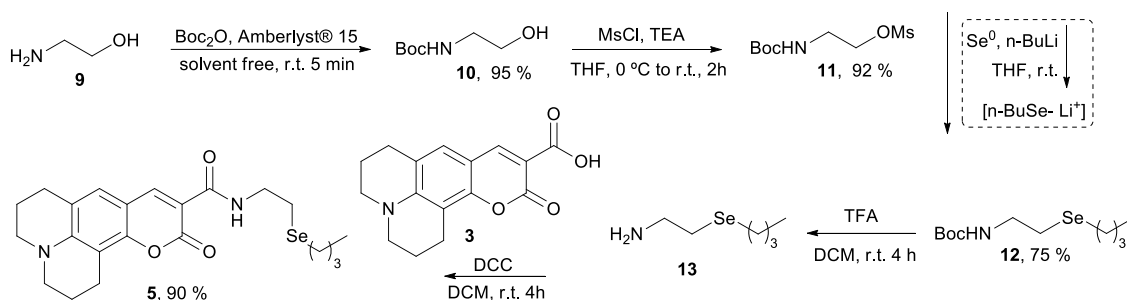
**Esquema 1.** Rota sintética utilizada na preparação da sonda **4**.

Voltando a atenção à preparação da sonda **5**, trataremos da estratégia empregada visando o sensor seletivo ao íon  $\text{Cu}^{2+}$ . Desta vez, a cumarina de partida (**3**) contém um ácido carboxílico, cuja a carbonila, um sítio eletrofílico, apresenta afinidade reativa a grupamentos de caráter eletrofílico. Por isso, quando idealizamos a estrutura molecular do receptor ao  $\text{Cu}^{2+}$ , precisávamos desenhá-lo de modo a conter uma função nucleofílica. Sendo assim, nossa proposta foi a de preparar um ligante contendo uma amina, buscando a ligação entre cromóforo e ligante através de uma amida, cuja a robustez para a maioria das aplicações é adequada. Além disso, amidas são em geral ótimos ligantes em compostos de coordenação envolvendo o íon  $\text{Cu}^{2+}$  como elemento coordenante.<sup>36</sup>

Quando imaginamos um composto planar rígido, tal qual a estrutura **3**, não é de se esperar que uma amida garanta constante de estabilidade alta o suficiente para formar complexos de coordenação estáveis com o íon  $\text{Cu}^{2+}$ . Nesse sentido, imaginamos a inserção de um ligante bidentado, e aproveitando o ponto forte de nosso grupo de pesquisa, propusemos a inserção de um organoseleneto, uma vez que selenetos orgânicos apresentam alguma afinidade pelo íon  $\text{Cu}^{2+}$ .<sup>37</sup> Imaginamos também a

necessidade de um espaçador de ao menos 2 átomos de carbono entre os grupamentos ligantes, de modo a favorecer o envolvimento efetivo do íon durante a complexação.

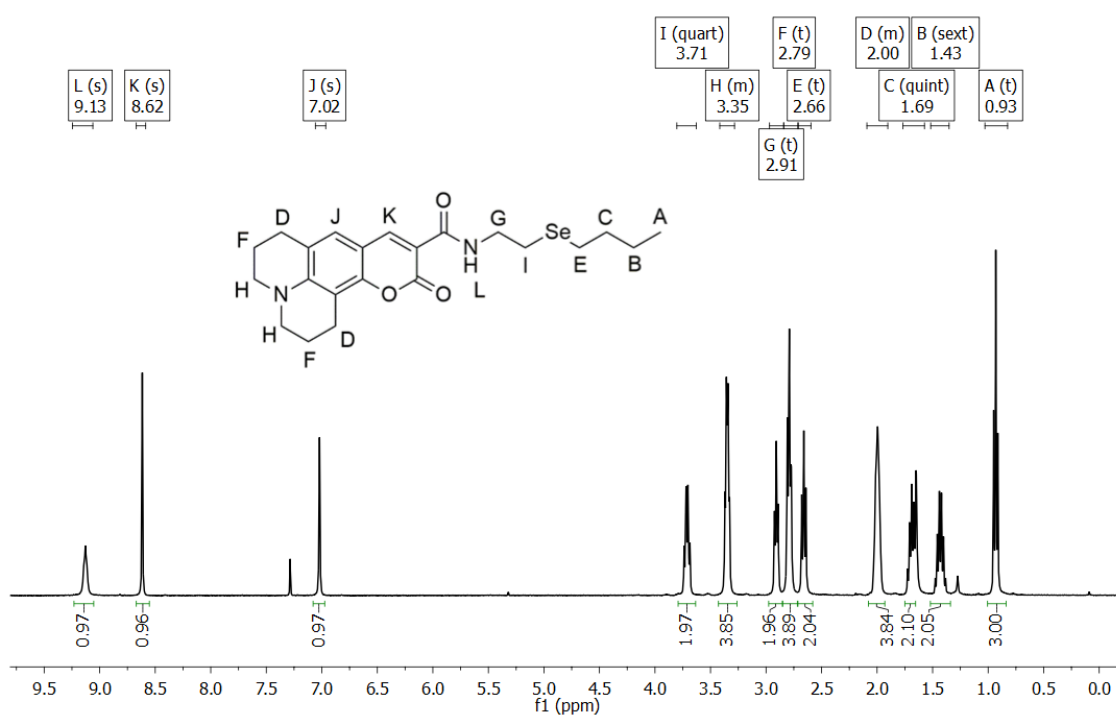
Como apresentado no Esquema 2, nossa estratégia de construção da fração ligante da sonda foi elaborada a partir 2-aminoetanol (**9**). Como primeira etapa, realizamos a proteção da função amina com o grupo N-Boc, gerando o 2-N-Boc-aminoetanol (**10**), para prevenir a formação do 2-N-mesil-aminoetanol na etapa subsequente. Para a inserção do átomo de selênio foi necessário converter previamente a hidroxila de **10** em um grupo abandonador através da reação da hidroxila com o cloreto de mesila, resultando no composto **11**. Em seguida realizamos a substituição nucleofílica de segunda ordem ( $S_N2$ ) do mesilato pelo n-butilselenolato de lítio (o qual foi gerado previamente pela reação entre o selênio elementar e n-butillítio em condições anidras), gerando o composto **12**. Em seguida realizamos a remoção do grupo protetor N-Boc com ácido trifluoroacético, regenerando a função amina livre (**13**). Por fim, na última etapa, realizamos a amidação entre a cumarina **3** e o amino-alquilseleneto **13**, resultando na sonda **5** com rendimento global de 59 % após 5 etapas, na forma de sólido amarelo.



**Esquema 2.** Rota sintética utilizada na preparação da sonda **5**.

A título de exemplo, discutiremos a atribuição de sinais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figuras 4 e 5, respectivamente) do composto **5**. Começando pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , observam-se alguns sinais chave que dão a identidade da molécula como um todo. Da parte da seleno-butila, o tripleto (0,93 ppm), o sexteto (1,43 ppm), o quinteto (1,69 ppm) e o tripleto (2,66 ppm) estão relacionados com os hidrogênios butílicos das posições  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$  e  $\alpha$  em relação ao átomo de selênio, respetivamente. O quarteto em 3,71 ppm e o tripleto em 2,91 ppm correspondem ao acoplamento entre os hidrogênios nas posições  $\alpha$  e  $\beta$ -N-amida. Os hidrogênios referentes

aos anéis N-ciclohexila fundidos da anilina terciária são observados através dos sinais em 2,00 ppm, 2,79 ppm e 3,35 ppm. Como os grupos CH<sub>2</sub> dos dois anéis fundidos do grupo N-ciclohexila não são magneticamente equivalentes, as suas multiplicidades são similares àquelas dos ciclohexanos 1,2-dissubstituídos. Por fim, na região de campo mais alto do espectro, observam-se os singletos em 8,82 ppm e 7,02 ppm relacionadas aos hidrogênios β e δ-carbonílicos do esqueleto cumarínico, além do singlete em 9,13 ppm, referente ao H-N blindado da amida.



**Figura 4.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **5** (400 MHz em CDCl<sub>3</sub>).

Tratando do espectro de RMN de <sup>13</sup>C, todos os carbonos hibridizados em sp<sup>3</sup> (frações alquilseleneto e anéis fundidos das N-ciclohexilas) apresentam sinais compreendidos entre 13 e 51 ppm. Os carbonos do núcleo cumarínico conjugado, exceto o da carbonila da lactona, são observados entre 105 e 153 ppm. Os sinais blindados e mais deslocados pertencem aos grupos carbonílicos da lactona e amida, em 163 ppm e 163,6 ppm, respectivamente (Figura 5).

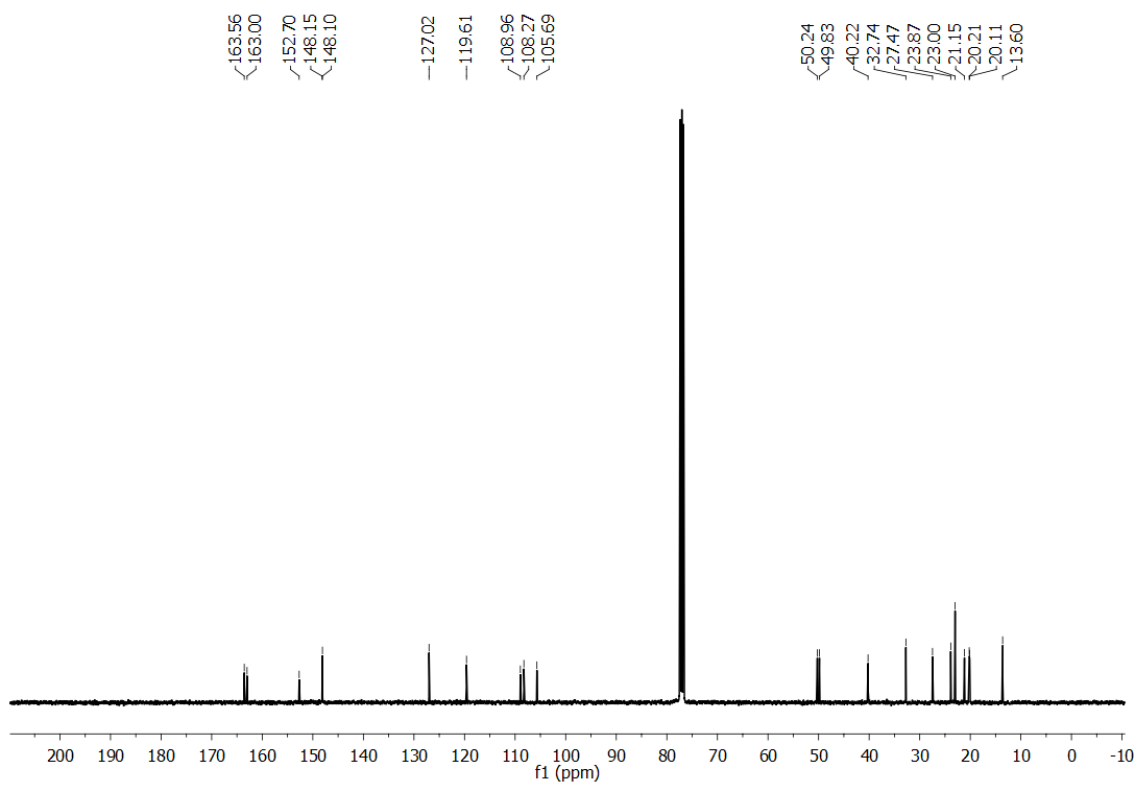


Figura 5. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **5** (101 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ).

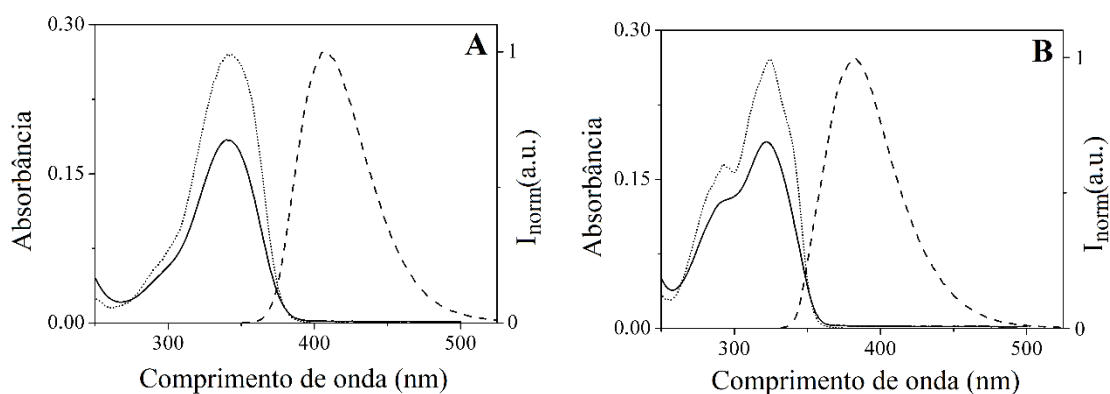
### 1.3.2. Propriedades fotofísicas e analíticas da sonda para fluoreto

As características fotofísicas dos compostos envolvidos nesta seção serão discutidas visando a correlação entre as variações observadas e o mecanismo de detecção proposto. Nesse sentido, buscamos utilizar ao máximo as técnicas espectroscópicas disponíveis, de modo a compor uma discussão fundamentada nos dados empíricos. Nessa parte do capítulo trataremos das modificações fotofísicas imputadas pela inserção do bloco N-Boc-Ser(TBDMS)-OH junto da estrutura da aminocumarina **2**. Depois disso, apresentaremos os ensaios visando verificar a seletividade ao fluoreto. Por fim, trataremos do composto **4** como uma sonda pela análise dos experimentos analíticos qualitativos a olho nu, RMN de prótons e espectrometria de massas. Por fim, seguiremos com os estudos quantitativos através das técnicas de espectroscopia de absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência, onde estabelecemos os limites analíticos e condições operacionais, presumindo aplicações reais.

Os compostos **2** e **4** foram caracterizados em acetonitrila a 25°C. Os dados de máximo de absorção, emissão, rendimento quântico de fluorescência e tempo de vida médio do estado excitado estão apresentados na Tabela 1. A Figura 6 apresenta os espectros de absorção, excitação e emissão normalizada dos compostos **2** (A) e **4** (B).

Tabela 1. Dados de absorção e fluorescência dos compostos **2** e **4** ( $1 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) em acetonitrila.

Compostos	UV-vis		Fluorescência			
	$\lambda_{exc}$ (nm)	Log $\epsilon$	$\lambda_{em}$ (nm)	Desvio de Stokes (nm)	Rendimento Quântico $\phi$	Tempo de vida $\tau$ (ns)
<b>2</b>	340	4,27	407	67	0,63	3,18
<b>4</b>	322	4,1	382	60	0,06	0,314

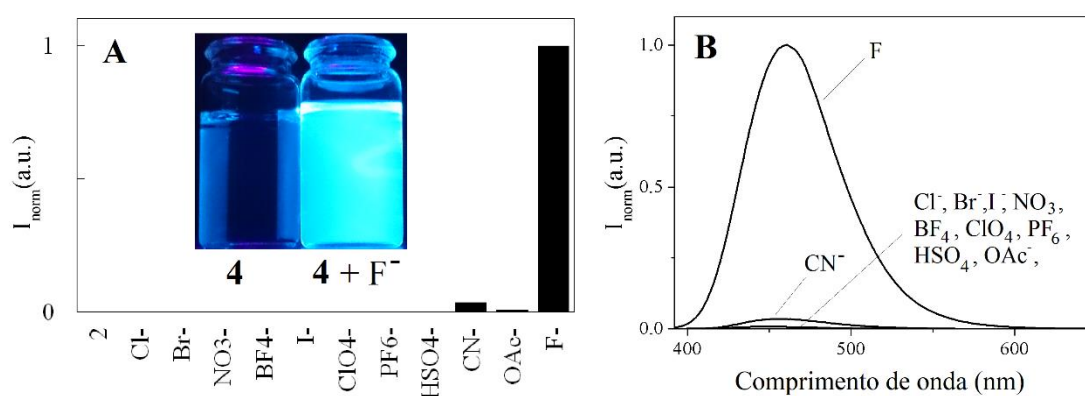


**Figura 6.** Espectros de absorção (linha cheia), emissão normalizada (linha tracejada  $\lambda_{exc} = 341$  nm, parte A;  $\lambda_{exc} = 322$  nm, parte B) e espectro de excitação (linha pontilhada,  $\lambda_{em} = 408$  nm, parte A;  $\lambda_{em} = 384$  nm, parte B) dos compostos (A) **2** e **4** (B) em acetonitrila ( $1 \times 10^{-5}$  mol.L $^{-1}$ ).

Os compostos **2** e **4** apresentam máximos de absorção em 340 e 322 nm, respectivamente. Essas bandas são atribuídas às transições  $\pi$ - $\pi^*$  do núcleo cromofórico cumarínico. A reação de amidação da anilina **2** que leva ao composto **4** é acompanhada do deslocamento hipsocrômico em ambos os espectros de absorção e emissão. Também observa-se a redução do desvio de Stokes de 67 nm (**2**) para 60 nm (**4**). Os rendimentos quânticos de fluorescência foram calculados comparativamente à cumarina-343 ( $\phi = 0,63$  em etanol)<sup>38</sup>; os valores encontrados foram  $\phi_2 = 0,63$  e  $\phi_4 = 0,06$ , em acordo com a descrição de **2** em literatura.<sup>38</sup> Fica evidente que a inserção do aminoácido modificado ao núcleo cumarínico resulta na redução de aproximadamente 11 vezes do rendimento quântico de fluorescência. Os tempos de vida dos estados excitados foram medidos em solução de acetonitrila, com excitação a 365 nm. Os decaimentos de fluorescência obtidos por contagem de fótons correlacionada ao tempo (CFCT) foram ajustados matematicamente com equações exponenciais de primeira ordem, onde os tempos médios calculados foram de 3,18 e 0.314 ns para os compostos **2** e **4**, respectivamente.

Após devidamente caracterizados os parâmetros fotofísicos, seguimos com as investigações sobre o potencial analítico de **4** pela introdução de diferentes ânions à solução da sonda **4**, de modo a verificar sua seletividade. Introduzimos separadamente à uma solução de **4** ( $1.10^{-5}$  mol.L $^{-1}$ ) em acetonitrila, 10 equivalentes molares dos seguintes sais de tetrabutilamônio (TBA): F $^-$ , Cl $^-$ , Br $^-$ , I $^-$ , BF $_4^-$ , NO $_3^-$ , ClO $_4^-$ , PF $_6^-$ , HSO $_4^-$ , CN $^-$ , OAc $^-$ . Passados 5 minutos registramos os espectros de absorção UV-vis e emissão de cada uma

das soluções resultantes. As intensidades relativas de emissão (Figura 7A) e os espectros de fluorescência (Figura 7B) estão apresentadas na figura abaixo. Na figura 7A podemos observar o aumento expressivo de emissão pela adição de  $F^-$ . A imagem em destaque na Figura 7A mostra a diferença do aspecto visual das soluções de **4** na ausência e na presença de  $F^-$  sob luz ultravioleta (365 nm). Observa-se ligeiro aumento de emissão pela adição dos ânions cianeto e acetato, devido à reação parcial destes com o éter de silício da cadeia lateral da *L*-Serina. Como comentado anteriormente o éter de *tert*-butildimetilsilano apresenta alguma reatividade frente a compostos de caráter básico/nucleofílico, mesmo assim, muito inferior ao observado pela adição de fluoreto.



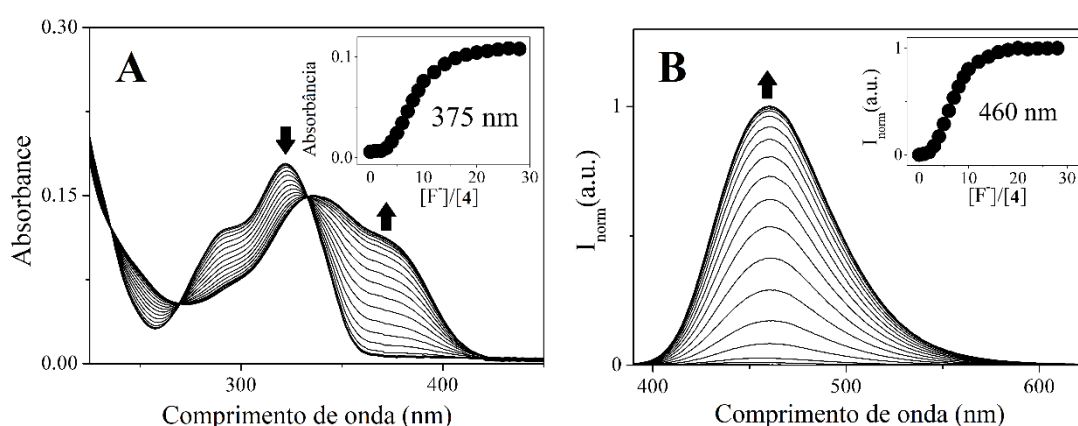
**Figura 7.** A: Intensidade relativa de emissão de **4** após adição de 10 equivalentes molares de  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $BF_4^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $ClO_4^-$ ,  $PF_6^-$ ,  $HSO_4^-$ ,  $CN^-$ ,  $OAc^-$  e  $F^-$  em acetonitrila ( $[4] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $\lambda_{exc} = 333 \text{ nm}$ ). Em destaque as alterações visuais de **4** sob luz ultravioleta após adição de  $F^-$  ( $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$ ). B: Espectros de emissão normalizados após as adições dos ânions ( $\lambda_{exc} = 333 \text{ nm}$ ).

A partir dos resultados obtidos da varredura de ânions, procedemos com as titulações espectrofotométricas (Figura 8A) e espectrofluorimétricas (Figura 8B) do composto **4** com fluoreto. Os espectros foram registrados imediatamente após a adição de quantidades crescentes de uma solução de concentração conhecida do agente titulante, até a estabilização. As titulações foram conduzidas em triplicata com soluções preparadas previamente à cada experimento, de modo a confirmar a reprodutibilidade da dinâmica dos perfis espectrais em função da adição do  $F^-$ .

Pela análise da titulação espectrofotométrica, observa-se a diminuição de intensidade da principal banda em 322 nm, acompanhada do desvio batocrômico que resulta na banda em 340 nm. Não foi observado ganho de cor pela adição de  $F^-$ , uma vez



que as bandas de absorção não ultrapassam a barreira do visível, em 400 nm. A excitação no comprimento de onda que compreende o ponto isobéstico, em 333 nm, resultou nos espectros de emissão (Figura 8B), com máximo em 460 nm. As plotagens em destaque dentro dos gráficos das titulações mostram perfil similar em ambas as titulações, com tendência à estabilização por volta de 15 equivalentes molares de  $F^-$  em relação a **4**. Seria de se esperar estabilização com estequiometria 1:1, no entanto, como o mecanismo da sonda é baseada em uma reação química e, considerando a baixíssima concentração de **4** ( $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ), se faz necessário forçar o equilíbrio da reação entre os reagentes por aumentar a concentração do nucleófilo titulante.



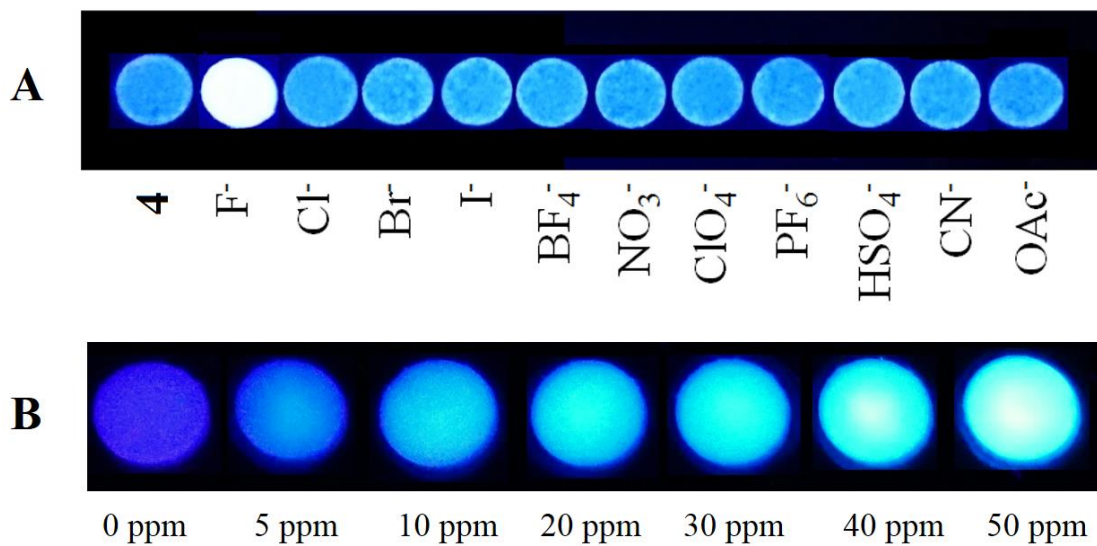
**Figura 8.** A: Titulação espectrofotométrica de **4** pela adição de quantidades crescentes de  $F^-$  em solução de acetonitrila. Em destaque: Absorbância a 375 nm em função da  $[F^-]/[4]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[4] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ). B: Titulação espectrofluorimétrica de **4** com adições crescentes de  $F^-$  em solução de acetonitrila. Em destaque: Emissão a 460 nm em função da  $[F^-]/[4]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[4] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\lambda_{exc} = 333 \text{ nm}$ ).

A partir dos dados obtidos das titulações, determinamos as quantidades mínimas detectáveis e quantificáveis de  $F^-$ , conforme o procedimento descrito no Capítulo 4, seção “4.2. Medidas espectrofotométricas e espectrofluorimétricas”. Os limites de detecção (LDD) encontrados foram de  $LDD_{abs} = 0,009 \pm 0,001$  por absorção e  $LDD_{em} = 0,00031 \pm 0,00002$  por emissão. Os limites de quantificação (LDQ) foram de  $LDQ_{abs} = 0,017 \pm 0,001$  e  $LDQ_{em} = 0,00043 \pm 0,00002$  por emissão. As quantidades mínimas detectáveis (QMD) foram  $QMD_{em} = 0,10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $QMD_{abs} = 2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . As quantidades mínimas quantificáveis (QMQ) foram  $QMQ_{abs} = 3,00 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por absorção e  $QMQ_{em} = 0,27 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por emissão. Os LDD’s e LDQ’s dizem respeito às variações de sinal intrínsecos dos

equipamentos utilizados nas medições. Já os valores de QMD e QMQ representam o valor numérico das menores concentrações detectáveis e quantificáveis pelo método. A tabela 2 sumariza os resultados discutidos neste parágrafo. A espectrofluorimetria, por ser uma técnica mais seletiva e se basear apenas na luz emitida, é mais sensível do que a espectroscopia de absorção, o que pode ser constatado na prática pelos valores encontrados.

A adição de  $F^-$  à solução de **4** resulta em aumento significativo do rendimento quântico de fluorescência. As medidas foram realizadas pelo método comparativo, utilizando a cumarina-343 em etanol como substância padrão. Encontramos o aumento de  $\phi = 0,06$ , do composto **4** puro em acetonitrila para  $\phi = 0,53$ , para a mistura entre **4** e o 10 equivalentes molares de  $F^-$ , um incremento de 9 vezes. Resultado semelhante foi observado nas medidas espectrofluorimétricas resolvidas no tempo; onde observou-se o aumento do tempo de vida do estado excitado de  $\tau = 0,314$  ns, do composto **4** para  $\tau = 3,18$  ns para a mistura entre **4** e  $F^-$ , aumento de aproximadamente 10 vezes. De modo geral compostos com rendimentos quânticos de fluorescência superiores apresentam maior estabilidade do estado excitado, o que está de acordo com as nossas observações.

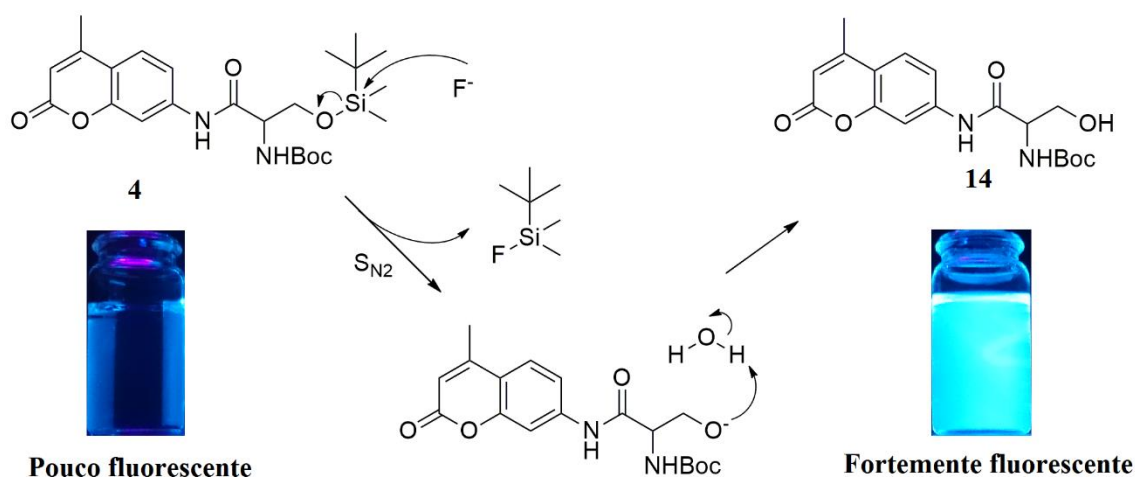
Buscando a implementação do composto **4** em análises de  $F^-$  ao olho nu, adaptamos um aparato simples e de baixo custo baseado no uso de discos de papel embebidos em uma solução de acetonitrila da sonda, os quais são posicionados sob luz UV (365 nm). Iniciamos os testes pela repetição da varredura dos mesmos ânions utilizados anteriormente nos ensaios espectroscópicos, a fim de certificar a seletividade na nova matriz. A figura 9A apresenta a manutenção de seletividade no aparato adaptado. A partir desse resultado, introduzimos à discos de papel previamente embebidos na solução de **4**, concentrações crescentes de  $F^-$ . Ao introduzir os discos sob luz UV, foi possível distinguir visualmente as diferentes concentrações, conforme apresentado na Figura 9B.



**Figura 9.** A: varredura de ânions em discos de papel embebidos com solução em acetonitrila de **4**, sob luz UV ( $\lambda_{exc.} = 365$  nm;  $[4] = 1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ;  $[\text{ânions}] = 100$  ppm). B: Alterações visuais dos discos de papel com solução de **4** sob luz UV na presença de diferentes concentrações de F<sup>-</sup> ( $[4] = 1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ;  $\lambda_{exc.} = 365$  nm).

### 1.3.3. Estudos do mecanismo de detecção de fluoreto

Como já abordado anteriormente, o éter de silício instalado junto à cadeia lateral da *L*-Serina foi projetado para ser o sítio de interação com o fluoreto através de uma reação  $S_N2$ . Portanto, propusemos o mecanismo de acordo com o apresentado no Esquema 3. A proposta esteve pautada na escolha de um composto altamente fluorescente (**2**), o qual pela ligação com o sítio receptor tivesse desativado a via radiativa de decaimento através de dois mecanismos em paralelo: i) Transferência de elétron foto-induzida (TEFI) <sup>39</sup> e ii) Efeito do átomo pesado (EAP) imputado pelo átomo de Si. <sup>10</sup> A partir do rompimento da ligação O-Si mediada pelo  $F^-$ , dá-se origem ao composto **14**, o qual teria reestabelecidos os modos radiativos de decaimento pela inibição da TEFI e EAP, apresentando expressivo aumento de rendimento quântico e modificações das bandas de absorção, sendo estes os modos operantes da sonda.

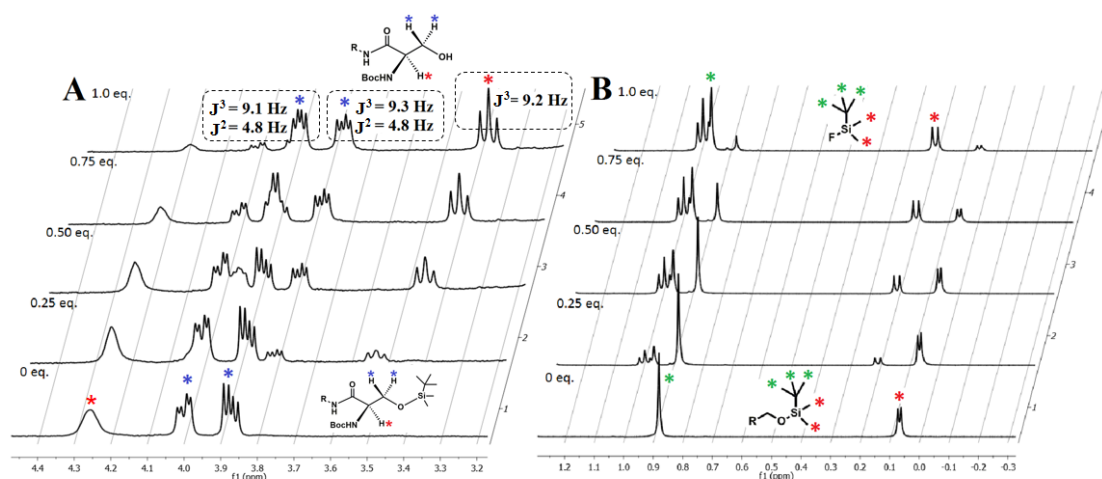


Esquema 3. Mecanismo de detecção de fluoreto.

Precisávamos comprovar nossa proposta mecanística através de técnicas instrumentais que atestassem a formação de **14**. Para isso utilizamos as técnicas de RMN de  $^1H$  e espectrometria de massas. Iniciaremos a discussão pela análise da titulação do composto **4** com uma solução de TBAF, cujos espectros foram adquiridos após a adição sequencial de 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 equivalentes molares do agente titulante. A compilação das regiões cujas modificações suportam a nossa proposta, são apresentadas na Figura 10.

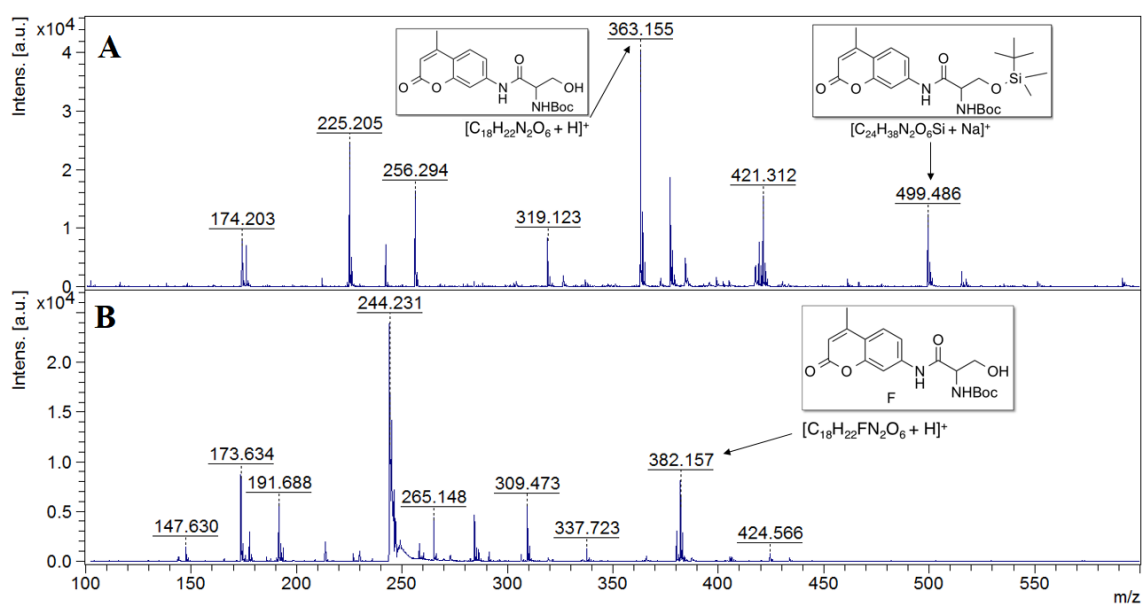
O primeiro conjunto de sinais relevantes está apresentado na Figura 10A, referente ao hidrogênio  $\alpha$ -carbonílico da cadeia lateral da *L*-Serina, cujo sinal alargado está marcado com asterisco vermelho em 4,28 ppm na fração correspondente à ausência do titulante (0 eq., Figura 10A). À medida em que o  $F^-$  foi adicionado à solução de **4**, observou-se o deslocamento gradual de 4,28 ppm para 3,38 ppm na forma de um tripleto definido (t,  $J = 9,2$  Hz, 1H), originado pelo acoplamento com o par de hidrogênios diastereotópicos  $\beta$ -carbonílicos, marcados com asteriscos azuis. Tratando dos hidrogênios  $\beta$ -carbonílicos, cada um deles resultaram em duplos dubletos [3,89 ppm (dd,  $J = 9,1$ ; 4,8 Hz, 1H) e 3,77 ppm (dd,  $J = 9,3$ ; 4,8 Hz, 1H)], derivados do acoplamento germinal ( $J^2$ ) e do acoplamento com o H- $\alpha$ -carbonílico ( $J^3$ ).

Analisando a Figura 10B, daremos enfoque à fração que corresponde ao ataque nucleofílico do  $F^-$  ao átomo de silício, e que resulta na conversão do éter O-TBDMS no fluoreto correspondente F-TBDMS. A *terc*-butila ligada ao Si está sinalizada com asteriscos verdes, e as metilas em vermelho. Observa-se que o sinal dos hidrogênios metílicos são deslocados de 0,07 ppm para 0,2 ppm, devido à formação do derivado FTBDMS. O sinal em 0,88 ppm, atribuído inicialmente aos hidrogênios da *terc*-butila conectada ao silício sofre deslocamento para 0,96 ppm.



**Figura 10.** Titulação de **4** assistida por RMN de  $^1H$  (400 MHz) pela adição de 0 a 1,0 equivalente molar de  $F^-$  em  $CD_3CN$ . A: alterações do padrão de sinais de H da cadeia lateral da *L*-Serina. B: alterações dos hidrogênios das vizinhanças do grupo TBDMS.

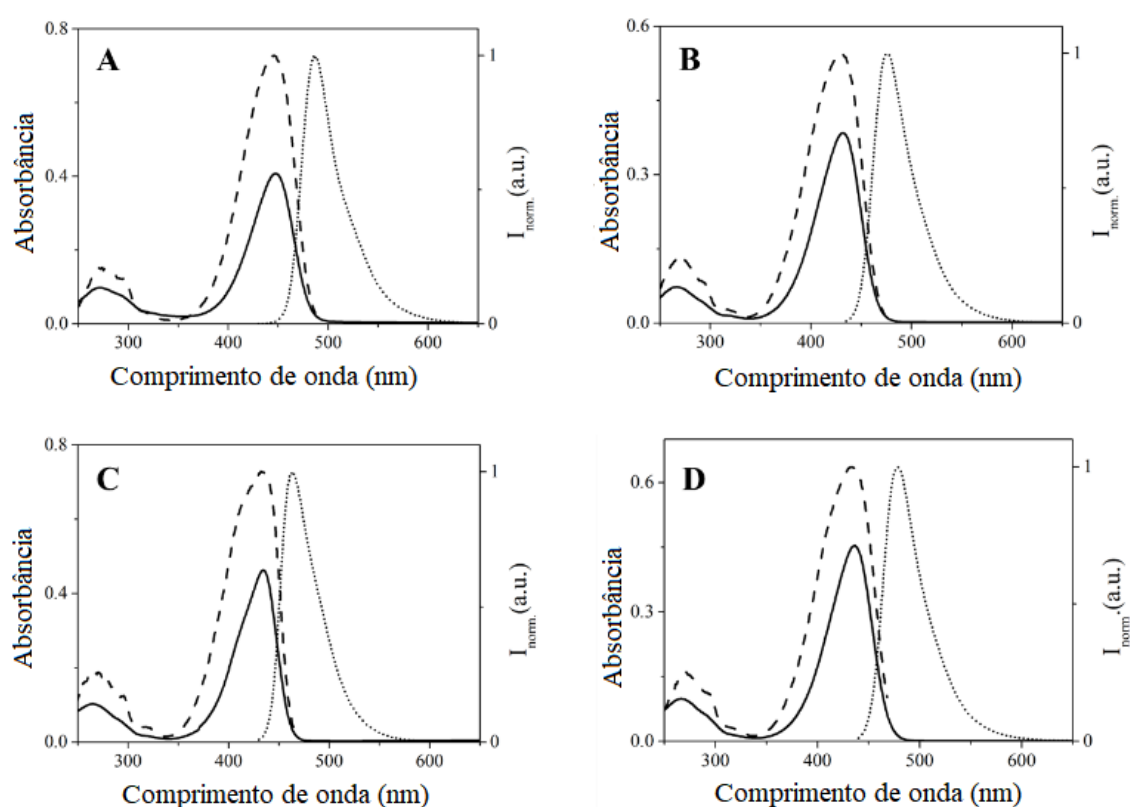
Dando sequência à elucidação do mecanismo de reação entre **4** e  $F^-$ , realizamos estudos por MALDI-TOF-MS na fase gasosa, conforme apresentado na Figura 11. Na Figura 11A, os picos correspondentes às espécies de  $m/z$   $[4+Na]^+ = 499,486$  e  $[14+H]^+ = 363,155$  foram identificadas no espectro de massas de **4** após a irradiação do laser do MALDI em 330 nm. Na Figura 11B, após a adição de  $F^-$  à placa do MALDI contendo **4**, observa-se o pico correspondente ao aduto entre **14** e o ânion  $F^-$ , de  $m/z$   $[14+F^-+H]^+ = 382,157$ . Concomitantemente, ambos os picos atribuídos no espectro A (**4**) desapareceram. A ausência de sinais correspondentes às formas livres dos compostos **4** e **14** na Figura 11B corroboram nossa hipótese de mecanismo de detecção.



**Figura 11.** A: Espectro de MALDI-TOF-MS para a caracterização da sonda **4**. B: Espectro de MALDI-TOF-MS da sonda **4** após adição de  $F^-$  (1 mg/ml de **4** em acetonitrila; 10 equivalentes molares de TBAF).

### 1.3.4. Propriedades fotofísicas e analíticas da sonda para Cu<sup>2+</sup>

Os compostos **3** e **5** foram estudados pelas técnicas de absorção, fluorescência estacionária e fluorescência resolvida no tempo. Visando comparar as alterações fotofísicas entre **3** e **5**, os espectros de absorção, emissão e excitação de ambos foram registrados em acetonitrila, conforme apresentado na Figura 12A e Figura 12B, respectivamente. Os espectros de **5** em clorofórmio e etanol (Figuras 12C e D) foram também adquiridos de modo a estabelecer a relação entre algumas propriedades físicas dos solventes e fotofísicas de **5**.



**Figura 12.** Espectros de absorção (linha cheia), emissão normalizada (linha pontilhada) e excitação (linha tracejada) dos compostos **3** (A: acetonitrila,  $\lambda_{exc} = 447$  nm [**3**] =  $1,0 \cdot 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) e **5** (B: acetonitrila,  $\lambda_{exc} = 431$  nm; C: clorofórmio,  $\lambda_{exc} = 434$  nm; e D: etanol,  $\lambda_{exc} = 436$  nm. [**5**] =  $1,0 \cdot 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>).

Os dados fotofísicos provenientes da Figura 12 junto dos rendimentos quânticos de fluorescência e tempo de vida no estado excitado foram compilados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados de absorção no UV-visível e fluorescência dos compostos **3** ( $1.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) em acetonitrila e **5** ( $1.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) em acetonitrila, clorofórmio e etanol absoluto.

Entrada	Compostos	Solventes	UV-vis		Fluorescência			
			$\lambda_{exc}$ (nm)	Log $\epsilon$	$\lambda_{em}$ (nm)	Desvio de Stokes (nm)	Rendimento Quântico $\phi$	Tempo de vida $\tau$ (ns)
1	3	CH <sub>3</sub> CN	447	4,61	486	39	0,56	3,86
2	5	CH <sub>3</sub> CN	431	4,58	478	47	0,66	3,32
3	5	CHCl <sub>3</sub>	434	4,67	463	29	0,73	2,96
4	5	EtOH	436	4,85	478	42	0,66	3,38

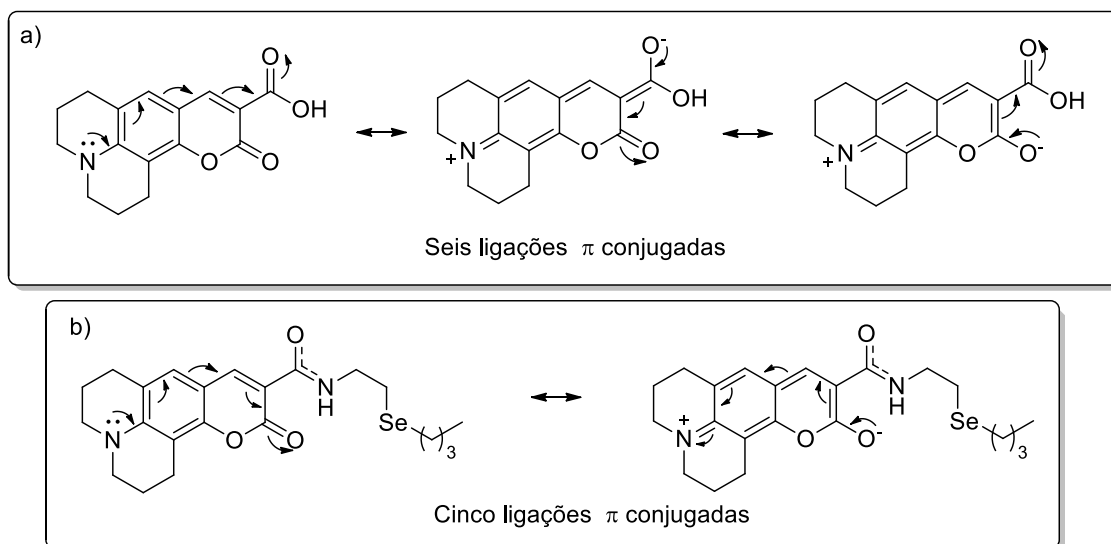
Pela análise das entradas 1 e 2 da Tabela 2, que tratam dos dados de **3** e **5** em acetonitrila, observa-se que a amidação de **3** que resulta em **5**, promove o deslocamento hipsocrômico do máximo de absorção bastante acentuado, o que é acompanhado do aumento do desvio de Stokes. Discutiremos o deslocamento hipsocrômico em termos das estruturas de ressonância e extensão do sistema conjugado  $\pi$ .

Como a conjugação isolada do grupo amida em **5** é mais efetiva do que a conjugação isolada do ácido carboxílico em **3**, a amida em **5** não participa de modo efetivo do sistema conjugado  $\pi$  como um grupo retirador de elétrons do núcleo cumarínico. Ao contrário disso, o grupo ácido carboxílico tem papel mais importante na conjugação da molécula como um todo em **3**. Por isso, **3** contém três híbridos de ressonância representativos com seis ligações  $\pi$  conjugadas (Esquema 4A), enquanto **5** contém apenas dois híbridos de ressonância com cinco ligações  $\pi$  conjugadas, como apresentado no Esquema 4B. Com um sistema conjugado maior, o composto **3** absorve e emite radiação com comprimentos de onda maiores do que **5**. Uma vez que **3** contém seis orbitais moleculares participando do sistema conjugado, as diferenças energéticas entre os orbitais de



fronteira são menores em **3** do que em **5**, que contém cinco orbitais participando do sistema conjugado.

O composto **5** apresentou maior rendimento quântico de fluorescência do que o seu precursor **3**, apesar da presença do átomo de selênio como função marginal ao núcleo fluorescente. O átomo de selênio geralmente atua como desativador de fluorescência quando diretamente ligado ou quando muito próximo de núcleos fluorogênicos, devido ao efeito do átomo pesado.<sup>40</sup> Entretanto, no composto **5** há um espaçador de quatro unidades atômicas entre o núcleo cumarínico e o átomo de selênio, o que torna o átomo de selênio pouco determinante sobre a eficiência de emissão em **5**. O tempo de vida do estado excitado de **3** é ligeiramente superior a **5**.



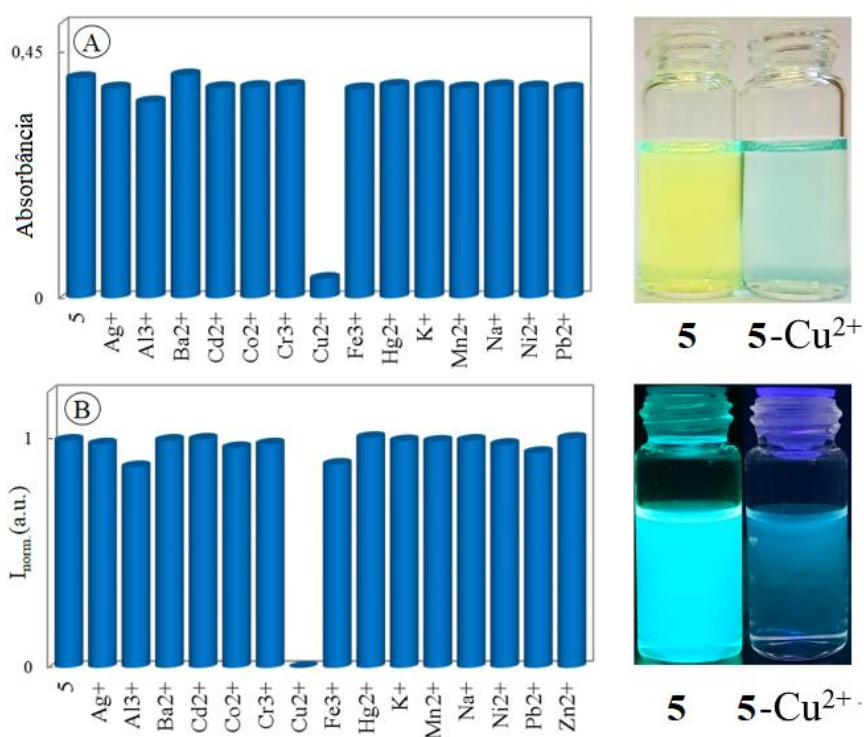
**Esquema 4.** Híbridos de ressonância de a) **3** e b) **5**.

Adicionalmente, o composto **5** foi caracterizado em clorofórmio e etanol (entradas 3 e 4 da Tabela 2; Figuras 12C e 12D), com o objetivo de obter melhor entendimento das influências das características físico-químicas dos solventes, como polaridade e interações intermoleculares sobre as propriedades fotofísicas de **5**. Considerando que o etanol apresenta características de um solvente polar prótico, acetonitrila sendo polar aprótico e o clorofórmio apolar aprótico, o fenômeno de solvatação se dá de modo distinto e, em consequência, a

estabilização do estado excitado é diferente para cada um dos sistemas. Dos parâmetros avaliados como desvio de Stokes, rendimento quântico e tempo de vida do estado excitado, podemos apontar algumas observações. Em clorofórmio, **5** apresenta o menor valor de desvio de Stokes comparado aos solventes polares. Isso se explica pelo fato de **5** passar por um menor número de processos de relaxação no estado excitado em clorofórmio quando comparado com os solventes de maior polaridade. Devido à presença de funções orgânicas polarizadas em **5**, os solventes polares apresentam maior tendência em receber energia de **5** quando no estado excitado, o que explicaria a maior diferença de energia entre radiação absorvida e emitida. Por interagir mais fracamente com o clorofórmio, no momento em que a radiação é absorvida por **5**, que é promovido ao estado excitado **5\***, os processos de transferência de energia ocorrem em menor extensão, levando preferencialmente ao decaimento radiativo com menor número de eventos de transferência de energia. Isso explica também o fato de o tempo de vida de **5\*** em clorofórmio ser inferior dentre os demais. Também faz sentido o rendimento quântico de fluorescência ser o maior em clorofórmio, pois, uma vez que há menor número de eventos de transferência energética, mais efetivos são os eventos de decaimento radiativo.

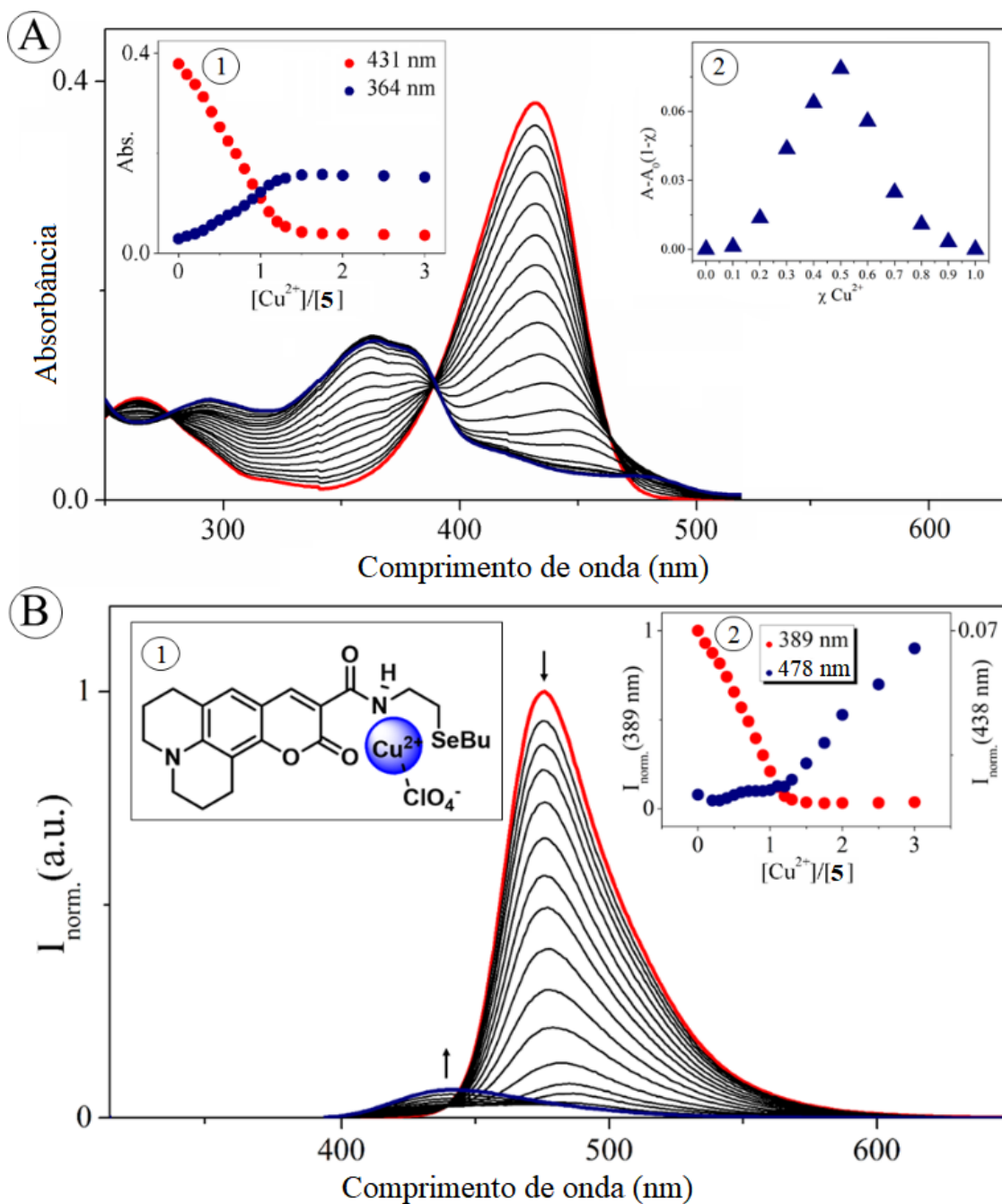
### 1.3.5. Estudos analíticos

Iniciamos os testes de seletividade pela adição de uma série de percloratos de cátions monovalentes, divalentes e trivalentes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{3+}$ ) à soluções **5** em acetonitrila. Dentre os cátions testados, apenas o  $\text{Cu}^{2+}$  induziu mudanças significativas nos perfis espectrais de absorção e emissão de **5**, como apresentado na Figura 13A e 13B, respectivamente. Ao lado dos gráficos de barra da Figura 13, observam-se as mudanças visuais provocadas pela presença do  $\text{Cu}^{2+}$ . Sob luz branca na região do visível, observa-se mudança do amarelo original da solução de **5** em acetonitrila para o azul, resultado do composto de coordenação entre **5**- $\text{Cu}^{2+}$ . Sob luz ultravioleta (Figura 13B), observamos o intenso brilho azul esverdeado de **5** e, ao lado, a brusca diminuição da intensidade de brilho pela adição de  $\text{Cu}^{2+}$ .



**Figura 13.** A) Absorbância em 432 nm e B) emissão de fluorescência normalizada do composto **5** ( $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) na presença de cinco equivalentes molares de diferentes íons metálicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{3+}$ ) em solução de acetonitrila. Ao lado do gráfico A, alterações visuais sob luz branca. Ao lado do gráfico B, alterações visuais sob luz UV (365 nm).

A partir dos resultados obtidos com o teste de seletividade frente a cátions, procedemos as titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas, conforme apresentado nas Figuras 14A e 14B, respectivamente.



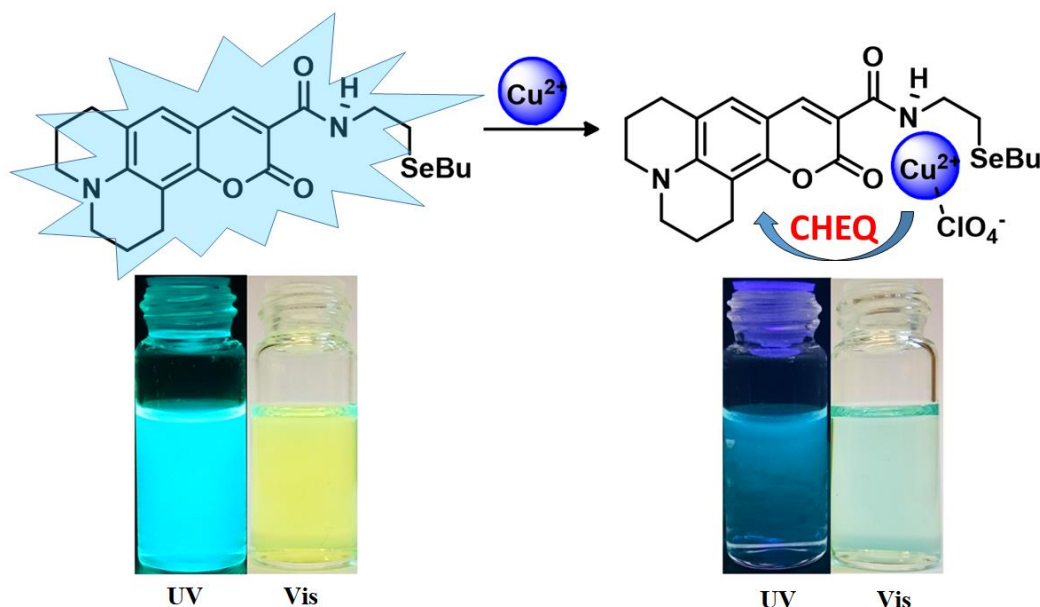
**Figura 14.** A: Titulação espectrofotométrica de 5 com quantidades crescentes de  $\text{Cu}^{2+}$  em solução de acetonitrila. Em destaque: 1) Absorção a 431 nm (vermelho) e 364 nm (azul) em função da  $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{5}]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[\text{5}] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ). 2) Plotagem de Job em acetonitrila ( $\lambda_{\text{abs}} = 364 \text{ nm}$ ). B: Titulação espectrofluorimétrica de 5 com quantidades crescentes de  $\text{Cu}^{2+}$ . Em destaque: 1) Proposta estrutural do composto de coordenação 5- $\text{Cu}^{2+}$ . 2) Emissão normalizada em 476 nm (vermelho) e 438 nm (azul) em função da  $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{5}]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[\text{5}] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ;  $\lambda_{\text{exc.}} = 389 \text{ nm}$ ).

Pela análise dos espectros da titulação espectrofotométrica na Figura 14A, observa-se o deslocamento hipsocrômico bastante expressivo de 67 nm, pela migração do máximo de absorção inicial em 431 nm na ausência de  $\text{Cu}^{2+}$  (linha vermelha) para o novo máximo do complexo **5**- $\text{Cu}^{2+}$  em 364 nm (linha azul). Devido à larga diferença de 67 nm entre os espectros de absorção de **5** e do complexo **5**- $\text{Cu}^{2+}$ , a formação do complexo pode ser acompanhada a olho nu pela viragem de coloração do verde para o azul. Interessantemente, o nosso sistema difere em comportamento dos exemplares de sonda construídas a partir da plataforma da cumarina-519 (**3**) reportadas em literatura, onde os deslocamentos do espectro de absorção ocasionados pela interação com íons metálicos são batocrômicos.<sup>41,42</sup>

Nossa proposta de interação entre **5** e o íon  $\text{Cu}^{2+}$  leva em consideração a aproximação do íon metálico (ácido de Lewis) junto da nuvem eletrônica do núcleo cumarínico, onde o par de elétrons do oxigênio carbonílico da lactona junto do átomo de selênio são coordenados ao íon metálico como um ligante bidentado. Ao passo que o íon  $\text{Cu}^{2+}$  toma para si parte da densidade eletrônica do oxigênio carbonil-lactônico, o núcleo cumarínico torna-se deficiente de elétrons, resultando no aumento da diferença energética entre HOMO e LUMO, o que gera o deslocamento hipsocrômico do espectro de absorção. A estequiometria do complexo foi determinada através da plotagem de Jobs,<sup>43</sup> representado na Figura 14A2, onde a fração molar de  $\text{Cu}^{2+}$  e **5** coincide com o valor de 0,5; indicando estequiometria equimolar entre os participantes. Observa-se também, na Figura 14A1 que a resposta em termos de absorbância é bastante linear até a adição de 1 equivalente molar do íon  $\text{Cu}^{2+}$  em relação a **5** e, imediatamente após esse ponto, atinge-se um platô de intensidade para ambas as bandas na descendente (em vermelho) e na ascendente (azul). Quando a estequiometria determinada através da plotagem de Jobs e a estabilização dos máximos de absorção coincidem, como é o caso, é um indicativo de que existe uma constante de interação intensa entre metal e ligante, pois a reação se completa mesmo em baixas concentrações. O ponto isobéstico em 389 nm evidencia que só existem duas espécies em equilíbrio, nesse caso o composto **5** e o complexo **5**- $\text{Cu}^{2+}$ .<sup>44</sup>

Quando analisamos a titulação por emissão (Figura 14B), observamos a atenuação da banda em 389 nm, o que ocorre até a adição de 1 equivalente molar de  $\text{Cu}^{2+}$ , conforme apresentado em vermelho na Figura 14B2. Com a adição de excesso de  $\text{Cu}^{2+}$  observamos o surgimento de uma nova banda 438 nm, representado seu máximo em azul, também na Figura 14B2, cuja atribuição não foi investigada.

Considerando a natureza paramagnética do íon  $\text{Cu}^{2+}$  (configuração eletrônica  $d^9$ ), este íon é capaz de promover o acoplamento spin-órbita com o elétron no estado excitado, <sup>45</sup> resultando em quenching de fluorescência. Este comportamento é frequentemente observado tratando-se de ligantes emissivos quando coordenados ao íon  $\text{Cu}^{2+}$ . Portanto, a coordenação do  $\text{Cu}^{2+}$  pelo ligante ou sonda **5** resulta no fenômeno de “atenuação de fluorescência por quelação”, ou do inglês, como geralmente é tratado em literatura - “Chelation Enhanced Fluorescence Quenching” ou simplesmente CHEQ. O Esquema 5 apresenta o processo de detecção de forma ilustrativa, correlacionando-o com as mudanças visuais observadas antes e após a formação do complexo.



**Esquema 5.** Parte superior: proposta do mecanismo de detecção do íon  $\text{Cu}^{2+}$  pela sonda **5**. Parte inferior: Alterações visuais sob luz ultravioleta e visível de **5** antes e após formação do complexo **5**- $\text{Cu}^{2+}$ .

Ambas as técnicas de absorção e emissão são capazes de fornecer informação analítica quantitativa sobre a presença do íon  $\text{Cu}^{2+}$ . Quando utilizamos a técnica de

absorção temos as opções de monitoramento das bandas decrescente em 431 nm ou crescente em 364 nm, que podem ser monitoradas visando a quantificação de  $\text{Cu}^{2+}$ . No entanto, quando utilizada a banda decrescente em 431 nm, devido à sua maior inclinação dentro da faixa linear, alcançamos maior sensibilidade das medidas, portanto, fazemos a indicação do uso desta. Quando utilizada a técnica de emissão de fluorescência na quantificação do  $\text{Cu}^{2+}$ , a informação analítica deve ser extraída da banda decrescente em 478 nm.

Com o objetivo de obter maiores detalhes analíticos do método para detecção de  $\text{Cu}^{2+}$ , os limites de detecção (LDD), limites de quantificação (LDQ), quantidades mínimas detectáveis (QMD) e quantidades mínimas quantificáveis (QMQ) foram calculados, conforme descrito Capítulo 4, item 4.2. Dos dados de absorção, pelo monitoramento da banda em 431 nm, as QMD e QMQ encontradas foram de  $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente. Dos dados de emissão, as QMD e QMQ encontradas foram de  $0,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente, valores ligeiramente maiores do que os obtidos pela espectroscopia de absorção.

A constantes de equilíbrio de formação do complexo  $5\text{-Cu}^{2+}$  ( $\log \beta$ ) em solução de acetonitrila foram calculadas a partir dos dados das titulações por absorção e emissão usando o software HypSpec,<sup>46</sup> sendo que os valores encontrados ficaram muito próximos:  $\log \beta = 5.78 \pm 0.01$  (absorção) e  $\log \beta = 6.32 \pm 0.04$  (emissão).

Por fim, compilamos os dados fotofísicos gerais na Tabela 3 abaixo, de modo a estabelecer um paralelo entre **3**, **5** e o complexo  $5\text{-Cu}^{2+}$ .

Tabela 3. Dados fotofísicos de 3, 5 e 5-Cu<sup>2+</sup> em acetonitrila.

Compostos	UV-vis		Fluorescência			
	$\lambda_{exc}$ (nm)	Log $\epsilon$	$\lambda_{em}$ (nm)	Stokes' shift (nm)	Quantum Yield	Lifetime (ns)
3	447	4,61	486	39	0,56	3,86
5	431	4,58	478	47	0,66	3,32
5-Cu <sup>2+</sup>	364	4,18	438	74	0,0053	2,68

Além do já mencionado deslocamento hipsocrômico observado entre a sonda **5** e o complexo 5-Cu<sup>2+</sup>, nos chamou a atenção a amplitude da diminuição de rendimento quântico de fluorescência devido à complexação da sonda pelo Cu<sup>2+</sup>. Inicialmente **5** apresentava rendimento quântico de  $\phi = 0,66$ , sendo que o complexo 5-Cu<sup>2+</sup> apresentou  $\phi = 0,0053$ , diminuição de 125 vezes. Consideramos muito marcante o efeito do Cu<sup>2+</sup> sobre este aspecto. O desvio de Stokes aumentou consideravelmente quando comparamos **5** (47 nm) e 5-Cu<sup>2+</sup> (74 nm), aponta maior extensão de processos de relaxação que precedem a emissão. Por fim, o tempo de vida do estado excitado decresce de 3,32 ns em **5** para 2,68 ns em 5-Cu<sup>2+</sup>, algo esperado devido à desestabilização do estado excitado.



## 1.4. Conclusões

Sobre a sonda **4**, dedicada à detecção de  $F^-$ , ficou constatado por estudos de RMN de  $^1H$  e espectrometria de massas, que o rompimento da ligação O-Si mediado pelo ataque nucleofílico do  $F^-$  ao Si, configura o mecanismo de ação da sonda, o que resulta em expressivo aumento de fluorescência. A estratégia sintética adotada na preparação de **4** estende a aplicação de sondas deste tipo aos amino-fluoróforos, o que até então havia sido aplicado apenas aos hidróxi-fluoróforos. O sistema pôde ser adaptado a discos de papéis na detecção de  $F^-$  ao olho nu.

No caso da sonda **5**, demonstramos a síntese de um novo seleno-derivado da cumarina-519, que foi aplicada no reconhecimento do íon  $Cu^{2+}$  através das técnicas de espectrofotometria e espectrofluorimetria mediante complexação sonda pelo analito. A sonda se mostrou altamente seletiva e sensível ao  $Cu^{2+}$ , e também capaz de atuar como sonda colorimétrica pela viragem do verde para o azul na presença do íon. A sonda é ativa apenas em meio orgânico aprótico, por isso sugerimos aplicação em estudos de mecanismos reacionais que envolvam espécies de  $Cu^{2+}$  como intermediário ou catalisador.

## Capítulo 2

---

Síntese e aplicação de derivados da fluoresceína detecção de íons tóxicos

## 2.1. Introdução

A fluoresceína e seus derivados constituem uma classe muito interessante de fluoróforos verde-emissivos versáteis, e tem sido aplicada em biologia celular, imagiologia e ferramentas moleculares em bioquímica.<sup>47,48</sup> Seus derivados apresentam propriedades físico-químicas interessantes, pois são normalmente solúveis em água quando na forma iônica e apresentam boa capacidade de penetração em membrana celular. Além disso, respondem à variação de pH, possuem elevados rendimentos quânticos de fluorescência e altos coeficientes de extinção, além do que, tem sido explorados na preparação de sondas para detecção de íons tóxicos.<sup>49-53</sup>

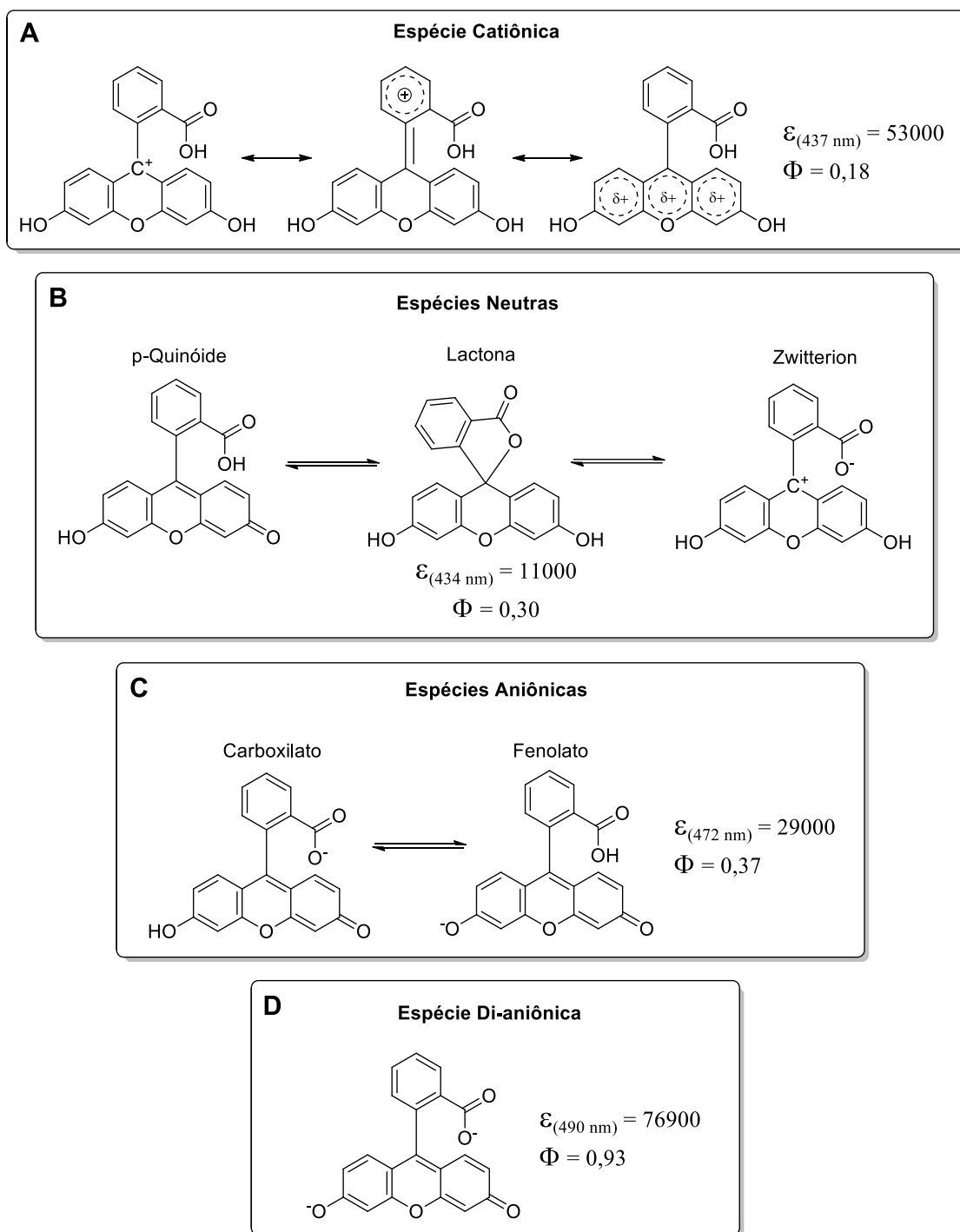
A fluoresceína apresenta uma série de equilíbrios protolíticos (que envolvem a transferência de um próton de uma molécula para outra), dependendo da faixa de pH do meio. Cada uma dessas espécies em equilíbrio apresenta propriedades fotofísicas completamente distintas entre elas. Em 1995, Sjoback e colaboradores publicaram um importante trabalho tratando das propriedades físico químicas das várias espécies possíveis em equilíbrio da fluoresceína em solução aquosa.<sup>49</sup> A Figura 15 mostra as formas protolíticas da fluoresceína acompanhada dos respectivos valores de absorvidade molar e rendimento quântico de fluorescência, conforme apresentados na referência bibliográfica supracitada.

Como é de se esperar, os rendimentos quânticos de emissão apresentam uma relação direta com o número de elétrons das formas protolíticas. Quando analisamos a forma deficiente em elétrons, a catiônica, seu rendimento quântico é 0,18. Apesar de deficiente em elétrons, o carbocátion representado na posição central do quadro A, hibridizado em  $sp^2$ , permite o livre trânsito de elétrons  $\pi$  entre as porções xanteno e ácido benzóico, garantido diferenças de energia entre HOMO e LUMO dentro da faixa do visível ( $\lambda_{max} = 437$  nm). Previsivelmente, as formas neutras em equilíbrio, apresentadas no quadro B, exibem rendimento quântico de fluorescência (0,30) superior à espécie catiônica; deficientes em elétrons. Diferentemente das formas catiônicas, representadas como híbridos de ressonância, as formas aniônicas são representadas como formas em equilíbrio, pois envolvem a transferência de prótons. Por mais que a forma neutra-lactônica contenha um carbono hibridizado em  $sp^3$ , as outras duas formas em equilíbrio permitem o livre trânsito dos elétrons  $\pi$  ao redor da estrutura, permitindo conjugação e

diferenças energéticas HOMO-LUMO da mesma ordem da observada na espécie catiônica.

A formas em equilíbrio mono-aniônicas, além de apresentar rendimento quântico (0,37) superior ao das formas neutras (0,30), chama atenção o seu máximo de absorção pelo desvio batocrômico. O seu máximo de absorção encontra-se em 472 nm, contra 437 e 434 nm das formas neutras e catiônica, uma diferença média de 36,8 nm. Podemos atribuir essa diferença dos máximos de absorção ao fato de que, o orbital molecular desocupado de energia mais adequada para acomodar o par de elétrons extra, corresponde a um orbital n, proveniente do heteroátomo de oxigênio. Por isso, o HOMO das espécies mono-aniônicas em equilíbrio é um orbital n, de maior energia do que os orbitais  $\pi$ , tornando menor a diferença energética HOMO-LUMO, comparado às espécies neutras e catiônicas.

Por fim, devido maior número de elétrons, a espécie di-aniônica apresenta a menor diferença de energia entre os orbitais de fronteira. O rendimento quântico de fluorescência apresenta um salto muito expressivo, indo de 0,37 da forma mono-aniônica para 0,90 na forma di-aniônica. Esse dado nos traz a interpretação de que a constante cinética de decaimento radiativo é bastante favorecida em relação à constante cinética dos fenômenos não-radiativos. A reunião de características tais como diferença energética HOMO-LUMO, excesso de elétrons livres e apenas uma única forma em equilíbrio, reforçam a alta eficiência no processo de emissão.



**Figura 15.** Formas protolíticas da fluoresceína e os respectivos equilíbrios entre elas. Dentro de cada quadro estão indicados as absorvidades molares nos respectivos máximos de absorção, bem como os rendimentos quânticos de fluorescência.

Tratando das possibilidades de transformações estruturais, a fluoresceína é um bloco construtor interessante em síntese orgânica, pois contém ambos grupos funcionais nucleofílicos (fenóis) e eletrofílico (carboxilato). No entanto, a presença de grupos

funcionais oxigenados em torno de toda a sua estrutura molecular, o torna pouco seletiva quando se busca a detecção de um analito. As modificações estruturais dos grupos funcionais marginais da porção xanteno<sup>8</sup> podem permitir o ajustamento das propriedades do cromóforo para aplicações específicas. Tendo esse conceito em mente, a associação do núcleo de fluoresceína à biomoléculas endógenas, tais como aminoácidos ou peptídeos<sup>9,10</sup> é um campo promissor de investigação, uma vez que sensores químicos biocompatíveis para aplicações *in vivo* pode ser concebidos.

Quando se busca por alvos analíticos, alguns íons metálicos como o mercúrio (II) e o crômio (II) são sempre muito visados, devido ao risco e implicações das suas contaminações na natureza. Muitos efeitos tóxicos em organismos vivos são atribuídos ao  $Hg^{2+}$ , incluindo danos oxidativo-celulares, distúrbios neuro-toxicológicos, carcinogenicidade etc.<sup>54,55</sup> O mercúrio ocorre nas formas metálica, iônica (I ou II), organometálica e como complexos de coordenação,<sup>56,57</sup> sendo que a forma iônica divalente constitui seu estado de oxidação mais estável. O  $Hg^{2+}$  pode ser facilmente bioacumulado em alimentos ou animais a partir da exposição direta ao ambiente contaminado ou por ingestão.<sup>58</sup> O íon apresenta grande afinidade pelo enxofre, levando à bio-complexos estáveis, sendo acumulado de forma permanente, comprometendo funções de proteínas e enzimas.<sup>29,59</sup>

No que se refere aos cátions trivalentes, o  $Cr^{3+}$  é um elemento essencial e tem papel importante na nutrição e processos metabólicos nos seres humanos. No entanto, em concentrações elevadas atua como um grave poluente.<sup>60,61</sup> O estado de oxidação do crômio pode variar de -2 a +6, sendo que a forma trivalente ( $Cr^{3+}$ ) é a predominante nos organismos vivos.<sup>62</sup> O  $Cr^{3+}$  desempenha papel essencial como nutriente dentro da faixa adequada (50-200  $\mu g$ /dia), onde participa do metabolismo da glucose. Contudo a ingestão de doses superiores a 50 mg/Kg é letal em adultos.<sup>63</sup>

O  $Al^{3+}$  é um íon naturalmente abundante em silicatos, criolita e bauxita, sendo este último mineral a principal matéria-prima para a produção do alumínio metálico. Ele é também utilizado em medicamentos anti-ácidos na forma de hidróxido de alumínio ou em antiperspirantes como cloreto de alumínio, além de ser utilizado em estações de tratamento de água como agente floculante.<sup>64</sup> Embora ainda não bem compreendido, existem algumas evidências que associam o  $Al^{3+}$  à distúrbios neurológicos, tais como as doenças de Parkinson e Alzheimer.<sup>65,66</sup> Considerando a importância destes elementos

para a vida e, por conseguinte, a necessidade da sua detecção para fins de monitoramento ambiental e alimentar, o desenvolvimento de métodos de análise seletivas e sensíveis estabelece um interessante campo de investigação.<sup>67-70</sup>

## 2.2. Objetivos

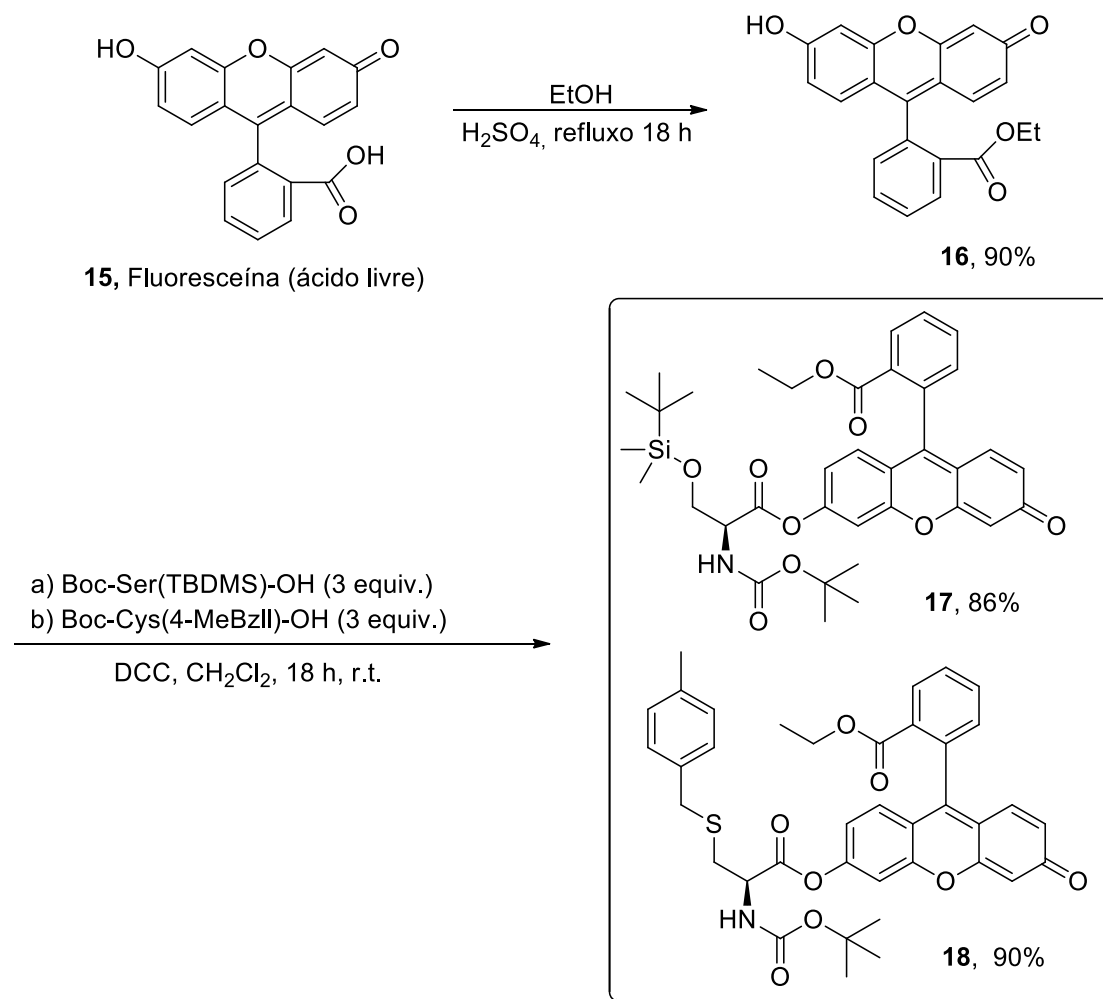
O presente estudo teve como principal objetivo a preparação e caracterização de derivados de fluoresceína homologados à aminoácidos visando a obtenção de sondas fluorogênicas voltadas para a detecção de íons trivalentes ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{3+}$ ) e  $\text{Hg}^{2+}$ .



## 2.3. Resultados e discussão

### 2.3.1. Planejamento e síntese dos derivados de fluoresceína

O primeiro passo da rota de síntese deu-se via esterificação de Fisher da fluoresceína (**15**) em etanol, gerando-se o respectivo éster etílico de fluoresceína **16**, conforme apresentado no Esquema 6. Em seguida, foram realizadas as reações de acoplamento via éster entre a porção fenólica de **16** e os derivados de aminoácidos Boc-Ser(TBDMS)-OH (**8**) e Boc-Cys(4-MeBzl)-OH (obtido comercialmente), gerando-se os compostos finais **17** e **18**. A formação dos respectivos ésteres foi mediada pelo reagente ativador de grupos carboxílicos *N,N'*-diciclohexilcarboiimida (DCC), com rendimentos de 86 % (**17**) e 90% (**18**). Ambos os compostos foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figuras 15 – 18), análise elementar, espectrometria de massas, absorção no UV-vis, espectroscopia de emissão estacionária e resolvida no tempo.



Esquema 6. Síntese das síndas **17** e **18**.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de **17** e **18** (Figuras 16 e 17, respectivamente) apresentam o sinal singlete da *terc*-butila do grupo protetor N-Boc, além dos sinais característicos NH-carbamato,  $\alpha$ -CH e  $\beta$ -CH<sub>2</sub> da cadeia lateral dos aminoácidos. Sobre o composto **17**, o H-metil e H-*terc*-butil ligado ao grupo silano são observados na região de baixo deslocamento químico, devido ao efeito de blindagem imputada pelo átomo de silício. Observam-se os sinais pertencentes aos anéis heterocíclicos da fluoresceína entre 6,5 e 8,3 ppm. Os sinais pertencentes aos CH<sub>2</sub> (4,1 ppm) e CH<sub>3</sub> (1,0 ppm) do benzoato de etila da fluoresceína são observados em ambos os compostos **17** e **18**. Em relação ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 18 e 19), a confirmação da ligação éster entre aminoácido e fluoresceína se dá pelo surgimento do sinal do grupo carbonila quaternário em 186 ppm, bem como pelos sinais  $\alpha$ -carbonílicos em 56,2 ppm (**17**) e 53,5 ppm (**18**). O espectro de IV mostra alguns dos sinais mais característicos das funções químicas presentes nas moléculas, como o estiramento C=O da carbonila do éster alifático que liga a fluoresceína ao resíduo de aminoácido em 1770 cm<sup>-1</sup> e do grupo carbonila do benzoato de etila em 1720 cm<sup>-1</sup>. A banda larga em torno de 3300 cm<sup>-1</sup> corresponde ao NH-carbamato secundário presente em ambos os compostos **17** e **18**.<sup>31</sup> A partir da análise dos espectros de massas obtidos em MALDI-TOF-MS (**17**) e HRMS (**18**), foi possível identificar o pico do ion molecular das espécies protonadas [**17** + H<sup>+</sup>] com 662,28 m/z (Figura 20A1, 20A2) e [**18** + H<sup>+</sup>] com 668,23 m/z (Figura 20B).

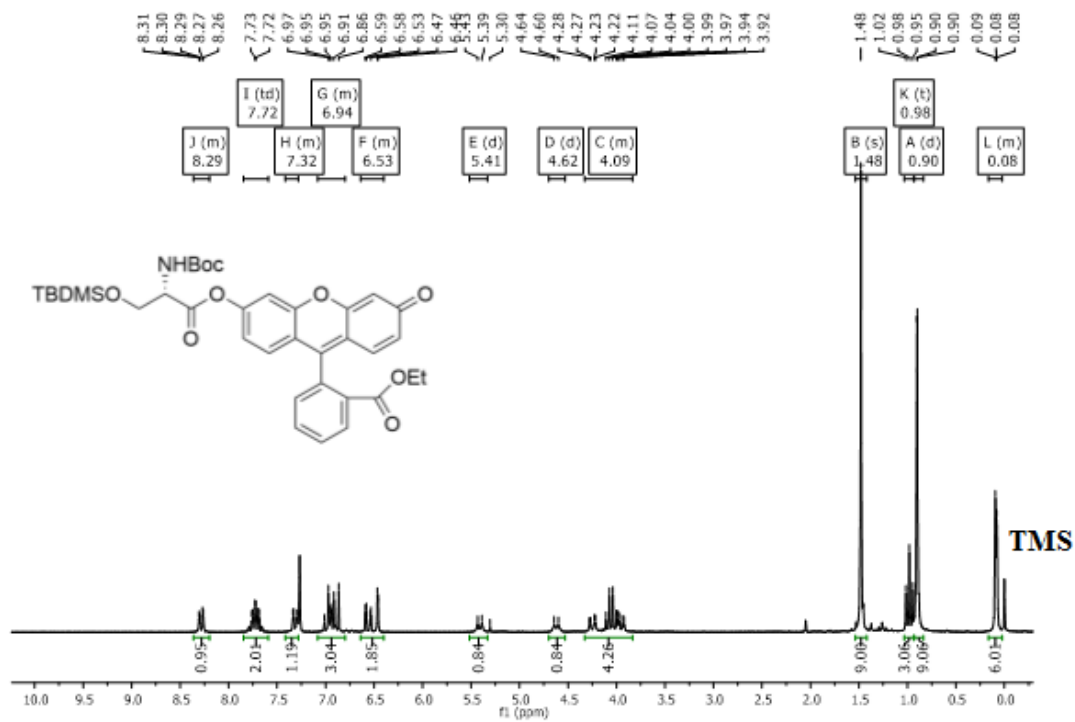


Figura 16. Espectro de  $^1\text{H}$  NMR de 17.

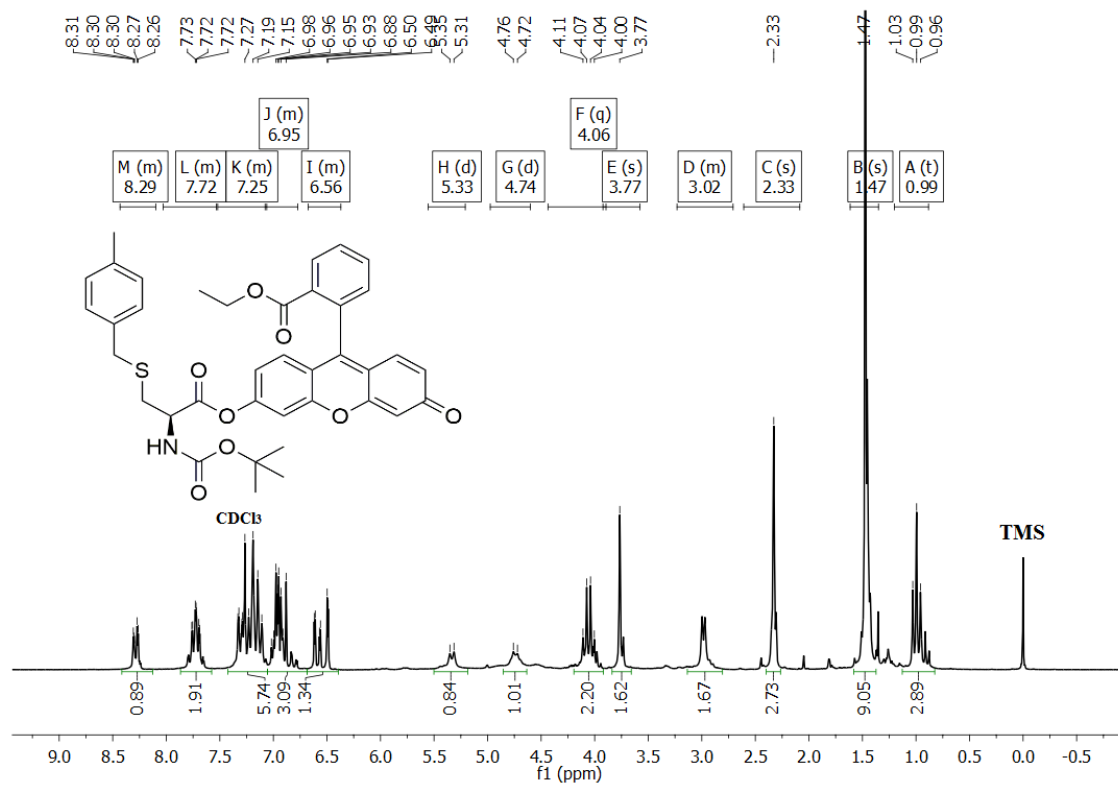


Figura 17. Espectro de  $^1\text{H}$  NMR de 18.



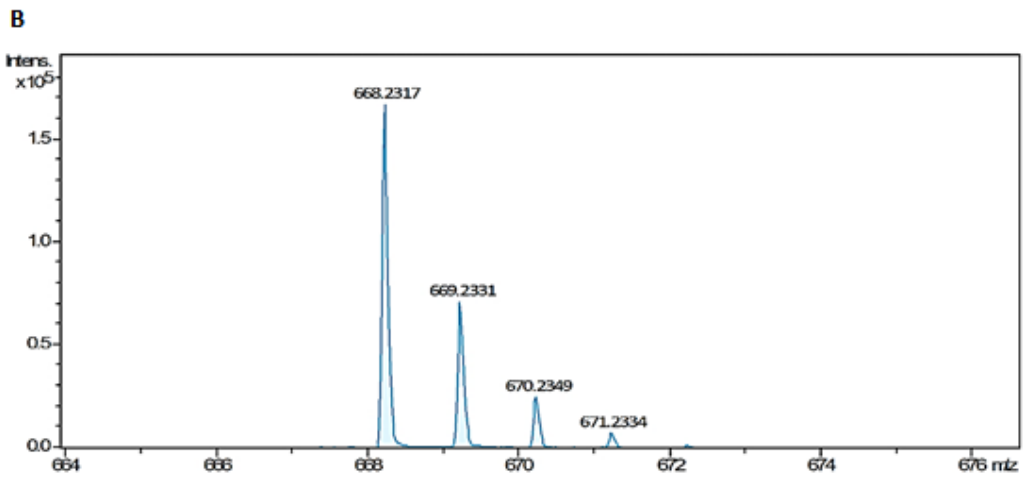
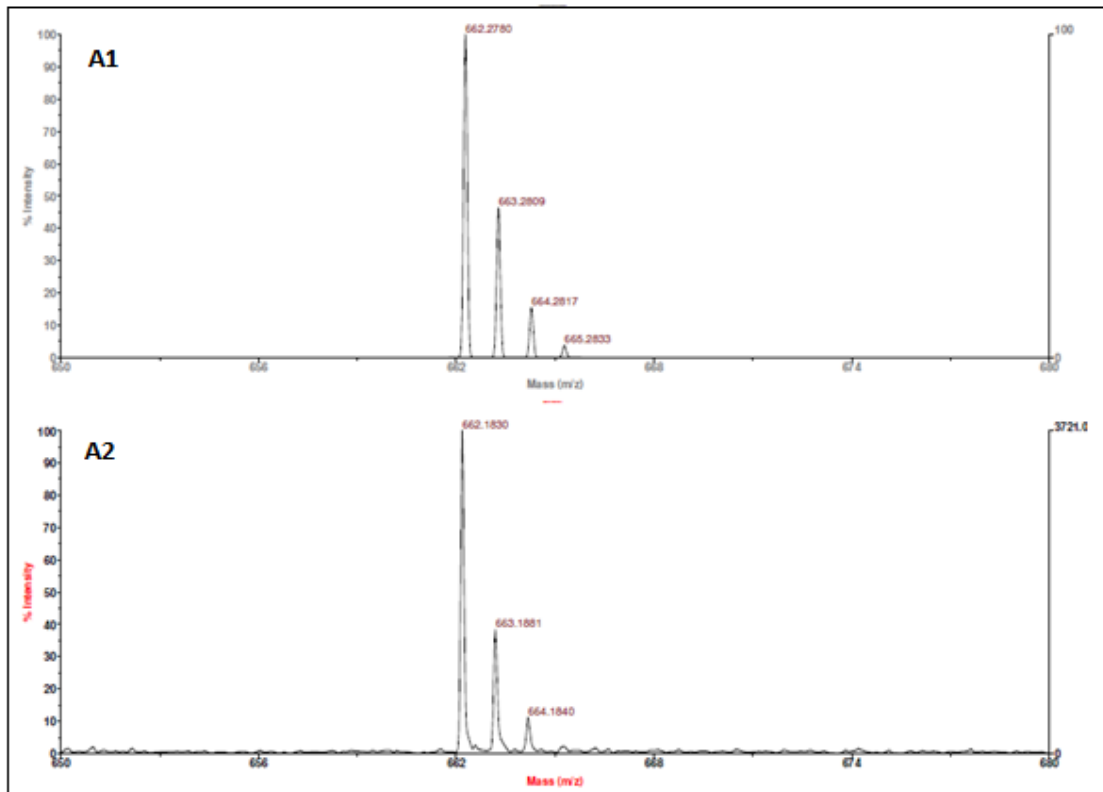


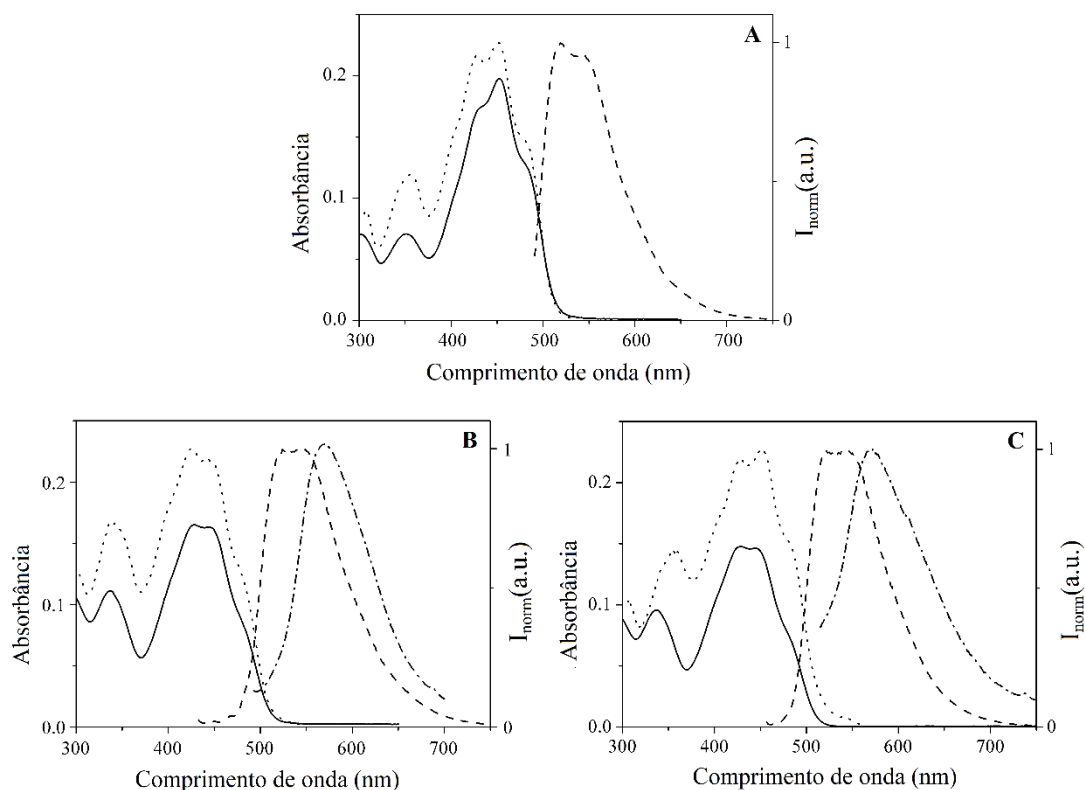
Figura 20. A1: Modelo isotópico de 17; A2: Espectro MALDI-TOF-MS de 17. B: Espectro de massas de alta resolução de 18.

### 2.3.2. Caracterização fotofísica

Os derivados de fluoresceína **16**, **17** e **18** foram caracterizados em acetonitrila a 298 K; os principais dados estão reunidos na Tabela 4. A Figura 21 apresenta os espectros de absorção, emissão e de excitação.

Tabela 4. Dados de absorção UV-vis e fluorescência de **16**, **17** e **18** ( $1.10^{-5}$  mol.L $^{-1}$ ) em acetonitrila.

Compostos	UV-vis		Fluorescência				
	$\lambda_{exc}$ (nm)	Log $\epsilon$	$\lambda_{em}$ (nm)	$\lambda_{em}$ est. sólido (nm)	Desvio de Stokes (nm)	Rendimento quântico $\phi$	Tempo de vida do estado exc. $\tau$ (ns)
<b>16</b>	452	4,30	519	-	67		
<b>17</b>	428	4,22	546	576	118	0,002	2,3 $\pm$ 0,1
<b>18</b>	428	4,16	546	572	118	0,004	2,5 $\pm$ 0,1



**Figura 21.** Espectros de absorção (linha sólida), emissão normalizada (linha tracejada,  $\lambda_{exc}$  = 452 nm em A;  $\lambda_{exc}$  = 428 nm em B e C) e espectro de excitação (linha pontilhada,  $\lambda_{em}$  = 519 nm em A;  $\lambda_{em}$  = 546 nm em B e C) dos compostos **16** (A), **17** (B) e **18** (C) em acetonitrila ( $1.10^{-5}$  mol.L $^{-1}$ ). Espectros de emissão no estado sólido (linha pontilhada-tracejada,  $\lambda_{exc}$  = 428 nm, in part B and C) dos compostos **17** (B) e **18** (C).

Os espectros de absorção revelaram bandas com máximo em 452 nm em **16** e 428 nm em **17** e **18**, todas atribuídas à transições  $\pi$ - $\pi^*$  do núcleo cromóforo da fluoresceína. As bandas dos espectros de emissão são situadas em 519 nm em **16** e 546 nm em **17** e **18**. O acoplamento entre **16** e os aminoácidos resultaram no deslocamento hipsocrômico de 24 nm das bandas de absorção e deslocamento batocrômico de 27 nm das bandas de emissão. Consequentemente, os desvios de Stokes aumentaram comparando **16** com **17** e **18**. Os rendimentos quânticos de fluorescência ( $\phi$ ) foram calculados por comparação com o amarelo de acridina ( $\phi = 0,47$  em etanol)<sup>71</sup>, onde foram encontrados os valores de 0,023 (**16**), 0,002 (**17**) e 0,004 (**18**).

A inserção de aminoácidos ao precursor **16** na posição 6-xanteno do esqueleto da fluoresceína resulta em atenuação de aproximadamente 10 vezes do rendimento quântico de fluorescência. Por sua vez, quando comparamos o rendimento quântico de **16** ( $\phi = 0,023$ ) ao da fluoresceína na forma de ácido livre neutra ( $\phi = 0,30$ ),<sup>49</sup> observa-se a diminuição de 13 vezes. Tal diminuição pode ser atribuída ao impedimento estérico imposto pelo grupo etila após a esterificação de Fisher, o que resulta em um arranjo perpendicular entre o xanteno e a porção benzóica, o desfavorece a sobreposição orbitalar dos orbitais p do sistema  $\pi$ , reduzindo a efetividade das transições  $\pi$ - $\pi^*$ .<sup>72</sup>

Sabe-se que, quando ambas as xanteno-hidroxilas do éster metílico de fluoresceína são funcionalizados, os produtos são altamente fluorescentes.<sup>72</sup> No entanto, em caso de sondas assimétricos, tais como **17** e **18**, podemos compará-las aos rodóis,<sup>73</sup> no sentido de que um rodol combina uma enona e uma amina na porção xanteno, enquanto que os compostos **17** e **18** combinam analogamente uma enona com uma função éster fenólico. No caso dos rodóis, os rendimentos quânticos de fluorescência diminuem de acordo com o comprimento da cadeia do substituinte ligado à amina, o mesmo comportamento observado em **17** e **18** quando comparados ao precursor **16**.

Os decaimentos de tempo de vida do estado excitado foram medidos em acetonitrila a 298 K, com excitação a 460 nm. Todos os decaimentos de fluorescência foram bem ajustados com dupla equação exponencial, exibindo tempos de decaimento de 3,8; 2,3 e 2,5 ns, que são diretamente proporcionais aos rendimentos quânticos calculados.<sup>50</sup>

Foram adquiridos os espectros de emissão no estado sólido dos compostos **17** e **18** utilizando-se um sistema de fibra óptica acoplada ao espectrofluorímetro Fluoromax-

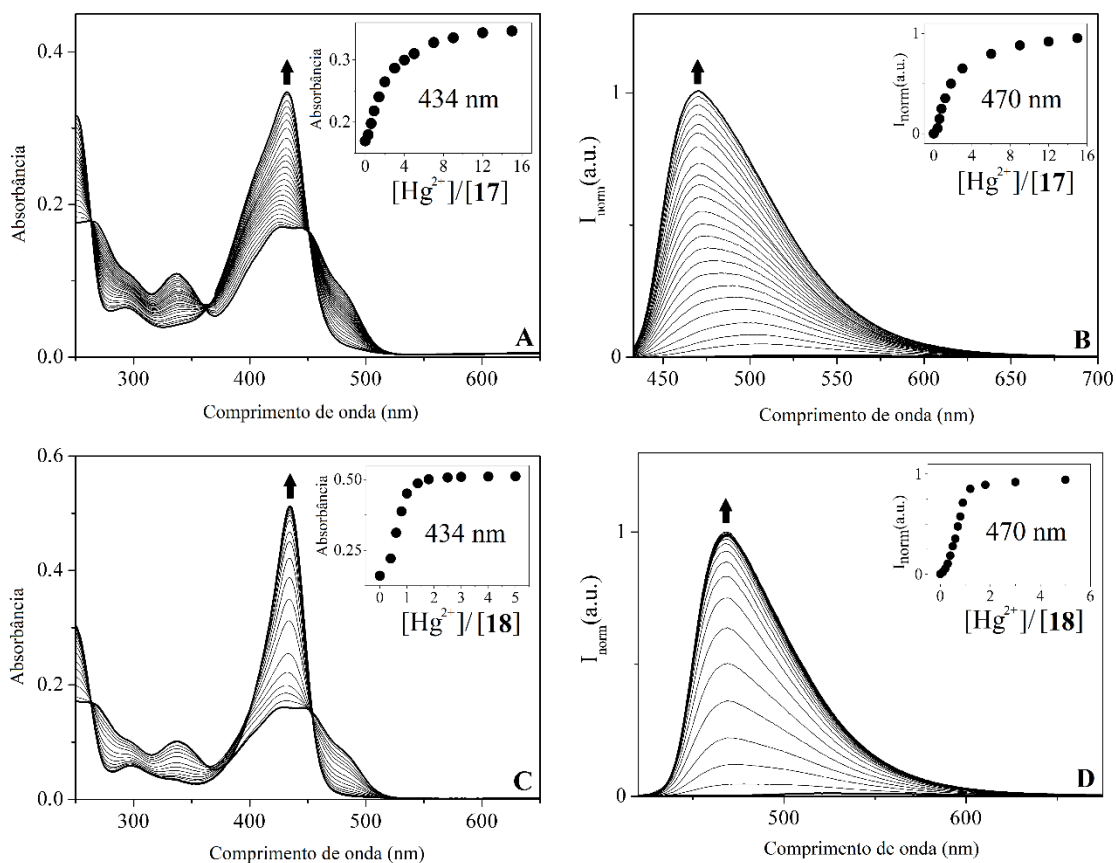
4 HORIBA Scientific. No estado sólido, ambos **17** e **18** apresentam picos de emissão deslocados para maiores comprimentos de onda em relação aos máximos de emissão em solução, sendo de 576 nm e 572 nm para os compostos **17** e **18**, respectivamente.

### 2.3.3. Sensibilidade à cátions

A capacidade de detecção dos compostos **17** e **18** frente aos íons de metais alcalinos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), alcalinos terrosos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ), metais de transição ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$ ), e de pós-transição ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ) foram avaliadas mediante a adição dos íons às soluções das sondas em acetonitrila. As soluções resultantes foram monitoradas por espectroscopia de absorção e de fluorescência. Ambos os compostos não apresentaram resposta pela presença de íons de metais alcalino-terrosos e alcalinos. No que diz respeito aos íons metálicos de transição e pós-transições, ambos foram capazes de fornecer resposta espectroscópica pela presença dos íons  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Ga}^{3+}$ .

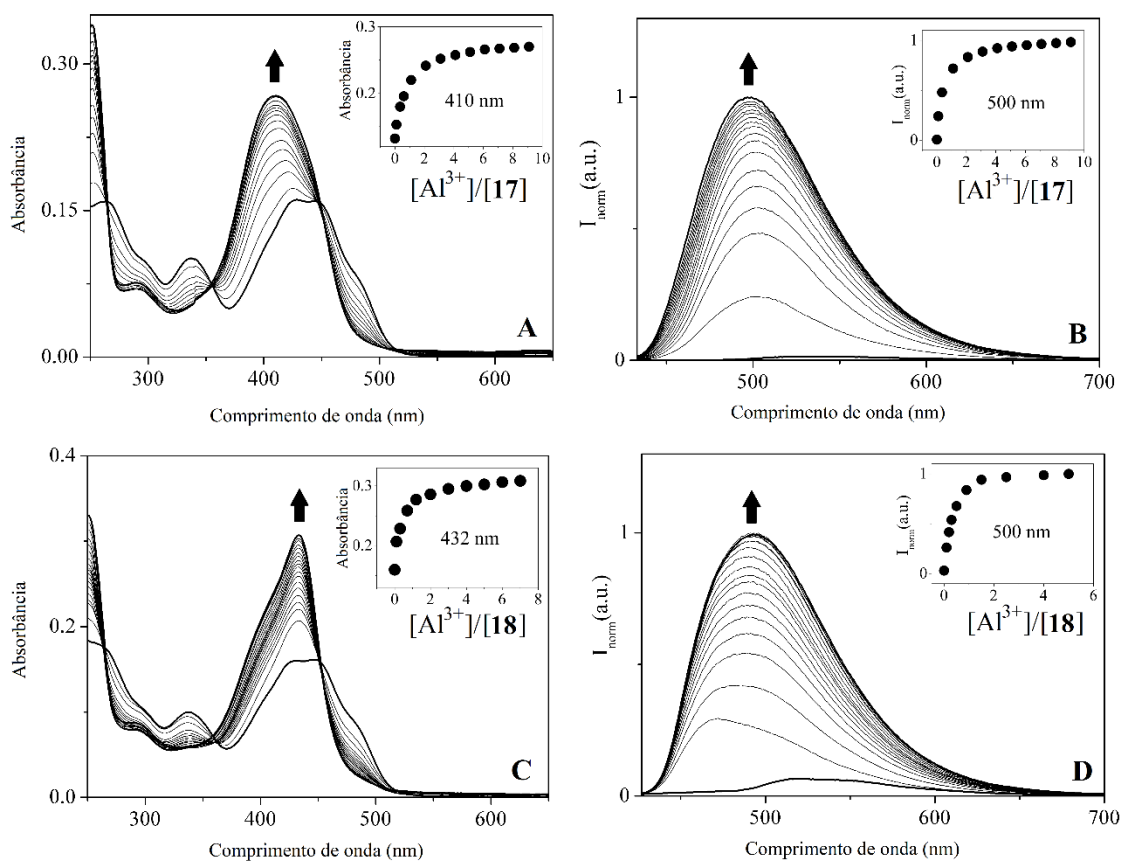
A Figura 22 apresenta a compilação dos espectros de absorção e emissão das titulações de **17** e **18** com  $\text{Hg}^{2+}$ . O comportamento espectroscópico é similar em ambas as sondas, que apresentaram ligeiro deslocamento batocrômico de 428 nm para 434 nm, e concomitante aumento da absorvidade molar da banda em 434 nm. Observa-se também desvio hipsocrômico da banda de emissão, que vai de 546 nm, nos compostos livres, para 570 nm pela adição do  $\text{Hg}^{2+}$ , o que também é acompanhado do intenso aumento da intensidade de emissão. Por ser um átomo pesado, o  $\text{Hg}^{2+}$  costuma induzir a ocorrência de decaimentos não-radiativos do estado excitado em compostos fluorescentes, resultando em quenching de fluorescência. Por isso, a maioria das sondas fluorescentes para a detecção de  $\text{Hg}^{2+}$  baseiam-se na extinção de fluorescência por complexação.<sup>74-76</sup> Por outro lado, poucos sensores químicos fluorescentes são baseados no aumento de emissão após a quelação com  $\text{Hg}^{2+}$ , conforme observado em nosso estudo.<sup>77-81</sup>



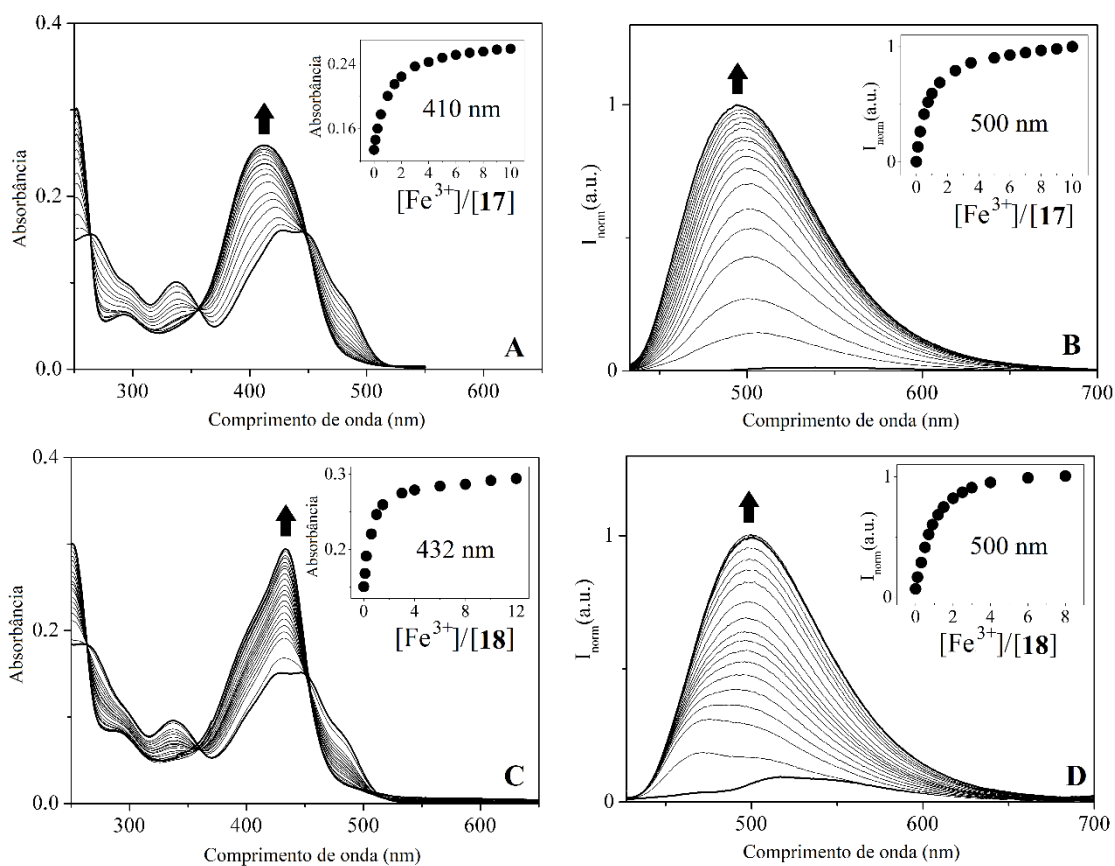


**Figura 22.** Titrções espectrofotométricas de **17** (A) e **18** (C) com quantidades crescentes de  $\text{Hg}^{2+}$  em solução de acetonitrila. Inserção: absorção a 434 nm em função da  $[\text{Hg}^{2+}]/[\mathbf{17}]$  e  $[\text{Hg}^{2+}]/[\mathbf{18}]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[\mathbf{17}] = [\mathbf{20}] = 1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Titrções espectrofluorimétricas de **17** (B) e **18** (D), com quantidades crescentes de  $\text{Hg}^{2+}$  em solução de acetonitrila. Inserção: emissão a 470 nm em função da  $[\text{Hg}^{2+}]/[\mathbf{17}]$  e  $[\text{Hg}^{2+}]/[\mathbf{18}]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[\mathbf{17}] = [\mathbf{18}] = 1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 362 \text{ nm}$ ).

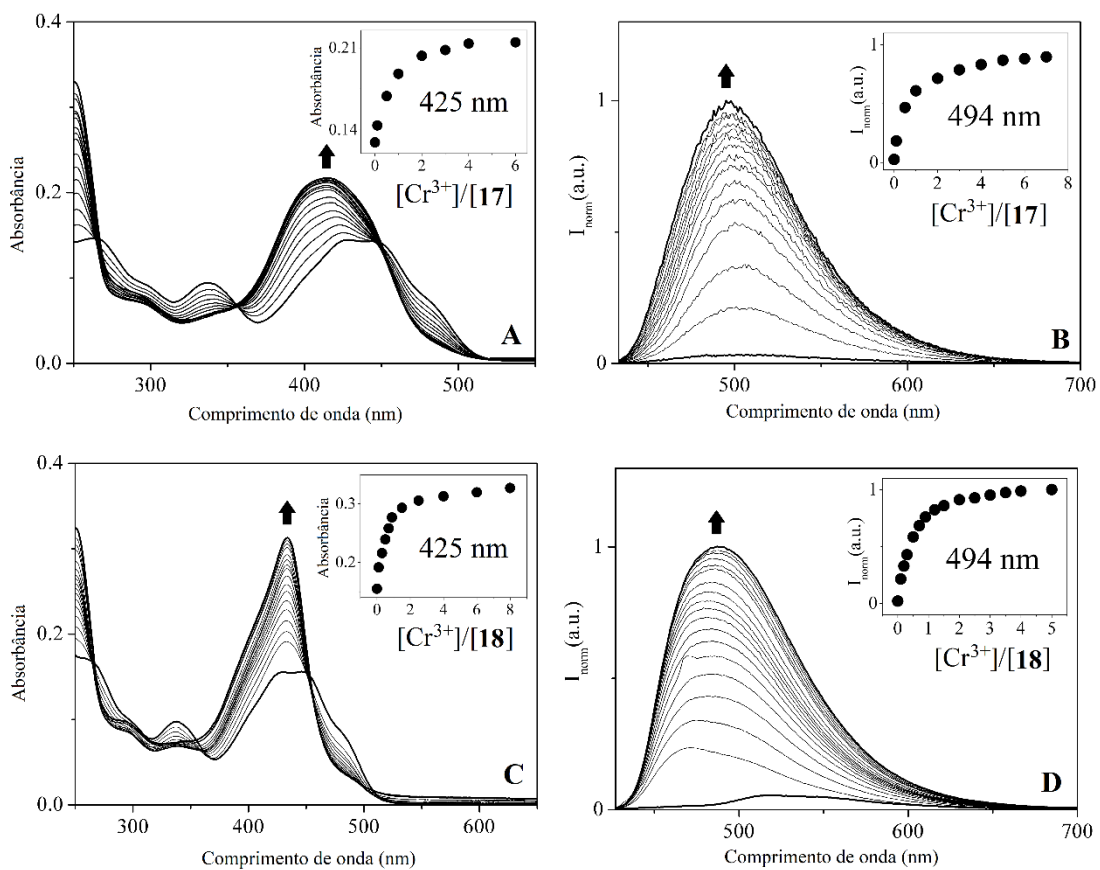
As sondas **17** e **18** interagem de forma muito semelhante com os demais íons ativos, conforme apresentado nas compilações de espectros de absorção e fluorescência das titrções com  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{Ga}^{3+}$ ; Figuras 23, 24, 25 e 26, respectivamente. A maior diferença entre as titrções com  $\text{Hg}^{2+}$  e com os íons trivalentes está relacionado ao perfil dos espectros de emissão, que são deslocados para maiores comprimentos de onda no caso dos trivalentes (próximo de 500 nm).



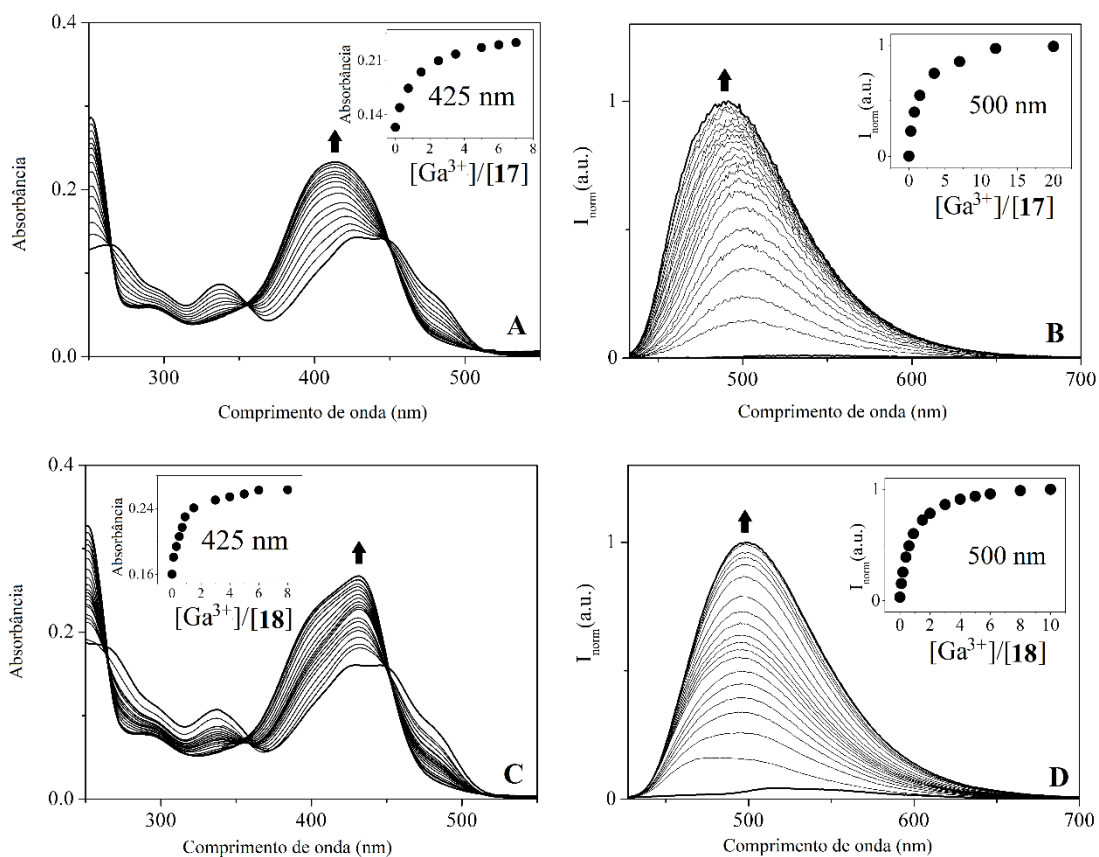
**Figura 23.** Titrções espectrofotométricas de **17** (A) e **18** (C) com quantidades crescentes de  $\text{Al}^{3+}$  em solução de acetonitrila. Inserção: absorção a 434 nm em função da  $[\text{Al}^{3+}]/[\mathbf{17}]$  e  $[\text{Al}^{3+}]/[\mathbf{18}]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[\mathbf{17}] = [\mathbf{18}] = 1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Titrções espectrofluorimétricas de **17** (B) e **18** (D), com quantidades crescentes de  $\text{Al}^{3+}$  em solução de acetonitrila. Inserção: emissão a 470 nm em função da  $[\text{Al}^{3+}]/[\mathbf{17}]$  e  $[\text{Al}^{3+}]/[\mathbf{18}]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[\mathbf{17}] = [\mathbf{18}] = 1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 362 \text{ nm}$ ).



**Figura 24.** Titraciones espectrofotométricas de **17** (A) e **18** (C) con cantidades crescentes de  $Fe^{3+}$  em solução de acetonitrila. Inserção: absorção a 434 nm em função da  $[Fe^{3+}]/[17]$  e  $[Fe^{3+}]/[18]$  ( $T = 298\text{ K}$ ;  $[17] = [18] = 1.10^{-5}\text{ mol.L}^{-1}$ ). Titraciones espectrofluorimétricas de **17** (B) e **18** (D), con cantidades crescentes de  $Al^{3+}$  em solução de acetonitrila. Inserção: emissão a 470 nm em função da  $[Fe^{3+}]/[17]$  e  $[Fe^{3+}]/[18]$  ( $T = 298\text{ K}$ ;  $[17] = [18] = 1.10^{-5}\text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\lambda_{exc} = 362\text{ nm}$ ).



**Figura 25.** Titulações espectrofotométricas de **17** (A) e **18** (C) com quantidades crescentes de  $\text{Cr}^{3+}$  em solução de acetonitrila. Inserção: absorção a 434 nm em função da  $[\text{Cr}^{3+}]/[\mathbf{17}]$  e  $[\text{Cr}^{3+}]/[\mathbf{18}]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[\mathbf{17}] = [\mathbf{18}] = 1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Titulações espectrofluorimétricas de **17** (B) e **18** (D), com quantidades crescentes de  $\text{Cr}^{3+}$  em solução de acetonitrila. Inserção: emissão a 470 nm em função da  $[\text{Cr}^{3+}]/[\mathbf{17}]$  e  $[\text{Cr}^{3+}]/[\mathbf{18}]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[\mathbf{17}] = [\mathbf{18}] = 1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 362 \text{ nm}$ ).



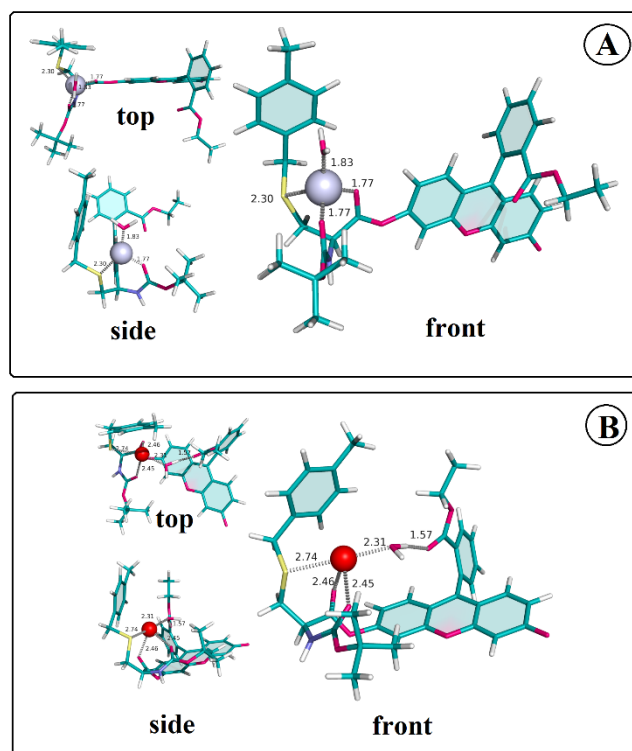
**Figura 26.** Titrções espectrofotométricas de **17** (A) e **18** (C) com quantidades crescentes de  $\text{Ga}^{3+}$  em solução de acetonitrila. Inserção: absorção a 434 nm em função da  $[\text{Ga}^{3+}]/[\mathbf{17}]$  e  $[\text{Ga}^{3+}]/[\mathbf{18}]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[\mathbf{17}] = [\mathbf{18}] = 1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Titrções espectrofluorimétricas de **17** (B) e **18** (D), com quantidades crescentes de  $\text{Ga}^{3+}$  em solução de acetonitrila. Inserção: emissão a 470 nm em função da  $[\text{Ga}^{3+}]/[\mathbf{17}]$  e  $[\text{Ga}^{3+}]/[\mathbf{18}]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[\mathbf{17}] = [\mathbf{18}] = 1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 362 \text{ nm}$ ).

Barba-Bon e colaboradores<sup>82</sup> publicaram um trabalho sobre uma sonda semelhante para  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ , onde mostraram por RMN de  $^1\text{H}$  o envolvimento da porção xanteno na coordenação ao íon metálico  $\text{Al}^{3+}$ . Realizamos estudos teóricos através de cálculos por DFT B3LYP (Density Functional Theory) sobre a geometria de coordenação da fluoresceína **18** aos íons  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ .<sup>1</sup>

As conformações de mais baixa energia encontradas para ambos um grupo **18**- $\text{Al}^{3+}$  e **18**- $\text{Hg}^{2+}$  (Figura 27) envolvem a coordenação dos íons metálicos à dois átomos de oxigênios carbonílicos (a partir das porções éster) e pelo enxofre do tio-éter. No caso de **18**- $\text{Al}^{3+}$  (Figura 27A), o cátion coordena-se em arranjo tetraédrico ao receptor ( $d_{\text{Al}\cdots\text{O}=\text{C}} =$

<sup>1</sup> Estudos realizados pelo Dr. Sergio M. Santos, CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Portugal.

1,77 Å e  $d_{Al...S} = 2,30$  Å) e à uma molécula de água ( $d_{Al...OH_2} = 1,83$  Å). Da mesma forma, no caso de **18**-Hg<sup>2+</sup> (Figura 26B), o cátion é coordenado ao receptor ( $d_{Al...O=C} = 2,45$  e 2,46 Å e  $d_{Al...S} = 2,74$  Å) e à uma molécula de água ( $d_{Al...OH_2} = 2,31$  Å) numa geometria tetraédrica bastante distorcida (a molécula de água foi incluída no cálculo como uma forma de proporcionar um ponto de ancoragem para a estabilização da esfera de coordenação do cátion).



**Figura 27.** A) Lado superior, lateral e vista frontal da conformação de menor energia do complexo **18**-Al<sup>3+</sup>, indicando as distâncias entre os sítios de interação dos receptores e cátions (código de cor: C – verde-água; O - rosa; H - branco; S - amarelo; N - azul, Al – esfera cinza). B) Lado superior, lateral e vista frontal da conformação de menor energia do complexo **18**-Al<sup>3+</sup>, indicando as distâncias entre os sítios de interação dos receptores e cátions (cor como na Figura A; Hg<sup>2+</sup> - esfera vermelha).

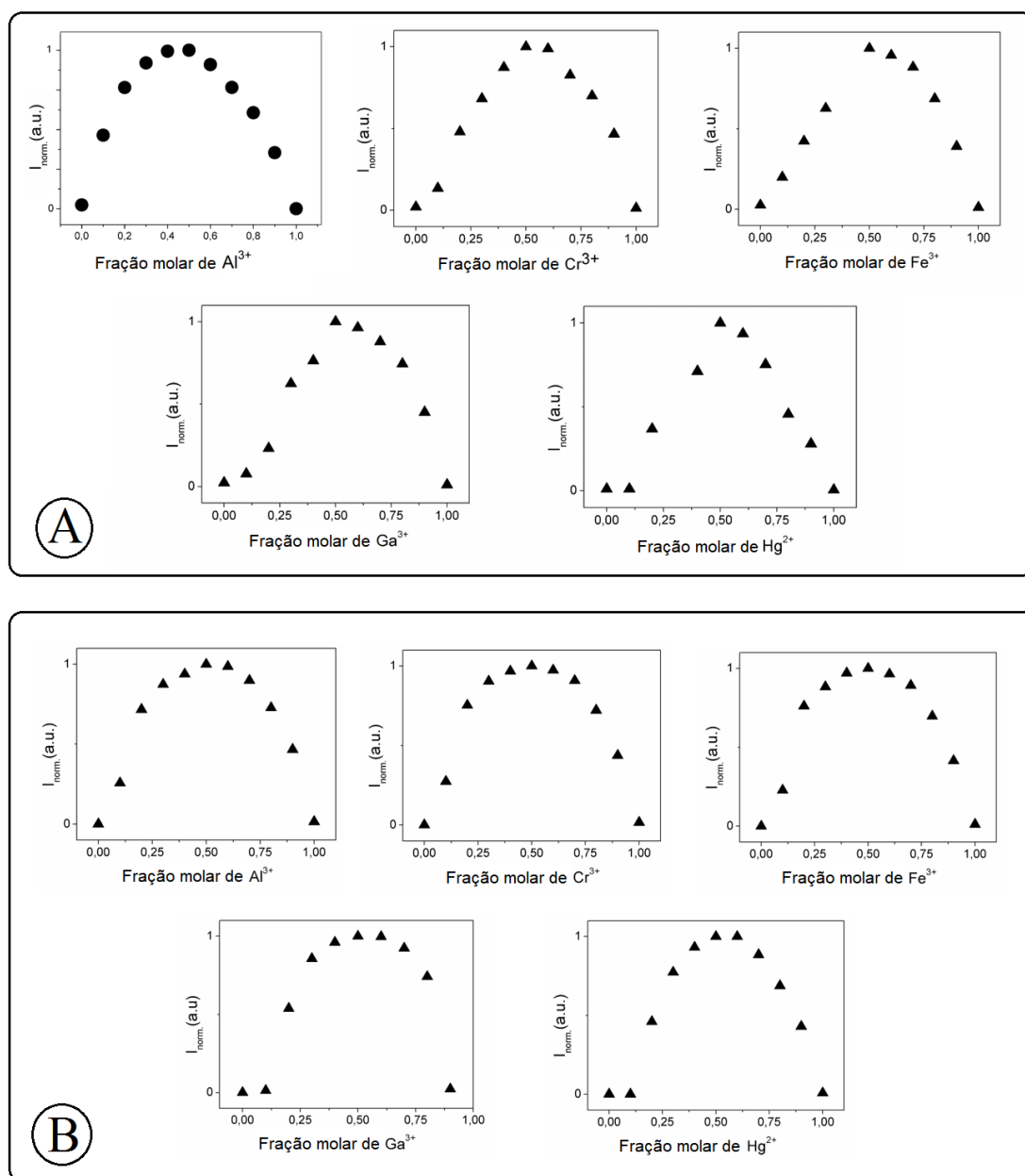
Por um lado, ambos os modos de ligação sugerem que o arranjo prévio dos dois grupos carbonila e o tio-éter fornecem adequadamente um bolso coordenação para acomodar o cátion. Por outro lado, o raio iônico do cátion desempenha um papel importante na conformação global da associação porque a coordenação de cátions maiores podem conduzir à participação dos oxigênios do éster a partir da porção da fluoresceína. Estes resultados suportam o modo de coordenação experimentalmente

inferida do receptor para o metal. As constantes de associação utilizando o programa HypSpec<sup>46</sup> corroboram ao modelo teórico de complexação por um ligante do íon metálico (L:M - 1:1). Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Constante de estabilidade  $\text{Log } \beta$  obtida por dados das titulações de absorvância e fluorescência. O programa HypSpec foi alimentado a partir da estequiometria 1:1.

Compostos	17		18	
	$\log \beta$ (A)	$\log \beta$ (F)	$\log \beta$ (A)	$\log \beta$ (F)
<b>Hg<sup>2+</sup></b>	5,1 ± 0,1	5,4 ± 0,1	6,5 ± 0,2	6,2 ± 0,2
<b>Ga<sup>3+</sup></b>	5,0 ± 0,2	4,8 ± 0,3	5,4 ± 0,3	5,8 ± 0,3
<b>Cr<sup>3+</sup></b>	5,2 ± 0,3	4,9 ± 0,2	5,3 ± 0,1	5,1 ± 0,3
<b>Al<sup>3+</sup></b>	5,3 ± 0,3	5,1 ± 0,3	5,5 ± 0,1	5,1 ± 0,3
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	5,0 ± 0,3	5,2 ± 0,2	4,9 ± 0,3	5,5 ± 0,1

Os valores de constante de estabilidade obtidos na maioria dos casos são bastante próximos ( $\text{Log } \beta \approx 5$ ), com exceção dos valores encontrados para o conjunto **18**-Hg<sup>2+</sup>, cujo valor encontrado foi de  $\text{Log } \beta = 6,5$ . Atribuímos essa diferença à presença do átomo de enxofre em **18**, que lhe confere maior afinidade ao íon Hg<sup>2+</sup>.<sup>83</sup> A estequiometria dos complexos foram confirmadas pelo método de Jobs, e as plotagens estão apresentadas na Figura 28.

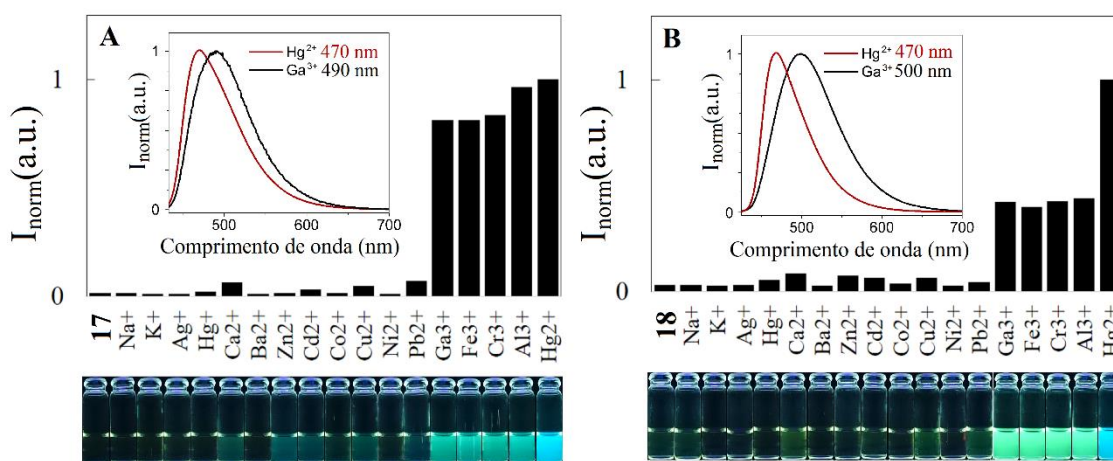


**Figura 28.** Plotagem de Jobs dos compostos **17** e **18** pela variação contínua das concentrações de Al<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup> e Hg<sup>2+</sup>.

As Figuras 29A e 29B apresentam as intensidades relativas de emissão a 480 nm de **17** e **18** na presença dos vários íons testados. Abaixo dos gráficos de barra encontram-se fotografias dos aspectos visuais sob luz ultravioleta na presença de cada um dos íons. Os máximos de emissão dos complexos de **17**-X<sup>3+</sup> situam-se em torno de 490 nm, enquanto que os complexos **18**-X<sup>3+</sup> situam-se ao redor de 500 nm, conforme exemplificado em destaque pelos espectro de emissão de **17**-Ga<sup>3+</sup> e **18**-Ga<sup>3+</sup>. Ambos os

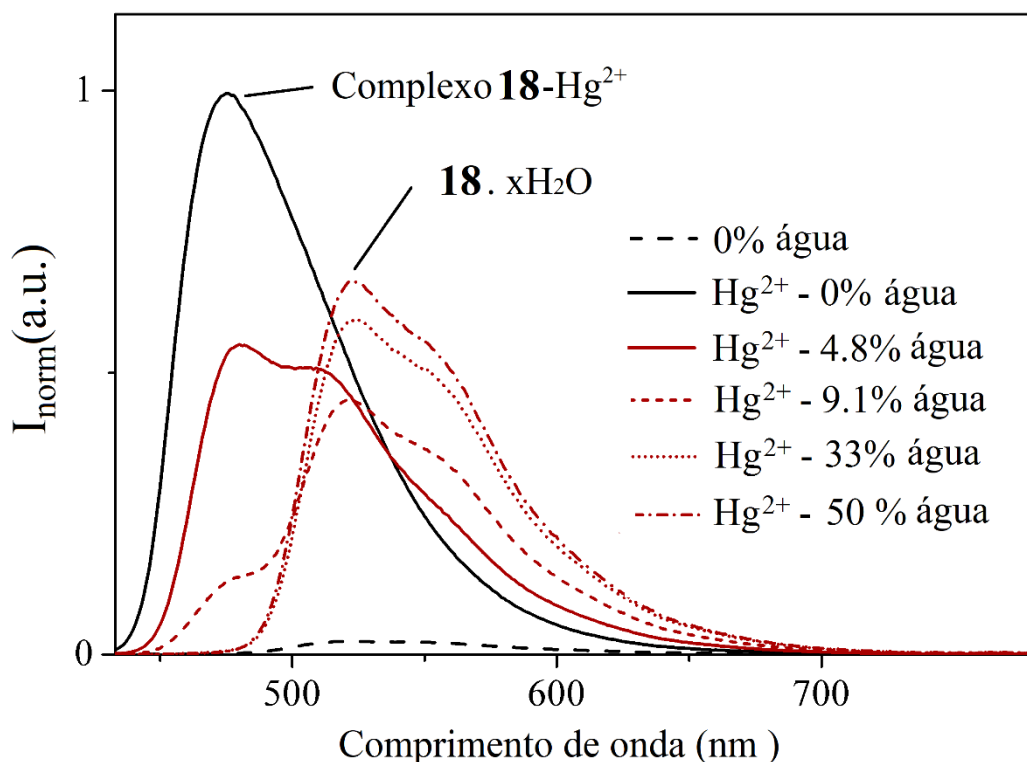


complexos **17**-Hg<sup>2+</sup> e **18**-Hg<sup>2+</sup> apresentam máximo de emissão em 470 nm. Pela maior diferença de comprimento de onda entre **18**-X<sup>3+</sup> e **18**-Hg<sup>2+</sup>, é mais evidente a diferença entre os tons verde (trivalentes) e azul (Hg<sup>2+</sup>) nas fotografias dos frascos sob luz ultravioleta (Figura 29B). Os diferentes modos de coordenação entre **18** e Hg<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup> observados nos cálculos de DFT podem ser estendidos aos demais complexos de íons trivalentes, o que reflete nos diferentes comprimentos de onda de emissão.



**Figura 29.** Intensidade de emissão relativa de **17** (A) e **18** (B), após adição de 4 equivalentes molares de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup> e Pb<sup>2+</sup> em acetonitrila ([A] = [B] = 1x10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>; λ<sub>exc</sub> = 362 nm). Inserção: espectros de emissão normalizada entre os complexos de Hg<sup>2+</sup> e Ga<sup>3+</sup> para **17** (A) e **18** (C). Abaixo: alterações visuais de **17** (esquerda) e **18** (à direita) sob luz UV após a adição de íons metálicos (λ<sub>exc</sub> = 365 nm).

Buscando aplicar as sondas em meio aquoso, foram adquiridos espectros de emissão de soluções do complexo **18**-Hg<sup>2+</sup> em misturas de acetonitrila/água, conforme apresentado na Figura 30. Devido à elevada energia de solvatação do Hg<sup>2+</sup>, a água compete com a sonda **18**, induzindo a supressão da banda de emissão do complexo. Até o limite de 4,8 % de água ainda é observada em seu máximo de emissão original. No entanto, a partir de 9,1 % de água a mesma é completamente extinta, dando lugar à uma nova banda de emissão em 525 nm, atribuída ao hidrato de **18**.



**Figura 30.** Progressão dos espectros de emissão do complexo **18**-Hg<sup>2+</sup> em diferentes misturas acetonitrila/água ([**18**] = 1x10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>; λ<sub>exc</sub> = 423 nm).

Buscando maiores detalhes sobre a capacidade de detecção das sondas, calculamos as quantidades mínimas detectáveis (QMD) e quantificáveis (QMQ) para os íons ativos, conforme descrito no Capítulo 4. Os valores resultantes estão reunidos na Tabela 6. Pela análise dos dados de absorção, o composto **17** apresenta valores muito próximos de QMD e QMQ entre os íons trivalentes (X<sup>3+</sup>) e o Hg<sup>2+</sup>. No entanto, **17** se mostrou muito mais sensível aos íons trivalentes do que ao Hg<sup>2+</sup> via fluorescência. O composto **18** também apresenta valores próximos de QMD e QMQ via absorção; sendo que a relação dos valores obtidos via emissão é similar entre os trivalentes e o Hg<sup>2+</sup>.

A maior sensibilidade de **18** ao Hg<sup>2+</sup> comparado ao composto **17** pode ser atribuída à presença do átomo de S da do resíduo da *L*-cisteína em **18**. Nossos sistemas apresentaram resultados de detecção similares ao publicado anteriormente pelo Barba-Bon e colaboradores.<sup>30</sup> No entanto, para o íon Cr<sup>3+</sup> nossas sondas mostraram-se ser mais sensíveis, uma vez que as quantidades detectáveis por absorção e emissão são mais baixas.

Tabela 6. Quantidade mínima detectável ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) para  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Ga}^{3+}$  em solução de acetonitrila. Os desvios padrão relativos são inferiores a 10%,  $n = 3$ .

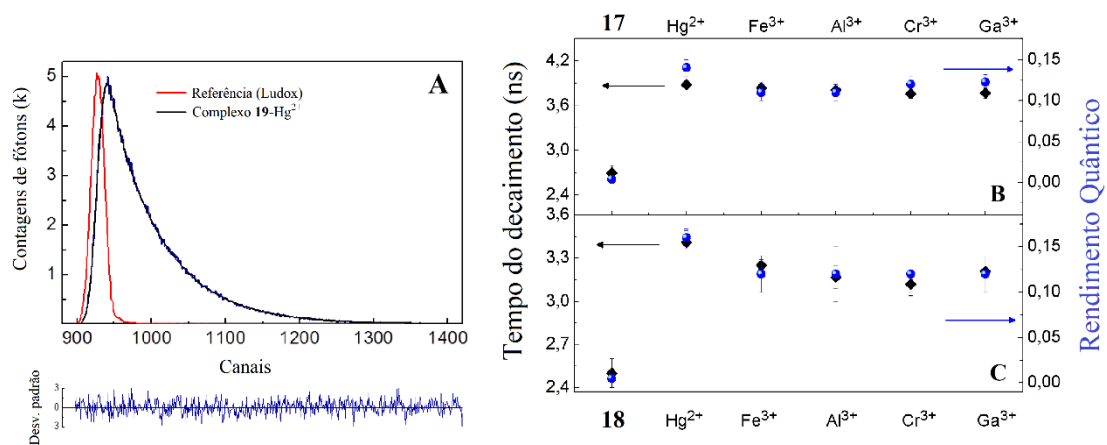
Compostos	Íons metálicos	Quantidade mínima detectável QMD ( $\mu\text{M}$ )		Quantidade mínima quantificável QMQ ( $\mu\text{M}$ )	
		Abs	Em	Abs	Em
17	$\text{Hg}^{2+}$	1,04	9,76	1,15	26,7
	$\text{Fe}^{3+}$	0,99	0,28	1,10	0,76
	$\text{Cr}^{3+}$	1,08	0,23	1,18	0,64
	$\text{Al}^{3+}$	0,95	0,20	1,05	0,55
	$\text{Ga}^{3+}$	1,09	0,34	1,20	0,93
18	$\text{Hg}^{2+}$	0,97	0,86	1,07	1,43
	$\text{Fe}^{3+}$	0,91	0,40	1,00	0,67
	$\text{Cr}^{3+}$	0,88	0,24	0,97	0,40
	$\text{Al}^{3+}$	0,82	0,22	0,91	0,37
	$\text{Ga}^{3+}$	0,99	0,31	1,10	0,52

Os tempos de vida do estado excitado dos compostos e dos complexos organometálicos, também foram avaliados. Os dados principais estão reunidos na Tabela 7. A título de exemplo apresentamos a Figura 31A contendo o histograma do decaimento da fluorescência do complexo **17**- $\text{Hg}^{2+}$  e também a correlação entre o tempo de vida e rendimento quântico dos compostos **17**, **18** e seus respectivos complexos (Figura 31B e C). Os decaimentos de fluorescência de ambos os compostos e seus complexos metálicos foram ajustados com dupla exponencial, sugerindo duas espécies ou confômeros distintos no estado excitado<sup>33,47</sup>. No caso compostos livres, as amplitudes relativas ( $B \sim 3\%$  e  $C \sim 97\%$ , Tabela 7) indicam uma espécie predominante em solução de curto tempo de vida e baixo rendimento quântico. De modo diferente, por meio da análise dos complexos, os valores mais elevados de amplitudes pertencem aos tempos de vida mais longos, indicando a formação eficaz de complexo. Estes resultados estão em conformidade com a literatura, onde decaimentos bi exponenciais (com dois tempos de vida de aproximadamente 4 ns e 0,5-2 ns) foram atribuídos à fluoresceína e ao seu respectivo complexo com o analito.<sup>84</sup> A inserção de derivados de aminoácidos no

esqueleto da unidade xanteno do precursor **16** leva à diminuição do rendimento quântico de fluorescência de  $\phi_{16} = 0,024 \pm 0,001$  a  $\phi_{17} = 0,002 \pm 0,001$  e  $\phi_{18} = 0,005 \pm 0,001$  (cerca de 10 vezes menor). No entanto, após a complexação ocorre um intenso aumento de emissão, resultando em valores de rendimento quântico de fluorescência entre 0,11-0,16. O mesmo comportamento foi observado nas medidas de tempo de vida, onde os valores mais altos foram observados nos complexos ( $\tau = 3,1-3,9$  ns) e os mais baixos nas sondas livres ( $\tau = 2,3-2,5$  ns).

Tabela 7. Rendimentos quânticos de fluorescência e tempo de vida dos compostos **17** e **18**. Os decaimentos de fluorescência de **17** e **19** foram ajustados usando a equação  $A+B \text{ Exp}(-t/\tau) + C \text{ Exp}(-t/\tau^*)$ . Os valores apresentados são uma média de seis medições independentes.

Compostos	17			18		
	$\phi$	$\tau^\dagger$	$\tau^{*\dagger}$	$\phi$	$\tau^\dagger$	$\tau^{*\dagger}$
		(ns)			(ns)	
		B	C		B	C
[Amp. Rel. %]		[Amp. Rel. %]				
<b>Sondas livres</b>	$0,002 \pm 0,001$	2,3 [2,9]	0,13 [97,1]	$0,005 \pm 0,001$	2,5 [4,1]	0,37 [95,9]
<b>Hg<sup>2+</sup></b>	$0,14 \pm 0,01$	3,9 [96]	0,5 [4]	$0,16 \pm 0,01$	3,4 [91]	0,6 [9]
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	$0,11 \pm 0,01$	3,8 [44]	0,06 [56]	$0,12 \pm 0,02$	3,2 [50]	0,10 [50]
<b>Al<sup>3+</sup></b>	$0,11 \pm 0,01$	3,8 [79]	0,11 [21]	$0,12 \pm 0,03$	3,2 [70]	0,24 [30]
<b>Cr<sup>3+</sup></b>	$0,12 \pm 0,01$	3,8 [5,4]	0,072 [46]	$0,12 \pm 0,02$	3,1 [60]	0,13 [40]
<b>Ga<sup>3+</sup></b>	$0,12 \pm 0,01$	3,8 [80]	0,09 [20]	$0,12 \pm 0,02$	3,2 [80]	0,31 [20]



**Figura 31.** A) histograma de decaimento de fluorescência de **17** e do complexo **17**-Hg<sup>2+</sup> (4 equivalentes de Hg<sup>2+</sup>); referência suspensão aquosa de sílica coloidal (Ludox®). Os valores de tempo de vida foram obtidos pela soma de duas exponenciais de 0.49 e 3.87 ns, Chisq 1,06. B) Correlação entre rendimento quântico de fluorescência (esferas azuis) e tempo de vida do estado excitado (esferas pretas) dos compostos **17** (B) **18** (C) e seus respectivos complexos com íons metálicos.

## 2.4. Conclusões

Dois novos derivados de fluoresceína com aminoácidos foram sintetizados e aplicados como sondas moleculares no reconhecimento de  $\text{Hg}^{2+}$  e de íons metálicos trivalentes em solução de acetonitrila. Cálculos DFT sugeriram diferentes modelos de interação entre os complexos **18**- $\text{Al}^{3+}$  e **18**- $\text{Hg}^{2+}$ , que são refletidas na emissão verde dos complexos de íons trivalentes e emissão azul do complexo com  $\text{Hg}^{2+}$ . A aplicação dos compostos **17** e **18** como sondas analíticas para  $\text{Al}^{3+}$  atingiram os mais baixos limites de detecção e quantificação, em ambas as técnicas de absorção e de fluorescência, em comparação com outros metais.

A forte interação entre o átomo de enxofre do composto **18** e o  $\text{Hg}^{2+}$  reflete em maior sensibilidade quando comparado ao par **17** e  $\text{Hg}^{2+}$ .

## Capítulo 3

---

Uma sonda fluorogênica baseada na estrutura do pireno para detecção de  $\text{Hg}^{2+}$  em sistemas aquosos e orgânicos

### 3.1. Introdução

Sondas moleculares seletivas capazes de atuar simultaneamente em sistemas aquosos e orgânicos são raras, pois exigem interações intensas com o analito dentro de ambientes com características muito distintas. O ambiente no qual se encontram inseridos sonda e analito é determinante sobre o mecanismo de interação do par. Considerando as concentrações de trabalho utilizadas na técnica de fluorescência, a proporção entre solvente e sonda é infinitamente superior comparado à proporção entre sonda e analito. Portanto, é fundamental que os pares solvente/sonda e solvente/analito estabeleçam relações inertes entre si, evitando competição pelas interações entre sonda e analito. Quando uma dada sonda interage fortemente com moléculas de água (solvente polar prótico) ou com diclorometano (solvente apolar aprótico), por exemplo, a mesma tende a não interagir de modo efetivo com o analito, por questões de equilíbrio químico. Portanto, equacionar a construção de sondas que sejam inertes à solventes de características complementares é sempre uma tarefa desafiadora.

Tratando do planejamento sintético, é difícil prever se uma estrutura molecular será efetiva na detecção do analito em meio polar ou apolar. Quando se observa atividade óptica pela interação do par sonda/analito, é importante atribuir o mecanismo pelo qual este se processa, buscando acumular conhecimento e previsibilidade em planejamentos futuros. Sistemas versáteis e capazes de atuarem em matrizes distintas são desejados, pois ampliam a gama de aplicações à sistemas reais, reduzindo etapas de preparo de amostras, o que reflete em maior assertividade.

O mercúrio na sua forma iônica bivalente ( $\text{Hg}^{2+}$ ) é considerado como sendo um dos elementos poluidores mais impactantes aos organismos vivos.<sup>85,86</sup> O elemento mercúrio é encontrado na forma metálica, iônica, organometálica e também na forma de sais complexos.<sup>56,57</sup> Muitos dos efeitos tóxicos causados pelo mercúrio são atribuídos à sua forma iônica divalente, o que tem sido relacionado à problemas de carcinogenicidade, desordens neurotoxicológicas e danos por estresse oxidativo.<sup>54,55,87</sup> Devido ao caráter iônico macio do  $\text{Hg}^{2+}$ , um dos fatores que contribui para seu acúmulo em organismos vivos, é a afinidade ligante aos resíduos de enxofre e selênio presentes em aminoácidos. Em razão da sobreposição orbitalar efetiva, a interação entre o  $\text{Hg}^{2+}$  com sulfetos e selenetos é intensa o suficiente para resultar em seu acúmulo nos seres

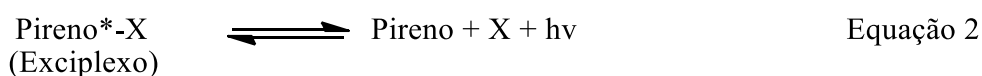
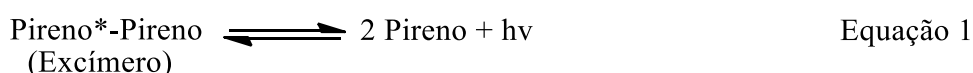


vivos.<sup>29,59,88-90</sup> Considerando tais observações, sondas fluorescentes podem ser desenhadas de modo a conter um núcleo emissivo ligado covalentemente à selenetos ou sulfetos visando a detecção do íon  $\text{Hg}^{2+}$ .

### 3.1.1. Formação de excímeros e exciplexos de pireno

O pireno é um dos núcleos mais compreendidos com relação ao comportamento fotofísico. Os espectros de emissão dos pirenos são altamente estruturados à temperatura ambiente, onde as “cristas” do espectro representam transições de diferentes níveis energéticos vibracionais do estado excitado para o estado fundamental. De modo geral, quando uma molécula absorve luz, suas propriedades físicas e químicas são bruscamente modificadas, podendo atuar distintamente do estado fundamental. No estado excitado, o pireno interage com outras moléculas de pireno no estado fundamental, resultando em complexos  $\text{pireno}^*$ -pireno, conhecidos como “excímeros” (dímeros no estado excitado). O mais interessante é que as propriedades fotofísicas dos excímeros são completamente distintas daquelas do monômero no estado excitado. Nos excímeros, a estrutura vibracional estruturada observadas nos monômeros é completamente desfeita, dando origem à uma banda larga e bastante deslocada para maiores comprimentos de onda.

Os pirenos podem também formar complexos no estado excitado com outros compostos, formando os exciplexos (complexos no estado excitado). Os excímeros ou exciplexos são metaestáveis, sendo desfeitos após a emissão e regenerados após absorção de outro fóton, conforme as Equação 1 e 2.<sup>91</sup>



Nas duas últimas décadas, o pireno tem sido aplicado de maneira corrente como bloco construtor na síntese de sondas moleculares.<sup>30,92-97</sup> Devido ao caráter apolar e estrutura plana com átomos de carbono conjugados e hibridizados em  $\text{sp}^2$ , as

interações tipo “ $\pi$ -stacking” atuam de forma considerável. Dependendo da polaridade do solvente e da concentração dos derivados de pireno em uma dada solução, os monômeros podem estar na forma de monômeros ou agregados da ordem de poucos micrometros de diâmetro. Em solventes apolares, as soluções de pirenos apresentam espectro de emissão estruturado, cuja característica remete à forma monoméricas. No entanto, em solução aquosa, as interações  $\pi$ -stacking tornam-se dominantes, resultando em agregados hidrofóbicos<sup>98,99</sup> ou excímeros,<sup>100</sup> sendo que ambas apresentam espectros de emissão não-estruturados e deslocados a maiores comprimentos de onda. Além disso, a presença de espaçadores conectando dois núcleos idênticos de pireno combinados à presença de um analito, é capaz de induzir a formação de excímeros intramoleculares, sendo este o mecanismo de detecção desse tipo de dispositivo.<sup>101,102</sup>

A interação estável entre o  $\text{Hg}^{2+}$  e seleno-aminoácidos nos sugeriram o uso desse grupamento orgânico como receptores do íon aplicados à sondas fluorescentes.<sup>29,59,88-90</sup>

No presente capítulo apresentaremos a preparação, caracterização e aplicação analítica de um novo derivado de um pireno contendo a função alquil-seleneto voltado para a detecção de  $\text{Hg}^{2+}$  em solução aquosa ou de acetonitrila. O mecanismo de detecção do dispositivo em cada solvente também foi assunto de nossa investigação. A relevância dos resultados aqui apresentados são atribuídos ao fenômeno de agregação do pireno em solventes polares, formação de excímeros e formação de complexos metálicos, relacionando estes conceitos às observações espectroscópicas experimentais.

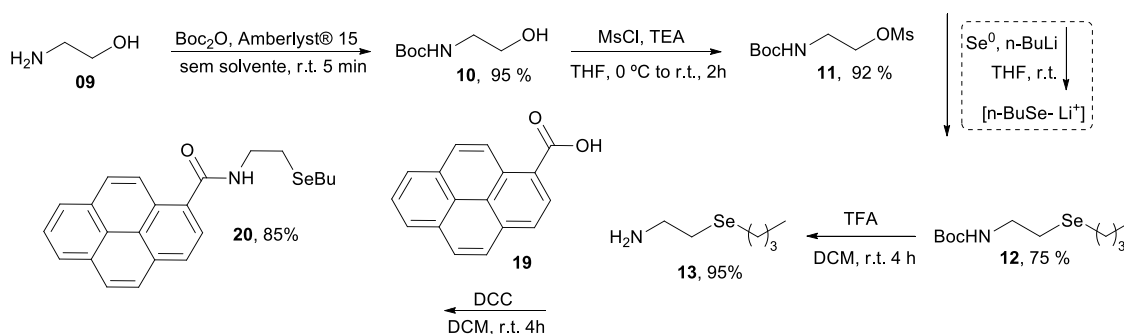
### 3.2. Objetivos

O objetivo dos estudos realizados no presente capítulo foi o de sintetizar um seleno-derivado de pireno capaz de detectar  $\text{Hg}^{2+}$  em meio aquoso e em solução de acetonitrila, bem como consolidar uma metodologia analítica baseada em fluorimetria. Foi também foco de estudo a elucidação dos mecanismos de detecção nos dois solventes.

### 3.3. Resultados e discussão

#### 3.3.1. Planejamento e síntese do seleno-derivado de pireno

Guiados por estudos que apontam a bioacumulação do  $\text{Hg}^{2+}$  nos seres vivos através de complexos estáveis de selênio e enxofre, propusemos a combinação de um resíduo de seleneto orgânico acoplado à estrutura do pireno na concepção da uma sonda. De modo muito similar ao realizado no capítulo 1, que tratou da preparação de um seleno-derivado de cumarina, procedemos a preparação do seleno-derivado de pireno. O resíduo de amino-alkilselento (composto **13**) utilizado na síntese de **5**, foi preparado de maneira idêntica à já apresentada no Capítulo 1, durante a descrição da síntese do composto **5**. Para a síntese da sonda **20**, modificou-se apenas a última etapa de amidação, onde o eletrófilo utilizado dessa vez foi o pireno-1-ácido carboxílico (**19**), conforme apresentado no Esquema 7 abaixo. Devido à mera repetição do procedimento de síntese, não trataremos a descrição das etapas reacionais envolvidas, que são análogas às apresentadas anteriormente.



Esquema 7. Rota sintética utilizada na preparação da sonda **20**.

O composto **20** foi devidamente caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , análise elementar, MALDI-TOF-MS, espectroscopia no infra-vermelho, espectroscopia de absorção, fluorescência e fluorescência resolvida no tempo. Para fins de identificação estrutural de **20**, trataremos nesta seção da atribuição dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 32) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 33). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **20** contém um tripleto (2,64 ppm), quinteto (1,67 ppm), sexteto (1,40 ppm) e outro tripleto (0,90 ppm) atribuídos ao grupamento alquílico n-butil ligado diretamente ao átomo de selênio. O quarteto (3,85

ppm) e o tripleto (2,91 ppm) foram atribuídos aos grupos etílenos das posições  $\alpha$  e  $\beta$  em relação à N-amida posicionados entre os átomos de selênio e nitrogênio. O singlete alargado em 6,56 ppm corresponde ao hidrogênio N-H trocável e, o multipletto na região dos hidrogênios aromáticos (7,8-8,7 ppm) correspondem aos hidrogênios do núcleo do pireno.

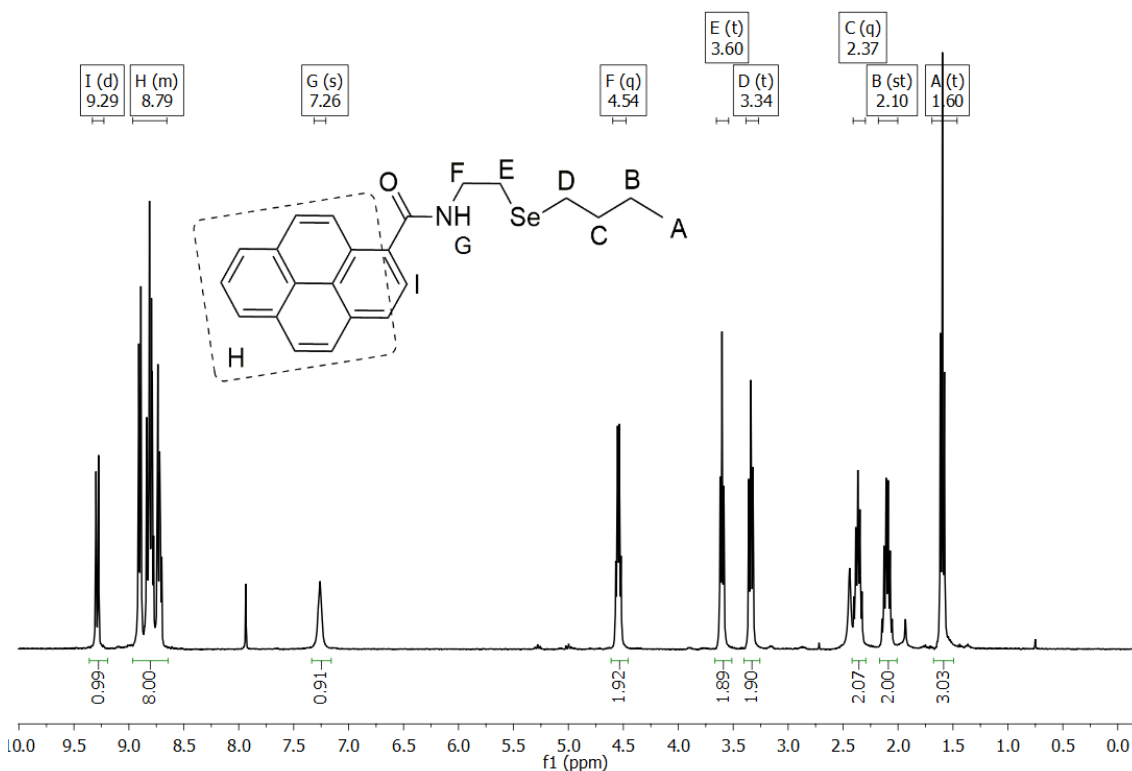


Figura 32. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **20** ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz).

Pela análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , pode ser observado o sinal referente ao carbono carbonílico da amida em 170 ppm. Por se tratar de um pireno assimétrico, nenhum dos carbonos  $\text{sp}^2$  do núcleo do pireno são quimicamente equivalentes, por isso podemos observar todos os 16 sinais individualmente separados dentro da faixa entre 124 e 133 ppm, conforme apresentado na ampliação da Figura 32. Os demais metílenos, referentes aos carbonos  $\text{sp}^3$  dos grupos n-butílo-seleneto e do espaçador entre os átomos de selênio e nitrogênio, estão distribuídos na faixa que compreende 13 e 40 ppm.<sup>103</sup>

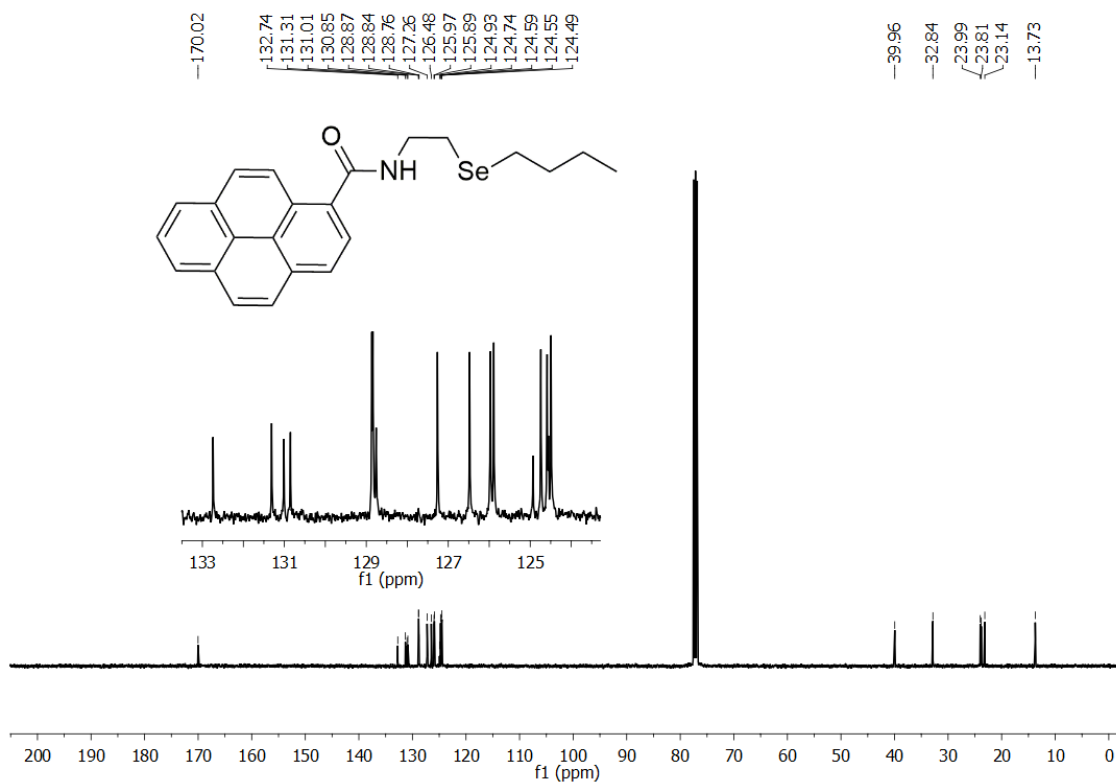


Figura 33. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **20** ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz).

Na Figura 34 apresentamos o modelo isotópico calculado para a fórmula molecular de **20** (Figura 34a), enquanto que abaixo, na Figura 34b, apresentamos a ampliação do pico do íon molecular obtido experimentalmente, cujas intensidades relativas reproduzem de maneira fiel o resultado obtido via cálculo computacional. É possível identificar o pico do íon molecular consistente com a estrutura de **20** em 409,07 m/z.

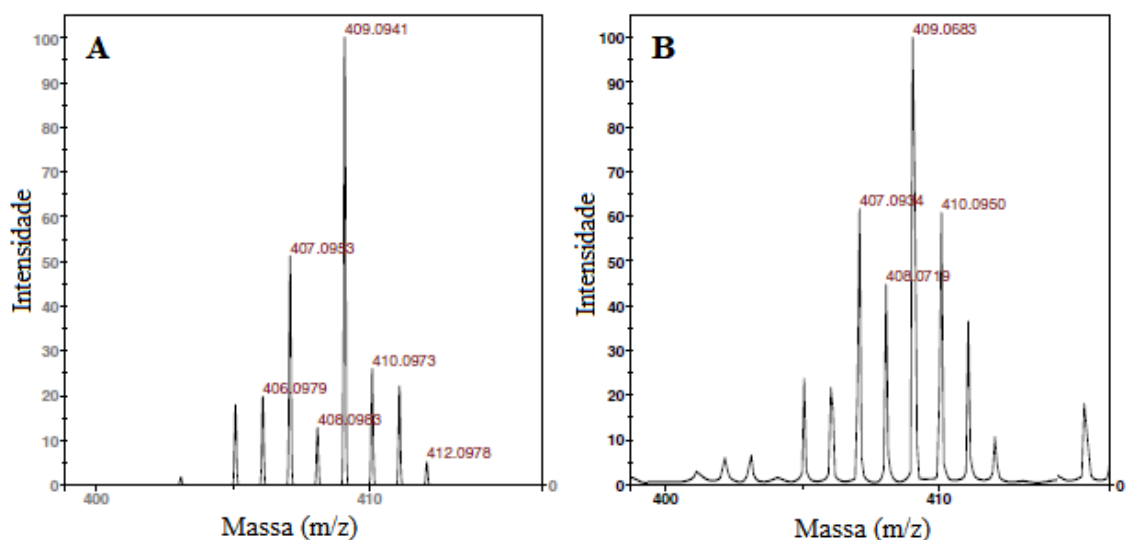


Figura 34. a) Modelo isotópico calculado para a fórmula molecular  $C_{23}H_{23}NOSe$ ; b) ampliação do pico do íon molecular de **20** obtidos experimentalmente via MALDI-TOF-MS.

### 3.3.2. Caracterização fotofísica e propriedades em água e acetonitrila

Os compostos **19** e **20** foram caracterizados em água e em acetonitrila a 25°C. Os dados referentes à caracterização estão sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8. Compilação dos dados de caracterização fotofísica dos compostos **19** e **20** em acetonitrila e água.

Compostos	Solvente	UV-vis		Fluorescência			
		$\lambda_{abs}$ (nm)	Log $\epsilon$	$\lambda_{em}$ (nm)	Desvio de Stokes (nm)	Rend. Quântico ( $\phi$ )	Tempo de vida ( $\tau$ )
<b>19</b>	CH <sub>3</sub> CN	347	4.47	387	40	0,11	3,55
<b>19</b>	H <sub>2</sub> O	339	4.41	379	40	0,11	37,9
<b>20</b>	CH <sub>3</sub> CN	340	4.37	379	39	0,024	9,78
<b>20</b>	H <sub>2</sub> O	354	4.12	486	133	0,036	37,5

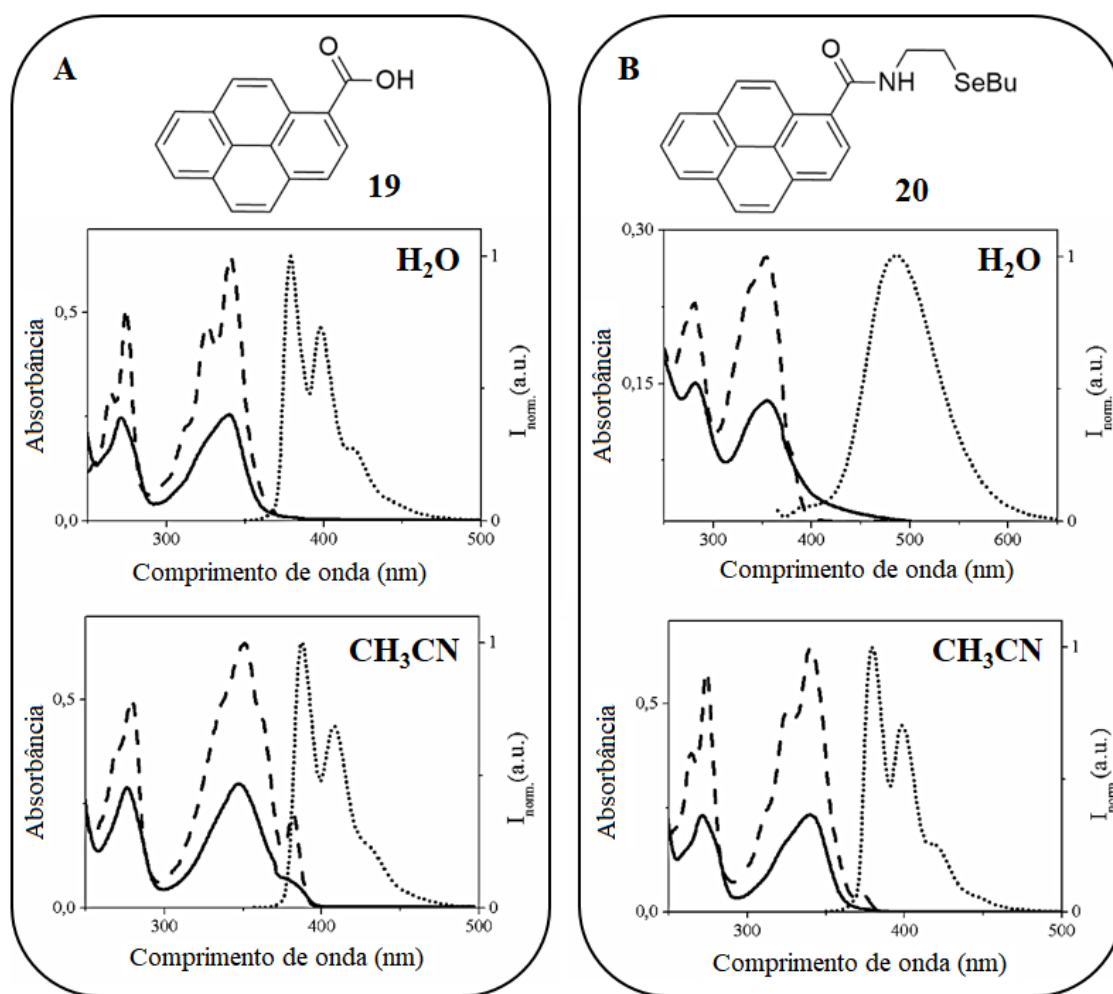
Os rendimentos quânticos de fluorescência de **19** e **20** em água e acetonitrila foram calculados a partir do próprio ácido 1-pirenocarboxílico (**19**) como padrão ( $\phi = 0,11$  em acetonitrila).

A Figura 35 apresenta os espectros de absorção, emissão e excitação de **19** e **20** em água e acetonitrila. Pela análise individual de cada um dos compostos, há uma importante observação com relação às posições das bandas de absorção e emissão quando varia-se o solvente. Tratando do composto **19**, em solução de acetonitrila observam-se as bandas de absorção e emissão com máximos em  $\lambda_{\text{abs}} = 347 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 387 \text{ nm}$ , respectivamente. O tempo de vida médio do estado excitado obtido através de medidas pela técnica de “Time-Correlated Single Photon Counting” (TCSPC), foram de 3,55 ns e 37,9 ns em acetonitrila e água. Era de se esperar comprimentos de onda de emissão maiores para o composto **19** em solução aquosa do que os observados em acetonitrila pois, teoricamente, a água (mais polar) tende a estabilizar de modo mais efetivo o estado excitado de **19** (bastante polarizado) do que o faz a acetonitrila (menos polar).<sup>104</sup> No entanto, observa-se exatamente o oposto. Devido à sua cadeia lateral rica em elétrons deslocalizados, o ácido carboxílico **19** apresenta comportamento ácido considerável ( $\text{pK}_a = 4,0$ ), pois a carga negativa de sua base conjugada é estabilizada ao redor de toda a sua estrutura. Portanto, **19** se apresenta majoritariamente na forma aniônica em água.<sup>105</sup> Os comprimentos de onda máximos de absorção ( $\lambda_{\text{abs}} = 339 \text{ nm}$ ) e emissão ( $\lambda_{\text{em}} = 379 \text{ nm}$ ) foram portanto, atribuídos à base conjugada de **19**, o carboxilato de pireno. A natureza do solvente não afetou os rendimentos quânticos de fluorescência de **19**, no entanto, o tempo de vida no estado excitado da forma majoritariamente aniônica (em água) é cerca de dez vezes maior do que a forma neutra (em acetonitrila).

O composto **20** em solução de acetonitrila apresentou o mesmo tipo de banda de absorção e banda de emissão estruturada daquela observada em **19**, correspondendo ao padrão monomérico emissivo do pireno.<sup>106</sup> A conversão do composto **19** em **20**, pela reação de amidação com **13** foi acompanhada da atenuação de fluorescência de aproximadamente 5 vezes, baixando o rendimento quântico de 11% (**19**) para 2,4% (**20**). A atenuação de fluorescência foi atribuída ao efeito de transferência de elétrons foto-induzida<sup>40</sup> em conjunto com o efeito do átomo pesado<sup>10</sup>, promovidos pelo átomo de selênio nas proximidades do núcleo fluorescente. Em água, o composto **20** apresenta propriedades fotofísicas completamente distintas daquelas observadas em solvente orgânico,

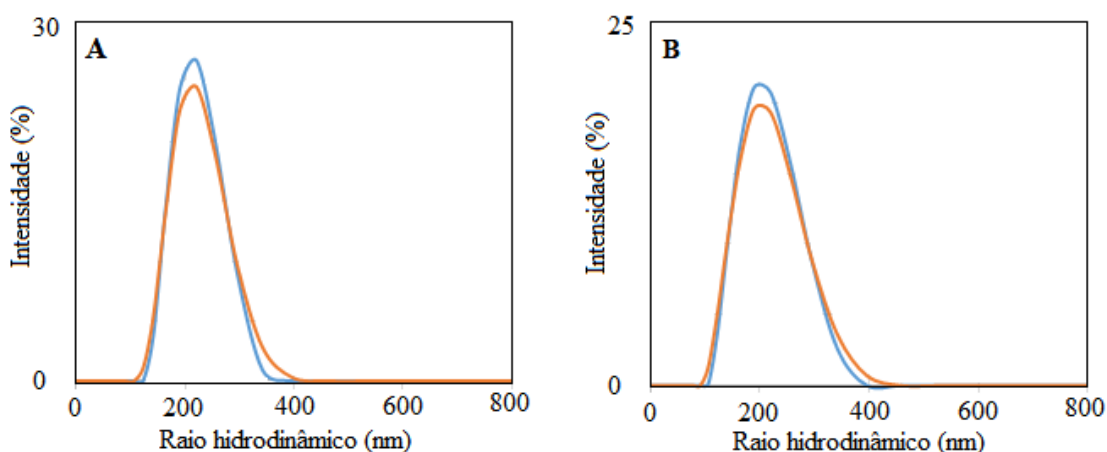


especialmente tratando do espectro de emissão. A primeira constatação fica por conta da banda larga de emissão em 487 nm (Figura 35B1). Ao mesmo tempo, observamos o espectro de absorção praticamente inalterado, algo muito característico de sistemas envolvendo excímeros, exciplexos ou agregados de pireno. Comparando os dados espectroscópicos de **20** nos diferentes solventes, observamos uma grandíssima diferença entre os valores de desvio de Stokes, correspondentes às energias de relaxação no estado excitado, para o sistema em acetonitrila (39 nm) e aquoso (133 nm). O rendimento quântico de fluorescência aumentou de 2,4% para 3,6%, e o tempo de vida cresceu consideravelmente, de 9,78ns para 37,5ns, cerca de 4 vezes.



**Figura 35.** Espectros de absorção (linha sólida), emissão (linha pontilhada) e excitação (linha tracejada) dos compostos A) **19** e B) **20** em água e acetonitrila.  $[19] = [20] = 1 \times 10^{-5}$  mol/L;  $\lambda_{exc} = 340$  nm.

Devido ao caráter altamente hidrofóbico do composto **20**, cuja maior parte de sua estrutura é composta de hidrocarbonetos, as forças de  $\pi$ -stacking entre as faces planas dos resíduos de pireno são bastante representativas. Por ser na sua maior parte um hidrocarboneto, **20** apresenta comportamento hidrofóbico, majorando as forças intermoleculares do soluto sobre as interações solvente/soluto. Por isso, a partir de determinada concentração, o equilíbrio de **20** em água pende para uma suspensão coloidal de agregados ao invés de uma solução molecular. A presença dos agregados pôde ser comprovada experimentalmente pela técnica de “Dynamic light Scattering” (DLS), onde as medidas realizadas da dispersão de pirenos em água apontam a presença de agregados monodispersos de tamanho médio de 210 nm (Figura 36), enquanto que a solução de **20** em acetonitrila aponta para a ausência de partículas em medidas via DLS. Algo interessante de ser observado na Figura 36 é que, independente da concentração de **20** em água, o tamanho médio dos agregados é sempre o mesmo, indicando que o processo de formação dos agregados não é aleatório, mas que existe uma faixa de tamanho de partículas dos agregados que são energeticamente mais estáveis. Essa característica torna o sistema reproduzível no sentido de formar um tamanho definido de micropartículas visando uma possível aplicação do coloide.

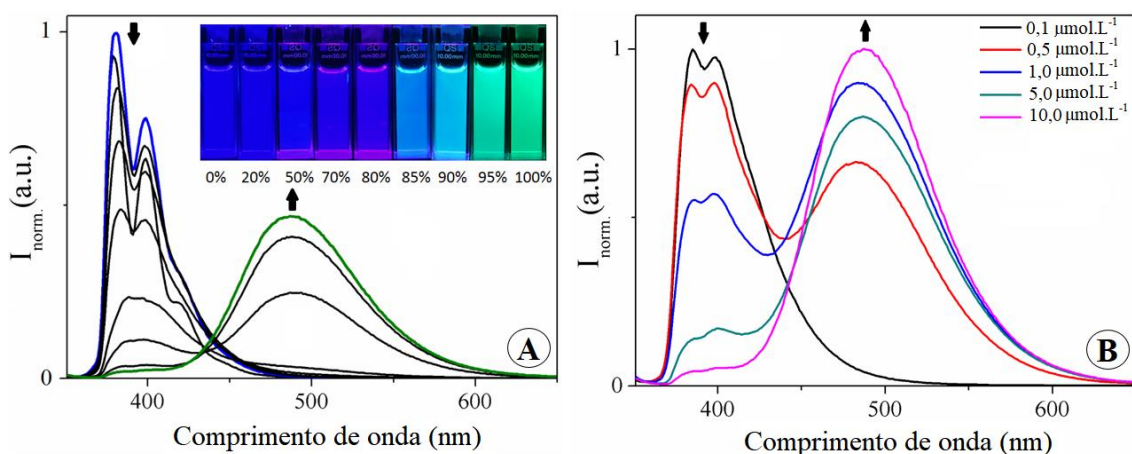


**Figura 36.** Distribuição de tamanho por Dynamic Light Scattering (DLS) em volume (linha laranja) e intensidade (linha azul) do composto **20** em água nas concentrações de a)  $5,0 \times 10^{-6}$  mol/L e b)  $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L.

Visando obter mais informações sobre as influências da polaridade do solvente e da concentração de **20** no processo de formação dos agregados, procedemos dois experimentos acompanhados por espectrofluorimetria. Em um deles, com a concentração de **20** foi fixada em  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ , variando-se as proporções da mistura de solventes acetonitrila/água, adquirindo espectros de emissão de cada uma das misturas, conforme apresentado na Figura 37A. Quando o espectro de **20** foi registrado em uma solução de acetonitrila pura (linha azul), observamos o padrão de emissão estruturado da espécie monomérica do pireno, com máximo em 379 nm. À medida em que as misturas vão sendo compostas com água, observou-se a gradativa atenuação da banda estruturada em 379 nm, e concomitante surgimento de uma nova banda larga na altura dos 486 nm, apresentado como a linha verde do espectro, o que foi atribuído aos agregados. A fotografia em destaque na Figura 37A, apresenta as mudanças visuais sob luz ultravioleta pelo aumento da composição aquosa de 0% (azul, 379 nm) a 100% (verde, 486 nm). Tais observações foram suportadas por medidas de fluorescência resolvida no tempo, conforme apresentado na tabela 9. Até a composição contendo 70% de água, o composto **20** teve a equação de decaimento em função do tempo ajustada com uma única lei exponencial. A partir de 80% de água, **20** foi ajustado sob lei de dupla exponencial, o que significa a coexistência de duas espécies emissivas. O tempo de vida mais curto (7,89 ns) foi atribuído à forma monomérica do pireno. O tempo de vida mais longo (37,7 ns) foi atribuído ao agregado. Em água pura, a amplitude relativa dos tempos de vida ( $B_1$  e  $B_2$ ) das espécies apresentam a relação de 93,1% na forma agregada e 6,9% na forma monomérica.

A Figura 37B apresenta a influência da concentração no equilíbrio monômero/agregado de **20** em meio aquoso. Em concentrações da ordem de  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ , observa-se apenas o padrão de banda de emissão do monômero (linha preta da Figura 37B). Além disso, como apresentado na Tabela 9, os decaimentos do tempo de vida foram ajustados em uma equação de primeira ordem com tempo de 3,65 ns, sugerindo apenas uma única espécie emissiva em solução. À medida em que a concentração de **20** é aumentada entre  $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  a  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ , ambas as formas de monômero e agregado são observadas, o que fica evidenciado pela presença

da banda dupla de emissão com máximo em 379 nm e 486 nm. Nessa faixa de concentração os decaimentos de tempo de vida no estado excitado puderam ser ajustados com dupla exponencial, cujos tempos de vida foram de 4,02 ns e 36,5 ns, referentes ao monômero e ao agregado, respectivamente. Ao final, na concentração de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  a forma do agregado predomina, conforme observa-se do formato da linha rosa do espectro na Figura 37B.



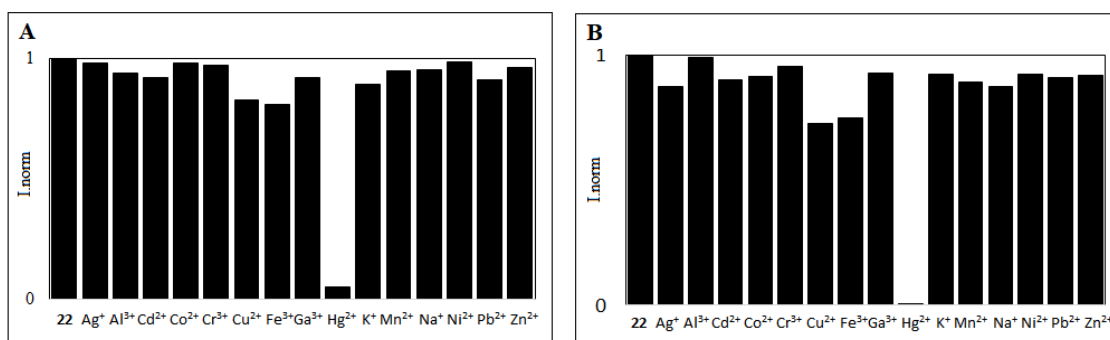
**Figura 37.** A) Espectros de emissão normalizados de **20** em diferentes combinações de água/acetonitrila desde 0% de água (linha azul) até 100 % (linha verde).  $[\mathbf{20}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ . Em destaque: alterações do aspecto visual de **20** desde 0% até 100% de água sob luz UV ( $[\mathbf{20}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ;  $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ ). B) Espectros de emissão normalizados de **20** desde  $1 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  até  $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  em água pura.  $[\mathbf{20}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ .

**Tabela 9.** Tempos de vida no estado excitado (T1m T2) e amplitudes relativas (B1, B2) de **20** em diferentes misturas de água/acetonitrila ( $[\mathbf{20}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ).

Teor de água (%)	T <sub>1</sub> (ns)	B <sub>1</sub> (Amp. Rel. %)	T <sub>2</sub> (ns)	B <sub>2</sub> (Amp. Rel. %)
0	9,8	100,0		
20	8,9	100,0		
50	6,9	100,0		
70	4,8	100,0		
80	3,6	95,1	15,5	4,9
85	3,3	77,1	21,5	22,9
90	3,8	56,1	27,0	43,9
100			34,8	100,0

### 3.3.3. Aplicação como sonda na detecção de Hg<sup>2+</sup>

Como apresentado anteriormente no Esquema 7, a estrutura do composto **20** foi desenhada visando conter um seleneto orgânico ligado à uma núcleo fluorescente através de um espaçador. O seleneto orgânico tem o papel de ligante químico e o espaçador contribui com o arranjo espacial para a acomodação do analito. Combinando essas duas características aumentamos a probabilidade de conceber uma sonda seletiva à um único íon. Desse modo, programamos um experimento para testar a seletividade da sonda frente a diferentes percloratos metálicos: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup> e Cr<sup>3+</sup>. A solução de cada sal foi adicionada separadamente à soluções de **20** em água ou acetonitrila. A Figura 38 apresenta a emissão de fluorescência normalizada de **20** pela adição de 5 equivalentes molares de cada íon em água e acetonitrila, monitorando os comprimentos de onda de 486 nm (aquoso) e 379 nm (acetonitrila). Observa-se claramente a supressão de fluorescência na presença de Hg<sup>2+</sup>, enquanto o Fe<sup>3+</sup> e o Cu<sup>2+</sup> apresentam resposta residual, de menor amplitude.



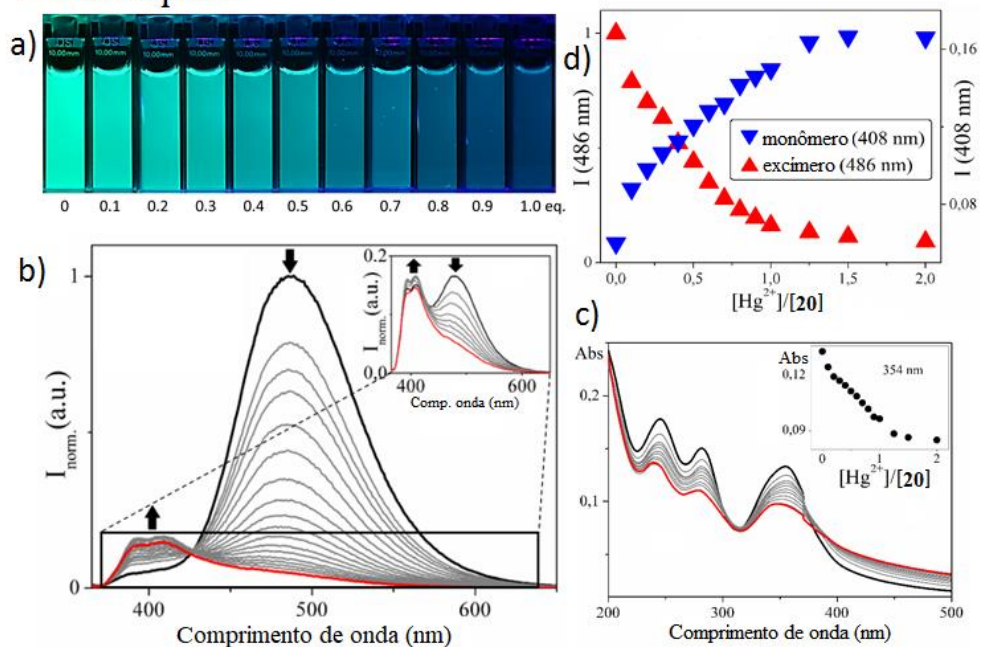
**Figura 38.** Emissão de fluorescência normalizada do composto **20** ( $1,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) na presença de 5 equivalentes molares de diferentes íons em A) água a 486 nm e B) em acetonitrila a 379 nm.

A partir desses resultados, procedemos as titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas do composto **20** com soluções de Hg<sup>2+</sup>. Em meio aquoso (Figura 39C), à medida em que a solução de Hg<sup>2+</sup> foi adicionada, foi observada a atenuação da principal banda de absorção em 354 nm, com um ligeiro deslocamento hipsocrômico. Por outro lado, os dados de fluorescência nos proporcionaram informação analítica mais

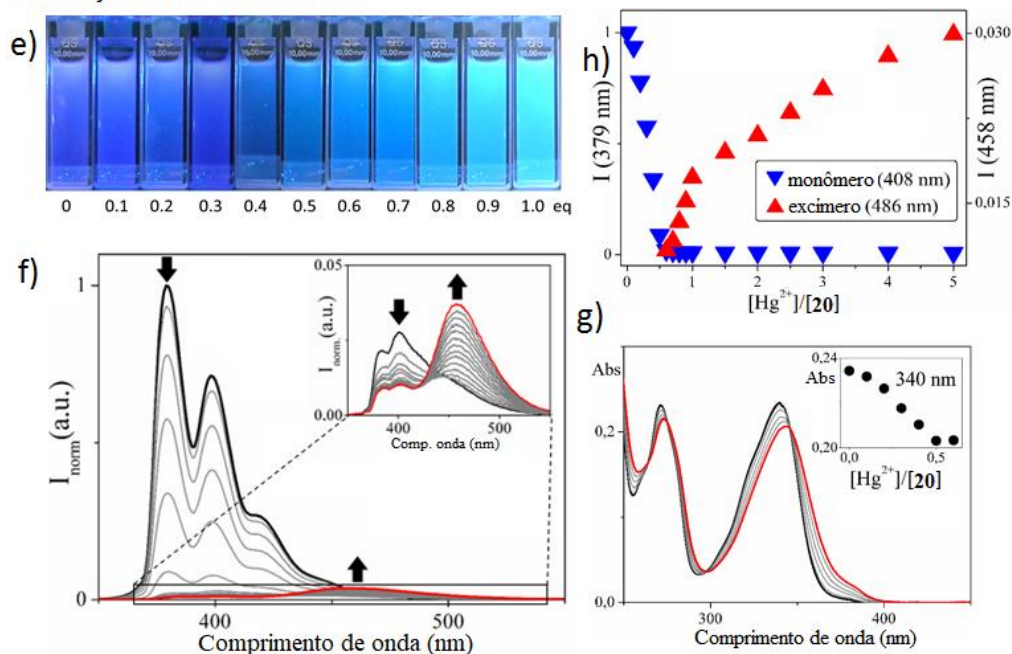
perceptível (Figura 39B). Observamos a atenuação expressiva da banda de emissão com máximo em 486 nm (sistema aquoso) logo na primeira adição, correspondente a 0,1 equivalente do agente titulante. Concomitantemente, foi observado o surgimento de uma nova banda estruturada em 408 nm (expansão na figura 39B). Na figura 39A, está apresentado as mudanças do aspecto visual das soluções de **20** pela adição de  $\text{Hg}^{2+}$  (desde 0 a 1,0 equivalente molar), a qual exibe a transição do verde ao azul. A figura 4D apresenta a dinâmica da atenuação da banda em 486 nm e o aumento de intensidade da banda em 408 nm.

Sobre a titulação de **20** em solução de acetonitrila, observamos apenas uma leve alteração dos espectros de absorção pela adição do  $\text{Hg}^{2+}$  titulante, tanto em intensidade quanto em deslocamento, como apresentado na Figura 39G. Em fluorimetria, à medida em que seguimos com a titulação, observamos a completa supressão da banda de emissão em 379 nm e surgimento de uma banda com características de exciplexo em 458 nm, como apresentado na expansão da Figura 39F. A quantidade necessária de  $\text{Hg}^{2+}$  para promover a completa supressão de fluorescência em **20** é de 0,5 equivalentes molares (Figura 39H). A Figura 39E mostra as mudanças de coloração sob luz ultravioleta pela adição de  $\text{Hg}^{2+}$ , indo do azul ao verde, exatamente o oposto do observado no sistema aquoso.

### Sistema aquoso



### Solução em acetonitrila



**Figura 39.** a, e) Mudanças visuais das soluções em água e acetonitrila de **22** sob luz ultravioleta (365 nm) a partir da adição de 0 até 1,0 equivalente molar de  $\text{Hg}^{2+}$  ( $[\mathbf{22}] = 1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ). b, f) Títulações espectrofluorimétricas de **22** em solução aquosa e de acetonitrila pela adição de quantidades crescentes de  $\text{Hg}^{2+}$  b)  $\lambda_{\text{exc.}} = 354 \text{ nm}$ ; f)  $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$ ;  $[\mathbf{22}] = 1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . Em destaque: expansões das bandas crescentes. c, g): títulações espectrofotométricas de **22** em solução aquosa e de acetonitrila pela adição de quantidades crescentes de  $\text{Hg}^{2+}$  ( $[\mathbf{22}] = 1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ). d): Variação da emissão normalizada em meio aquoso nos comprimentos de onda de 486 nm e 408 nm em função da  $[\text{Hg}^{2+}]/[\mathbf{22}]$ . g) Variação da emissão normalizada em acetonitrila nos comprimentos de onda de 458 nm e 379 nm em função da  $[\text{Hg}^{2+}]/[\mathbf{22}]$ .

A formação do composto de coordenação em meio aquoso resulta na diminuição expressiva do rendimento quântico de fluorescência, indo dos iniciais 3,6% do composto **20**, para 0,24% do complexo **20**-Hg<sup>2+</sup>, 15 vezes menor. Em acetonitrila, os rendimentos quânticos de fluorescência variaram de 2,4 % para 0,14 % antes e após adição do metal, uma diminuição de 17 vezes. O fenômeno de atenuação de fluorescência por quelação foi atribuído ao efeito do átomo pesado, induzido pelo íon Hg<sup>2+</sup> nas proximidades do pireno.

A atenuação da emissão de fluorescência refletiu diretamente nos tempos de vida do estado excitado. Em meio aquoso, o tempo de vida inicial, de 38,02 ns (**20** em água) caiu para 3,70 ns após a adição de cinco equivalentes molares do metal, uma diminuição de cerca de 10 vezes. As adições intermediárias entre 0 e 5 equivalentes de Hg<sup>2+</sup> estão detalhadas na Tabela 10. As amplitudes relativas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> representam de forma aproximada a proporção entre as formas emissivas que correspondem aos tempos de vida T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>, respectivamente. Considerando que T<sub>2</sub> pertence à forma agregada de **20**, temos a diminuição gradual de sua amplitude B<sub>2</sub> à medida em que se adiciona o Hg<sup>2+</sup>. Concomitantemente observamos o aumento da amplitude relativa (B<sub>1</sub>) correspondente ao tempo de vida do complexo **20**-Hg<sup>2+</sup> (T<sub>1</sub>), até 100%.

Tabela 10. Tempos de vida (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>) e amplitudes relativas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) de **20** em solução aquosa em diferentes concentrações de Hg<sup>2+</sup> ([**20**] = 1.0 x 10<sup>-5</sup> mol/L).

<b>Equiv. Hg<sup>2+</sup></b> <b>(Meio aquoso)</b>	<b>T<sub>1</sub></b> <b>(ns)</b>	<b>B<sub>1</sub></b> <b>(Amp. Rel. %)</b>	<b>T<sub>2</sub></b> <b>(ns)</b>	<b>B<sub>2</sub></b> <b>(Amp. Rel. %)</b>
<b>0,00</b>	6,24	7,49	38,02	92,51
<b>0,25</b>	4,99	12,79	34,75	87,21
<b>0,50</b>	4,65	18,72	30,85	81,28
<b>0,75</b>	4,25	22,48	28,63	77,52
<b>1,00</b>	4,26	28,15	27,67	71,85
<b>2,00</b>	2,73	34,76	23,53	65,24
<b>5,00</b>	3,70	100,00		



Em acetonitrila observamos inicialmente o tempo de vida correspondente à forma monomérica ( $T_1$ ) de 9,84 ns. Observamos um novo tempo de vida do estado excitado a partir da adição de 0,75 equivalentes molares de  $Hg^{2+}$ . Até 1,0 equivalentes molares de  $Hg^{2+}$ , ainda observamos o tempo de vida da forma monomérica, desta vez como  $T_2$ , com medida de 7,57 ns. A partir de 1,0 apenas observamos os tempo de vida da forma complexada, da ordem de 4,01 ns.

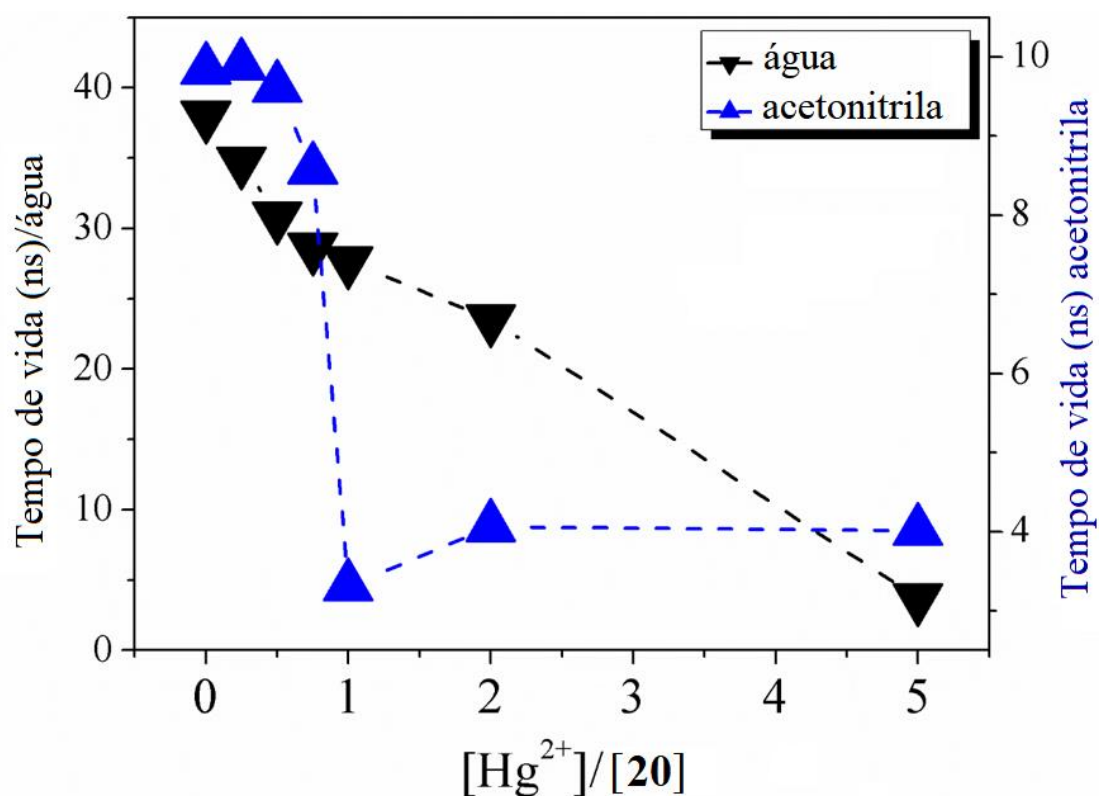
Tabela 11. Tempos de vida ( $T_1$ ,  $T_2$ ) e amplitudes relativas ( $B_1$ ,  $B_2$ ) de **20** em solução de acetonitrila em diferentes concentrações de  $Hg^{2+}$  ( $[20] = 1.0 \times 10^{-5}$  mol/L).

<b>Equiv. <math>Hg^{2+}</math></b> <b>(Acetonitrila)</b>	<b><math>T_1</math></b> <b>(ns)</b>	<b><math>B_1</math></b> <b>(Amp. Rel. %)</b>	<b><math>T_2</math></b> <b>(ns)</b>	<b><math>B_2</math></b> <b>(Amp. Rel. %)</b>
<b>0</b>	9,84	100		
<b>0,25</b>	9,89	100		
<b>0,5</b>	9,61	100		
<b>0,75</b>	2,93	39,75	8,58	60,25
<b>1</b>	3,31	66,74	7,57	33,26
<b>2</b>	4,06	100		
<b>5</b>	4,01	100		

Observou-se também a diminuição dos tempos de vida do estado excitado, de 9,84 ns para 4,10 ns.

Pela análise da Figura 40 podemos visualizar a dinâmica do tempo de vida do estado excitado de **20** em função da presença de  $Hg^{2+}$ . Quando analisamos o sistema em solvente acetonitrila (triângulos azuis) percebemos que 1 equivalente molar de mercúrio é capaz de estabilizar o tempo de vida do estado excitado, por se tratar de uma reação entre uma espécie molecular totalmente disponível e uma espécie iônica também totalmente disponível em solução. Quando avaliamos o sistema aquoso, podemos perceber que o desmanche da estrutura coloidal de **20** depende também de questões de equilíbrio químico. Quando o equilíbrio é forçado em direção à formação do composto de coordenação pelo aumento da concentração da concentração de  $Hg^{2+}$ , temos a

completa diminuição dos tempos de vida, o que ocorre apenas com 5 equivalentes molares de  $\text{Hg}^{2+}$  em relação ao ligante.



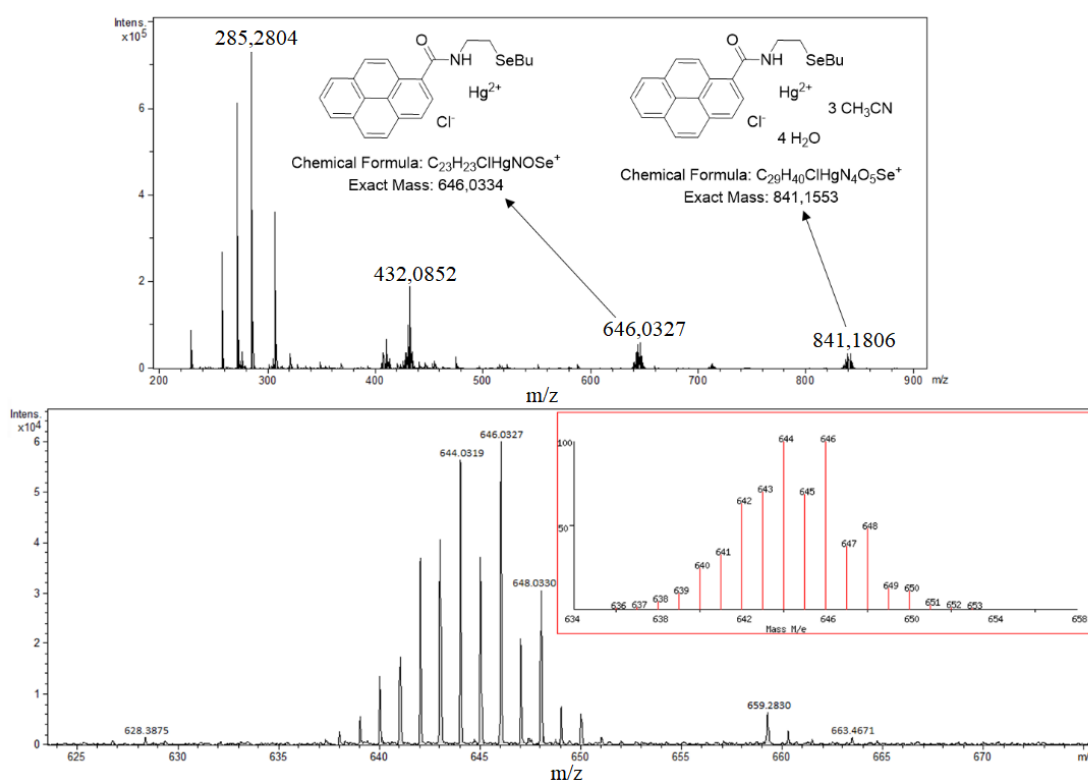
**Figura 40.** Tempo de vida do principal estado excitado em função da  $[\text{Hg}^{2+}]/[\mathbf{20}]$  em meio aquoso (triângulos pretos) e em acetonitrila (triângulos azuis).

Tratando do mecanismo de detecção propriamente dito, daremos início pela discussão do sistema aquoso, cuja proposta é mais complexa. Como já mencionado, o composto **20** é pouco solúvel em água, sendo que na concentração de trabalho, quase a totalidade da sonda se apresenta na forma de agregados em suspensão. No entanto, a presença desses agregados não impede a interação com o  $\text{Hg}^{2+}$ , o que leva à supressão de fluorescência. Observamos que ao adicionarmos 5 equivalentes molares do titulante ( $[\text{Hg}^{2+}] = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) à suspensão coloidal da sonda ( $[\mathbf{20}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ), não era mais possível detectar partículas em suspensão pela técnica de DLS. Tal observação nos induziu a realizar um estudo de espectrometria de massas com intuito de identificar a espécie formada em decorrência do desmanche dos agregados. Como pode ser observado na Figura 41, foi possível identificar a massa correspondente ao complexo **20-**

$\text{Hg}^{2+}$  de estequiometria 1:1, acompanhado de moléculas solventes e um cloreto como estabilizantes da esfera de coordenação do  $\text{Hg}^{2+}$ .

Em solução de acetonitrila o modelo proposto de formação do composto de coordenação é mais direto, pois envolve apenas a espécie molecular **20** e a iônica  $\text{Hg}^{2+}$ . Uma amostra da mistura entre **20** e  $\text{Hg}^{2+}$  foi também analisada por espectrometria de massas com objetivo de identificar a estequiometria do complexo, conforme apresentado na Figura 42.

Por fim, propusemos de forma ilustrativa os processos de complexação de **20** pelo íon  $\text{Hg}^{2+}$ , apresentado no Esquema 8.



**Figura 41.** Superior: espectro de massas de alta resolução do complexo de coordenação **20**- $\text{Hg}^{2+}$  em meio aquoso. Inferior: ampliação do pico do íon molecular e em destaque, padrão isotópico calculado.

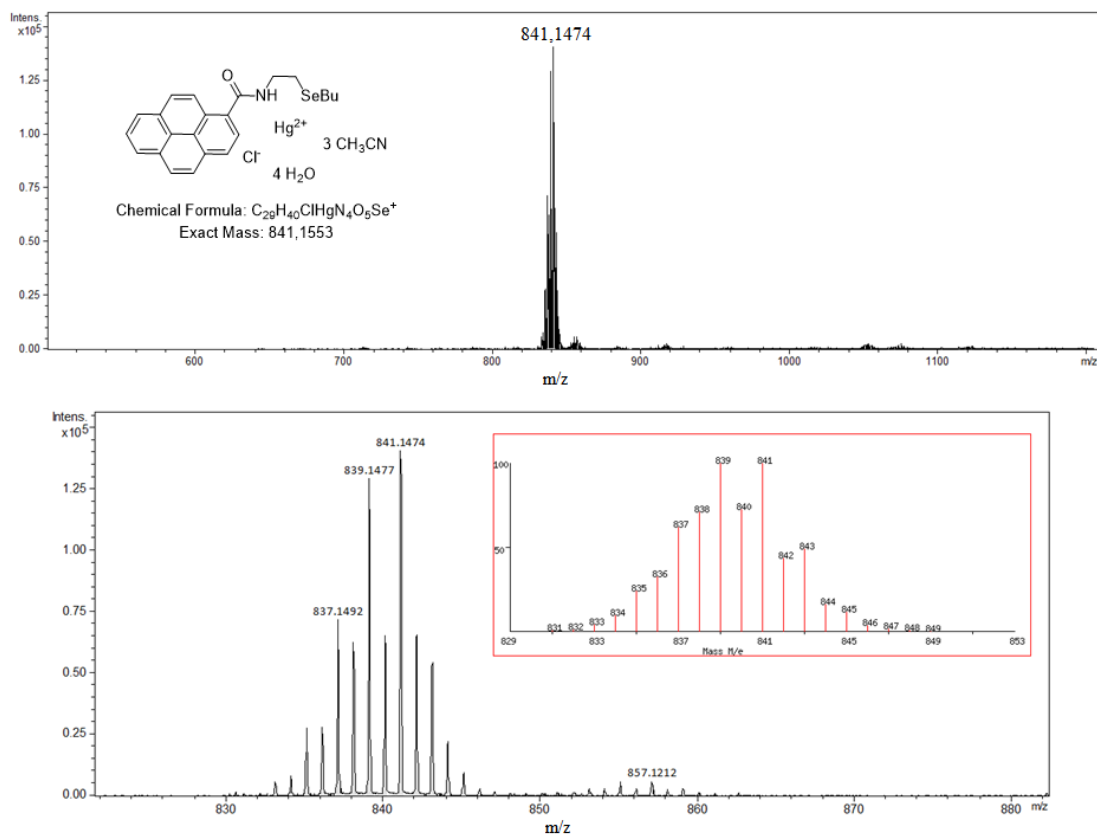
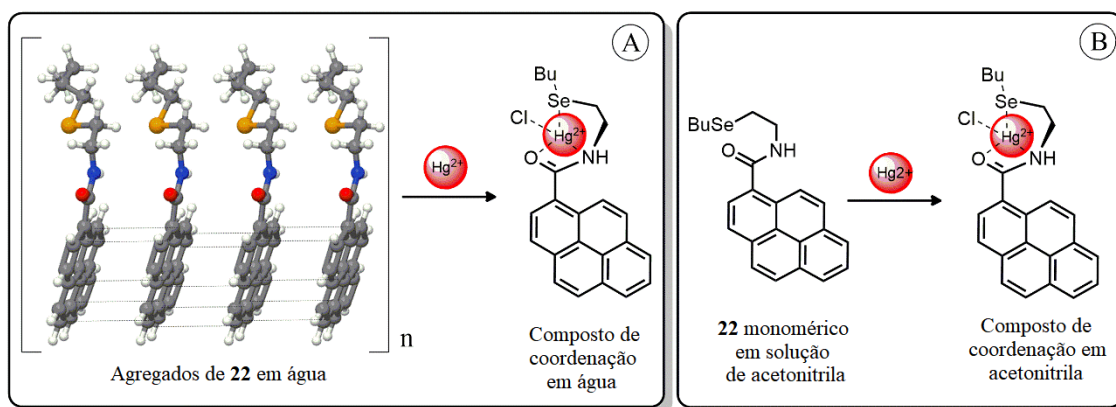


Figura 42. Superior: espectro de massas de alta resolução do complexo de coordenação **20**- $Hg^{2+}$  em acetonitrila. Inferior: ampliação do pico do íon molecular e em destaque, padrão isotópico calculado.



Esquema 8. Propostas de formação do complexo entre **20** e  $Hg^{2+}$  em A) água e B) acetonitrila.

As constantes de interação entre **20** e  $Hg^{2+}$  foram determinadas a partir dos dados de emissão, de maneira análoga ao realizado nos capítulos anteriores. Encontramos o valor de  $\log \beta = 6.19 \pm 0.03$  em meio aquoso e  $\log \beta = 8.59 \pm 0.04$  em

acetonitrila. Os valores de  $\log \beta$  superiores em acetonitrila podem ser explicados pelo fato de que solventes polares próticos, como a água, tendem a interagir mais fortemente e estabelecer maior energia de solvatação com o íon metálico comparado a solventes polares apróticos. Dessa maneira, em acetonitrila os íons  $\text{Hg}^{2+}$  encontram-se mais disponíveis para a formação do complexo **20**- $\text{Hg}^{2+}$ , resultando em maior valor da constante de interação.

As quantidades mínimas detectáveis e quantificáveis (QMD e QMQ) em acetonitrila encontradas a partir dos dados de emissão foram de  $2,0 \mu\text{mol/L}$  e  $4,0 \mu\text{mol/L}$ , respectivamente. Em meio aquoso, os valores de QMD e QMC encontrados foram de  $0,1 \mu\text{mol/L}$  e  $0,17 \mu\text{mol/L}$ , respectivamente.

Buscando aplicação à uma situação analítica real, conduzimos um experimento visando a detecção de  $\text{Hg}^{2+}$  com três diferentes marcas águas minerais de Portugal de diferentes valores de pH (S1 = 5,7; S2 = 6,6; S3 = 9,5). Como prova de conceito, o  $\text{Hg}^{2+}$  foi introduzido artificialmente nas amostras de água, com o objetivo de detectar e quantificar a contaminação pelo uso da sonda **20** através da espectrofluorimetria. Para isso, monitoramos a banda do agregado (486 nm) que atua de forma decrescente; e a banda do complexo (408 nm) que atua na crescente, a fim de estabelecer qual banda é a mais adequada para a quantificação do íon. A partir de soluções padrão de  $\text{Hg}^{2+}$ , plotamos curvas de calibração e obtivemos equações da reta por regressão linear. Foram adicionadas às amostras S1, S2 e S3 quantidades de  $0,1 \mu\text{mol/L}$ ;  $0,2 \mu\text{mol/L}$  e  $0,3 \mu\text{mol/L}$  de  $\text{Hg}^{2+}$ . As concentrações encontradas em cada amostra pelo acompanhamento da banda crescente (408 nm) e decrescente (486 nm) estão apresentadas na Tabela 12. A melhor precisão de medidas foi alcançada quando utilizada a banda com máximo em 408 nm, que surge pela formação do complexo **20**- $\text{Hg}^{2+}$ . Por ser uma entidade química definida, o complexo **20**- $\text{Hg}^{2+}$  responde de forma mais precisa às variações de concentração do que a banda do agregado, em 486 nm, cujo a atenuação depende do desmanche de espécies mais complexas.

Tabela 12. Análise espectrofluorimétrica quantitativa do Hg<sup>2+</sup> adicionado à diferentes marcas de águas minerais.

[Hg <sup>2+</sup> ] adicionada (10 <sup>-7</sup> M)	[Hg <sup>2+</sup> ] Detectado					
	408 nm			486 nm		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
1,0	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,4	1,31 ± 0,05	1,33 ± 0,02	0,6 ± 0,1
2,0	1,82 ± 0,06	2,04 ± 0,04	1,7 ± 0,4	2,7 ± 0,2	2,1 ± 0,1	1,08 ± 0,03
3,0	3,14 ± 0,09	2,9 ± 0,2	2,6 ± 0,3	3,4 ± 0,2	2,5 ± 0,3	1,65 ± 0,06

### 3.4. Conclusões

Foi possível sintetizar uma nova sonda fluorescente derivada do pireno-1 ácido carboxílico com especial afinidade pelo íon  $\text{Hg}^{2+}$ . A estratégia de síntese adotada nos permitiu construir a sonda em poucas etapas reacionais e em bons rendimentos. A sonda se mostrou versátil, pois permite atuar tanto em solução aquosa quanto em acetonitrila. Os mecanismos de detecção em cada solvente são bastante distintos. Através das técnicas de espectrofluorimetria, Dinamic Light Scattering e espectrometria de massas, foi possível identificar a formação de agregados da sonda em meio aquoso, que são capazes de identificar o  $\text{Hg}^{2+}$  através do desmanche dos agregados e formação de um complexo de coordenação de estequiometria 1:1. Em acetonitrila a sonda atua de forma direta com o íon  $\text{Hg}^{2+}$ , também formando prontamente o complexo 1:1. A sonda teve as suas habilidades sensoriais avaliadas e a mesma foi aplicada em uma situação real, onde contaminamos amostras de água mineral com  $\text{Hg}^{2+}$ , o qual pode ser devidamente detectado e quantificado por espectrofluorimetria.

## Capítulo 4

---

### Materiais e métodos



## 4.1. Instrumentação e reagentes

Os espectros de absorção foram obtidos de um espectrofotômetro UV-Vis Jasco V-650. Os espectros de emissão no estado estacionário foram obtidos de um espectrofluorímetro Horiba Scientific Fluoromax-4 spectrofluorimeter. Os tempos de vida do estado excitado foram medidos utilizando o contador de fótons Horiba Jobin-Yvon Temprow, equipado com as fontes de luz NanoLED adequada a cada caso. Os espectros de massa MALDI-TOF/TOF foram obtidos em um espectrômetro Ultraflex II MALDI-TOF/TOF da Bruker Daltonics. Todos estes equipamentos foram fornecidos pelo Proteomass-BIOSCOPE Research Facilities Lab.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de 400 MHz e de  $^{13}\text{C}$  de 101 MHz foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III 400. As análises elementares foram realizadas em um equipamento Thermo-Finnigan CE Flash-EA 1112-CHNS, e os espectros de infravermelho foram registrados em um Spectrum BX Perkin-Elmer FT-IR System, todos fornecidos pelo Serviço de Análises Químicas do Departamento de Química da Faculdade de Ciência e Tecnologia (DQ-FCT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de 200 MHz e  $^{13}\text{C}$  de 50 MHz foram adquiridos de um espectrômetro Bruker Avance III 200. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos pelo espectrômetro Electron Spray ionization Time of Flight (ESI-TOF) micrOTOF-QII Bruker, fornecidos pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

A cumarina-440 e a cumarina-519 adquiridas da Exciton; os sais de tetrabutylamônio (TBA): TBAF, TBACl, TBABr, TBAI, TBABF<sub>4</sub>, TBANO<sub>3</sub>, TBAClO<sub>4</sub>, TBAPF<sub>6</sub>, HSO<sub>4</sub>, TBACN e TBAOAc, L-Serina, dicarbonato de di-terc-butila (Boc<sub>2</sub>O) e o cloreto de terc-butildimetilsilano (TBDMSCl), selênio elementar, cloreto de mesila (MsCl), *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), Amberlyst®15, ácido trifluoroacético (TFA) e os sais metálicos: Hg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O, Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Pb(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O, Ca(BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.xH<sub>2</sub>O, NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub> e AgNO<sub>3</sub> foram comprados da Sigma-Aldrich. Os sais metálicos: Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O, Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O, Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O, Cd(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e Hg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O foram comprados da Alpha Aesar.

## 4.2. Medidas espectrofotométricas e espectrofluorimétricas

As medidas espectroscópicas dos cromóforos e sondas foram realizadas a partir de soluções de trabalho de concentração de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . Estas soluções foram geradas a partir da diluição de soluções estoque de concentrações próximas a  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , preparadas pela dissolução da quantidade adequada de cada composto em frascos volumétricos de 25 mL até a marca do menisco. As soluções estoque dos sais testados foram preparadas pela dissolução da quantidade adequada de cada um em balões volumétricos de 10 ml, com concentrações próximas de  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  em acetonitrila. A partir dessas, foram geradas soluções de trabalho de concentração  $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  em acetonitrila, todas preparadas logo antes das medidas. As titulações foram realizadas pela adição de poucos microlitros das soluções de trabalho dos sais às cubetas contendo as soluções de trabalho das sondas, sendo que os espectros de absorção e emissão foram registrados imediatamente após as adições. Nas medidas de emissão, os comprimentos de onda de excitação foram aplicados de acordo com o máximo de absorção, já conhecidos durante a caracterização. Nos casos de titulação, utilizamos os comprimentos de ondas correspondentes aos pontos isobésticos (ponto comum de intersecção) compilados a partir dos espectros de absorção compilados. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, com soluções estoque e de trabalho preparadas previamente aos experimentos, de modo a confirmar a reprodutibilidade dos resultados. As representações gráficas dos espectros foram obtidas de ensaios isolados, no entanto, os valores numéricos apresentados em tabela são provenientes das médias das triplicatas. Os rendimentos quânticos de fluorescência foram obtidos através do método comparativo à compostos padrão com absorção e emissão em regiões similares à cada caso, conforme a Equação 3:

$$\Phi = \Phi_{ref} \frac{\eta^2}{\eta_{2ref}} \frac{I}{A} \frac{A_{ref}}{I_{ref}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde  $\Phi$  é o rendimento quântico da amostra,  $\Phi_{ref}$  é o rendimento quântico da substância utilizada como padrão,  $\eta$  é o índice de refração dos solventes,  $I$  é a área sob o espectro (obtida por integração) e  $A$  são as absorções nos pontos de excitação. Sempre utilizamos pontos de excitação que compreendessem intersecções entre os espectros de

absorção da amostra e referência, de modo a reproduzir as condições experimentais para ambos.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir da aquisição de dez espectros de cada uma das sondas. A partir desses, utilizando o máximo de absorção de cada espectro, obtivemos as variações das medidas de cada equipamento através das seguintes Equações 4 e 5.

$$LD = y_{\text{blank}} + 3 \text{ std} \quad \text{Equação 4}$$

$$LQ = y_{\text{blank}} + 10 \text{ std}; \quad \text{Equação 5}$$

Onde  $y$  é a média dos valores.

Consideramos como detectável valores maiores ou menores do que o valor médio das dez medidas somados de três vezes o desvio padrão. Consideramos como quantificáveis valores maiores ou menores do que a média, somada ou subtraída de dez vezes o desvio padrão das medidas. As quantidades mínimas detectáveis foram atribuídas à concentração referente ao ponto da titulação que corresponde ao ponto adjacente ao encontrado em LQ.

### 4.3. Cálculos teóricos

Os cálculos teóricos realizados em estudos do Capítulo 2 foram realizados a partir do programa Gaussian09, usando a teoria da densidade funcional com as funções B3LYP e 6-61G\*\* (C, H, N, O, S, Al) e a base LanL2DZ (Hg), como implementado no Gaussian 09. A otimização dos parâmetros foi padrão e usada durante os cálculos.

#### 4.4. Procedimentos de síntese

**Boc-Ser-OH (7):**<sup>9</sup> Em um balão de fundo redondo de 100 ml, adicionou-se de *L*-serina (10,0 g; 95 mmol), 25 ml de água e 25 ml de 1,4-dioxano e hidróxido de sódio (8,0 g; 200 mmol). A temperatura da mistura foi diminuída a 0°C em banho de gelo. Em seguida, com auxílio de uma seringa, foram adicionados gota a gota, 20,8 g de Boc<sub>2</sub>O (95 mmol) previamente fundido em estufa a 45°C. A mistura foi mantida sob agitação por 15 minutos em banho de gelo, seguido de duas horas adicionais em temperatura ambiente. Em seguida o conjunto foi neutralizado com solução de ácido clorídrico 1,0 mol.L<sup>-1</sup> até pH 2. O produto foi extraído com 4 porções de 30 ml de acetato de etila. As frações orgânicas foram separadas da fase aquosa com auxílio de um funil de separação. Em seguida adicionou-se cerca de 5,0 g de sulfato de magnésio anidro e filtrou-se o conjunto em funil simples e papel pregueado. O solvente foi removido em rota-evaporador e o seu resíduo removido à baixa pressão em bomba de alto vácuo por 5 horas. O produto foi obtido com rendimento quantitativo, com pequena perda de material em função do processo. O produto apresentou-se na forma de um sólido branco de aspecto ceroso com rendimento de 100%. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6,97 (s, 1H), 5,87 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 4,45 – 4,27 (m, 1H), 4,12 (dd, J = 14,3, 7,1 Hz, 1H), 3,85 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 3,85 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 1,45 (s, 9H). RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 173,80, 156,16, 80,55, 62,91, 55,38, 28,22.

**Boc-Ser(TBDMS)-OH (8):** Em um balão de fundo redondo de 100 mL, adicionou-se 2,05 g da Boc-Ser-OH (10 mmol), 20 ml de diclorometano e 0,75 g de imidazol (11 mmol). A mistura foi resfriada a 0°C com banho de gelo. Em seguida foram adicionados 1,66 g do cloreto de *terc*-butildimetilsilano (TBDMSCl, 11 mmol), mantendo agitação por 10 minutos em banho de gelo, o qual foi removido permanecendo agitação durante a noite. Durante o workup da reação foram adicionados 12 mL de HCl 1,0 mol.L<sup>-1</sup>, e a mistura foi extraída em funil de separação com 4 aliquotas de 20 mL de acetato de etila. A frações orgânicas foram reunidas em um erlenmeyer ao qual foram adicionados cerca de 5,0 g de sulfato de magnésio, seguida da filtração em funil simples com papel filtro pregueado. O solvente foi removido em rota-evaporador e o resíduo de solvente extraído sob alto vácuo. O produto **8** foi obtido na forma de um sólido branco com 86% de rendimento.

**(S)-tert-butyl (3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-1-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate (4):** Em um balão de 50 mL, sob atmosfera inerte, foram adicionados a Boc-L-Ser(TBDMS)-OH (1,05 g; 3,0 mmol), a N,N'-dicyclohexilcarbodiimide, diclorometano (20 mL) e (DCC, 3 mmol, p.f. = 34 °C, d = 1,325 g/cm<sup>3</sup>, 0.6 mL), mantendo-se agitação durante 15 minutos. Em seguida adicionou-se a aminocumarina **2** e manteve-se agitação durante 18 horas. O meio reacional foi filtrado para remoção da uréia formada como subproduto do DCC e o solvente foi evaporado em rotaevaporador. O produto foi purificado em coluna cromatográfica utilizando sílica flash como fase estacionária e uma mistura de acetato de etila com hexanos na proporção de 1:2 como fase móvel. O produto **4** foi obtido na forma de um sólido branco com 85% de rendimento. RF em acetato de etila/hexanos 2:1 = 0,5. Ponto de fusão: 86-88 °C. RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,76 (s, 1H); 7,70 – 7,38 (m, J = 10,7; 7,4; 2,0 Hz; 1H); 6,21 (d, J = 1,2 Hz; 1H); 5,45 (d, J = 6,0 Hz; 1H); 4,40 – 4,20 (m, 1H); 3,91 (ddd, 1H); 2,42 (d, J = 1,2 Hz; 1H); 1,47 (d, J = 6,1 Hz; 2H); 0,91 (s, 2H); 0,11 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169,49; 161,20; 154,51; 152,30; 140,97; 125,51; 116,53; 115,79; 113,83; 107,50; 63,36; 28,52; 26,03; 18,79; 18,40; 0,21; -5,21; -5,26. HRMS [calcd (encontrado)]: 499,2240 (499,2240) [C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si+Na]. UV-vis [Acetonitrila; λ<sub>max</sub>, nm (ε<sub>max</sub>, dm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>): 337 (10727), 428 (16019), 444 (15835). IV (janela de BaF<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3310, 2934, 2860, 1724, 1692, 1618, 1582, 1526, 1390, 1238, 1168, 1118, 840. Análise elementar (encontrado: C, 60,4; H, 7,5; N, 5,93%. CHNS requerido: C, 60,48; H, 7,61; N, 5,88 %).

**tert-butyl (2-hydroxyethyl)carbamate (10):** Em um almofariz de porcelana foram adicionados sequencialmente o carbonato de diterc-butila (Boc<sub>2</sub>O; 2,18 g, 10 mmol), Amberlyst 15<sup>®</sup> (0,12 g; 15% m/m e a etanolamina (0,76 mL; 10 mmol). A mistura foi macerada com auxílio de pistilo e deixada em repouso por 10 minutos. Adicionou-se diclorometano à mistura e separou-se o resíduo sólido de Amberlist 15<sup>®</sup> pela filtração em algodão em funil simples. O solvente foi evaporado em rotaevaporador e o produto **10** foi obtido puro com conversão total, sendo possível recuperar 95% do material na forma pura. RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,4 – 1,5 (s., 9H); δ 3,4 – 3,5 (quart.; J = 6,22 Hz; 2H); δ 3,6 – 3,7 (quart.; J = 5,74 Hz; 2H); δ 3,8 – 3,9 (trip., J = 5,74; 1H); δ 4,9 – 5,5 (s.; 1H).

TMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$  28,43;  $\delta$  37,37;  $\delta$  39,5;  $\delta$  59,48;  $\delta$  79,42;  $\delta$  157,04. (CAS: 26690-80-2).

**2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl methanesulfonate (11):** Em um balão de 15 mL sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados **10** (9 mmol; 1,45 g), 15 mL de THF anidro e trietilamina anidra (1,53 mL; 1,2 eq.; 10,8 mmol). A mistura foi resfriada a 0°C e então adicionou-se gota a gota o cloreto de mesila (0,7 mL, 9 mmol). A reação foi mantida sob agitação em banho de gelo por 30 minutos seguidos de mais 2 horas em temperatura ambiente. O workup da reação foi realizado pela adição de uma solução saturada de cloreto de amônio (15 ml), e a mistura foi extraída com quatro porções de 15 ml de acetato de etila. As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, filtrada e o solvente removido em rotaevaporador. O composto 11 foi obtido puro após filtração em funil de placa porosa contendo sílica flash utilizando como eluente a mistura acetato de etila/hexanos 2:1. RMN  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,4 – 1,5 (s., 9H);  $\delta$  3,1 – 3,2 (s.; 3H);  $\delta$  3,2 – 3,3 (quart.;  $J = 6,22$  Hz, 2H);  $\delta$  3,6 – 3,7 (trip.;  $J = 5,74$  Hz; 2H);  $\delta$  4,9 – 5,5 (s.; 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$  28,43;  $\delta$  37,37;  $\delta$  39,5;  $\delta$  59,48;  $\delta$  79,42;  $\delta$  157,04. (CAS: 96628-67-0).

**Tert-butyl (2-(butylselanyl)ethyl)carbamate (12).** Em um balão de vidro de 50 mL sob atmosfera inerte de  $\text{N}_2$ , foi adicionado selênio elementar (0,632 g; 8 mmol) e suspenso em THF anidro (15 mL) sob agitação. Em seguida adicionou-se gota a gota uma solução de *n*-butillítio (5,33 mL; solução 1,5 mol.L $^{-1}$  em hexanos), até a viragem de vermelho intenso ao amarelo pálido. Dissolveu-se o composto **11** em 10 mL de THF anidro e adicionou-se à solução contendo o butilselenolato de lítio. Mantêve-se agitação por 30 minutos e procedeu-se o workup da reação com 15 mL de uma solução saturada de cloreto de amônio. A mistura foi extraída com 4 porções de 15 mL de acetato de etila, e as fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio e filtradas. O solvente foi removido em rotaevaporador e o produto bruto foi purificado em cromatografia de coluna utilizando sílica flash como fase estacionária e uma mistura de hexanos/acetato de etila 4:1, resultando no composto **12** na forma de um óleo amarelo, com 75% de rendimento. RMN de

$^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,8 – 1,0 (t.; 3H;  $J = 7,2$ );  $\delta$  1,2 – 1,4 (m.; 2H);  $\delta$  1,4 – 1,5 (s.; 9H);  $\delta$  1,5 – 1,7 (m.; 2H);  $\delta$  2,5 – 2,7 (m.; 4H);  $\delta$  3,3 – 3,5 (quart.; 2H;  $J = 6,59$ );  $\delta$  4,8 – 5,1 (s.; 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  13,74; 23,13; 23,88; 24,13; 28,56; 32,84; 40,76; 78,52; 155,87. RMN de  $^{77}\text{Se}$  (38,31 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  131,2;  $\delta$  46,8. IV  $\text{cm}^{-1}$  (filme): 3348; 2958; 2924; 2873; 1689; 1504; 1365; 1249; 1165; 1037; 941; 864; 775. HRMS calculado:  $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_2\text{SeNa} = 304,0792$  [ $\text{M}^+\text{Na}$ ], encontrado: 304,0784 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ].

**2-(butylselanyl)ethanamine (13):** Em um balão de 15 mL, adicionou-se ácido trifluoroacético (TFA, 2 mL) ao composto **12** em diclorometano (10 mL). A mistura foi mantida sob agitação por 4 horas, até o completo consumo do material de partida. O bruto reacional foi neutralizado com solução saturada de bicarbonato de sódio, até pH 8. Em seguida, extraiu-se a fase orgânica com 5 porções de 5 mL de diclorometano. As porções combinadas de diclorometano foram secas com sulfato de magnésio, filtradas e o solvente foi extraído com diclorometano. O composto **13** foi utilizado na etapa subsequente prévia purificação ou caracterização.

**N-(2-(butylselanyl)ethyl)-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahydro-1H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinoline-10-carboxamide (5):** O composto **13** (2,0 mmol; 0,56 g), a cumarina **3** (1,0 mmol; 0,29 mmol), o DCC (1,2 mmol; 0,248 g) e diclorometano (5 mL) foram reunidos em balão de vidro de 15 mL à temperatura ambiente e mantida agitação por 4 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o bruto reacional foi purificado em coluna cromatográfica contendo sílica flash como fase estacionária e a mistura hexanos/acetato de etila 2:1 com o eluente. O produto **5** foi obtido puro com 90% de rendimento na forma de um sólido amarelo. Ponto de fusão: 103 - 104 °C. Análise elementar (CHNS requerido: C, 59,06; H, 6,26; N, 6,31 %. encontrado: C, 59,53; H, 6,05; N, 5,97 %). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,13 (s, 1H); 8,62 (s, 1H); 7,02 (s, 1H); 3,71 (quart,  $J = 13,4$ ; 7,0 Hz, 1H); 3,42 – 3,28 (m,  $J = 10,8$ ; 4,9 Hz, 1H); 2,91 (t,  $J = 6,4$  Hz, 1H); 2,84 – 2,71 (m,  $J = 6,3$  Hz, 1H); 2,66 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H); 2,09 – 1,90 (m, 1H); 1,69 (quint, 1H); 1,43 (sext, 1H); 0,93 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163,56; 163,00; 152,70;



148,15; 148,10; 127,02; 119,61; 108,96; 108,27; 105,69; 50,24; 49,83; 40,22; 32,74; 27,47; 23,87; 23,00; 21,15; 20,21; 20,11; 13,60. MALDI-TOF-MS [ $M+H^+$  calculado (encontrado)]: 449,13 (449,04). UV-vis [Acetonitrila;  $\lambda_{max}$ , nm ( $\text{Log } \epsilon_{max}$ ,  $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ): 431 (4,58). Pico de fluorescência em acetonitrila ( $\lambda_{exc} = 431$  nm,  $\lambda_{emis} = 478$  nm).

**2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (16)**. Em um balão de vidro de 500 mL, adicionou-se gota a gota 15 mL de ácido sulfúrico concentrado à uma solução de fluoresceína (30,1 mmol; 10 g) em etanol (200 mL) à temperatura ambiente. Após agitar sob refluxo por 18 horas, o solvente foi removido em rotaevaporador e o material do balão foi neutralizado com bicarbonato de sódio até que a evolução de  $\text{CO}_2$  cessasse. A pasta resultante foi filtrada em funil de Buchner e o sólido resultando recristalizado de etanol, resultando em 8,90 g (90% de rendimento) de cristais marrons com brilho esverdeado. Ponto de fusão: 242 °C. RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO)  $\delta$  8,18 (d,  $J = 7,4$  Hz; 1H), 8,00 – 7,61 (m, 2H); 7,50 (d,  $J = 7,0$  Hz; 1H); 6,80 (d,  $J = 9,6$  Hz, 2H); 6,56 (d,  $J = 6,6$  Hz, 4H); 3,96 (q,  $J = 7,0$  Hz; 2H); 0,86 (t,  $J = 7,1$  Hz; 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO)  $\delta$  173,93; 165,02; 156,13; 150,49; 133,66; 132,91; 130,61; 130,06; 129,87; 121,75; 114,39; 103,24; 60,83; 13,29. UV-vis em acetonitrila;  $\lambda_{max}$ , nm ( $\epsilon_{max}$ ,  $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ): 452 (19953). Emissão de fluorescência em acetonitrila ( $\lambda_{exc} = 452$  nm,  $\lambda_{em} = 519$  nm).

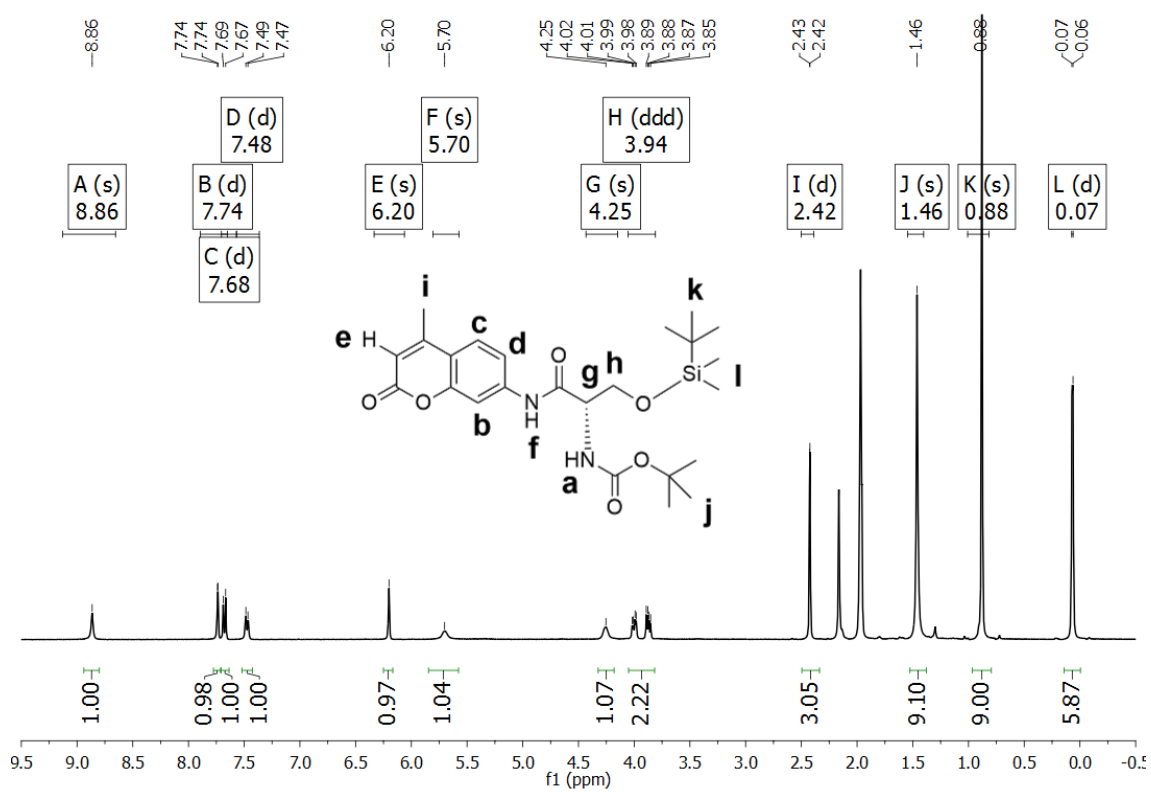
**(S)-ethyl**

**2-(6-((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-((tert-butyl)dimethylsilyloxy)propanoyloxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (17)**. Em um balão de 500 mL, sob atmosfera inerte, foram adicionados o composto **8**, (3,0 mmol; 1,05 g), DCC (3,0 mmol; 0,6 mL) e diclorometano (20 mL) e a mistura teve a temperatura reduzida a 0°C com auxílio de banho de gelo. Em seguida foi adicionado o composto **16** (1,1 mmol; 0,39 g) e mantida agitação a 0° durante 15 minutos. Após a remoção do banho de gelo, mantivemos agitação por 18 horas. O bruto reacional foi filtrado para remover a uréia proveniente da reação com DCC. O solvente da fase orgânica foi removido sob pressão reduzida e o produto final foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando sílica flash como fase estacionária e acetato de etila/hexanos na proporção 2:1. O produto foi obtido na forma de um sólido alaranjado com 86% de rendimento.

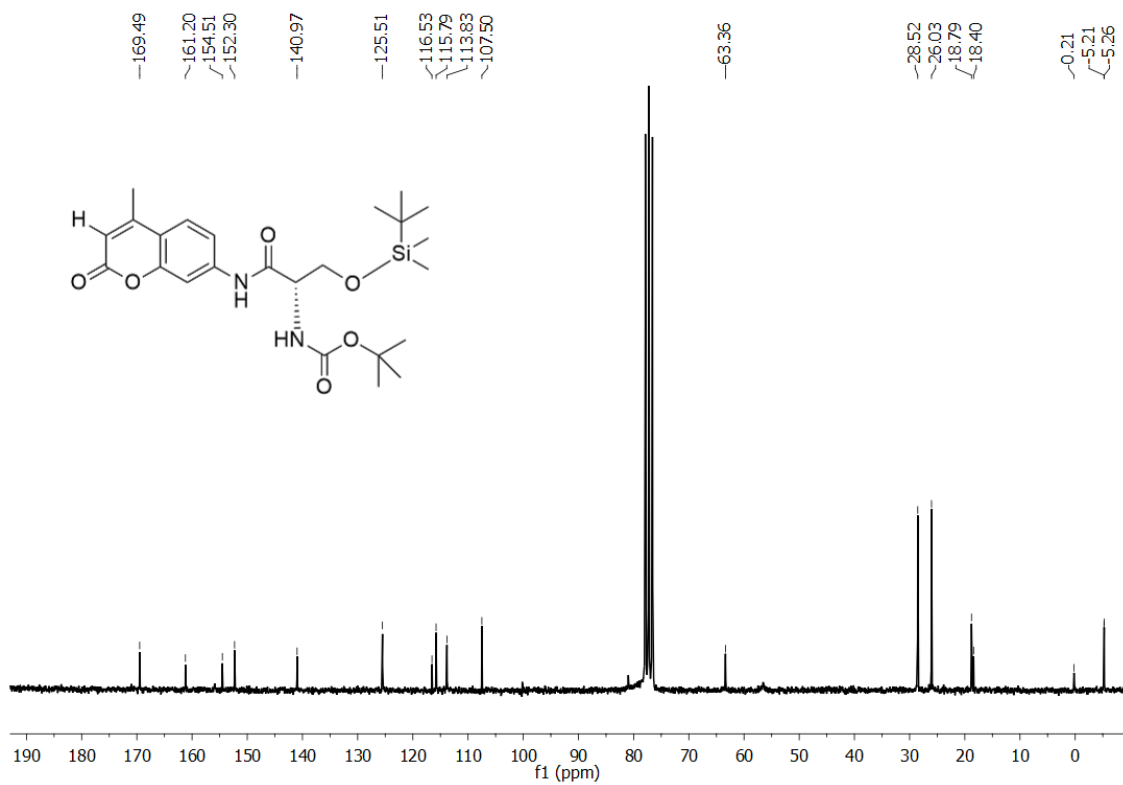
RF em EtOAc / Hexanes 2: 1 = 0.50. Ponto de fusão: 68 °C. Análise elementar (encontrado: C, 65,1; H, 6,7; N, 2,2 % CHNS requerido: C, 65,3; H, 6,6; N, 2,1). RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,36 – 8,20 (m, 1H); 7,72 (td, J = 6,7; 1,6 Hz, 2H); 7,42 – 7,28 (m, 1H); 7,08 – 6,80 (m, 3H); 6,64 – 6,40 (m, 2H); 5,41 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 4,62 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 4,33 – 3,83 (m, 4H); 1,48 (s, 9H); 0,98 (t, J = 7,1 Hz, 3H); 0,90 (d, J = 0,8 Hz, 9H); 0,16 – 0,02 (m, 6H). RMN de <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 186,19; 169,19; 165,41; 158,74; 155,65; 154,09; 152,90; 149,16; 134,07; 132,94; 131,60; 130,99; 130,90; 130,68; 130,57; 130,07; 128,91; 119,95; 119,42; 118,22; 110,23; 106,46; 80,61; 63,95; 61,69; 56,18; 28,52; 25,98; 18,45; 13,78; 0,20; -5,28. MALDI-TOF-MS [calculado (encontrado)]: 662,28 (662,28) [M+H]. UV-vis [Acetonitrila; λ<sub>max</sub>, nm (ε<sub>max</sub>, dm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>): 337 (10727), 428 (16019), 444 (15835). Emissão de fluorescência em acetonitrila (λ<sub>exc</sub> = 428 nm, λ<sub>em</sub> = 546 nm). IV (Janela de BaF<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2954, 2933, 2859, 1774, 1717, 1645, 1598, 1523, 1367, 1259, 1153, 1106, 838, 777.

**(R)-ethyl 2-(6-((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-((4-methylbenzyl)thio)propanoyl)oxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (18)**. Mesmo procedimento realizado para a obtenção de **17**, utilizando a Boc-Cys(4-MeBzl)-OH em substituição à Boc-Ser(TBDMS)-OH (**8**). O composto **18** foi obtido puro na forma de sólido alaranjado com 90% de rendimento. RF em acetato de etila/hexanos 2:1 = 0,54. Ponto de fusão: 66 °C. Análise Elementar (encontrado: C, 68,1; H, 5,7; N, 2,1; S, 4,7 % CHNS requerido: C, 68,4; H, 5,6; N, 2,1; S, 4,8). RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,43 – 8,17 (m, 3H); 7,92 – 7,55 (m, 6H); 7,04 (ddd, J = 19,0; 15,8; 12,5 Hz; 28H); 6,69 – 6,41 (m, 4H); 5,33 (d, J = 7,6 Hz, 3H); 4,74 (d, J = 7,6 Hz, 4H); 4,06 (q, J = 7,1 Hz, 7H); 3,77 (s, 5H); 2,98 (d, J = 5,4 Hz, 5H); 2,33 (s, 9H); 1,47 (s, 30H); 0,99 (t, J = 7,1 Hz, 8H). RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 186,01; 172,95; 169,19; 165,09; 158,64; 157,50; 155,13; 153,74; 152,64; 149,54; 137,09; 134,15; 133,75; 132,70; 131,35; 130,59; 130,47; 130,38; 129,89; 129,74; 129,36; 129,14; 128,79; 121,87; 119,63; 119,26; 118,10; 115,21; 110,06; 106,08; 103,81; 80,59; 61,45; 53,49; 36,39; 33,11; 28,24; 21,06; 13,57. MALDI-TOF-MS [calculado(encontrado)]: 668,23 (668,23) [M+H]. UV-vis [Acetonitrila; λ<sub>max</sub>, nm (ε<sub>max</sub>, dm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>): 336 (9360), 428 (14425), 445 (14350). Emissão de fluorescência em acetonitrila (λ<sub>exc</sub> = 428 nm, λ<sub>em</sub> = 546 nm). IV (Janela de BaF<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2974, 2918, 1771, 1715, 1639, 1598, 1509, 1263, 1158, 860.

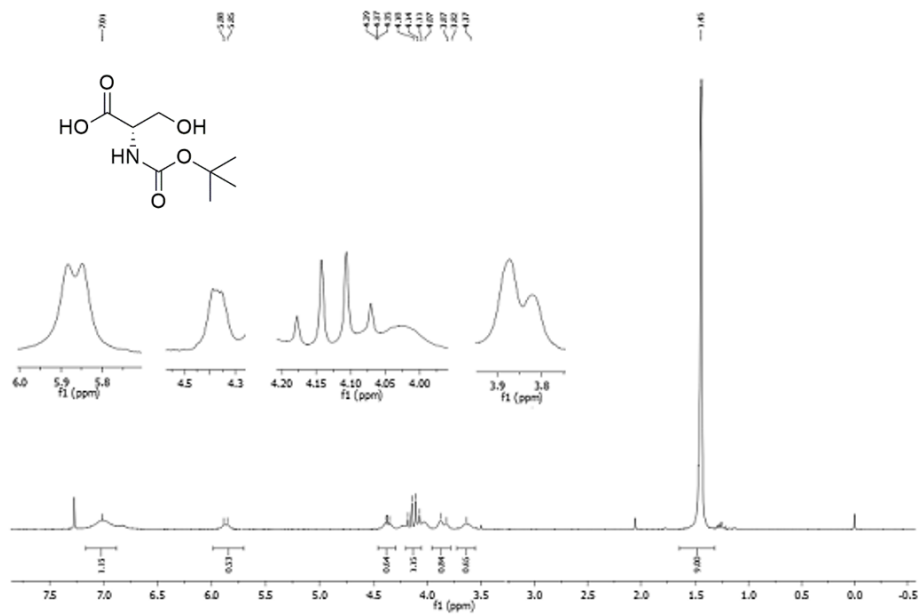
#### 4.4. Espectros seleccionados.



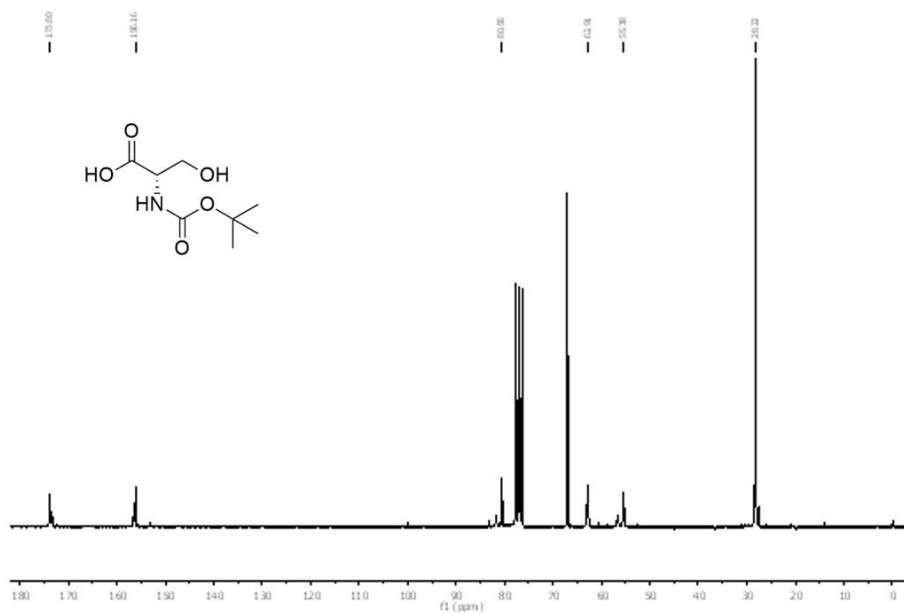
Composto 4. RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



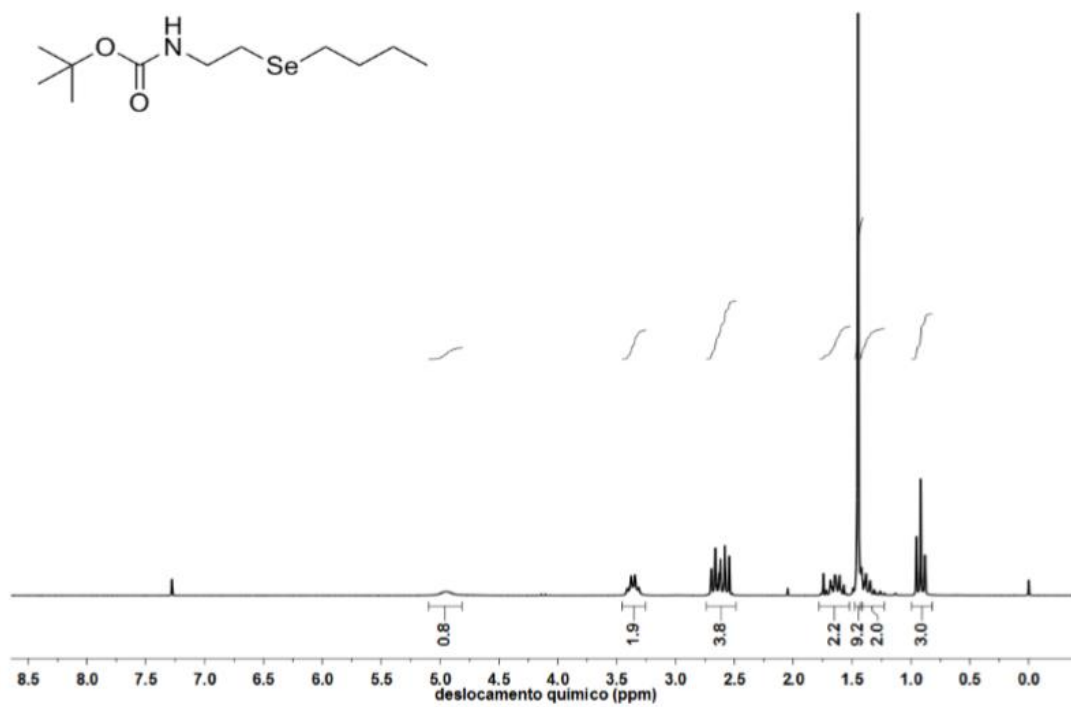
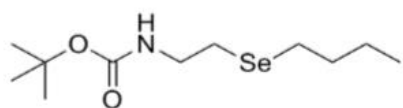
Composto 4. RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



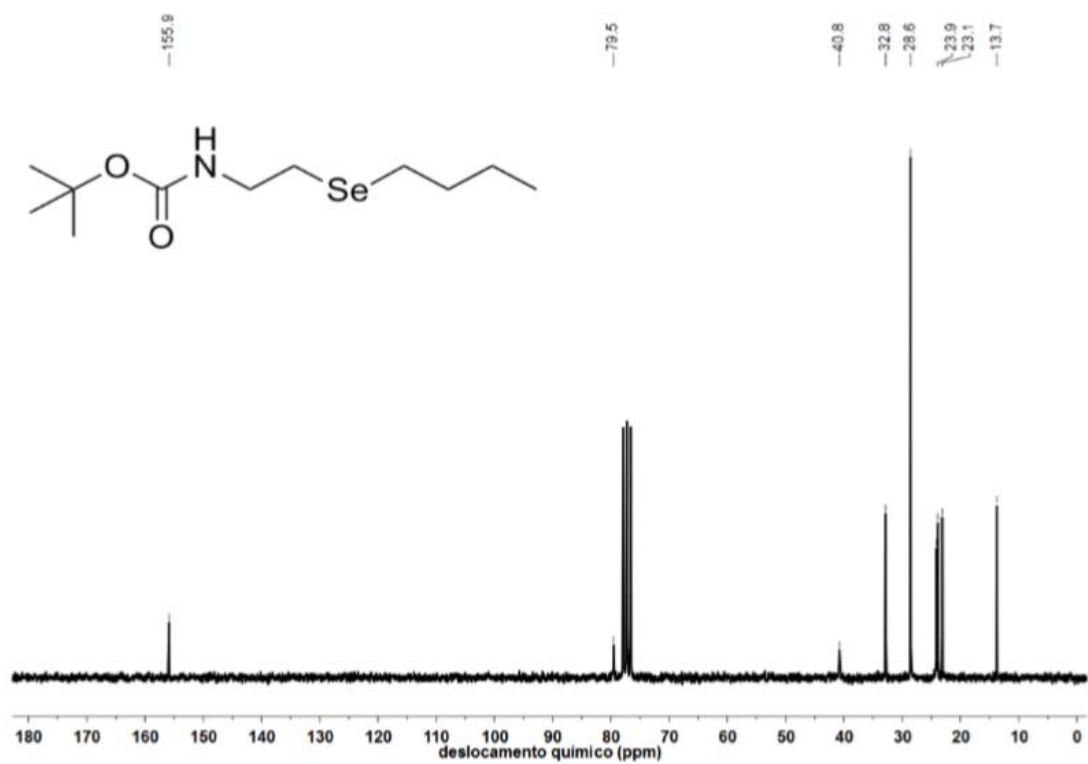
Composto 7. RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Composto 7. RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

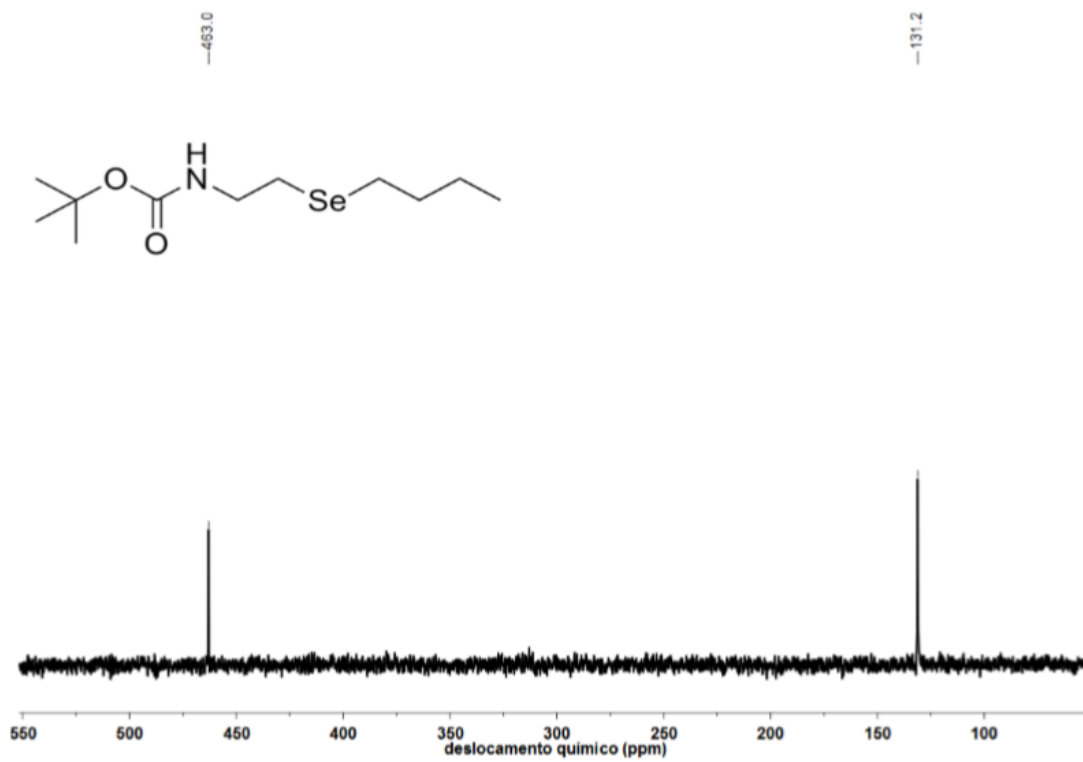


Composto 12. RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Composto 12. RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).





Composto 12. RMN de  $^{77}\text{Se}$  (38,3 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

## 5. Referências Bibliográficas

---

- (1) Duke, J. A.; DuCellier, J. L. *CRC Handbook of Alternative Cash Crops*; CRC Press: Boca Raton, 1993.
- (2) Parker, E.; Lewington, A. *Ancient Trees: Trees That Live for a Thousand Years*, 1st Editio.; Collins Brow, 1999.
- (3) Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (8), 887–916.
- (4) Gai, L.; Mack, J.; Lu, H.; Nyokong, T.; Li, Z.; Kobayashi, N.; Shen, Z. Organosilicon Compounds as Fluorescent Chemosensors for Fluoride Anion Recognition. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *285*, 24–51.
- (5) Duke, R. M.; Veale, E. B.; Pfeffer, F. M.; Kruger, P. E.; Gunnlaugsson, T. Colorimetric and Fluorescent Anion Sensors: An Overview of Recent Developments in the Use of 1,8-Naphthalimide-Based Chemosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (10), 3936–3953.
- (6) Browne, D.; Whelton, H.; O’Mullane, D. Fluoride Metabolism and Fluorosis. *J. Dent.* **2005**, *33* (3), 177–186.
- (7) Harrison, P. T. C. Fluoride in Water: A UK Perspective. *J. Fluor. Chem.* **2005**, *126* (11–12), 1448–1456.
- (8) WHO. *WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. 4th Edition*; 2011; Vol. 38.
- (9) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis. In *Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis*; 2007; pp 16–366.
- (10) Turro, N. J.; Ramamurthy, V.; Scaiano, J. C. *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*; 2012; Vol. 88.
- (11) Yang, X.-F. Novel Fluorogenic Probe for Fluoride Ion Based on the Fluoride-Induced Cleavage of Tert-Butyldimethylsilyl Ether. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2007**, *67* (2), 321–326.
- (12) Sokkalingam, P.; Lee, C. H. Highly Sensitive Fluorescence “Turn-on” Indicator for Fluoride Anion with Remarkable Selectivity in Organic and Aqueous Media. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (10), 3820–3828.
- (13) Kim, S. Y.; Park, J.; Koh, M.; Park, S. B.; Hong, J.-I. Fluorescent Probe for Detection of Fluoride in Water and Bioimaging in A549 Human Lung Carcinoma Cells. *Chem. Commun.* **2009**, No. 31, 4735.
- (14) Park, M.; Jang, D.; Young Kim, S.; Hong, J.-I. A Chemodosimetric Gelation System Showing Fluorescence and Sol-to-Gel Transition for Fluoride Anions in Aqueous Media. *New J. Chem.* **2012**, *36* (5), 1145.
- (15) Ghosh, K.; Kar, D.; Fröhlich, R.; Chattopadhyay, A. P.; Samadder, A.; Khuda-Bukhsh, A. R. O-Tert-Butyldiphenylsilyl Coumarin and Dicoumarol: A Case toward Selective Sensing of F<sup>-</sup> Ions in Organic and Aqueous Environments. *Analyst* **2013**, *138* (10), 3038.
- (16) Abebe, F. a.; Eribal, C. S.; Ramakrishna, G.; Sinn, E. A “turn-on” Fluorescent Sensor for the Selective Detection of Cobalt and Nickel Ions in Aqueous Media. *Tetrahedron Lett.*

**2011**, 52 (43), 5554–5558.

- (17) Massue, J.; Frath, D.; Ulrich, G. Synthesis of Luminescent 2-(2'-Hydroxyphenyl) Benzoxazole (HBO) Borate Complexes. *Org. Lett.* **2011**, No. c, 2008–2011.
- (18) Habib Jiwan, J.-L.; Branger, C.; Soumillion, J.-P.; Valeur, B. Ion-Responsive Fluorescent Compounds V. Photophysical and Complexing Properties of Coumarin 343 Linked to Monoaza-15-Crown-5. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1998**, 116 (2), 127–133.
- (19) Desai, V.; Kaler, S. G. Role of Copper in Human Neurological Disorders 1 – 3. *Am. Soc. Clin. Nutr.* **2008**, 88, 855–858.
- (20) Atwood, C. S.; Moir, R. D.; Scarpa, R. C.; Michael, N. E.; Romano, D. M.; Mariana, a; Tanzi, R. E.; Ashley, I.; Huang, X.; Bacarra, N. M. E.; et al. PROTEIN CHEMISTRY AND STRUCTURE : Dramatic Aggregation of Alzheimer A  $\beta$  by Cu ( II ) Is Induced by Conditions Representing Physiological Acidosis Dramatic Aggregation of Alzheimer A  $\beta$  by Cu ( II ) Is Induced by Conditions Representing Physiological Acidos. **1998**, 273 (li), 12817–12826.
- (21) Huang, X.; Cuajungco, M. P.; Atwood, C. S.; Hartshorn, M. a.; Tyndall, J. D. a; Hanson, G. R.; Stokes, K. C.; Leopold, M.; Multhaup, G.; Goldstein, L. E.; et al. Cu ( II ) Potentiation of Alzheimer A $\beta$  Neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (52), 37111–37116.
- (22) Chen, X.; Jou, M. J.; Lee, H.; Kou, S.; Lim, J.; Nam, S. W.; Park, S.; Kim, K. M.; Yoon, J. New Fluorescent and Colorimetric Chemosensors Bearing Rhodamine and Binaphthyl Groups for the Detection of Cu<sup>2+</sup>. *Sensors Actuators, B Chem.* **2009**, 137 (2), 597–602.
- (23) Li, P.; Duan, X.; Chen, Z.; Liu, Y.; Xie, T.; Fang, L.; Li, X.; Yin, M.; Tang, B. A Near-Infrared Fluorescent Probe for Detecting Copper(II) with High Selectivity and Sensitivity and Its Biological Imaging Applications. *Chem. Commun. (Camb).* **2011**, 47 (27), 7755–7757.
- (24) Tang, B.; Yu, F. B.; Zhang, W. S.; Li, P.; Xing, Y. L.; Tong, L. L.; Ma, J. P. Cu(2+)-Selective Naked-Eye and Fluorescent Probe: Its Crystal Structure and Application in Bioimaging. *Analyst* **2009**, 134 (9), 1826–1833.
- (25) Xu, Z.; Yoon, J.; Spring, D. R. A Selective and Ratiometric Cu<sup>2+</sup> Fluorescent Probe Based on Naphthalimide Excimer-Monomer Switching. *Chem. Commun. (Camb).* **2010**, 46, 2563–2565.
- (26) You, Q.-H.; Lee, A. W.-M.; Chan, W.-H.; Zhu, X.-M.; Leung, K. C.-F. A Coumarin-Based Fluorescent Probe for Recognition of Cu(2+) and Fast Detection of Histidine in Hard-to-Transfect Cells by a Sensing Ensemble Approach. *Chem. Commun. (Camb).* **2014**, 50 (47), 6207–6210.
- (27) Yu, C.; Zhang, J.; Wang, R.; Chen, L. Highly Sensitive and Selective Colorimetric and Off-on Fluorescent Probe for Cu<sup>2+</sup> Based on Rhodamine Derivative. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 5277–5279.
- (28) Chemler, S. R. Copper Catalysis in Organic Synthesis. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, 11, 2252–2253.
- (29) Núñez, C.; Diniz, M.; Dos Santos, A. a.; Capelo, J. L.; Lodeiro, C. New Rhodamine Dimer Probes for Mercury Detection via Color Changes and Enhancement of the Fluorescence Emission: Fast Recognition in Cellulose Supported Devices. *Dye. Pigment.* **2014**, 101, 156–163.
- (30) Pinheiro, D.; De Castro, C. S.; Seixas De Melo, J. S.; Oliveira, E.; Nuñez, C.; Fernández-

- Lodeiro, A.; Capelo, J. L.; Lodeiro, C. From Yellow to Pink Using a Fluorimetric and Colorimetric Pyrene Derivative and Mercury (II) Ions. *Dye. Pigment.* **2014**, *110*, 152–158.
- (31) Gonçalves, A. C.; Pilla, V.; Oliveira, E.; Santos, S. M.; Capelo, J. L.; Dos Santos, A. A.; Lodeiro, C. The Interaction of Hg<sup>2+</sup> and Trivalent Ions with Two New Fluorescein Bio-Inspired Dual Colorimetric/Fluorimetric Probes. *Dalt. Trans.* **2016**.
- (32) Cunico, R. F.; Bedell, L. The Triisopropylsilyl Group as a Hydroxyl-Protecting Function. *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (23), 4797–4798.
- (33) Collington, E. W.; Finch, H.; Smith, I. J. Selective Deprotection of Alcoholic and Phenolic Silyl Ethers. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26* (5), 681–684.
- (34) Nicolaou, K. C.; Bunnage, M. E.; Koide, K. Total Synthesis of Balanol. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (18), 8402–8403.
- (35) Johnson, T. O.; Hua, Y.; Luu, H. T.; Brown, E. L.; Chan, F.; Chu, S. S.; Dragovich, P. S.; Eastman, B. W.; Ferre, R. A.; Fuhrman, S. A.; et al. Structure-Based Design of a Parallel Synthetic Array Directed toward the Discovery of Irreversible Inhibitors of Human Rhinovirus 3C Protease. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (10), 2016–2023.
- (36) Sigel, H.; Martin, R. B.; Depamwini, C.; Vokonia, W. Coordinating Properties of the Amide Bond. Stability and Structure of Metal Ion Complexes of Peptides and Related Ligands. **1982**, 385–426.
- (37) Dietzsch, W.; Reinhold, J.; Kirmse, R.; Hoyer, E.; Marov, I. N.; Belyaeva, V. K. Ligand Exchange Reactions between Copper(II)- and Nickel(II)-Chelates of Different Sulfur- and Selenium-Containing Ligands. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1977**, *39* (8), 1377–1384.
- (38) Reynolds, G. A.; Drexhage, K. H. New Coumarin Dyes with Rigidized Structure for Flashlamp-Pumped Dye Lasers. *Opt. Commun.* **1975**, *13* (3), 222–225.
- (39) de Silva, A. P.; Moody, T. S.; Wright, G. D. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) Sensors as Potent Analytical Tools. *Analyst* **2009**, *134* (12), 2385–2393.
- (40) Fernández-Lodeiro, J.; Pinatto-Botelho, M. F.; Soares-Paulino, A. a.; Gonçalves, A. C.; Sousa, B. a.; Princival, C.; Dos Santos, A. a. Synthesis and Biological Properties of Selenium- and Tellurium-Containing Dyes. *Dye. Pigment.* **2014**, *110*, 28–48.
- (41) Jung, H. S.; Han, J. H.; Kim, Z. H.; Kang, C.; Kim, J. S. Coumarin-Cu (II) Ensemble-Based Cyanide Sensing Chemodosimeter. **2011**, No. ii, 8–11.
- (42) Taziaux, D.; Soumillion, J.; Jiwan, J. H. Photophysical and Complexing Properties of New Fluoroionophores Based on Coumarin 343 Linked to Rigidified Crown-Ethers. **2004**, *162*, 599–607.
- (43) Renny, J. S.; Tomasevich, L. L.; Tallmadge, E. H.; Collum, D. B. Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (46), 11998–12013.
- (44) McNaught, A. D.; Wilkinson, A. Isosbestic Point. In *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1997.
- (45) Razi, S. S.; Srivastava, P.; Ali, R.; Gupta, R. C.; Dwivedi, S. K.; Misra, A. A Coumarin-Derived Useful Scaffold Exhibiting Cu<sup>2+</sup> Induced Fluorescence Quenching and Fluoride Sensing (On-Off-On) via Copper Displacement Approach. *Sensors Actuators, B Chem.* **2015**, *209*, 162–171.

- (46) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. Talanta Suite of Programs. *Talanta* **1996**, *43*, 1739–1753.
- (47) Hungerford, G.; Benesch, J.; Mano, J. F.; Reis, R. L. Effect of the Labelling Ratio on the Photophysics of Fluorescein Isothiocyanate (FITC) Conjugated to Bovine Serum Albumin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6* (2), 152–158.
- (48) Kaur, K.; Saini, R.; Kumar, A.; Luxami, V.; Kaur, N.; Singh, P.; Kumar, S. Chemodosimeters: An Approach for Detection and Estimation of Biologically and Medically Relevant Metal Ions, Anions and Thiols. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (17–18), 1992–2028.
- (49) Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. Absorption and Fluorescence Properties of Fluorescein. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1995**, *51* (6), L7–L21.
- (50) Zhang, X.-F.; Zhang, J.; Liu, L. Fluorescence Properties of Twenty Fluorescein Derivatives: Lifetime, Quantum Yield, Absorption and Emission Spectra. *J. Fluoresc.* **2014**, *24* (3), 819–826.
- (51) Zhang, L.; Zhang, X. A Selectively Fluorescein-Based Colorimetric Probe for Detecting Copper(II) Ion. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *133*, 54–59.
- (52) Yang, X.-F.; Li, Y.; Bai, Q. A Highly Selective and Sensitive Fluorescein-Based Chemodosimeter for Hg<sup>2+</sup> Ions in Aqueous Media. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *584* (1), 95–100.
- (53) Oliveira, E.; Lorenzo, J.; Cid, A.; Capelo, J. L.; Lodeiro, C. Non-Toxic Fluorescent Alanine–fluorescein Probe with Green Emission for Dual Colorimetric/Fluorimetric Sensing. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2013**, *269*, 17–26.
- (54) Marnett, M.; Lippolis, V.; Caltagirone, C.; Capelo, J. L.; Faza, O. N.; Lodeiro, C. Hg<sup>2+</sup> Detection by New Anthracene Pendant-Arm Derivatives of Mixed N/S- and N/S/O-Donor Macrocycles: Fluorescence, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and Density Functional Theory Studies. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (18), 8276–8286.
- (55) Kim, H. N.; Ren, W. X.; Kim, J. S.; Yoon, J. Fluorescent and Colorimetric Sensors for Detection of Lead, Cadmium, and Mercury Ions. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (8), 3210–3244.
- (56) Liu, W.-Y.; Shen, S.-L.; Li, H.-Y.; Miao, J.-Y.; Zhao, B.-X. Fluorescence Turn-on Chemodosimeter for Rapid Detection of Mercury (II) Ions in Aqueous Solution and Blood from Mice with Toxicosis. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *791*, 65–71.
- (57) Boening, D. W. Ecological Effects, Transport, and Fate of Mercury: A General Review. *Chemosphere* **2000**, *40* (12), 1335–1351.
- (58) Hu, J.; Li, J.; Qi, J.; Chen, J. Highly Selective and Effective Mercury(II) Fluorescent Sensors. *New J. Chem.* **2015**, *39* (2), 843–848.
- (59) Ekino, S.; Susa, M.; Ninomiya, T.; Imamura, K.; Kitamura, T. Minamata Disease Revisited: An Update on the Acute and Chronic Manifestations of Methyl Mercury Poisoning. *J. Neurol. Sci.* **2007**, *262* (1–2), 131–144.
- (60) Mertz, W. Chromium in Human Nutrition: A Review. *J. Nutr.* **1993**, *123* (4), 626–633.
- (61) Jeejeebhoy, K. N. Potential Toxin. *Nutr. Rev.* **1999**, *57* (11), 329–335.

- (62) Dayan, a. D.; Paine, a. J. Mechanisms of Chromium Toxicity, Carcinogenicity and Allergenicity: Review of the Literature from 1985 to 2000. *Hum. Exp. Toxicol.* **2001**, *20* (9), 439–451.
- (63) Gordon, B.; Callan, P.; Vickers, C. WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. *WHO Chron.* **2008**, *38* (3), 564.
- (64) Krewski, D.; Yokel, R. a; Nieboer, E.; Borchelt, D.; Cohen, J.; Harry, J.; Kacew, S.; Lindsay, J.; Mahfouz, A. M.; Rondeau, V. Human Health Risk Assessment for Aluminium, Aluminium Oxide, and Aluminium Hydroxide. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* **2007**, *10 Suppl 1* (August 2013), 1–269.
- (65) Han, S.; Lemire, J.; Appanna, V. P.; Auger, C.; Castonguay, Z.; Appanna, V. D. How Aluminum, an Intracellular ROS Generator Promotes Hepatic and Neurological Diseases: The Metabolic Tale. *Cell Biol. Toxicol.* **2013**, *29* (2), 75–84.
- (66) Rondeau, V.; Commenges, D.; Jacqmin-Gadda, H.; Dartigues, J. F. Relation between Aluminum Concentrations in Drinking Water and Alzheimer’s Disease: An 8-Year Follow-up Study. *Am. J. Epidemiol.* **2000**, *152* (1), 59–66.
- (67) Daly, B.; Ling, J.; de Silva, a. P. Current Developments in Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) Sensors and Switches. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4203–4211.
- (68) Das, S.; Dutta, M.; Das, D. Fluorescent Probes for Selective Determination of Trace Level Al<sup>3+</sup>: Recent Developments and Future Prospects. *Anal. Methods* **2013**, *5* (22), 6262.
- (69) Chan, J.; Dodani, S. C.; Chang, C. J. Reaction-Based Small-Molecule Fluorescent Probes for Chemoselective Bioimaging. *Nat. Chem.* **2012**, *4* (12), 973–984.
- (70) Carter, K. P.; Young, A. M.; Palmer, A. E. Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4564–4601.
- (71) Olmsted, J. Calorimetric Determinations of Absolute Fluorescence Quantum Yields. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83* (20), 2581–2584.
- (72) Ueno, T.; Urano, Y.; Setsukinai, K. I.; Takakusa, H.; Kojima, H.; Kikuchi, K.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S.; Nagano, T. Rational Principles for Modulating Fluorescence Properties of Fluorescein. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (43), 14079–14085.
- (73) Peng, T.; Yang, D. Construction of a Library of Rhodol Fluorophores for Developing New Fluorescent Probes. *Org. Lett.* **2010**, *12* (3), 496–499.
- (74) Nolan, E. M.; Lippard, S. J. Tools and Tactics for the Optical Detection of Mercuric Ion. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (9), 3443–3480.
- (75) Tamayo, A.; Pedras, B.; Lodeiro, C.; Escriche, L.; Casabo, J.; Capelo, L.; Covelo, B.; Kiveka, R.; Sillanpa, R. Exploring the Interaction of Mercury ( II ) by N 2 S 2 and NS 3 Anthracene-Containing Macrocyclic Ligands : Photophysical , Analytical , and Structural Studies. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (19), 159–165.
- (76) Zhang, Y.; Yang, Y.; Hao, J.; Yin, C.; Huo, F.; Chao, J.; Liu, D. Spectroscopic Study of the Recognition of 2-Quinolinone Derivative on Mercury Ion. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *132*, 27–31.
- (77) Yang, Y.; Yook, K.; Tae, J. A Rhodamine-Based Fluorescent and Colorimetric Chemodosimeter for the Rapid Detection of Hg<sup>2+</sup> Ions in Aqueous Media. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *1*, 16760–16761.

- (78) Zhang, G.; Zhang, D.; Yin, S.; Yang, X.; Shuai, Z.; Zhu, D. 1,3-Dithiole-2-Thione Derivatives Featuring an Anthracene Unit: New Selective Chemodosimeters for Hg(II) Ion. *Chem. Commun.* **2005**, 6 (16), 2161–2163.
- (79) Guo, X.; Qian, X.; Jia, L. A Highly Selective and Sensitive Fluorescent Chemosensor for Hg<sup>2+</sup> in Neutral Buffer Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (8), 2272–2273.
- (80) Hennrich, G.; Walther, W.; Resch-genger, U.; Sonnenschein, H. Cu ( II ) - and Hg ( II ) - Induced Modulation of the Fluorescence Behavior of a Redox-Active Sensor Molecule. *Inorg. Chem.* **2001**, 40 (4), 641–644.
- (81) Zhao, Y.; Lin, Z.; He, C.; Wu, H.; Duan, C. A “Turn-on” Fluorescent Sensor for Selective Hg(II) Detection in Aqueous Media Based on Metal-Induced Dye Formation. *Inorg. Chem.* **2006**, 45 (25), 10013–10015.
- (82) Barba-bon, A.; Costero, A. M.; Gil, S.; Parra, M.; Soto, J. ChemComm A New Selective Fluorogenic Probe for Trivalent Cations W. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3000–3002.
- (83) Huo, F.; Sun, Y.; Su, J.; Yang, Y.; Yin, C. Chromene “ Lock ”, Thiol “ Key ”, and Mercury ( II ) Ion “ Hand ”: A Single. **2010**, No. II, 1257–1260.
- (84) Klonis, N.; Sawyer, W. H. The Thiourea Group Modulates the Fluorescence Emission Decay of Fluorescein-Labeled Molecules. *Photochem. Photobiol.* **2003**, 77 (5), 502–509.
- (85) WHO, W. H. O. WHO | Mercury and health  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/en/>.
- (86) Goswami, S.; Maity, S.; Maity, A. C.; Das, A. kumar; Pakhira, B.; Khanra, K.; Bhattacharyya, N.; Sarkar, S. ESIPT Based Hg<sup>2+</sup> and Fluoride Chemosensor for Sensitive and Selective ‘Turn on’ Red Signal and Cell Imaging. *RSC Adv.* **2015**, 5 (8), 5735–5740.
- (87) Fernández-Lodeiro, J.; Nuñez, C.; Lodeiro, A. F.; Oliveira, E.; Rodríguez-González, B.; Dos Santos, A. a.; Capelo, J. L.; Lodeiro, C. New-Coated Fluorescent Silver Nanoparticles with a Fluorescein Thiol Esther Derivative: Fluorescent Enhancement upon Interaction with Heavy Metal Ions. *J. Nanoparticle Res.* **2014**, 16 (3), 2315.
- (88) Dang, F.; Wang, W.-X. Antagonistic Interaction of Mercury and Selenium in a Marine Fish Is Dependent on Their Chemical Species. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45 (7), 3116–3122.
- (89) Falnoga, I.; Tušek-Žnidarič, M. Selenium–Mercury Interactions in Man and Animals. *Biol. Trace Elem. Res.* **2007**, 119 (3), 212–220.
- (90) Ralston, N. V. C.; Raymond, L. J. Dietary Selenium’s Protective Effects against Methylmercury Toxicity. *Toxicology* **2010**, 278 (1), 112–123.
- (91) Demchenko, A. P. *Introduction to Fluorescence Sensing*, 2nd Editio.; Springer International Publishing: Cham, 2015.
- (92) Ludwig, R.; Dzung, N. T. K. Calixarene-Based Molecules for Cation Recognition. *Sensors* **2002**, 2 (10), 397–416.
- (93) Wu, J.-S.; Zhou, J.-H.; Wang, P.-F.; Zhang, X.-H.; Wu, S.-K. New Fluorescent Chemosensor Based on Exciplex Signaling Mechanism. *Org. Lett.* **2005**, 7 (11), 2133–2136.
- (94) Youn, N. J.; Kim, J. S.; Song, K. C.; Kim, S. H.; Ahn, S.; Chang, S. Cyclam Based Hg ( II ) - and Cu ( II ) -Selective Fluoroionophore Having Appended Pyrene Function. **2005**, 26 (5),

849–851.

- (95) Lodeiro, C.; Lima, J. C.; Parola, a. J.; Seixas de Melo, J. S.; Capelo, J. L.; Covelo, B.; Tamayo, a.; Pedras, B. Intramolecular Excimer Formation and Sensing Behavior of New Fluorimetric Probes and Their Interactions with Metal Cations and Barbituric Acids. *Sensors Actuators B Chem.* **2006**, *115* (1), 276–286.
- (96) Kim, H. J.; Kim, S. H.; Quang, D. T.; Kim, J. H.; Suh, I.; Kim, J. S. Highly Selective Fluorescent Signaling for Al<sup>3+</sup> in Bispyrenyl Polyether. **2007**, *28* (5), 811–815.
- (97) Wang, H. F.; Wu, S. P. A Pyrene-Based Highly Selective Turn-on Fluorescent Sensor for Copper(II) Ions and Its Application in Living Cell Imaging. *Sensors Actuators, B Chem.* **2013**, *181*, 743–748.
- (98) Khakhel, O. a. Absorption Spektra of Pyrene Aggregates in Saturated Solutions. *J. Appl. Spectrosc.* **2001**, *68* (2), 280–286.
- (99) Zhao, Z.; Chen, S.; Lam, J. W. Y.; Wang, Z.; Lu, P.; Mahtab, F.; Sung, H. H. Y.; Williams, I. D.; Ma, Y.; Kwok, H. S.; et al. Pyrene-Substituted Ethenes: Aggregation-Enhanced Excimer Emission and Highly Efficient Electroluminescence. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (20), 7210.
- (100) Castanheira, E. M. S.; Martinho, J. M. G. Thermochemical Shifts of Pyrene Excimer Fluorescence. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *206* (1–4), 45–48.
- (101) Singla, P.; Kaur, P.; Singh, K. A Fluorescent Probe for the Detection of Hg<sup>2+</sup>: Shift from “on-State A” to “on-State B.” *Talanta* **2014**, *130*, 571–576.
- (102) Fernández-Lodeiro, J.; Núñez, C.; de Castro, C. S.; Bértolo, E.; Seixas de Melo, J. S.; Capelo, J. L.; Lodeiro, C. Steady-State and Time-Resolved Investigations on Pyrene-Based Chemosensors. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (1), 121–129.
- (103) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds 7ed 2005 - Silverstein, Webster & Kiemle.Pdf*; 2005; Vol. 21.
- (104) Wirth, M. J. Solvation Effects on Spectroscopic Measurements. *TrAC Trends Anal. Chem.* **1982**, *1* (16), 383–386.
- (105) Lerner, M. B.; Reszczenski, J. M.; Amin, A.; Johnson, R. R.; Goldsmith, J. I.; Johnson, a. T. C. Toward Quantifying the Electrostatic Transduction Mechanism in Carbon Nanotube Molecular Sensors. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14318–14321.
- (106) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 2006.



## 6. Anexos

---

## SÚMULA CURRICULAR

### DADOS PESSOAIS

Nome: Augusto Cesar Gonçalves

Local e data de nascimento: Cambé, Paraná. 16/07/1986

Endereço Residencial: Rua José Lucas Pinheiro Filho, 75. Cambé, Paraná. Brasil.

Email: aucegon@yahoo.com.br

Telefone: +55 11 95803 2460/+55 43 3254 4510

### EDUCAÇÃO

- Colégio Estadual Olavo Bilac. Cambé, Paraná. 2003. Ensino Médio.
- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná. 2008. Bacharelado em Química com Habilitação em Química Tecnológica.
- Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo. Mestrado em Química Orgânica. 2012.

### OCUPAÇÃO

Químico de Pesquisa e Desenvolvimento. Nortox SA, Arapongas, Paraná.

## PUBLICAÇÕES

### Artigos Completos publicados em periódicos

GONÇALVES, AUGUSTO C.; CAPELO, JOSÉ LUIS; LODEIRO, CARLOS; SANTOS, ALCINDO A. DOS. A seleno-pyrene selective probe for Hg<sup>2+</sup> detection in either aqueous or aprotic systems. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, v. 239, p. 311-318, 2017.

GONÇALVES, A. C.; PILLA, V.; OLIVEIRA, E.; SANTOS, S. M.; CAPELO, J. L.; DOS SANTOS, A. A.; LODEIRO, C. The interaction of Hg and trivalent ions with two new fluorescein bio-inspired dual colorimetric/fluorimetric probes. *Dalton Transactions (2003. Print)*, v. 45, p. 9513-9522, 2016.

GONÇALVES, AUGUSTO C.; SATO, NAYARA C. ; SANTOS, HUGO M. ; CAPELO, JOSÉ LUIS ; LODEIRO, CARLOS ; DOS SANTOS, ALCINDO A. . The confidence of blue: A new highly selective bio-inspired coumarin emissive probe for fluoride recognition. *Dyes and Pigments*, v. 135, p. 177-183, 2016.

GONÇALVES, AUGUSTO C.; CAPELO MARTINEZ, JOSE LUIS ; LODEIRO, CARLOS ; DOS SANTOS, ALCINDO APARECIDO . A selective emissive chromogenic and fluorogenic seleno-coumarin probe for Cu<sup>2+</sup> detection in aprotic media. *PHOTOCHEMICAL & PHOTOBIOLOGICAL SCIENCES*, v. 16, p. 1174-1181, 2017.

FERNÁNDEZ-LODEIRO, JAVIER ; PINATTO-BOTELHO, MARCOS FELIPE ; SOARES-PAULINO, ANTÔNIO A. ; GONÇALVES, AUGUSTO CESAR ; SOUSA, BRUNO A. ; PRINCIVAL, CLEVERSON ; DOS SANTOS, ALCINDO A. . Synthesis and Biological Properties of Selenium- and Tellurium-containing Dyes. *Dyes and Pigments*, v. 110, p. 28-48, 2014.

TAKATA, LEANDRO M. S. ; GONÇALVES, AUGUSTO C. ; ANDO, RÔMULO A. ; DOS SANTOS, ALCINDO A. ; CAMARGO, PEDRO H. C. . Functionalization of gold and silver nanoparticles with diphenyl dichalcogenides probed by surface enhanced Raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 42, p. n/a-n/a, 2011.

REIS DE SÁ, LEANDRO FIGUEIRA ; TOLEDO, FABIANO TRAVANCA ; DE SOUSA, BRUNO ARTUR ; GONÇALVES, AUGUSTO CÉSAR ; TESSIS, ANA CLAUDIA ; WENDLER, EDISON P ; COMASSETO, JOÃO V ; DOS SANTOS, ALCINDO A ; FERREIRA-PEREIRA, ANTONIO . Synthetic organotelluride compounds induce the reversal of Pdr5p mediated fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiology (Online)*, v. 14, p. 201, 2014.

BRASIL, PAULA FERREIRA ; DE FREITAS, JÚLIA ARAÚJO ; BARRETO, ANNA LÉA SILVA ; ADADE, CAMILA MARQUES ; REIS DE SÁ, LEANDRO FIGUEIRA ; CONSTANTINO-TELES, PAMELLA ; TOLEDO, FABIANO TRAVANCA ; DE SOUSA, BRUNO A. ; GONÇALVES, AUGUSTO CESAR ; ROMANOS, MARIA TERESA VILLELA ; COMASSETO, JOÃO V. ; DOS SANTOS, ALCINDO A. ; TESSIS, ANA CLAUDIA ; SOUTO-PADRÓN, THAIS ; SOARES, ROSANGELA MARIA A. ; FERREIRA-PEREIRA, ANTONIO . Antiproliferative and ultrastructural effects of phenethylamine derivatives on promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi. *Parasitology International (Print)*, v. 66, p. 47-55, 2017.

REIS DE SÁ, L. F. ; TOLEDO, F. T. ; GONÇALVES, A. C. ; Sousa, B. A. ; Dos SANTOS, A. A. ; BRASIL, P. F. ; DUARTE DA SILVA, V. A. ; TESSIS, A. C. ; RAMOS, J. A. ; CARVALHO, M. A. ; LAMPING, E. ; FERREIRA-PEREIRA, A. . Synthetic Organotellurium Compounds Sensitize Drug-Resistant *Candida albicans* Clinical Isolates to Fluconazole. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, v. 61, p. e01231-16, 2017.

### Resumos publicados em anais de congressos

GONÇALVES, AUGUSTO CESAR; LODEIRO, C. ; CAPELO, JOSÉ LUIS ; SANTOS, A. A. . A selective green emissive chromogenic and fluorogenic seleno-coumarin probe for Cu<sup>2+</sup> detection. In: 2nd International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials, 2016, Caparica. 2nd International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials, 2016.

GONÇALVES, AUGUSTO CESAR; Pilla, V. ; Oliveira, E. ; SANTOS, A. A. ; LODEIRO, C. ; CAPELO, JOSÉ LUIS . Toxic Ion Detection Using a Bio-inspired Fluorescein-aminoacid Probes. In: 2nd EuChemMS Congress on Green and Sustainable Chemistry, 2015, Lisboa. 2nd EuChemMS Congress on Green and Sustainable Chemistry, 2015.

GONÇALVES, AUGUSTO CESAR; SATO, NAYARA C. ; SANTOS, HUGO M. ; LODEIRO, C. ; CAPELO, JOSÉ LUIS ; SANTOS, A. A. . A new highly selective bio-inspired coumarin fluorogenic probe for fluoride recognition. In: 1st International Caparica Christmas Conference on Translational Chemistry, 2015, Caparica. 1st International Caparica Christmas Conference on Translational Chemistry, 2015.

GONÇALVES, AUGUSTO CESAR; Pilla, V. ; Oliveira, E. ; CAPELO, JOSÉ LUIS ; LODEIRO, C. ; SANTOS, A. A. . Fluorescein-aminoacid based probes for trivalent and Hg<sup>2+</sup> ions detection. In: Noite da Luz, 2015, Almada. Ano Internacional da Luz 2015, 2015.

Pilla, V. ; GONÇALVES, AUGUSTO CESAR ; SANTOS, A. A. ; CAPELO, JOSÉ LUIS ; LODEIRO, C. . Spectroscopic Characterization of Two New Fluorescein-Amino Acid Based Ligands in Different Solvents. In: 1st International Caparica Christmas Conference on Translational Chemistry, 2015, Caparica. 1st International Caparica Christmas Conference on Translational Chemistry, 2015.

SANTOS, A. A. ; PINATTO-BOTELHO, MARCOS FELIPE ; SOARES-PAULINO, ANTÔNIO A. ; GONÇALVES, A. C. ; FERNANDEZ-LODEIRO, J. ; DE SOUSA, BRUNO ARTUR ; PRINCIVAL, CLEVERSON . Selenium and Tellurium Fluorescent Probes for Reactive Oxygen Species Determination and Cell Labeling. In: IC3EM, 1st International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials, 2014, Caparica. Proceedings of the 1st IC3 EM, 1st International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials, 2014.

FERNANDEZ-LODEIRO, J. ; GONÇALVES, A. C. ; ANDO, RÔMULO A. ; SANTOS, A. A. ; LODEIRO, C. . Colorimetric Se@AgNP@Triple Bond chain-modulated nanomaterial as a new Silver(I) Chemosensor in water. In: 1st IC3EM, 1st International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials, 2014, Caparica. Proceedings of the 1st IC3EM, 1st International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials, 2014.

GONÇALVES, A. C.; ASSIS, F. F. ; FERNANDEZ-LODEIRO, J. ; LODEIRO, C. ; SANTOS, A. A. ; OLIVEIRA, K. T. ; COMASSETO, JOÃO V . Selenoporphyrine as a fluorescent probe: Understanding the role of several selenium atoms in the structure of a fluorescent sensor. In: 1st IC3EM, 1st International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials, 2014. Proceedings of the 1st IC3EM, 1st International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials.

TAKATA, LEANDRO M. S. ; GONÇALVES, AUGUSTO C. ; CAMARGO, PEDRO H. C. ; SANTOS, ALCINDO A. DOS . Functionalization of Au and Ag Nanoparticles with Novel Organodichalcogenide compounds. In: 14th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2013, Brasília. Proceedings of the 14th Brazilian Meeting on Organic Synthesis Proceedings. São Paulo: Editora Edgard Blücher. p. 225-P5-39.

GONÇALVES, A. C.; DOS SANTOS, A. A. . Seleno-amino acid-based helical polymers for organocatalysis and functionalization of nanoparticles. In: 15th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2013, Campos do Jordão. Proceedings of the 15th Brazilian Meeting on Organic Synthesis Proceedings. São Paulo: Editora Edgard Blücher. p. 90.

GONÇALVES, A. C.; TAKATA, L. ; CAMARGO, P. H. C. ; SANTOS, A. A. . Preparação de nanopartículas de Au e Ag funcionalizadas com organoselenetos arílicos e derivados de aminoácidos. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011. p. 124.

TAKATA, L. ; GONÇALVES, A. C. ; CAMARGO, P. H. C. ; SANTOS, A. A. . Preparação de Nanopartículas de Au e Ag Organoteluro-funcionalizadas. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011. p. 120.

GONÇALVES, A. C.; PAVAN, M. A. ; Miyazawa, M. . Análise Quantitativa de Fósforo Orgânico Por Digestão Via Fotocatálise Heterogênea Com TiO<sub>2</sub>/UV. In: XVI Seminário Do Programa de Iniciação Científica, 2008, Londrina. Resumos - XVI Seminário do Programa de Iniciação Científica - IAPAR, 2008.

OLIVEIRA, F. A. A. ; GOIS, J. S. de ; GONÇALVES, A. C. ; PELICHO, A. F. ; PAVAN, M. A. ; ARAUJO, P. M. . Biofortificação de Alimentos Básicos Para a Melhoria da Saúde da População Brasileira e Determinação do Teor de Proteína Total Nos Grãos de Milho. In: XXVII Congresso Nacional do Milho e Sorgo. 'Agroenergia, Produção de Alimentos e Mudanças Climáticas: Desafios para Milho e Sorgo', 2008, Londrina. Agroenergia, Produção de Alimentos e Mudanças Climáticas: Desafios para Milho e Sorgo, 2008. p. 675-675.

GOIS, J. S. de ; OLIVEIRA, F. A. A. ; GONÇALVES, A. C. ; PELICHO, A. F. ; PAVAN, M. A. ; ARAUJO, P. M. . Biofortificação de Alimentos Básicos Visando a Melhoria da Saúde da População Brasileira. Análise dos Teores de P, Ca, Mg, Cu, Mn, e S em Grãos de Milho. In: XXVII Congresso Nacional do Milho e Sorgo. 'Agroenergia, Produção de Alimentos e Mudanças CLimáticas: Desafios para Milho e Sorgo', 2008, Londrina. Agroenergia,

Produção de Alimentos e Mudanças Climáticas: Desafios para Milho e Sorgo, 2008. p. 676-676.

PELICO, A. F. ; OLIVEIRA, F. A. A. ; GONÇALVES, A. C. ; GOIS, J. S. de ; PAVAN, M. A. ; ARAUJO, P. M. . Determinação dos Teores Nutricionais de Ferro e Zinco Para a Biofortificação de Grãos de Milho. In: XXVII CONGRESSO NACIONAL DO MILHO E SORGO, 2008, Londrina. "Agroenergia, Produção de Alimentos e Mudanças Climáticas: Desafios para Milho e Sorgo", 2008.

GONÇALVES, A. C.; PAVAN, M. A. Determinação Espectrofotométrica de Fósforo Orgânico em Alimentos e Tecidos Vegetais por Digestão Via Fotocatálise Heterogênea com TiO<sub>2</sub>/UV. In: FERTBIO, 2008, Londrina. Desafios para o uso do solo com eficiência e qualidade ambiental, 2008.

PELICO, A. F.; OLIVEIRA, F. A. A. ; GONÇALVES, A. C. ; GOIS, J. S. de ; PAVAN, M. A. ; ARAUJO, P. M. . Determinações dos Teores Nutricionais de Ferro e Zinco Para a Biofortificação de Grãos de Milho. In: XXVII Congresso Nacional do Milho e Sorgo. 'Agroenergia, Produção de Alimentos e Mudanças Climáticas: Desafios para Milho e Sorgo', 2008, Londrina. Agroenergia, Produção de Alimentos e Mudanças Climáticas: Desafios para Milho e Sorgo, 2008.

GONÇALVES, A. C.; PAVAN, M. A. ; Miyazawa, M. . Métodos de Determinação de Fósforo Orgânico. In: XV Seminário Do Programa de Iniciação Científica, 2007, Londrina. Resumos - XV Seminário do Programa de Iniciação Científica - IAPAR, 2007.

GONÇALVES, A. C.; PAVAN, M. A. ; Miyazawa, M. . Determinação Analítica de Fósforo Orgânico. In: 9º ENCONTRO DE ATIVIDADES CIENTÍFICAS DA UNOPAR, 2006, Londrina. 9º ENCONTRO DE ATIVIDADES CIENTÍFICAS DA UNOPAR, 2006.

## Artigos Publicados da Tese

### Capítulo 1

Gonçalves, A. C.; Sato, N. C.; Santos, H. M.; Capelo, J. L.; Lodeiro, C.; dos Santos, A. A. The Confidence of Blue: A New Highly Selective Bio-Inspired Coumarin Emissive Probe for Fluoride Recognition. *Dye. Pigment.* **2015**.

Gonçalves, A. C.; Luis Capelo, J.; Lodeiro, C.; Dos Santos, A. A. A Selective Emissive Chromogenic and Fluorogenic Seleno-Coumarin Probe for Cu<sup>2+</sup> Detection in Aprotic Media. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2017**, 16 (7).

### Capítulo 2

Gonçalves, A. C.; Pilla, V.; Oliveira, E.; Santos, S. M.; Capelo, J. L.; Dos Santos, A. A.; Lodeiro, C. The Interaction of Hg<sup>2+</sup> and Trivalent Ions with Two New Fluorescein Bio-Inspired Dual Colorimetric/Fluorimetric Probes. *Dalt. Trans.* **2016**, 45 (23).

### Capítulo 3

Gonçalves, A. C.; Capelo, J. L.; Lodeiro, C.; Santos, A. A. D. A Seleno-Pyrene Selective Probe for Hg<sup>2+</sup> Detection in Either Aqueous or Aprotic Systems. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, 239.



## The confidence of blue: A new highly selective bio-inspired coumarin emissive probe for fluoride recognition



Augusto C. Gonçalves<sup>a, b</sup>, Nayara C. Sato<sup>b</sup>, Hugo M. Santos<sup>a, c</sup>, José Luis Capelo<sup>a, c</sup>, Carlos Lodeiro<sup>a, c, \*</sup>, Alcindo A. dos Santos<sup>b, \*\*</sup>

<sup>a</sup> BIOSCOPE Group, UCIBIO-REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516, Caparica, Portugal

<sup>b</sup> Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, CxP. 26077, São Paulo, 05508-000, Brazil

<sup>c</sup> Proteomass Scientific Society, Rua dos Inventores, Madan Park, 2829-516, Caparica, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 November 2015

Received in revised form

12 February 2016

Accepted 26 February 2016

Available online 18 March 2016

#### Keywords:

Fluorescence

Fluoride

Detection

*Tert*-butyldimethyl silane

*L*-serine

### ABSTRACT

A new fluorogenic probe for fluoride anion detection was designed and synthesized accomplishing by the linkage between a Coumarin-440 and a Boc-Ser(TBDMS)-OH via amide bond formation. The photo-physical properties and the selectivity for fluoride detection, among a range of anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{OAc}^-$ ), was explored. The sensing mechanism was proposed and supported by  $^1\text{H}$  NMR and MALDI-MS experiments. A reaction triggered by the nucleophilic attack of the fluoride anion to the silicon atom of the *tert*-butyldimethylsilane (TBDMS) group was responsible for the disruption of O–Si bond, which generates an emissive species. UV–vis absorption, fluorescence steady state, and time resolved emission spectroscopy were employed. The lowest quantity of detectable amount of  $3.3 \mu\text{mol/L}$  for  $\text{F}^-$  was achieved for fluorescence measurements in acetonitrile solution. The system could be adapted to paper discs under a UV lamp (365 nm) for direct visual fluoride ion detection.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Over the last two decades there has been a great effort by researchers from all over the world towards sensitive and selective methods for detecting anions of environmental and biological importance [1]. Because of the moderate toxicity and presence in water, food and dental products, fluoride ion ( $\text{F}^-$ ) fits well in this class of analytes with potential risk [2]. The  $\text{F}^-$  ion plays an important role associated to the growth and maintenance of bone tissues in humans. The principal form of intake of  $\text{F}^-$  occurs through drinking water, and the amount ingested and period of exposure determines its toxicity, disease type and extent of damage caused by  $\text{F}^-$  in human organisms. In suitable doses ( $50 \mu\text{mol/L}$ )  $\text{F}^-$  helps to prevent tooth loss and demineralization of tooth enamel [3]. However, when ingested at high concentrations (up to  $250 \mu\text{mol/L}$ )

and for prolonged periods it causes problems such as weakening, white and yellowish spots on teeth (dental fluorosis), weakening of the bones (bone fluorosis), nephrotoxic changes and even death [4]. The World Health Organization sets the limits of safe intake of  $\text{F}^-$  and recommends the addition of fluoride to water in places with low natural incidence of the anion, to prevent tooth loss [5]. Because of these features the detection and quantification of fluoride remains the focus of considerable attention.

Sensitive, selective and accurate analytical methods to detect and quantify a specific analyte are very important analytical tasks, especially when its occurrence and appliances are of low concentrations. Fluorimetry, is so far, one of the most accurate, sensitive and non-destructive analytical tools for the detection and quantification of a myriad of entities, including fluoride [6].

In the recent years, much attention has been directed towards fluorogenic probes whose mechanism of recognition is based on specific chemical reactions, due to the high selectivity provided for such kind of systems. Because the high affinity of fluoride by silicon, two different approaches have been applied on selective reaction-based detection of fluoride: the spontaneous cleavage of O–Si or C–Si assisted by an  $\text{S}_{\text{N}}2$  attack of  $\text{F}^-$  through the silicon atom (dissociation energies are 103 and 69 kcal/mol, respectively) [1].

\* Corresponding author. BIOSCOPE Group, UCIBIO-REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516, Caparica, Portugal.

\*\* Corresponding author. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, CxP. 26077, São Paulo, 05508-000, Brazil.

E-mail addresses: [cle@fct.unl.pt](mailto:cle@fct.unl.pt) (C. Lodeiro), [alcindo@iq.usp.br](mailto:alcindo@iq.usp.br) (A.A. dos Santos).



Silyl ethers (R'-O-Si-R<sub>3</sub>), such as TBDMS, TMS and TIPS and are widely used protective groups for the OH functional group and are routinely used in organic synthesis, because of the known selective strategies to install and remove the silyl function [7]. When connected directly to a dye, the silyl ether modifies the photophysical properties of fluorophores shifting the maximum absorption and emission, and may even impute to the dye non-emissive properties, which can be attributed to the heavy atom effect [8].

Many recent publications have reported the synthesis of O-silyl protected hydroxy-coumarins for detection and quantification of F<sup>-</sup>, however, these examples are restricted to structures which have a hydroxyl group directly attached to the chromophoric core [9–15].

Over the last 10 years, our research group has been devoted to the synthesis of molecular probes for the detection of environmental potential risk anions, through intermolecular interactions [16–23]. Now in the present work we support our approach on a reaction mechanism of molecular rupture for the selective recognition of fluoride ion.

Aiming to extend the synthesis of reaction-based molecular probes to fluorophores bearing amino groups, in the present work we present the use of the coumarin-440 (an amino-coumarin) functionalized with an amino-acid residue (Boc-Ser(TBDMS)-OH) for F<sup>-</sup> detection. Our strategy can be applied to any other fluorescent core containing amines for example rhodamines, amino-anthracenes, Nile Blue, depending on the spectral region of interest.

## 2. Experimental section

### 2.1. Chemicals and starting materials

Coumarin 440 (7-amino-4-methyl-2H-1-benzopyran-2-one) was purchased from Exciton; tetrabutylammonium (TBA) salts: TBAF, TBACl, TBABr, TBAI, TBABF<sub>4</sub>, TBANO<sub>3</sub>, TBAClO<sub>4</sub>, TBAPF<sub>6</sub>, HSO<sub>4</sub>, TBACN and TBAOAc were purchased from Sigma–Aldrich and used as received. Boc-Ser(TBDMS)-OH was prepared as reported in the literature [24].

### 2.2. Instruments and materials

Elemental analysis was performed using a Thermo-Finnigan CE Flash-EA 1112-CHNS and <sup>1</sup>H NMR titration spectra were recorded on a Bruker Avance III 400 (400 MHz, <sup>1</sup>H) instrument provided by the Chemical Analysis Service of the REQUIMTE, DQ-FCT, Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica, Portugal. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR characterization spectra were recorded on a Bruker Avance III 200 (200 MHz, <sup>1</sup>H; 50 MHz, <sup>13</sup>C) spectrometer and the high-resolution mass spectrometry spectra were recorded in an Electron Spray ionization Time of Flight (ESI-TOF) micrOTOF-QII Bruker spectrometer provided by IQ, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. The lifetime of the excited state was measured using a Horiba Jobin-Yvon Temprow equipped with the light source NanoLED of 279 nm (Proteomass Scientific Society facilities lab); the infrared spectra were recorded on a Spectrum BX Perkin–Elmer FT-IR System. Mass spectrometry characterization of the ligand **2**, before and after addition of F<sup>-</sup> was carried out in an Ultraflex II MALDI-TOF/TOF instrument from Bruker Daltonics (Proteomass-BIOSCOPE Research facilities Lab). Prior to analysis, a solution of **2** and **2**+F<sup>-</sup> (1 mg/mL of **2** in acetonitrile; 10 equiv. of TBAF) were prepared. Then 0.5 µL of each sample was hand-spotted onto a MALDI target plate (384-spot ground steel plate) and overlaid with 1 µL of a 1 mg/mL solution of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix in 0.1% (v/v) TFA and 50% (v/v) CAN, and allowed to air dry. The mass spectrometer was operated in positive ion mode using a reflectron, and thus, spectra were acquired in the *m/z* range of 100–500. A total of 500 spectra were acquired for each sample at a laser frequency of 50 Hz.

External calibration was performed with the monoisotopic peaks of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 190.0499, [2M + H]<sup>+</sup> *m/z* 379.0925; and sinapinic acid, [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 225.0763, [2M + H]<sup>+</sup> *m/z* 449.1448.

### 2.3. Spectrophotometric and spectrofluorimetric measurements

Absorption spectra were recorded on a Jasco V-650 spectrophotometer and fluorescence emission on a Horiba Scientific Fluoromax-4 spectrofluorimeter (Proteomass-BIOSCOPE Research Facilities Lab). All Spectrofluorimetric titrations were performed as follows: the stock solution of the probe **2** (ca. 5 × 10<sup>-4</sup> M) was prepared by dissolving an appropriated amount of the ligands in 25 mL volumetric flask to the mark with acetonitrile. The work solution was prepared by dilution of the stock solution of **2** at a final concentration of 1 × 10<sup>-5</sup> M in acetonitrile. The stock solutions of the anions were prepared by dissolving an appropriate amount of the tetrabutylammonium salts in a 10 mL volumetric flasks to the mark with acetonitrile (ca. 0.05 M). The work solution of anions was prepared by dilution of the respective stock solutions at a final concentration of 1.5 × 10<sup>-3</sup> M in acetonitrile. Titrations of the **2** was conducted by the addition of microliters of tetrabutylammonium fluoride solution in acetonitrile. The absorbance and emission spectra of these solutions were recorded after additions (λ<sub>exc</sub> = 333 nm and λ<sub>em</sub> = 460 nm).

Fluorescence quantum yield of compounds **1** and **2** was measured using a solution of coumarin-343 in absolute ethanol as a standard (φ = 0.63) [25] and was corrected for different refraction indexes of solvents.

The detection (LOD) and quantification (LOQ) limits were performed, having in mind analytical applications for real samples. For these measurements, ten different analyzes for the selected receptor were performed to obtain the LOD and LOQ. The LOD and LOQ were obtained by applying the formula:

$$\text{LOD} = y_{\text{blank}} + 3 \text{ std} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = y_{\text{blank}} + 10 \text{ std}; \quad (2)$$

Where *y*<sub>blank</sub> = signal detection limit and std = standard deviation.

### 2.4. Synthesis of (S)-tert-butyl (3-((tert-butyl)dimethylsilyloxy)-1-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl) carbamate (**2**)

In a 50 mL, round bottomed flask, under inert atmosphere, was added Boc-L-Ser(TBDMS)-OH (3.0 mmol, 1.05 g); N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 3 mmol, m. p. = 34 °C, d = 1.325 g/cm<sup>3</sup>, 0.6 mL) and dichloromethane (20 mL) while keeping stirring for 15 min. Subsequently, **1** (Coumarin 440) was added (1.1 mmol, 0.1927 g) and the reaction was followed by TLC examination until all the starting coumarin was consumed. After 18 h, the reaction medium was filtered to remove the urea generated by the consumption of DCC, and the solvent was removed by rotary evaporation under reduced pressure. The product was purified in a chromatographic column using silica flash as a stationary phase and an ethyl acetate/hexanes mixture in the ratio 1: 2, as eluent. The pure product was obtained as a white solid in 85% yield. RF in EtOAc/Hexanes 2: 1 = 0.50. Melting point: 86–88 °C. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.76 (s, 1H), 7.70–7.38 (m, *J* = 10.7, 7.4, 2.0 Hz, 1H), 6.21 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 5.45 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.40–4.20 (m, 1H), 3.91 (ddd, 1H), 2.42 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 1.47 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 0.91 (s, 2H), 0.11 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.49, 161.20, 154.51, 152.30, 140.97, 125.51, 116.53, 115.79, 113.83, 107.50, 63.36, 28.52, 26.03, 18.79, 18.40, 0.21, -5.21, -5.26. HRMS [calcd (found)]:

499.2240 (499.2240) [C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si + Na]. UV–vis [Acetonitrile;  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon_{\text{max}}$ , dm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 337 (10727), 428 (16019), 444 (15835). IR (BaF<sub>2</sub> windows, cm<sup>-1</sup>): 3310, 2934, 2860, 1724, 1692, 1618, 1582, 1526, 1390, 1238, 1168, 1118, 840. Elemental analysis (found: C, 60.4; H, 7.5; N, 5.93%. CHNS requires: C, 60.48; H, 7.61; N, 5.88; %).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Synthesis strategy

The coupling between Coumarin-440 and Boc-ser(TBDMS)-OH was mediated by DCC (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide) as a carboxylic activator group resulting in the amide **2** in 85% yield, as presented in Scheme 1.

Compound **2** was characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, elemental analysis, ESI-TOF, infra-red spectroscopy, Uv–vis spectroscopy, fluorescence emission spectroscopy and lifetime of the excited state.

The <sup>1</sup>H NMR spectra of **2** presents the singlet signal of the *t*-butyl group from the *N*-Boc protective group at 1.47 ppm and the characteristic signals of NH from peptides (5.45 ppm),  $\alpha$ -H (4.29 ppm) and the doublet of doublet doublets  $\beta$ -CH<sub>2</sub> (3.91 ppm) of the serine side chain. The H-dimethyl (0.11 ppm) and H-*tert*-butyl (0.91 ppm) singlets of the groups attached to the silane residue are observed in the upfield region of the spectra, as a result of the shielding effect by silicon. Also, the signals owing to the aromatic rings, present in the coumarin moiety is observed in 7.51 ppm. The signal related to CH<sub>3</sub> (2.42 ppm) from coumarin moiety, is also observed. The formation of the peptide linkage was confirmed using <sup>13</sup>C NMR spectroscopy which showed the appearance of the signal belonging to the amide carbonyl group at about 169.49 ppm, as well as by the  $\alpha$ -carbon at 63.36 ppm. The IR spectrum shows some of the main signals, such as, the carbonyl of the aliphatic amide that binds the coumarin to the amino acid derivative at 1692 cm<sup>-1</sup>. The broad band around 3310 cm<sup>-1</sup> corresponds to the secondary N–H carbamate and amide [26]. Moreover, from the ESI-MS analysis it is possible to identify the molecular ion peak species [**2** + Na] at 499.2240 *m/z*.

#### 3.2. Photophysical characterization

Compounds **1** and **2** were characterized in acetonitrile at 298 K and the main data are gathered in Table 1. Fig. 1 presents the absorption, emission and excitation spectra of **1**(A) and **2**(B).

Compounds **1** and **2** show absorption maxima at 340 and 322 nm, respectively, attributed to  $\pi$ – $\pi^*$  transitions of the coumarin chromophore. The amidation of the amine group in position 7 of the coumarin moiety in **2** leads to a hypsochromic shift of the absorption and emission spectra, accompanied by the reduction of the Stokes' shift, compared to its precursor **1**. The quantum yields of fluorescence for **1** and **2** in acetonitrile were calculated from the Coumarin-343 as standard ( $\phi = 0.63$  in ethanol) [25], which were obtained values of  $\phi_1 = 0.63$  and  $\phi_2 = 0.06$ , respectively. The value obtained for **1** is in perfect agreement with data described in the literature [27]. It is evident that the insertion of the amino acid

derivative in the amide form leads to a fluorescence quenching of approximately 11 times. The lifetime of the excited states were measured in acetonitrile solution, with excitation at 365 nm. The fluorescence decays fitted with single exponential law, with decay times of 3.18 and 0.314 ns for the compounds **1** and **2**, respectively, in accordance with the quantum yield values.

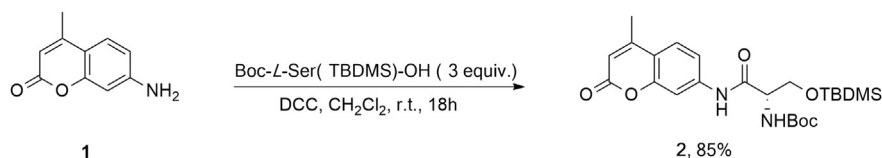
#### 3.3. Anion sensing

As shown in Scheme 1, the structure of compound **2** was designed to make it possible in a single reaction step, in a bio-inspired way and from a readily available material such as an amino acid, to include fluorophores containing an aniline in the class of fluorescent probes based on the cleavage of the O–Si bond triggered by fluoride. The proposal was based on the choice of a highly fluorescent compound (**1**) which upon the linkage to a serine derivative, could undergo non-radiative decay of the excited states in two distinct collaborative photophysical pathways: i) Photo-Induced Electron Transfer (PET) [28] ii) and the HAE imputed by the Si atom [8]. From the disruption of the O–Si bond mediated by F<sup>-</sup>, the system could regenerate fluorescence emission by inhibiting PET and HAE, featuring the operating mechanism of the molecular probe shown in Scheme 2.

The sensing selectivity of compound **2** toward a wide range of anions (F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, OAc<sup>-</sup>) was explored in acetonitrile solution. Fig. 2 shows the response regarding the fluorescence of the probe **2** by the interaction with different potential analytes. From the results obtained in the screening of different anions, we proceeded with spectrophotometric and spectrofluorimetric titrations of compound **2** with fluoride as shown in Fig. 3. Regarding the spectrophotometric titration, there was a decrease in intensity accompanied by the bathochromic shift of the primary absorption band from 322 nm to 340 nm. No colour change was observed after the addition of F<sup>-</sup> to **2**, once the absorption wavelengths are below 400 nm. The excitation at the isosbestic point (333 nm) of the absorption spectra resulted in the emission band showed in Fig. 3B, with the maximum at 460 nm.

In order to shed more light in the sensing ability of compound **2**, the minimal detectable and quantified amount of F<sup>-</sup> were determined according to the procedure described in experimental section. The limit of detection for compound **2** was of LOD<sub>Abs</sub> = 0.009 ± 0.001 by absorption, and LOD<sub>Em</sub> = 0.00031 ± 0.00002 by emission. The limit of quantification was of LOQ<sub>Abs</sub> = 0.017 ± 0.001 and LOQ<sub>Em</sub> = 0.00043 ± 0.00002. The minimal detectable amounts for F<sup>-</sup> are 0.10 and 2.00  $\mu$ M by emission and absorption measurements, respectively, and the minimal quantifiable amounts are 0.27  $\mu$ M for emission and 3.00  $\mu$ M for absorption techniques.

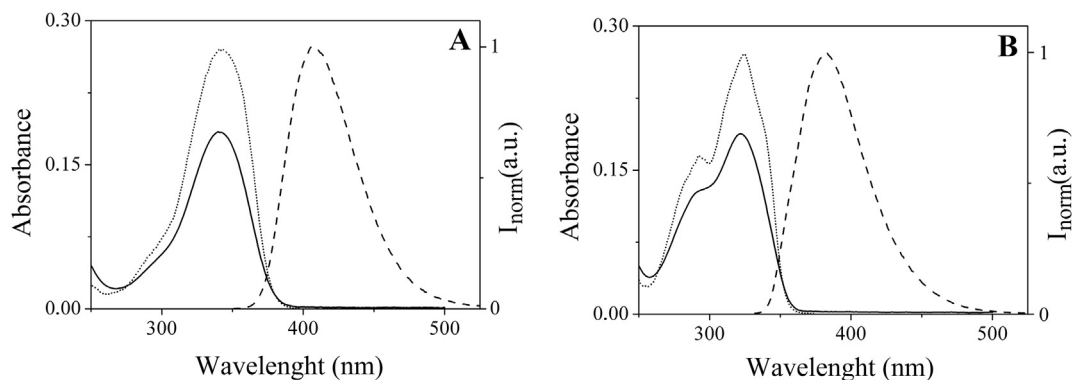
The addition of F<sup>-</sup> increases the fluorescence quantum yield of the system, by converting **2** in compound **3**, from  $\phi = 0.06$  to  $\phi = 0.53$  (ca. 9 times), through the O–Si bond cleavage, which makes the fluorescence technique much more sensitive to F<sup>-</sup> detection compared to absorption. The same behavior was observed in time resolved spectroscopy measurements, whereas an increase from  $\tau = 0.314$  ns to  $\tau = 3.18$  ns was observed. These



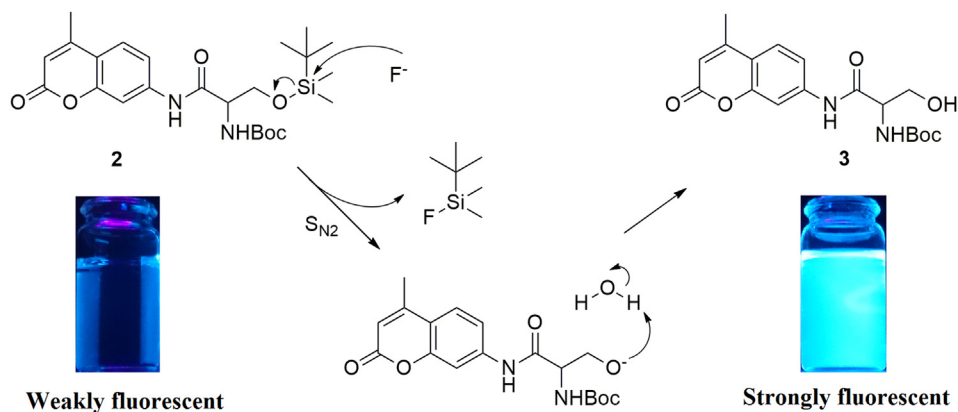
Scheme 1. Synthesis of probe 2.

**Table 1**  
UV–vis and fluorescence data for **1** and **2** ( $1 \times 10^{-5}$  M) in acetonitrile.

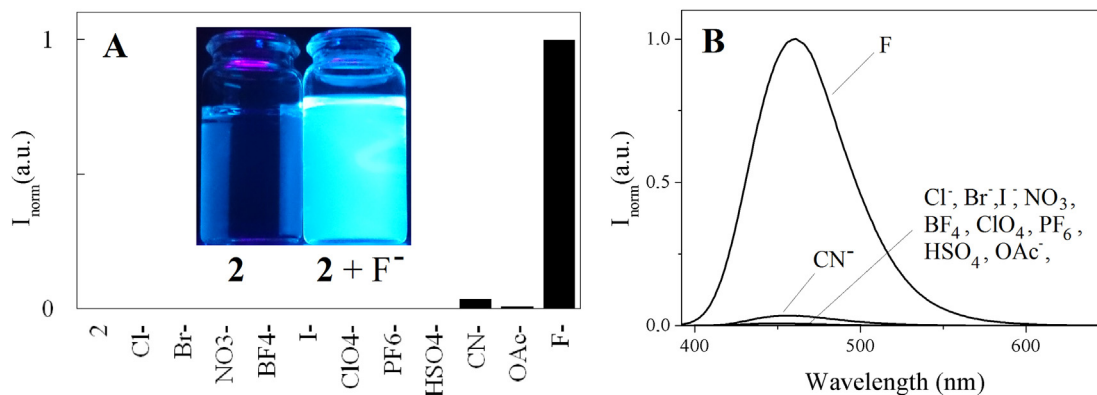
Compounds	UV–vis		Fluorescence			
	$\lambda_{\text{exc}}$ (nm)	Log $\epsilon$	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	Stokes shift (nm)	Quantum yield $\phi$	Lifetime $\tau$ (ns)
1	340	4.27	407	67	0.63	3.18
2	322	4.1	382	60	0.06	0.314



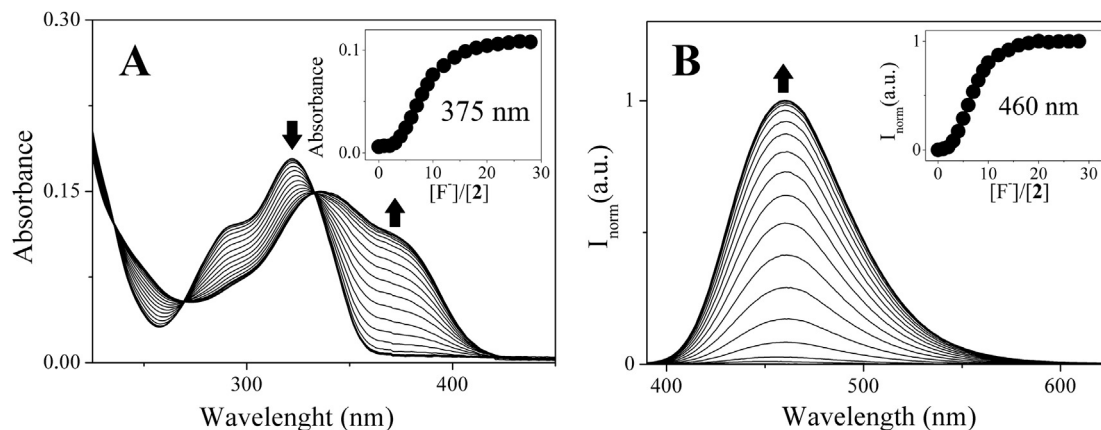
**Fig. 1.** Room temperature absorption (full line), normalized emission (dashed line,  $\lambda_{\text{exc}} = 341$  nm in part A;  $\lambda_{\text{exc}} = 322$  nm in part B) and excitation spectra (dotted line, dotted line,  $\lambda_{\text{em}} = 408$  nm in part A;  $\lambda_{\text{em}} = 384$  nm in part B) of compounds **1** (A) and **2** (B) in acetonitrile ( $1 \times 10^{-5}$  M).



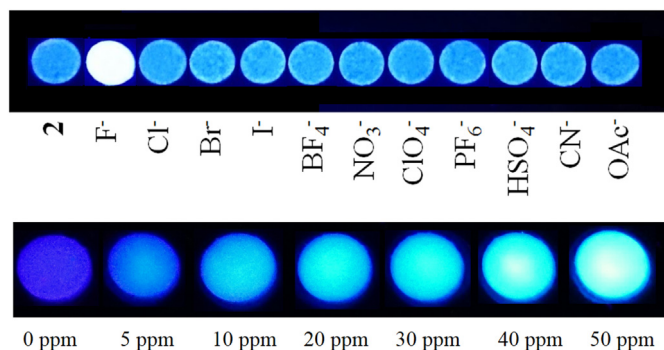
**Scheme 2.** Mechanism of the  $\text{F}^-$  sensing.



**Fig. 2.** A: Relative emission intensity of **2** upon addition of 10 equiv of  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{OAc}^-$  and  $\text{F}^-$  in acetonitrile ( $[\mathbf{2}] = 1 \times 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{exc}} = 333$  nm). Inset: visual changes of **2** under UV light after addition of  $\text{F}^-$  ( $\lambda_{\text{exc}} = 365$  nm). B: normalized emission in the presence of the different anions ( $\lambda_{\text{exc}} = 333$  nm).



**Fig. 3.** A: Spectrofluorimetric titration of **2**, with increasing amounts of  $F^-$  in acetonitrile solution. Inset: Absorption at 375 nm as a function of  $[F^-]/[2]$  ( $T = 298\text{ K}$ ;  $[2] = 1 \times 10^{-5}\text{ M}$ ). B: Spectrofluorimetric titrations of **2**, with increasing amounts of  $F^-$  in acetonitrile solution. Inset: Emission at 460 nm as a function of  $[F^-]/[2]$  ( $T = 298\text{ K}$ ;  $[2] = 1 \times 10^{-5}\text{ M}$ ,  $\lambda_{exc} = 333\text{ nm}$ ).

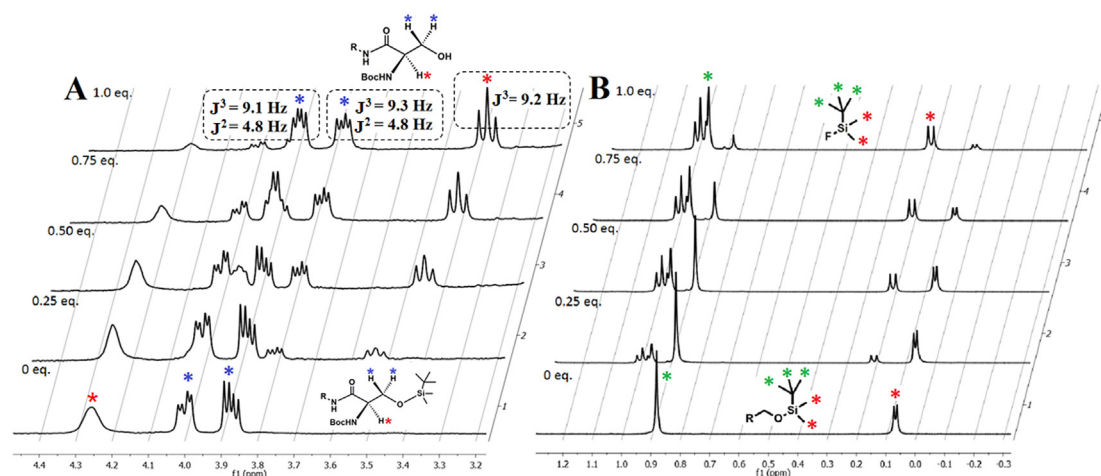


**Fig. 4.** Up: screening of anions in paper disks impregnated with **2** under UV light ( $[anions] = 100\text{ ppm}$ ,  $\lambda_{exc} = 365\text{ nm}$ ). Down: Visual changes in paper disks containing **2** under UV light by addition of different concentrations of  $F^-$  ( $\lambda_{exc} = 365\text{ nm}$ ).

results are in agreement with the values of fluorescence quantum yield, since that from a general way, molecules with higher fluorescence quantum yields are more stable in the excited state. Aiming at the implementation of compound **2** as a “naked eye” probe of easy handling and using a very simple instrumental

apparatus, we adapt the system to be used in paper disks to detect fluoride. Firstly, the same screening of anions was repeated in paper disks to evaluate the interaction of the solid support with the anionic species in terms of emission. In Fig. 4, it can be seen that the selectivity of  $F^-$  is maintained in solid phase. From this result, solutions of **2** containing known concentrations of fluoride were prepared and applied on paper discs. The discs were exposed under UV light (365 nm), and it was possible to distinguish between the different concentrations through the tones of blue brightness, as shown in Fig. 4.

In account of the gradual conversion of R-OTBDMS to the deprotected amino-acid derivative and the corresponding F-TBDMS (tert-butyl-dimethylsilane fluoride) flagged in red, it is possible to observe the intensity decrease of the doublet at 0.07 ppm attributed to the H-methyl attached to the silane group, while another doublet simultaneously arises at 0.2 ppm, due to the new silicon derivative. The signal originally at 0.88 ppm, assigned to the H-tert-butyl group connected to Silicon atom also undergoes a displacement to 0.96 ppm and it is signaled in green. The second important set of signals belongs to the  $\alpha$ -carbonyl-CH from the serine side chain. As the titration proceeded, it gradually shifted from 4.28 ppm to 3.38 ppm as a well-defined triplet ( $t, J = 9.2\text{ Hz}$ , 1H), originated from the coupling with the diastereotopic  $\beta$ -carbonyl-CH<sub>2</sub>



**Fig. 5.**  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz) titration of **2** upon the addition of 0–1.0 M equiv. of  $F^-$  in  $\text{CD}_3\text{CN}$ . A: changes in the H-pattern of serine side chain. B: Changes promoted by the nucleophilic attack of the  $F^-$  to the Si atom.



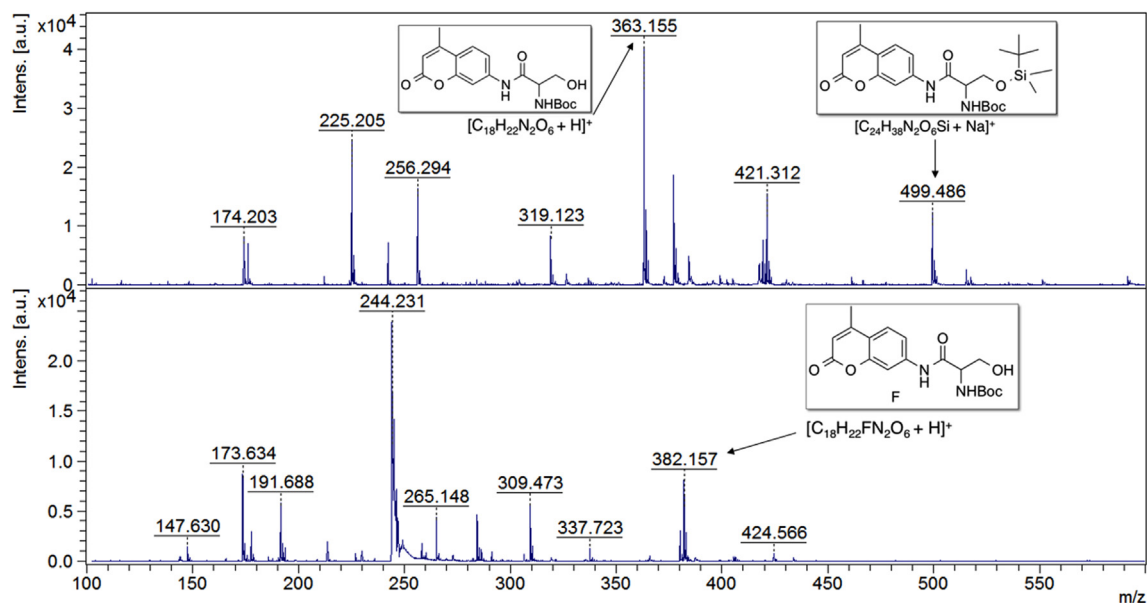


Fig. 6. Mass spectrometry characterization of the ligand **2**, before and after addition of  $F^-$  (1 mg/mL of **2** in acetonitrile; 10 equiv. of TBAF).

hydrogens. Each of these nucleus produce a double doublets [3.89 ppm (dd,  $J = 9.1, 4.8$  Hz, 1H) and 3.77 ppm (dd,  $J = 9.3, 4.8$  Hz, 1H)] (Fig. 5A), respectively derived from the geminal coupling ( $J^2$ ) and the coupling with the  $\alpha$ -carbonyl-CH ( $J^3$ ). The full spectra obtained from the titration and detailed expansions are shown in Figure S13.

To further elucidate the mechanism, free compound **2**, and after the addition of  $F^-$  were studied by MALDI-TOF-MS in the gas phase (see Fig. 6). Peaks corresponding to the species at  $m/z$  found:  $[2 + Na]^+ = 499.486$  and  $[3 + H]^+ = 363.155$  were identified in the mass spectra of **2** after the MALDI laser irradiation at 330 nm. The formation of the adduct species between **3** and fluoride ion was confirmed with the formation of the peak at  $m/z$   $[3F + H]$  at 382.157 after the addition of  $F^-$  to **2** in the MALDI plate, and at the same time, both peaks assigned in the first spectra (**2**) disappear. The absence of signals corresponding to free compounds **2** and **3** confirms our reaction mechanism hypothesis by MALDI-TOF-MS for fluoride detection.

#### 4. Conclusions

A new bio-inspired coumarin derivative probe for  $F^-$  detection was synthesized, characterized and its photophysical properties were evaluated. The synthetic strategy applied allows in a single reaction step, the use of an amino acid to include amino-fluorophores in the class of fluorescent probes based on the cleavage of the O–Si bond triggered by  $F^-$ . The compound was highly selective to  $F^-$  detection among a wide range of anions, and presented low limits of detection and quantification, especially when applying fluorimetry. The cleavage of the O–Si mediated by  $F^-$  was assigned as the fluorescence “switch on” mechanism, supported by results obtained via  $^1H$  NMR spectroscopy. The system could be adapted to be used in paper disks for naked-eye-detection of  $F^-$  anion, employing easy handling and using a very simple instrumental apparatus.

#### Acknowledgements

A. Gonçalves thanks to CNPq/Brazil for his PhD grant. H. M. Santos is grateful to FCT (Portugal) by his Postdoctoral Grand SRFH/

BPD/73997/2010. C. Lodeiro thanks to the CNPq program, Science without borders 2014–2016 for the “Special Guest Researcher” grant (Brazil). All authors are also grateful to the financial and structural support offered by: the University of São Paulo through the NAP-CatSinQ (Research Core in Catalysis and Chemical Synthesis), FAPESP and CAPES (Brazil), the Scientific PROTEOMASS Association (Portugal), and the Unidade de Ciências Biomoleculares Aplicadas-UCIBIO FCT/MEC (UID/Multi/04378/2013 and PT2020 (POCI-01-0145-FEDER-007728).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.02.032>.

#### References

- [1] Gai L, Mack J, Lu H, Nyokong T, Li Z, Kobayashi N, et al. Organosilicon compounds as fluorescent chemosensors for fluoride anion recognition. *Coord Chem Rev* 2015;285:24–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.10.009>.
- [2] Duke RM, Veale EB, Pfeffer FM, Kruger PE, Gunnlaugsson T. Colorimetric and fluorescent anion sensors: an overview of recent developments in the use of 1,8-naphthalimide-based chemosensors. *Chem Soc Rev* 2010;39:3936–53. <http://dx.doi.org/10.1039/b910560n>.
- [3] Browne D, Whelton H, O'Mullane D. Fluoride metabolism and fluorosis. *J Dent* 2005;33:177–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2004.10.003>.
- [4] Harrison PTC. Fluoride in water: a UK perspective. *J Fluor Chem* 2005;126:1448–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfluchem.2005.09.009>.
- [5] WHO. WHO guidelines for drinking-water quality. 4th edn., vol. 38; 2011. [http://dx.doi.org/10.1016/S1462-0758\(00\)00006-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1462-0758(00)00006-6).
- [6] Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 2006. <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- [7] Wuts PGM, Greene TW. Greene's protective groups in organic synthesis. *Greene's Prot Groups Org Synth* 2007;16:366. <http://dx.doi.org/10.1002/0470053488>.
- [8] Turro NJ, Ramamurthy V, Scaiano JC. Modern molecular photochemistry of organic molecules, vol. 88; 2012. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01178.x>.
- [9] Yang X-F. Novel fluorogenic probe for fluoride ion based on the fluoride-induced cleavage of tert-butyldimethylsilyl ether. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2007;67:321–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2006.07.020>.
- [10] Sokkalingam P, Lee CH. Highly sensitive fluorescence “turn-on” indicator for fluoride anion with remarkable selectivity in organic and aqueous media. *J Org Chem* 2011;76:3820–8. <http://dx.doi.org/10.1021/jo200138t>.
- [11] Kim SY, Park J, Koh M, Park SB, Hong J-I. Fluorescent probe for detection of fluoride in water and bioimaging in A549 human lung carcinoma cells. *Chem*

- Commun 2009;4735. <http://dx.doi.org/10.1039/b908745a>.
- [12] Park M, Jang D, Young Kim S, Hong J-I. A chemodosimetric gelation system showing fluorescence and sol-to-gel transition for fluoride anions in aqueous media. *New J Chem* 2012;36:1145. <http://dx.doi.org/10.1039/c2nj20878d>.
- [13] Ghosh K, Kar D, Fröhlich R, Chattopadhyay AP, Samadder A, Khuda-Bukhsh AR. O-tert-Butyldiphenylsilyl coumarin and dicoumarol: a case toward selective sensing of F<sup>-</sup> ions in organic and aqueous environments. *Analyst* 2013;138:3038. <http://dx.doi.org/10.1039/c3an00279a>.
- [14] Abebe F a, Eribal CS, Ramakrishna G, Sinn E. A “turn-on” fluorescent sensor for the selective detection of cobalt and nickel ions in aqueous media. *Tetrahedron Lett* 2011;52:5554–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.08.072>.
- [15] Massue J, Frath D, Ulrich G. Synthesis of luminescent 2-(2'-hydroxyphenyl) benzoxazole (HBO) borate complexes. *Org Lett* 2011;2008–11. <http://dx.doi.org/10.1039/c1cs15132k>.
- [16] Santos CIM, Oliveira E, Barata JFB, Faustino MAF, Cavaleiro J a S, Neves MGPMS, et al. New gallium(III) corrole complexes as colorimetric probes for toxic cyanide anion. *Inorg. Chim Acta* 2014;417:148–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2013.09.049>.
- [17] Santos CIM, Oliveira E, Menezes JCMDS, Barata JFB, Faustino MAF, Ferreira VF, et al. New coumarin-corrole and -porphyrin conjugate multifunctional probes for anionic or cationic interactions: synthesis, spectroscopy, and solid supported studies. *Tetrahedron* 2014;70:3361–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2013.07.022>.
- [18] Santos CIM, Oliveira E, Barata JFB, Faustino MAF, Cavaleiro J a S, Neves MGPMS, et al. Corroles as anion chemosensors: exploiting their fluorescence behaviour from solution to solid-supported devices. *J Mater Chem* 2012;22:13811. <http://dx.doi.org/10.1039/c2jm31281f>.
- [19] Batista RMF, Oliveira E, Costa SPG, Lodeiro C, Raposo MMM. Imidazo-benzo-15-crown-5 ethers bearing arylthienyl and bithienyl moieties as novel fluorescent chemosensors for Pd<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>. *Tetrahedron* 2011;67:7106–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2011.06.106>.
- [20] Batista RMF, Oliveira E, Nuñez C, Costa SPG, Lodeiro C, Raposo MMM. Synthesis and evaluation of new thienyl and bithienyl-bis-indolylmethanes as colorimetric sensors for anions. *J Phys Org Chem* 2009;22:362–6. <http://dx.doi.org/10.1002/poc.1440>.
- [21] Batista RMF, Oliveira E, Costa SPG, Lodeiro C, Raposo MMM. Synthesis and ion sensing properties of new colorimetric and fluorimetric chemosensors based on bithienyl-imidazo-anthraquinone chromophores. *Org Lett* 2007;9:3201–4. <http://dx.doi.org/10.1021/ol071029b>.
- [22] Aldrey A, Nuñez C, García V, Bastida R, Lodeiro C, Macías A. Anion sensing properties of new colorimetric chemosensors based on macrocyclic ligands bearing three nitrophenylurea groups. *Tetrahedron* 2010;66:9223–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2010.09.054>.
- [23] Batista RMF, Oliveira E, Costa SPG, Lodeiro C, Raposo MMM. Cyanide and fluoride colorimetric sensing by novel imidazo-anthraquinones functionalised with indole and carbazole. *Supramol Chem* 2014;26:71–80. <http://dx.doi.org/10.1080/10610278.2013.824082>.
- [24] Grzeszczyk B, Stecko S, Mucha Ł, Staszewska-Krajewska O, Chmielewski M, Furman B. A practical preparation of the key intermediate for penems and carbapenems synthesis. *J Antibiot (Tokyo)* 2013;66:161–3. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2013.8>.
- [25] Reynolds GA, Drexhage KH. New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers. *Opt Commun* 1975;13:222–5. [http://dx.doi.org/10.1016/0030-4018\(75\)90085-1](http://dx.doi.org/10.1016/0030-4018(75)90085-1).
- [26] Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spectrometric identification of organic compounds 7ed 2005-Silverstein, vol. 21. Webster & Kiemle.pdf; 2005. [http://dx.doi.org/10.1016/0026-265X\(76\)90069-2](http://dx.doi.org/10.1016/0026-265X(76)90069-2).
- [27] Pal H, Nad S, Kumbhakar M. Photophysical properties of coumarin-120: unusual behavior in nonpolar solvents. *J Chem Phys* 2003;119:443–52. <http://dx.doi.org/10.1063/1.1578057>.
- [28] De Silva AP, Moody TS, Wright GD. Fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst* 2009;134:2385–93. <http://dx.doi.org/10.1039/b912527m>.



Cite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2017, **16**, 1174

## A selective emissive chromogenic and fluorogenic seleno-coumarin probe for Cu<sup>2+</sup> detection in aprotic media†

A. C. Gonçalves,<sup>a,b</sup> J. Luis Capelo,<sup>b,c</sup> C. Lodeiro<sup>\*b,c</sup> and A. A. Dos Santos<sup>†a</sup>

A new selenium containing coumarin (compound **7**) was designed and synthesized from the amide linkage between coumarin-519 (**6**) and 2-(butylselenanyl)ethanamine (**5**). The molecular structure of **7** was accurately characterized, and its photophysical properties in acetonitrile, ethanol and chloroform solutions were studied by absorption, stationary and time-resolved fluorescence spectroscopies. Changes in the solvent polarity affected the Stokes shift, quantum yields and lifetime of the excited states. The spectroscopic behavior of compound **7** was evaluated in the presence of different monovalent, divalent and trivalent metallic cations (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Hg<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup> and Cr<sup>3+</sup>) in acetonitrile solution. Among the tested cations, **7** exhibited high selective interaction with Cu<sup>2+</sup>, which was evidenced by the not expected absorption hypsochromic shift (usually coumarin-519 gives red-shifted complexes) and intense chelation-enhanced fluorescence quenching (CHEQ). We performed spectrophotometric and spectrofluorimetric titrations of **7** upon addition of Cu<sup>2+</sup>. From these data, the minimal detectable and quantifiable amounts were calculated and found to be 0.2 and 0.4 μmol L<sup>-1</sup> by absorption and 0.6 and 1.0 μmol L<sup>-1</sup> by emission, respectively. The **7**-Cu<sup>2+</sup> compound presented the 1 : 1 stoichiometry and the stability constant values of absorption and emission were found to be log β = 5.78 and log β = 6.32 respectively. Taking into account the high selectivity of the **7**-Cu<sup>2+</sup> compound in organic solvent systems, and considering the role of copper in organic transformations, it can be regarded as a promising fluorescent sensor for studies concerning the determination of oxidation-dependent transient entities in organic reactions like those involving cuprates. Additionally, it can be used for the detection and quantification of this metal cation *in vitro* in aprotic biological systems.

Received 31st January 2017,  
Accepted 12th May 2017

DOI: 10.1039/c7pp00036g

rsc.li/pps

## Introduction

The coumarin nucleus in its most elementary form (2*H*-1-benzopyran-2-one) was discovered more than 200 years ago, and identified according to its natural first source, the plant species *Coumarouna odorata* Aube. As a natural product, the coumarin backbone is found in plants in several structures as metabolites containing variations of organic groups attached to the main structural core. With respect to their biological activity, coumarins have found applications as antimicrobial,

molluscicidal, antiviral and anticancer agents, as enzyme inhibitors, antioxidants, anti-inflammatory agents, anti-coagulants, and some related to cardiovascular and central nervous system diseases.<sup>1</sup>

As a consequence of the planar structure and the electronic π-conjugation, the coumarin core shows a high absorption coefficient in the UV part of the electromagnetic spectrum. The excited state of the coumarin nucleus is able to undergo radiative or non-radiative decay, depending on the presence or absence of a fluorescence quencher. Based on these photophysical features, added to the versatility of the coumarin as building blocks in organic synthesis, derivatives have been designed, synthesized and explored as molecular probes for metal ion, anion and reactive oxygen species detection.<sup>2,3,4</sup> Furthermore, because of the natural role of the coumarin, bio-inspired compatible probes can be envisioned for biological applications.

Coumarin-519 presents advantages over other simpler coumarins and is related to the presence of the electron-donating

<sup>a</sup>Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, CxP. 26077, São Paulo, 05508-000, Brazil. E-mail: alcindo@iq.usp.br

<sup>b</sup>BIOSCOPE Group, UCIBIO-REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Caparica, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Portugal. E-mail: cle@fct.unl.pt

<sup>c</sup>Proteomass Scientific Society, Rua dos Inventores, Madan Park, 2829-516 Caparica, Portugal

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7pp00036g

amino group at position 7 and the electron-withdrawing groups at positions 3 (carboxylic acid) and 2 (carbon location). This substitution pattern results in an electron-enriched  $\pi$ -system, which exhibits a relatively low energy level between the frontier orbitals, resulting in absorption and emission in the visible range.<sup>5</sup> This feature makes coumarin-519 employable in the synthesis of fluorescent probes to be applied to the biological window.

Copper plays a major function in nature, and depending on its quantity, it can be beneficial or deleterious to humans. As a trace element,  $\text{Cu}^{2+}$  performs important biochemical functions as for instance, in cellular respiration, peptide amidation, neurotransmitter biosynthesis, pigment formation, and connective tissue strength.  $\text{Cu}^{2+}$  also acts as a cofactor for several enzymes and plays an important role in the central nervous system.<sup>6</sup> However,  $\text{Cu}^{2+}$  was found to induce a dramatic aggregation of Alzheimer  $\text{A}\beta$  (low molecular weight protein) under physiological acidosis,<sup>7</sup> and also potentiates the neurotoxicity exhibited by  $\text{A}\beta$  in cell culture.<sup>8</sup>

A series of structures of different classes of dye nucleus have been designed with the aim of obtaining analytical information from the presence of copper, especially, in aqueous media.<sup>9–14</sup> However, systems developed with the aim of acting in purely aprotic solvents can also find important applications. Concerning synthetically useful chemical transformations, Cu is one of the most versatile, robust and diverse elements of the periodic table. Copper-catalyzed C–C and C–N cross coupling, C–H functionalization, conjugate additions, allylic alkylation, alkene functionalization, heterocycle synthesis and cyclopropanation are some of the examples of this important promoter/catalyst for preparative purposes. Furthermore, copper is an earth-abundant metal, making its use feasible compared to other noble metals of similar synthetic importance.<sup>15</sup>

Pearson's hard/soft acid/base principle gives a trend about the differential complexation behavior of cations and ligands. Accordingly,  $\text{Cu}^{2+}$  is classified as an intermediate cation, organic selenide as a soft ligand and N–H amide as a hard ligand. Hence molecular probes can be designed in a way to contain a ligand with high compatibility toward a given analyte (cation) in order to reach high stability constant values.

Considering the importance of  $\text{Cu}^{2+}$  in biological systems and organic catalysis, our groups have combined their experience in organic synthesis of selenium-containing compounds, and in designing and studying fluorescent probes, to design and prepare a new selective fluorescent probe for  $\text{Cu}^{2+}$  detection.<sup>16–18</sup>

## Experimental section

### Chemicals and starting materials

Coumarin 519 (11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahydro-1H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinoline-10-carboxylic acid) was purchased from Exciton. Elemental selenium, di-*tert*-butyl dicarbonate ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ), methanesulfonyl chloride ( $\text{MsCl}$ ), *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), Amberlyst® 15, trifluoroacetic acid (TFA)

and 1-pyrenecarboxylic acid were purchased from Sigma-Aldrich. Ethanolamine was purchased from Vetec and *n*-butyllithium from Fluka. Metallic salts:  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{BF}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  and  $\text{AgNO}_3$  were purchased from Sigma-Aldrich, and  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  were purchased from Alpha Aesar and used as received.

### Instruments and materials

Elemental analysis was performed using a Thermo-Finnigan CE Flash-EA 1112-CHNS and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker Advance III 400 instrument provided by the Chemical Analysis Service of the REQUIMTE, DQ, Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica, Portugal and a Bruker Advance III 200 (200 MHz,  $^1\text{H}$ ; 50 MHz,  $^{13}\text{C}$ ) spectrometer provided by LocSin, IQ, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. The lifetime of the excited state was measured using a Horiba Jobin–Yvon Temprow equipped with a light source NanoLED of 279 nm (BIOSCOPE-ProteoMass Scientific Society facility lab). Mass spectrometry of compound 4 was performed using an Electron Spray ionization Time of Flight (ESI-TOF) microTOF-QII Bruker spectrometer provided by IQ, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. The spectrum of ligand 7 was recorded in an Ultraflex II MALDI-TOF/TOF instrument from Bruker Daltonics (BIOSCOPE-ProteoMass Scientific Society facility lab).

### Spectrophotometric and spectrofluorimetric measurements

Absorption spectra were recorded on a Jasco V-650 spectrophotometer and fluorescence emission spectra were recorded on a Horiba Scientific Fluoromax-4 spectrofluorimeter (BIOSCOPE-ProteoMass Scientific Society facility lab). All spectrofluorimetric titrations were performed as follows: the stock solution of compound 7 (*ca.*  $5 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) was prepared by dissolving an appropriate amount of the ligands in a 5 mL volumetric flask to the mark with acetonitrile. The work solution was prepared by dilution of the stock solution of 7 to a final concentration of  $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$  in acetonitrile. The stock solutions of the metallic ions were prepared by dissolving an appropriate amount of the salts in 10 mL volumetric flasks to the mark with water (*ca.* 0.05 mol  $\text{L}^{-1}$ ). The work solutions of metallic ions were prepared by dilution of the respective stock solutions to a final concentration of  $1.5 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  in acetonitrile. Titrations of 7 were performed in acetonitrile by the addition of microliters of copper perchlorate solutions ( $1.5 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ). The absorbance and emission spectra of these solutions were recorded after each addition of  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\lambda_{\text{exc}} = 389$  nm). The fluorescence quantum yield of compound 7 was measured using a solution of Coumarin 519 (6) in ethanol as a standard ( $\phi = 0.63$ )<sup>19</sup> and was corrected for different refraction indexes of solvents. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were performed, having in mind analytical applications for real samples. For these measurements, ten different analyses, for the selected



receptor, were carried out to obtain the LOD and LOQ. The LOD and LOQ were obtained by applying the following equations:

$$\text{LOD} = y_{\text{blank}} + 3\text{std}, \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = y_{\text{blank}} + 10\text{std}, \quad (2)$$

where  $y_{\text{blank}}$  = signal detection limit and std = standard deviation. The minimum detectable amount (MDA) and minimum quantifiable amount (MQA) were found as the adjacent titration point to the value found in LOD and LOQ formulas.

### Synthesis of *tert*-butyl(2-hydroxyethyl)carbamate (2)

In a mortar were sequentially added di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc<sub>2</sub>O, 2.18 g, 10 mmol), Amberlyst® 15 (0.12 g, 15% m/m) and ethanalamine (0.76 mL, 10 mmol). The resulting mixture was macerated for 10 minutes. Dichloromethane (5 mL) was added to the mixture, and the resulting suspension was transferred to a funnel. The residue was washed with dichloromethane (3 × 10 mL) and the resulting organic solution was dried and concentrated on a rotary evaporator giving analytically pure compound 2 as a colorless viscous liquid in 95% isolated yield. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.4–1.5 (s, 9H); δ 3.4–3.5 (quart; *J* = 6.22 Hz, 2H); δ 3.6–3.7 (quart; *J* = 5.74 Hz, 2H); δ 3.8–3.9 (trip, *J* = 5.74, 1H); δ 4.9–5.5 (s, 1H). R <sup>13</sup>C NM (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 28.43; δ 37.37; δ 39.5; δ 59.48; δ 79.42; δ 157.04. (CAS: 26690-80-2).

### Synthesis of 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl methanesulfonate (3)

In a 15 mL round bottomed flask under a N<sub>2</sub> atmosphere, were added 2 (9 mmol, 1.45 g) and dry triethylamine (1.53 mL, 1.2 eq., 10.8 mmol) in 15 mL of dry tetrahydrofuran (THF, 15 mL). The mixture was cooled to 0° C and mesyl chloride (0.693 mL, 9 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was kept in an ice bath for 30 minutes and after 2 hours at room temperature, the reaction was quenched by addition of aqueous NH<sub>4</sub>Cl<sub>(sat.)</sub> solution (15 mL); the resulting mixture was extracted with ethyl acetate (3 × 15 mL). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was removed under reduced pressure using a rotatory evaporator. Compound 3 was obtained as a white solid in 92% yield after a simple filtration over a plug of flash silica eluting with an ethyl acetate/hexanes 2 : 1 mixture. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.4–1.5 (s, 9H); δ 3.1–3.2 (s, 3H); δ 3.2–3.3 (quart; *J* = 6.22 Hz, 2H); δ 3.6–3.7 (trip; *J* = 5.74 Hz, 2H); δ 4.9–5.5 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 28.43; δ 37.37; δ 39.5; δ 59.48; δ 79.42; δ 157.04. (CAS: 96628-67-0).

### Synthesis of *tert*-butyl(2-(butylselanyl)ethyl)carbamate (4)

In a 50 mL round-bottomed flask under a N<sub>2</sub> atmosphere, elemental selenium (0.632 g, 8 mmol) was suspended in dry THF (15 mL), then *n*-butyllithium (*ca.* 5.33 ml, 1.5 mol L<sup>-1</sup> solution in hexanes) was added dropwise (the reaction was accompanied by a color change from intense red to pale yellow). Compound 3 was dissolved in dry THF (10 mL) and

the resulting solution was transferred to a reaction flask containing selenolate nucleophile, under continuous stirring for 30 minutes. The reaction was quenched by addition of aqueous NH<sub>4</sub>Cl<sub>(sat.)</sub> solution; the phases were separated and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 × 15 mL). The resulting organic phases were combined and dried over MgSO<sub>4</sub> and then filtered. The solvent was removed under reduced pressure using a rotatory evaporator and the crude product was purified by chromatography using flash silica as a stationary phase eluting with a hexanes/ethyl acetate (4 : 1) mixture, giving compound 4 as a yellow oil in 75% yield. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.8–1.0 (t; 3H; *J* = 7.2); δ 1.2–1.4 (m; 2H); δ 1.4–1.5 (s; 9H); δ 1.5–1.7 (m; 2H); δ 2.5–2.7 (m; 4H); δ 3.3–3.5 (quart; 2H; *J* = 6.59); δ 4.8–5.1 (s; 1H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13.74; 23.13; 23.88; 24.13; 28.56; 32.84; 40.76; 78.52; 155.87. NMR <sup>77</sup>Se (38.31 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 131.2. δ 46.8. IR cm<sup>-1</sup> (film): 3348; 2958; 2924; 2873; 1689; 1504; 1365; 1249; 1165; 1037; 941; 864; 775. HRMS calculated: C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>2</sub>SeNa = 304 0792 [M<sup>+</sup>Na], found: 304.0784 [M<sup>+</sup>Na].

### Synthesis of 2-(butylselanyl)ethanamine (5)

Trifluoroacetic acid (TFA, 2 mL) was added to 4 (7 mmol; 1.68 g) in dichloromethane (10 mL) contained in a round-bottomed flask.

The mixture was kept under stirring until all of the starting material was consumed (4 hours – monitored by TLC). The resulting acidic solution was neutralized with aqueous NaHCO<sub>3(sat.)</sub> solution, and the pH was adjusted to 8. Compound 5 was extracted with dichloromethane (5 × 5 mL). CaSO<sub>4</sub> was added to the combined organic fractions, which was filtered and finally the solvent was removed in a rotatory evaporator. Compound 5 was used in the next reactional step without purification.

### Synthesis of *N*-(2-(butylselanyl)ethyl)-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahydro-1*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinoline-10-carboxamide (7)

Compound 4 (2.0 mmol; 0.561 g), coumarin 519 6 (1.0 mmol; 0.285 g) and DCC (1.2 mmol; 0.248 g) were added to the reaction flask which was kept under stirring for 4 h. The solvent was removed under reduced pressure using a rotatory evaporator and the crude product was subjected to purification by column chromatography using flash silica as a stationary phase and hexanes/ethyl acetate (2 : 1) as the eluent, giving compound 7 as a yellow solid in 90% yield. Melting point: 103–104 °C. Elemental analysis (CHNS requires: C, 59.06; H, 6.26; N, 6.31%. found: C, 59.53; H, 6.05; N, 5.97%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.13 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 3.71 (quart, *J* = 13.4, 7.0 Hz, 1H), 3.42–3.28 (m, *J* = 10.8, 4.9 Hz, 1H), 2.91 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 2.84–2.71 (m, *J* = 6.3 Hz, 1H), 2.66 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.09–1.90 (m, 1H), 1.69 (quint, 1H), 1.43 (sext, 1H), 0.93 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.56, 163.00, 152.70, 148.15, 148.10, 127.02, 119.61, 108.96, 108.27, 105.69, 50.24, 49.83, 40.22, 32.74, 27.47, 23.87, 23.00, 21.15, 20.21, 20.11, 13.60. MALDI-TOF-MS [M + H<sup>+</sup> calcd (found)]: 449.13 (449.04). UV-vis [acetonitrile; λ<sub>max</sub>, nm

( $\log \epsilon_{\max}$ ,  $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 431 (4.58). Fluorescence emission in acetonitrile ( $\lambda_{\text{exc}} = 431 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emis}} = 478 \text{ nm}$ ).

## Results and discussion

### Synthetic route

The construction of the sensor was designed to contain N and Se atoms suitably arranged to coordinate a metal cation within a five-membered ring complex. To achieve this structure, 2-amino-ethanol **1** was subjected to N-protection using a solvent-free procedure (95% yield) followed by a mesylation reaction (92%). The third step consisted of an  $\text{S}_{\text{N}}2$  reaction substituting the methanesulfonate group by the *n*-butylselenolate (generated *in situ*).<sup>20</sup> The *N*-Boc protective group was removed by reacting **4** with trifluoroacetic acid, giving **5**. Finally, we performed *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) mediated amide coupling between the alkyl-selenoamine (**5**) and the coumarin 519 (**6**), affording **7** as a yellow solid in 59% overall yield, as shown in Scheme 1. The structure of compound **7** was confirmed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, mass spectrometry, elemental analysis and infra-red spectroscopy. By the analysis of the  $^1\text{H}$  NMR spectrum (Fig. S1†), it is possible to observe some of the key signals of the whole structure. From the butyl-seleno moiety, a triplet (0.93 ppm), a sextet (1.43 ppm), a quintet (1.69 ppm) and a triplet (2.66 ppm) are related to the  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$  and  $\alpha$ -seleno butyl hydrogens, respectively. The quartet at 3.71 ppm and the triplet at 2.91 ppm correspond to the coupling between hydrogens at  $\alpha$  and  $\beta$ -*N*-amide positions. The *N*-cycloalkyl hydrogens of tertiary aniline are observed in the signals at 2.00 ppm, 2.79 ppm and 3.35 ppm. As the  $\text{CH}_2$  groups from the two fused *N*-cyclohexyl rings are not magnetically equivalent, their multiplicities are similar to those of cyclohexanes. Finally, in the upfield region of the spectrum, we observed the singlets at 8.82 ppm and 7.02 ppm related to the  $\beta$  and  $\delta$ -carbonyl hydrogens at the coumarin scaffold, and additionally the shielded H–N amide singlet at 9.13 ppm. With respect to the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (Fig. S2†), all the  $\text{sp}^3$  carbon signals from both coumarin-519 and alkyl-selenoamide residue are observed between 13 ppm and 51 ppm. The carbons from the coumarin conjugated core, except the carboxyl lactone, are observed between 105 ppm and 153 ppm. The top shielded signals are related to the lactone and amide

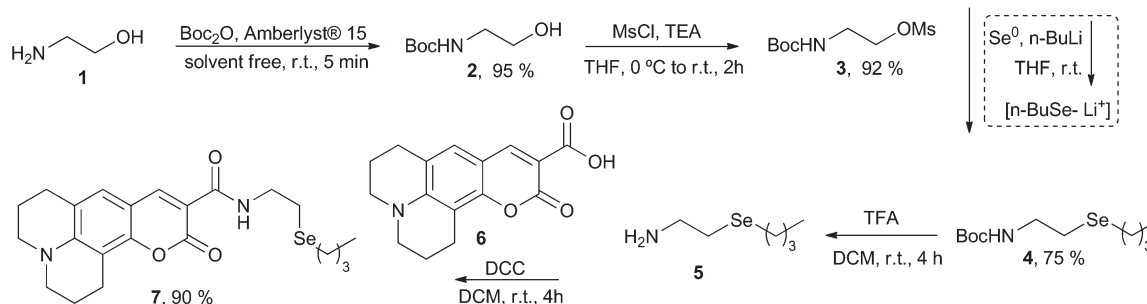
carboxyl groups, at 163 ppm and 163.6 ppm, respectively. The MALDI-TOF spectrum shows a molecular ion peak of  $[7 + \text{H}^+]$  with  $m/z$  of 449.04, in accordance with the calculated isotopic model (Fig. S3†).

### Photophysical characterization

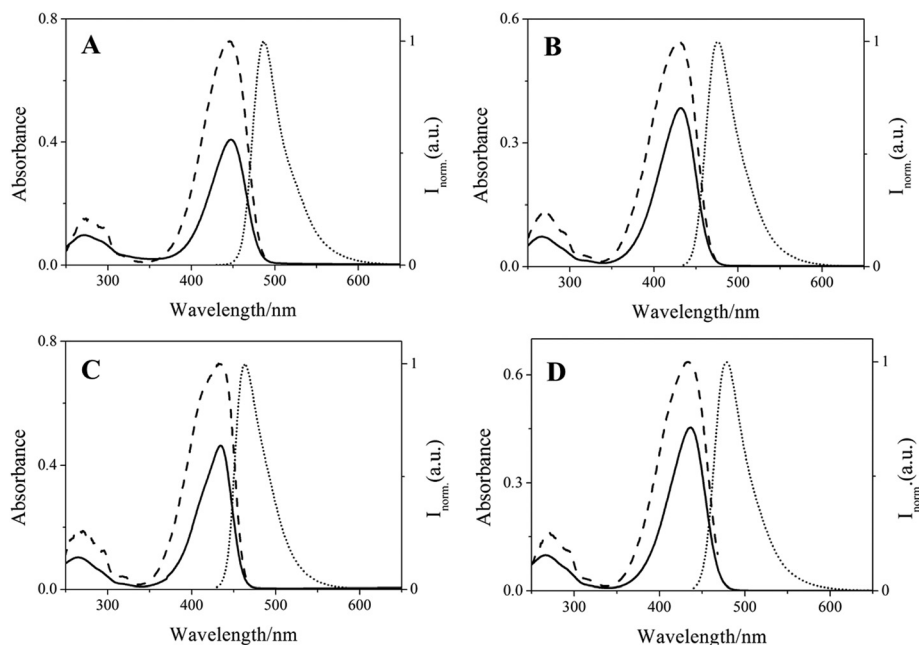
Compounds **6** and **7** were studied by absorption, stationary and time resolved fluorescence spectroscopies. In order to compare the photophysical changes between reactant (**6**) and product (**7**), we choose acetonitrile as a solvent, and the collected spectra are shown in Fig. 1A and B. By analyzing entries 1 and 2 of Table 1, a considerable hypsochromic deviation at absorption maximum, accompanied by the increase of Stokes' shift from **6** to **7** was observed by the amide bond formation. The hypsochromic shift can be discussed in terms of resonance structures and an extension of the  $\pi$ -system.

As the internal conjugation of the amide group ( $\text{RNH-C=O}$ ) is more representative than in the acid group ( $\text{HO-C=O}$ ), the amide **7** contributes least as an electron withdrawing group of the coumarin moiety compared to the carboxylic acid **6**. Therefore, **6** contains three representative resonance hybrids with six  $\pi$ -conjugated double bonds, whereas **7** contains only hybrids with five  $\pi$ -conjugated double bonds, as shown in Scheme 2. With a larger conjugated  $\pi$ -system, compound **6** absorbs and emits light at longer wavelengths than **7**. Compound **7** showed a higher quantum yield than its precursor **6**, despite the presence of a selenide group in the structure. The selenium atom is known as a fluorescence quencher when it is directly attached to or is close to a fluorogenic nucleus due to the heavy atom effect. However in compound **7** there is a spacer of four atomic units, so the electronic effect seems to be not dominant on the efficiency of emission. The lifetime of the excited states is slightly higher for **6**.

Additionally, we have characterized **7** in chloroform and ethanol (entries 3 and 4, Fig. 1C and D), with the aim of a better understanding of the influence of polarity and interaction forces on the photophysical properties of probe **7**. Given that ethanol (polar, protic), acetonitrile (polar, aprotic) and chloroform (nonpolar, aprotic) display different solvating properties, they draw attention to aspects such as Stokes' shift, quantum yield and lifetime of the excited states. In chloroform, **7** exhibited a lower value of Stokes' shift than the polar



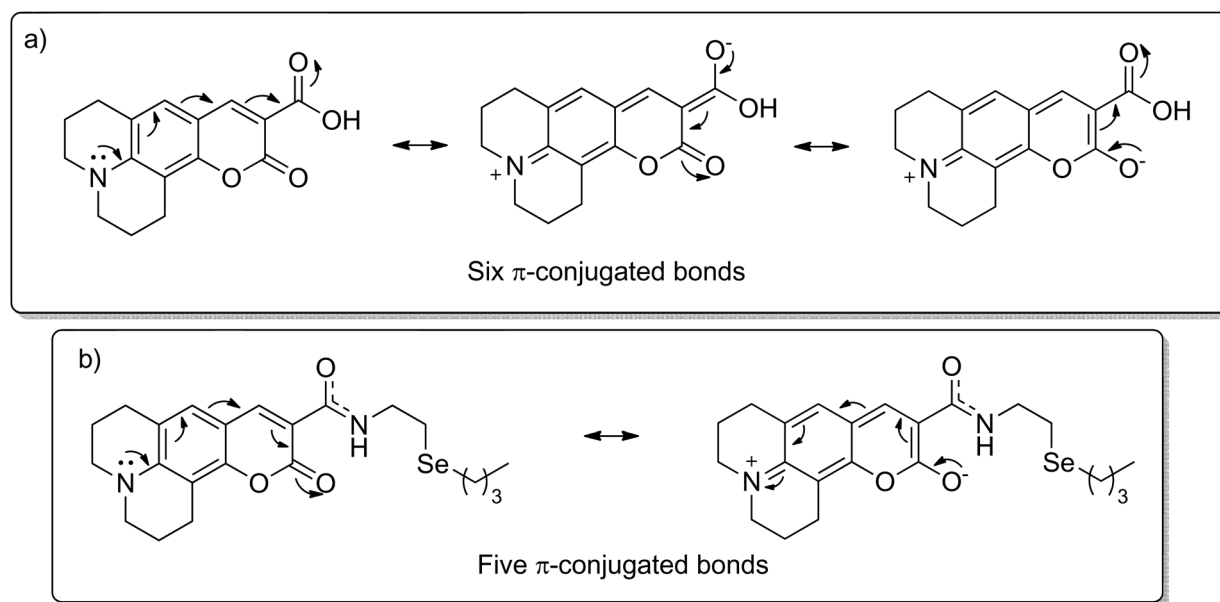
Scheme 1 Synthesis of the ligand **7**.



**Fig. 1** Room temperature absorption (full line), normalized emission (dashed line) and excitation spectra (dotted line) of compounds **6** (A;  $\lambda_{\text{exc}} = 447$  nm;  $[\mathbf{6}] = 1 \times 10^{-5}$  mol L $^{-1}$ ) and **7** (B: acetonitrile,  $\lambda_{\text{exc}} = 431$  nm; C: chloroform,  $\lambda_{\text{exc}} = 434$  nm; and D: ethanol,  $\lambda_{\text{exc}} = 436$  nm;  $[\mathbf{7}] = 1 \times 10^{-5}$  mol L $^{-1}$ ).

**Table 1** UV-vis and fluorescence data for **6** ( $1 \times 10^{-5}$  M) in acetonitrile and **7** ( $1 \times 10^{-5}$  M) in acetonitrile, chloroform, and absolute ethanol

Entry	Compounds	Solvents	UV-vis		Fluorescence			Lifetime $\tau$ (ns)
			$\lambda_{\text{exc}}$ (nm)	$\log \epsilon$	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	Stokes' shift (nm)	Quantum yield $\phi$	
1	<b>6</b>	CH <sub>3</sub> CN	447	4.61	486	39	0.56	3.86
2	<b>7</b>	CH <sub>3</sub> CN	431	4.58	478	47	0.66	3.32
3	<b>7</b>	CHCl <sub>3</sub>	434	4.67	463	29	0.73	2.96
4	<b>7</b>	EtOH	436	4.85	478	42	0.66	3.38



**Scheme 2** Hybrids of resonance of (a) **6** and (b) **7**.

solvents (acetonitrile and ethanol). It is worth noting that 7 undergoes less relaxation processes at the excited state as in Table 1. This result suggests that there are more interactions and energy transfer between polar solvents and the highly functionalized 7.

For the same reason, the higher quantum yield observed in chloroform theorizes less frequent non-radiative decays. Finally, as the emissive process is less delayed through relaxation processes, 7 displays shorter lifetimes in chloroform than in the other studied solvents.

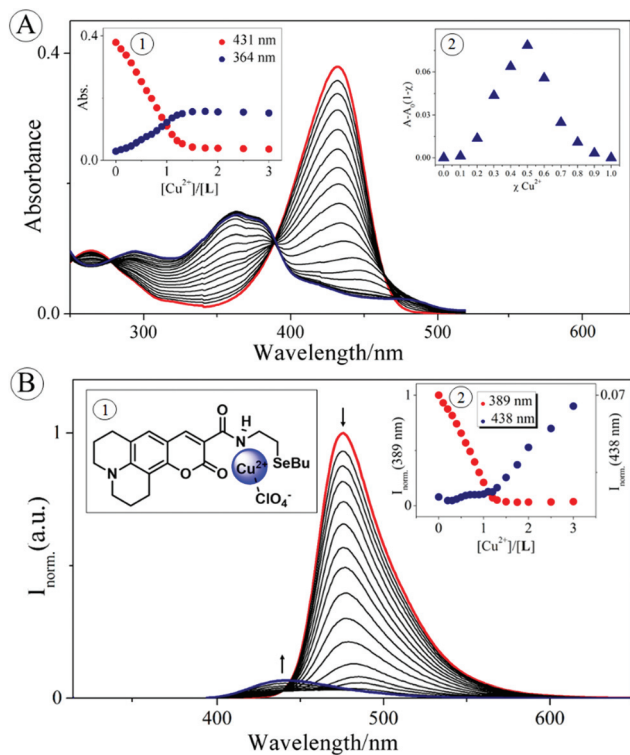
### Cu<sup>2+</sup> sensing

The sensing ability of 7 was evaluated through monovalent, divalent and trivalent metallic cations (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Hg<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup> and Cr<sup>3+</sup>) in acetonitrile solution. Among the tested ions, only Cu<sup>2+</sup> induced significant changes in the absorption and emission spectra of probe 7 (Fig. 2A). A remarkable hypsochromic shift (67 nm) was observed in the presence of the ion, from 431 nm to 364 nm. Due to this, the 7-Cu<sup>2+</sup> coordination complex formation could be followed by the naked eye as a result of the instantaneous color change of the solution from

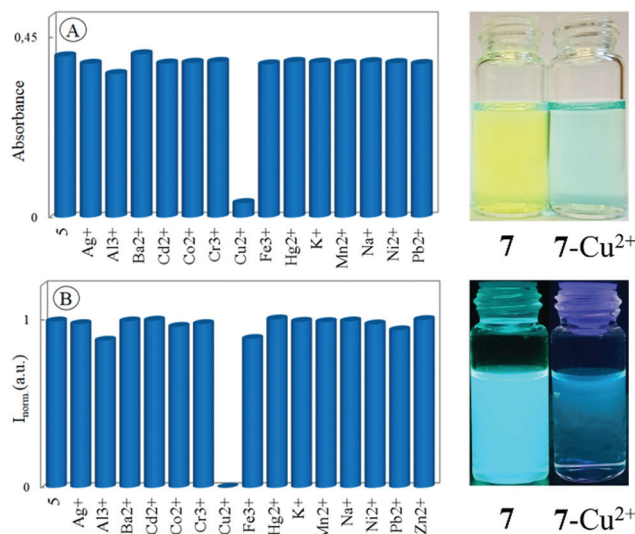
green to blue. The coumarin-519 derivative probes reported in the literature present absorption with redshift displacements (going from green to yellow or red), upon the interaction with metallic ions.<sup>21,22</sup> However, compound 7 shows the opposite pathway, going from green to blue, making it special with regard to the optical response. As Cu<sup>2+</sup> approaches the electron enriched lactone moiety (Scheme 2b), the lone electron pair of the lactone oxygen, coordinates to the metal ion, increasing the energy between HOMO and LUMO of the coumarin nucleus, resulting in a blue-shift absorption.

Considering its paramagnetic nature, Cu<sup>2+</sup> (d<sup>9</sup> electronic configuration) induces spin-orbit coupling,<sup>23</sup> resulting in the deactivation of the excited states of emissive ligands attached to Cu<sup>2+</sup> in coordination complexes. Therefore, the coordination of Cu<sup>2+</sup> by probe 7 led to an intense chelation-enhanced fluorescence quenching (CHEQ) at 478 nm, as shown in Fig. 2B. Following the selectivity test, we performed spectrophotometric and spectrofluorimetric titrations of the probe 7 with Cu<sup>2+</sup> in acetonitrile solution, and the results are presented in Fig. 3A and B, respectively. Both absorption and emission spectroscopies are able to provide analytical information regarding Cu<sup>2+</sup>, consequently compound 7 works well as both chromogenic and fluorogenic probes.

Regarding the absorption titration, the concentration of Cu<sup>2+</sup> can be monitored by the decreasing (431 nm) or rising (364 nm) bands, however, more sensitivity was reached when using the decreasing band (431 nm), due to the more pronounced slope angulation of the linear range (inset 1, Fig. 3A). Both absorption bands reach the plateau at the ratio [Cu<sup>2+</sup>]/[7] = 1, suggesting a complex stoichiometry of 1 : 1, which was confirmed by the Job's plot (inset 2, Fig. 3A).<sup>24</sup> The proposed coordination compound structure is presented in the inset 1



**Fig. 2** A: Spectrophotometric titration of 7, with increasing amounts of Cu<sup>2+</sup> in acetonitrile solution. Inset: (1) absorption at 431 nm (red) and 364 nm (blue) as a function of [Cu<sup>2+</sup>]/[7] (*T* = 298 K; [7] = 1 × 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>). (2) Job plot in acetonitrile (λ<sub>abs</sub> = 364 nm). B: Spectrofluorimetric titration of 7, with increasing amounts of Cu<sup>2+</sup>. Inset: (1) Proposed coordination compound structure and geometry. (2) Normalized emission at 478 nm (red) and 438 nm (blue) as a function of [Cu<sup>2+</sup>]/[7] (*T* = 298 K; [7] = 1 × 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>; λ<sub>exc</sub> = 389 nm).



**Fig. 3** (A) Absorbance at 431 nm and (B) normalized fluorescence emission at 478 nm of compound 7 (1.0 × 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) in the presence of 5 molar equiv. of different metallic ions (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Hg<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup> and Cr<sup>3+</sup>) in acetonitrile solution.



**Table 2** Photophysical data of **7** and the **7-Cu<sup>2+</sup>** complex in acetonitrile

Compounds/complex	UV-vis		Fluorescence			
	$\lambda_{\text{exc}}$ (nm)	$\log \epsilon$	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	Stokes' shift (nm)	Quantum yield	Lifetime (ns)
<b>6</b>	447	4.61	486	39	0.56	3.86
<b>7</b>	431	4.58	478	47	0.66	3.32
<b>7-Cu<sup>2+</sup></b>	364	4.18	438	74	0.0053	2.68

of Fig. 3B. The isosbestic point at 389 nm is clear evidence that the stoichiometry of the reaction remains unchanged and that no secondary reactions occur during the formation of the **7-Cu<sup>2+</sup>** complex.<sup>25</sup>

With respect to the fluorescence titration, analytical information could be extracted from the quenching at 476 nm. As is observed in the absorption data, the emission plateau is reached at 1 molar equivalent of **Cu<sup>2+</sup>**, as shown in the inset of Fig. 3B.

In the interest of having more accurate analytical details on the **Cu<sup>2+</sup>** sensing, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), as well the minimum detectable amount (MDA) and minimum quantifiable amount (MQA) were calculated, as presented in the "Experimental section". From the absorption data, by tracking the 431 nm maximum, the MDA and MQA were found to be 0.2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 0.4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively. From the emission data, at the 478 nm maximum, the MDA was found to be 0.6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and the MQA = 1.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

The equilibrium constant of the **7-Cu<sup>2+</sup>** complex formation ( $\log \beta$ ) in acetonitrile solution was calculated from the absorption and emission titration data by using the HypSpec software,<sup>26</sup> and both values were close ( $\log \beta = 5.78 \pm 0.01$  (absorption) and  $\log \beta = 6.32 \pm 0.04$  (emission)).

To compare the photophysical changes between the complex and the free ligand, characterization of both are summarized in Table 2. Apart from the above mentioned hypsochromic shift, it draws attention to the enormous decrease of 125 times in the quantum yield, from  $\phi = 0.66$  in **7** to  $\phi = 0.0053$  in the **7-Cu<sup>2+</sup>** complex and such remarkable quenching is the influence of the paramagnetic **Cu<sup>2+</sup>** center in the deactivation of the excited state of chromophores. The Stokes shift increased considerably, from 47 nm (**7**) to 74 nm (**7-Cu<sup>2+</sup>** complex), and the lifetime of the excited state decreased from 3.32 ns for **7** to 2.68 ns for **7-Cu<sup>2+</sup>**.

## Conclusions

A new seleno derivative probe containing a coumarin-519 (**7**) was synthesized and characterized. The photophysical properties and sensing ability were evaluated among a series of metallic ions. Probe **7** showed high selectivity to **Cu<sup>2+</sup>** ions, giving a coordination compound of 1:1 stoichiometry. The interaction between the ion and ligand was evidenced by the abrupt changes in the absorption and emission patterns. A considerable hypsochromic shift of the **7-Cu<sup>2+</sup>** complex was

observed in comparison with the free ligand. The not expected absorption blue shift was attributed to the complexation of the ligand by the ion at the lactone-amide-selenide moiety of **7**, and this characteristic is the major difference of our probe compared to coumarin-519 derivative probes reported in the literature, which usually result in absorption redshift. The complexation is reinforced by the presence of the selenide group, which is compatible with **Cu<sup>2+</sup>** according to the hard/soft-acid/base Pearson's theory. A strong CHEQ effect was observed for the **7-Cu<sup>2+</sup>** complex, which was attributed to the paramagnetic character of the divalent cation. The probe showed detection and quantification limits under the micromolar range, especially in UV-vis measurements. Compound **7** loses the ability to recognize **Cu<sup>2+</sup>** in protic solvents, however, it displays an attractive attribute to applications regarding aprotic environments, such as in mechanistic studies involving **Cu<sup>2+</sup>** as a catalyst or even quantification in micellar systems, membranes and cellular organelles.

## Acknowledgements

This work was supported by the PROTEOMASS Scientific Society (Portugal), the Unidade de Ciências Biomoleculares Aplicadas-UCIBIO/REQUIMTE (FCT/MEC – UID/Multi/04378/2013), LAQV/REQUIMTE (UID/QUI/50006/2013 (POCI-01-0145-FEDER-007728)). A. Gonçalves is thankful to CNPq/Brazil for his PhD grant. C. Lodeiro is thankful to the CNPq program, Science without borders 2014–2016 for the "Special Guest Researcher" grant (Brazil). All authors are also grateful for the financial and structural support offered by the University of São Paulo through the NAP-CatSinQ (Research Core in Catalysis and Chemical Synthesis), FAPESP and CAPES for financial support (Brazil).

## References

- 1 F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana and E. Uriarte, *Curr. Med. Chem.*, 2005, **12**, 887–916.
- 2 J. Fernández-Lodeiro, M. F. Pinatto-Botelho, A. A. Soares-Paulino, A. C. Gonçalves, B. A. Sousa, C. Princival and A. A. Dos Santos, *Dyes Pigm.*, 2014, **110**, 28–48.
- 3 L. Gai, J. Mack, H. Lu, T. Nyokong, Z. Li, N. Kobayashi and Z. Shen, *Coord. Chem. Rev.*, 2015, **285**, 24–51.
- 4 A. C. Gonçalves, N. C. Sato, H. M. Santos, J. L. Capelo, C. Lodeiro and A. A. dos Santos, *Dyes Pigm.*, 2015, 1–7.

- 5 J.-L. Habib Jiwan, C. Branger, J.-P. Soumillion and B. Valeur, *J. Photochem. Photobiol., A*, 1998, **116**, 127–133.
- 6 V. Desai and S. G. Kaler, *Am. Soc. Clin. Nutr.*, 2008, **88**, 855–858.
- 7 C. S. Atwood, R. D. Moir, R. C. Scarpa, N. E. Michael, D. M. Romano, a. Mariana, R. E. Tanzi, I. Ashley, X. Huang, N. M. E. Bacarra, M. a. Hartshorn and A. I. Bush, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 12817–12826.
- 8 X. Huang, M. P. Cuajungco, C. S. Atwood, M. a. Hartshorn, J. D. a. Tyndall, G. R. Hanson, K. C. Stokes, M. Leopold, G. Multhaup, L. E. Goldstein, R. C. Scarpa, A. J. Saunders, J. Lim, R. D. Moir, C. Glabe, E. F. Bowden, C. L. Masters, D. P. Fairlie and R. E. Tanzi, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 37111–37116.
- 9 X. Chen, M. J. Jou, H. Lee, S. Kou, J. Lim, S. W. Nam, S. Park, K. M. Kim and J. Yoon, *Sens. Actuators, B*, 2009, **137**, 597–602.
- 10 P. Li, X. Duan, Z. Chen, Y. Liu, T. Xie, L. Fang, X. Li, M. Yin and B. Tang, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 7755–7757.
- 11 B. Tang, F. B. Yu, W. S. Zhang, P. Li, Y. L. Xing, L. L. Tong and J. P. Ma, *Analyst*, 2009, **134**, 1826–1833.
- 12 Z. Xu, J. Yoon and D. R. Spring, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 2563–2565.
- 13 Q.-H. You, A. W.-M. Lee, W.-H. Chan, X.-M. Zhu and K. C.-F. Leung, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 6207–6210.
- 14 C. Yu, J. Zhang, R. Wang and L. Chen, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 5277–5279.
- 15 S. R. Chemler, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2015, **11**, 2252–2253.
- 16 C. Núñez, M. Diniz, A. a. Dos Santos, J. L. Capelo and C. Lodeiro, *Dyes Pigm.*, 2014, **101**, 156–163.
- 17 D. Pinheiro, C. S. De Castro, J. S. Seixas De Melo, E. Oliveira, C. Núñez, A. Fernández-Lodeiro, J. L. Capelo and C. Lodeiro, *Dyes Pigm.*, 2014, **110**, 152–158.
- 18 A. C. Gonçalves, V. Pilla, E. Oliveira, S. M. Santos, J. L. Capelo, A. A. Dos Santos and C. Lodeiro, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 9513–9522.
- 19 G. A. Reynolds and K. H. Drexhage, *Opt. Commun.*, 1975, **13**, 222–225.
- 20 A. L. Braga, L. A. Wessjohann, P. S. Taube, F. Z. Galetto and F. M. de Andrade, *Synthesis*, 2010, 3131–3137.
- 21 H. S. Jung, J. H. Han, Z. H. Kim, C. Kang and J. S. Kim, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 5056–5059.
- 22 D. Taziaux, J. Soumillion and J. H. Jiwan, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2004, **162**, 599–607.
- 23 S. S. Razi, P. Srivastava, R. Ali, R. C. Gupta, S. K. Dwivedi and A. Misra, *Sens. Actuators, B*, 2015, **209**, 162–171.
- 24 J. S. Renny, L. L. Tomasevich, E. H. Tallmadge and D. B. Collum, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 11998–12013.
- 25 A. D. McNaught and A. Wilkinson, in *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2nd edn, 1997.
- 26 P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, 1996, **43**, 1739–1753.



Cite this: DOI: 10.1039/c6dt01180b

## The interaction of Hg<sup>2+</sup> and trivalent ions with two new fluorescein bio-inspired dual colorimetric/fluorimetric probes†

A. C. Gonçalves,<sup>a,b</sup> V. Pilla,<sup>b,c</sup> E. Oliveira,<sup>b</sup> S. M. Santos,<sup>d</sup> J. L. Capelo,<sup>b,e</sup>  
A. A. Dos Santos<sup>\*a</sup> and C. Lodeiro<sup>\*b</sup>

Two new luminescent compounds containing fluorescein–amino acid units have been designed and synthesized *via* an ester linkage between a fluorescein ethyl ester and Boc-Ser(TBDMS)-OH or Boc-Cys(4-MeBzl)-OH, and their photophysical properties have been explored. The optical response of both compounds (**2** and **3**) towards the metal ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Hg<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup> and Cr<sup>3+</sup> was investigated in pure acetonitrile and in acetonitrile/water mixtures. A strong CHEF (Chelation-Enhanced Fluorescence) effect was observed with all the trivalent metals and Hg<sup>2+</sup> ions in both solvents. UV-vis absorption, steady state and time resolved emission spectroscopy methods were employed. The results show the formation of mononuclear complexes with Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, and Hg<sup>2+</sup>. Theoretical calculation using Density Functional Theory was performed in order to obtain atomistic insights into the coordination geometry of Al<sup>3+</sup> and Hg<sup>2+</sup> to the fluorescein **3**, which is in accordance with the experimental stoichiometry results obtained in the Job's plot method. Among the active cations, the minimum detectable amount is under 1 μM for most of the cases in both absorption and fluorescence spectroscopy methods.

Received 26th March 2016,  
Accepted 29th April 2016

DOI: 10.1039/c6dt01180b

www.rsc.org/dalton

### Introduction

Fluorescein, and its derivatives, are a very interesting class of versatile green emissive dyes due to their potential application in biological fields such as in cellular biology, cellular imaging, as molecular tools in biochemistry and biomedical fields.<sup>1,2</sup> Fluorescein-based derivatives are usually soluble in water, present good cell membrane penetration capacity, exhibit pH-responsive variations, show high fluorescence quantum yields, exhibit strong extinction coefficients, and are very useful for metal ion detection and quantification.<sup>3–7</sup> In its free-acid form, fluorescein is a very versatile fluorogenic building block for organic synthesis, due to the presence of both

nucleophilic (phenolic) and electrophilic (carboxylate) functional groups. However, the presence of oxygenated functional groups around the whole of its molecular structure makes fluorescein poorly selective when seeking for a specific analyte or a class of analytes. The structural modification of the marginal functional groups of the xanthene moiety<sup>8</sup> may allow the adjustment of the properties of the chromophore for specific applications making this dye one of the most widely explored probes. Having this concept in mind, the association of the fluorescein core with endogenous biomolecules such as amino acids or peptides<sup>9,10</sup> is a promissory field of investigation since biocompatible chemosensors for *in vivo* applications can be envisioned. Metals like mercury (Hg<sup>2+</sup>) and chromium (Cr<sup>3+</sup>) are considered to be the most impactful with respect to their environmental contamination and toxicity to living organisms. Hg<sup>2+</sup> exerts many toxic effects to living organisms including oxidative damage, neuro-toxicological disorders, carcinogenicity, *etc.*<sup>11,12</sup> Mercury may occur in metallic, ionic, organometallic and complex forms,<sup>13,14</sup> Hg<sup>2+</sup> being the most stable oxidation state. In this form it can be easily bioaccumulated in foods or directly in animals, humans or other living entities.<sup>15</sup> Hg<sup>2+</sup> presents very high affinity for sulfur atoms, leading to very stable complexes; indeed, it is able to bind very efficiently to exogenous as well as endogenous sulfur-containing derivatives and this is the main reason for accumulative intoxication in living organisms.<sup>16,17</sup> Concerning trivalent cations, Cr<sup>3+</sup> is

<sup>a</sup>Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, CxP. 26077, São Paulo, 05508-000, Brazil. E-mail: alcindo@iq.usp.br

<sup>b</sup>BIOSCOPE Group, UCIBIO-REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Portugal. E-mail: cle@fct.unl.pt, clodeiro@bioscopegroup.org

<sup>c</sup>Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia-UFU, Av. João Naves de Ávila 2121, Uberlândia, MG 38400-902, Brazil

<sup>d</sup>CICECO - Aveiro Institute of Materials, Department of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

<sup>e</sup>Proteomass Scientific Society, Rua dos Inventores, Madan Park, 2829-516 Caparica, Portugal

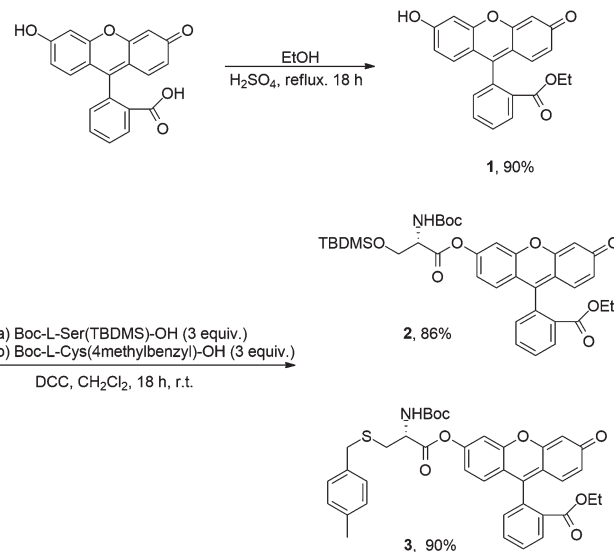
† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6dt01180b

an essential element playing an important role in nutrition and some metabolic processes of humans but it is also a major environmental pollutant.<sup>18,19</sup> The chromium oxidation states can range from  $-2$  to  $+6$ , wherein  $\text{Cr}^{3+}$  is the far predominant species of chromium in living organisms.<sup>20</sup>  $\text{Cr}^{3+}$  plays essential roles in “trace amounts” (50–200  $\mu\text{g}$  per day), necessary for the maintenance of glucose metabolism. However, the ingestion of doses up to 50  $\text{mg kg}^{-1}$  is lethal in human adults.<sup>21</sup>  $\text{Al}^{3+}$  is naturally abundant in silicates, cryolite and bauxite rocks, this last mineral being the main raw material in the production of metallic aluminum. It is even present in some pharmaceutical formulations as aluminum hydroxide in gastric pH regulators.<sup>22</sup> Although not yet well understood, there is some evidence pointing to the association of  $\text{Al}^{3+}$  with brain disorders like Parkinson's and Alzheimer's disease.<sup>23,24</sup> Considering the importance of these elements in life and consequently the need for their detection as well as quantification in different matrices, the development of selective and sensible analytical methods is still an interesting field of investigation.<sup>25–28</sup> Xiaoxu Li *et al.*<sup>29</sup> demonstrated the construction of bio-inspired compounds by the union of amino acids and fluorescein from its phenolic group by a very simple strategy. Marta Mameli *et al.*<sup>11</sup> demonstrated the effect of the presence of the sulfur atom in anthracenylmethyl derivatives in order to design probes to detect  $\text{Hg}^{2+}$ . Barba-Bon *et al.*<sup>30</sup> reported the preparation of fluorescein ester derivatives used as probes for trivalent metallic ions. In order to apply accessible reagents as fluorescein and amino acids in the detection of metallic ions, in this work we present the synthesis, characterization and spectroscopic studies of two new fluorescein-based amino acid derivatives and their application for the fluorescence detection of some trivalent ions ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  and  $\text{Cr}^{3+}$ ) and  $\text{Hg}^{2+}$ . The molecular probe structures and their photophysical properties were characterized and their sensing ability towards a range of ions in acetonitrile and aqueous acetonitrile solutions was evaluated. DFT calculations were also performed to unveil the complexation mode by varying the metal ion.

## Results and discussion

### Synthetic approach

The first step of the synthetic route started with Fischer's esterification of fluorescein, followed by coupling with the amino acid derivatives Boc-ser(TMS)-OH and Boc-cys(4-methylbenzyl)-OH, using *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) as a carboxylic activator group, which resulted in the esters **2** and **3** in 86% and 90% yields, respectively as presented in Scheme 1. Both the compounds were characterized by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, elemental analysis, mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), UV-vis absorption, and emission spectroscopy, and lifetime measurements of the excited state were performed. The  $^1\text{H}$  NMR spectra of **2** and **3** (Fig. S3 and S5†) present the singlet signal of the *t*-butyl from the *N*-Boc protective group and the characteristic signals of the amino acid backbone NH carbamate,  $\alpha$ -CH and  $\beta$ - $\text{CH}_2$  from serine and cysteine side chains.



Scheme 1 Synthesis of ligands **2** and **3**.

For compound **2**, the H-methyl and H-*tert*-butyl attached to the silane group are observed in the upfield region of the spectra, due to the shielding effect by silicon.

Also, the signals due to the heterocyclic rings of the fluorescein moieties were visible between 6.5 and 8.3 ppm. The signals belonging to  $\text{CH}_2$  (4.1 ppm) and  $\text{CH}_3$  (1.0 ppm) from ethyl benzoate of fluorescein were observed for compounds **2** and **3**. Relative to the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra (Fig. S4 and S6†), the formation of the ester function was confirmed by the appearance of the signal of the quaternary carbonyl group at about 186 ppm, as well as by the  $\alpha$ -carbon at 56.2 ppm (**2**) and 53.5 ppm (**3**). The IR spectra show some of the main signals, such as the carbonyl of the aliphatic ester that binds the fluorescein to the amino acid residue at  $1770\text{ cm}^{-1}$  and the carbonyl of the ethyl benzoate at  $1720\text{ cm}^{-1}$ . The broad band around  $3300\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the secondary N-H carbamate stretching present in both compounds **2** and **3**.<sup>31</sup> Moreover, from the MALDI-TOF-MS analysis it is possible to identify the protonated molecular ion peak species [**2** +  $\text{H}^+$ ] at 662.28  $m/z$  and [**3** +  $\text{H}^+$ ] at 668.23  $m/z$  (Fig. S12 and S13†).

### Photophysical characterization

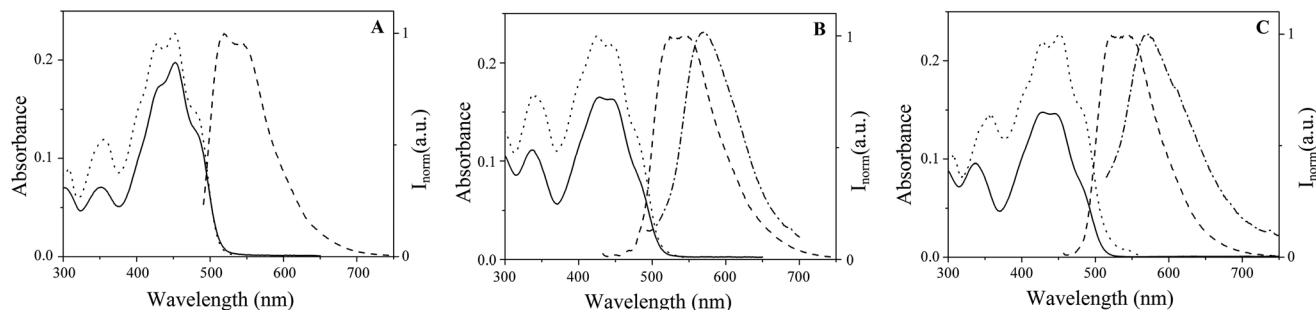
The fluorescein derivatives **1**, **2** and **3** were characterized in acetonitrile at 298 K and the main characterization data were gathered and are given in Table 1. Fig. 1 presents the absorption, emission and excitation spectra of all compounds. Indeed, the perfect match between the absorption and excitation spectra rules out the absence of emissive impurities.

The absorption spectra revealed peaks at 452 nm for **1**, and 428 nm for **2** and **3** attributed to  $\pi$ - $\pi^*$  transitions of the fluorescein chromophore. Considering the emission spectra characteristic bands at 519 nm for **1** and 546 nm for **2** and **3** are visualized. The coupling of the amino-acids to compound **1** leads to a bathochromic shift of 24 and 27 nm in the absorption and emission maximum bands, and an increase in the



**Table 1** UV-vis and fluorescence data for **1**, **2** and **3** ( $1 \times 10^{-5}$  M) in acetonitrile

Compounds	UV-vis		Fluorescence				
	$\lambda_{\text{exc}}$ (nm)	$\log \epsilon$	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ Solid (nm)	Stokes' shift (nm)	Quantum yield $\phi$	Lifetime $\tau$ (ns)
<b>1</b>	452	4.30	519	—	67	0.024	$3.8 \pm 0.1$
<b>2</b>	428	4.22	546	576	118	0.002	$2.3 \pm 0.1$
<b>3</b>	428	4.16	546	572	118	0.004	$2.5 \pm 0.1$

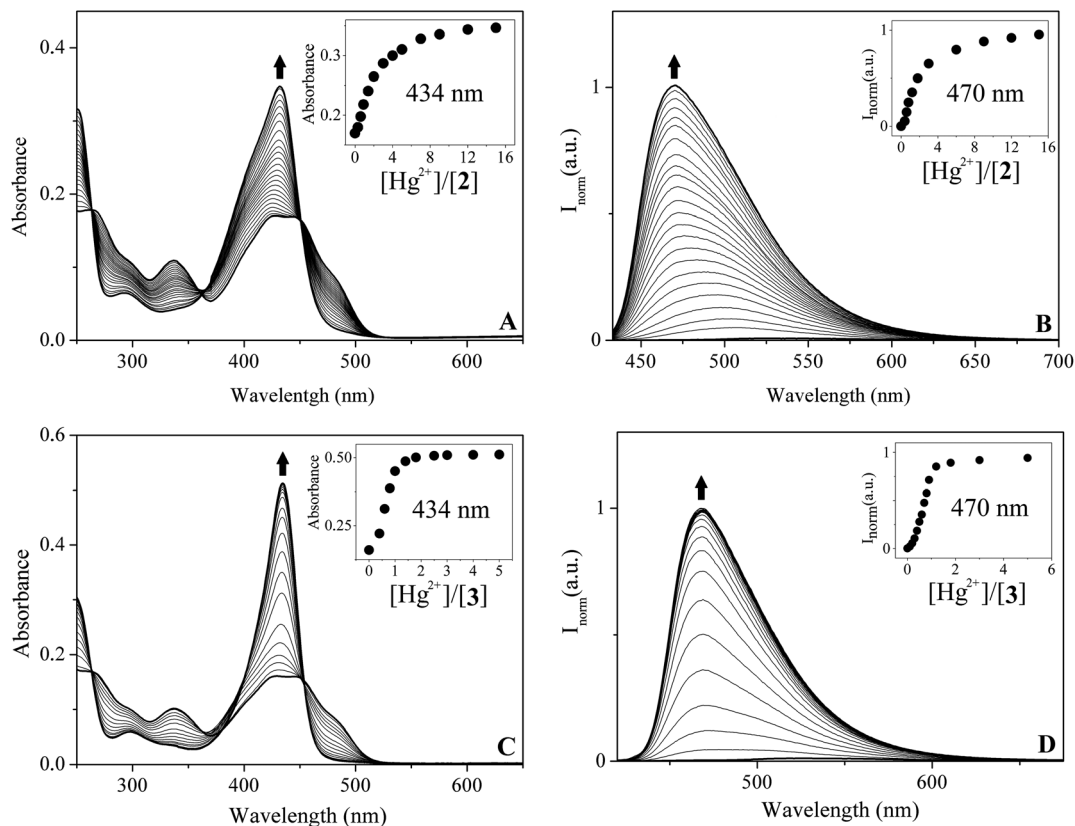
**Fig. 1** Room temperature absorption (full line), normalized emission (dashed line,  $\lambda_{\text{exc}} = 452$  nm in part A;  $\lambda_{\text{exc}} = 428$  nm in parts B and C) and excitation spectra (dotted line,  $\lambda_{\text{em}} = 519$  nm in part A;  $\lambda_{\text{em}} = 546$  nm in parts B and C) of compounds **1** (A), **2** (B) and **3** (C) in acetonitrile ( $1.10^{-5}$  M). Emission spectra in the solid state (dotted dashed line,  $\lambda_{\text{exc}} = 428$  nm, in parts B and C) of compounds **2** (B) and **3** (C).

Stokes' shift is also observed. The relative fluorescence quantum yields ( $\Phi$ ) of compounds **1** to **3** were calculated using acridine yellow as the standard ( $\Phi = 0.47$  in ethanol),<sup>32</sup> where values of 0.023, 0.002 and 0.004 were determined, respectively. As can be noted, the insertion of substituted amino acids in the precursor **1** at position 6 of the xanthene moiety led to a decrease of 10 times in the fluorescence quantum yield. In turn, when compared the quantum yield of **1** ( $\Phi = 0.024$ ) with the free acid fluorescein in its neutral form ( $\Phi = 0.30$ ),<sup>4</sup> there was a decrease of 13 times in the emission of fluorescence. The decrease in the quantum yield of the free-acid fluorescein compared to **1** can be attributed to the steric hindrance imposed by the ethyl group, which results in a perpendicular arrangement between xanthene and benzoic moieties, making the  $\pi$  orbital overlap impaired, a condition for the  $\pi$ - $\pi^*$  electronic transitions.<sup>33</sup> It is known that the methyl ester of fluorescein, where both hydroxyl groups are modified, is highly fluorescent.<sup>33</sup> However, herein two asymmetric probes (**2** and **3**) are reported, they can be compared with rhodols.<sup>34</sup> In the case of rhodols the fluorescence quantum yields decrease in accordance with the length of the linker. Fluorescence decays were measured in acetonitrile at 298 K, with excitation at 460 nm. All fluorescence decays were well fitted with a double exponential law, with decay times of 3.8, 2.3 and 2.5 ns, which are directly proportional to the quantum yield.<sup>3</sup> The emission of compounds **2** and **3** was measured in the solid state using a fiber optic system connected to the HORIBA Scientific Fluoromax-4. In the solid state both compounds show the maximum emission peaks to be red shifted,  $\Delta\lambda = 26$ – $30$  nm, in relation to the ones obtained in solution, the maximum wavelength being located at 576 nm and 572 nm for compounds **2** and **3**, respectively.

### Metallic ion sensing

The sensing ability of compounds **2** and **3** towards alkali ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), alkaline earth ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ), transition ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^+$  and  $\text{Hg}^{2+}$ ), and post-transition ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ) metal ions were evaluated by ligand titrations with increasing additions of the metal salts. The titrations were followed by absorption and fluorescence emission spectroscopy. Both compounds were silent in the presence of alkaline and alkaline earth metal ions. Concerning transition and post-transition metal ions, only  $\text{Hg}^{2+}$  and the trivalent  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Ga}^{3+}$  metal ions were able to coordinate with the fluorescein derivatives **2** and **3**. Fig. 2 shows the absorption and emission titrations of compounds **2** and **3** with the  $\text{Hg}^{2+}$  metal ion. A similar spectral behavior was observed in both compounds, whereas, in the absorption spectra, an increase at 431 nm and 434 nm in the absorbance with a concomitant disappearance of the band at 490 nm was detected, for compounds **2** and **3**, respectively. Probes **2** and **3** practically exhibit no fluorescence, however, surprisingly, a strong chelation-enhanced fluorescence (CHEF) at 470 nm (**2**) and 468 nm (**3**) was observed with  $\text{Hg}^{2+}$ . Due to its heavy metal ion nature, which usually leads to non-radiative decays, most systems using fluorescence spectroscopy for detecting  $\text{Hg}^{2+}$  are based on the complexation enhancement of the fluorescence quenching (CHEQ) effect.<sup>11,35–37</sup> On the other hand, only a few fluorescence chemosensors are based on the CHEF effect.<sup>38–42</sup>

Thus, this fact makes probes **2** and **3** very appealing for detection of toxic  $\text{Hg}^{2+}$  metal ions. Probes **2** and **3** also showed immediate turn-on upon the addition of trivalent metal ions,



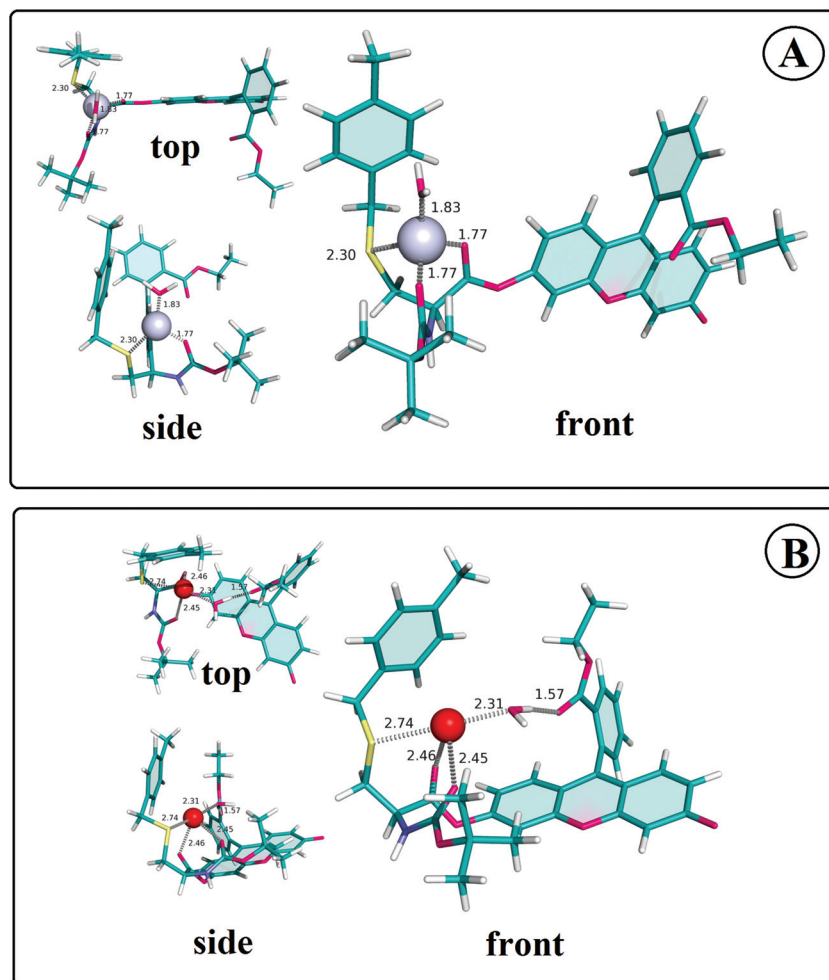
**Fig. 2** Spectrophotometric titrations of **2** (A) and **3** (C), with increasing amounts of  $\text{Hg}^{2+}$  in acetonitrile solution. Inset: Absorption at 434 nm as a function of  $[\text{Hg}^{2+}]/[\mathbf{2}]$  and  $[\text{Hg}^{2+}]/[\mathbf{3}]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[\mathbf{2}] = [\mathbf{3}] = 1.10^{-5} \text{ M}$ ). Spectrofluorometric titrations of **2** (B) and **3** (D), with increasing amounts of  $\text{Hg}^{2+}$  in acetonitrile solution. Inset: Emission at 470 nm as a function of  $[\text{Hg}^{2+}]/[\mathbf{2}]$  and  $[\text{Hg}^{2+}]/[\mathbf{3}]$  ( $T = 298 \text{ K}$ ;  $[\mathbf{2}] = [\mathbf{3}] = 1.10^{-5} \text{ M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 362 \text{ nm}$ ).

such as  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , and  $\text{Ga}^{3+}$ , despite  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  being known as fluorescence quenchers. Trivalent  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  are very effective fluorescence quenchers due to their paramagnetic nature, for this reason there are few turn-on sensors for these trivalent metal ions.<sup>43,44</sup> In contrast  $\text{Al}^{3+}$  is diamagnetic, whereas its binding to sensors usually enhances the fluorescence signal. Fig. S7–S10<sup>†</sup> show the absorption and emission titration of both compounds with  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Ga}^{3+}$  metal ions. Upon exposition of the probes to these metal ions, the absorbance at 490 nm decreases gradually and simultaneously a new significant band at 431 nm and 434 nm was developed. In the range of 450–600 nm, compounds **2** and **3** presented a weak emission, whereas a significant enhancement of the emission signal was detected at 500 nm and 493 nm for **2** and **3**, respectively. Barba-Bon and co-workers<sup>30</sup> published a similar selective turn-on chromo-fluorogenic probe for  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Al}^{3+}$ , whereas they showed by NMR studies the eventual involvement of the xanthene moiety in the metal coordination. Atomistic insights into the coordination geometry of  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  to the fluorescein **3** were obtained from density functional theory calculations with the B3LYP functional. The lowest energy complex conformations found for both  $3\text{-Al}^{3+}$  and  $3\text{-Hg}^{2+}$  (Fig. 3) involve the coordination of the metal to two carbonylic oxygens (from the ester moieties) and the sulphur from the thioether. In the case of  $3\text{-Al}^{3+}$

(Fig. 3A), the cation is tetrahedrally coordinated to the receptor ( $d_{\text{Al}\dots\text{O}=\text{C}} = 1.77 \text{ \AA}$  and  $d_{\text{Al}\dots\text{S}} = 2.30 \text{ \AA}$ ) and a water molecule ( $d_{\text{Al}\dots\text{OH}_2} = 1.83 \text{ \AA}$ ). Similarly, and in the case of  $3\text{-Hg}^{2+}$  (Fig. 3B), the cation is coordinated to the receptor ( $d_{\text{Al}\dots\text{O}=\text{C}} = 2.45$  and  $2.46 \text{ \AA}$  and  $d_{\text{Al}\dots\text{S}} = 2.74 \text{ \AA}$ ) and a water molecule ( $d_{\text{Al}\dots\text{OH}_2} = 2.31 \text{ \AA}$ ) in a highly distorted tetrahedral geometry (the water molecule was included in the calculation as a way to provide an anchor point for stabilizing the coordination sphere of the cation).

On one hand, both binding arrangements suggest that the prearrangement of the two carbonyl groups and the thioether adequately provide a coordination pocket for accommodating the cation. On the other hand, the ionic radius of the metallic cation suggests that it plays an important role in the overall conformation of the association since coordination to larger cations can lead to the involvement of the ester oxygens from the fluorescein moiety. These results support the experimentally inferred coordination mode of the metal to the receptor. The association constants using the HypSpec<sup>45</sup> program corroborate the theoretical model complexation of one ligand per metal ion ( $L : M 1 : 1$ ), and the main results are summarized in Table 2.

The values obtained are almost of the same order ( $\log \beta \approx 5$ ), with the exception of  $\text{Hg}^{2+}$  whereas a higher value of  $\log \beta \approx 6.5$  was observed for compound **3**. This fact is due to the presence of the sulphur atom in the cysteine amino acid in



**Fig. 3** (A) Top, side and front views of the lowest energy conformation of the **3**–Al<sup>3+</sup> complex, indicating the distances between the receptor's interaction sites and cation (color code: C – teal; O – pink; H – white; S – yellow; N – blue, Al – light blue sphere). (B) Top, side and front views of the lowest energy conformation of the **3**–Hg<sup>2+</sup> complex, indicating the distances between the receptor's interaction sites and cation (color code as in (A); Hg – red sphere).

**Table 2** Stability constants  $\log \beta$  obtained from absorbance (A) and fluorescence (F) titration data. The HypSpec program was applied considering 1 : 1 interaction

Compounds	2		3	
	$\log \beta$ (A)	$\log \beta$ (F)	$\log \beta$ (A)	$\log \beta$ (F)
Hg <sup>2+</sup>	5.1 ± 0.1	5.4 ± 0.1	6.5 ± 0.2	6.2 ± 0.2
Ga <sup>3+</sup>	5.0 ± 0.2	4.8 ± 0.3	5.4 ± 0.3	5.8 ± 0.3
Cr <sup>3+</sup>	5.2 ± 0.3	4.9 ± 0.2	5.3 ± 0.1	5.1 ± 0.3
Al <sup>3+</sup>	5.3 ± 0.3	5.1 ± 0.3	5.5 ± 0.1	5.1 ± 0.3
Fe <sup>3+</sup>	5.0 ± 0.3	5.2 ± 0.2	4.9 ± 0.3	5.5 ± 0.1

compound **3**, which confers a higher affinity to the Hg<sup>2+</sup> metal ion.<sup>46</sup> The final stoichiometry of **2** and **3** with each of the ions was confirmed by the Job's plot method and the results are compiled in Fig. S14.† Fig. 4 shows a general overview of the fluorescence properties of the probes **2** and **3** upon the addition of all the metal ions studied. The emission spectra of **2** and **3** upon the addition of 4 equivalents of alkali (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>),

alkaline earth (Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>), transition (Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup>) and post-transition (Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>) metal ions were recorded. Careful inspection of Fig. 4 leads to the conclusion that **2** and **3** show a turn-on and an unprecedented selectivity for Hg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup> and Ga<sup>3+</sup> metal ions producing intense emissive green-blue colours upon complexation by these metals. The difference in the coordination mode observed in the DFT calculations can be extended to the other trivalent ion complexes, and is reflected directly in the emission wavelengths: green for X<sup>3+</sup> (around 500 nm) and blue for Hg<sup>2+</sup> (470 nm), as shown at the bottom of Fig. 4B. In order to study the properties of probes **1**, **2** and **3**, the photophysical characterization in a mixture of acetonitrile/water (1 : 1) was carried out (Fig. 5). The addition of water induces a red shift in the maximum of absorption, from 428 nm to 460 nm in compounds **2** and **3**.

As is known, due to the high affinity of the studied metallic ions for water, the addition of an excess of water to the system involving the probes/analytes in acetonitrile solution induces

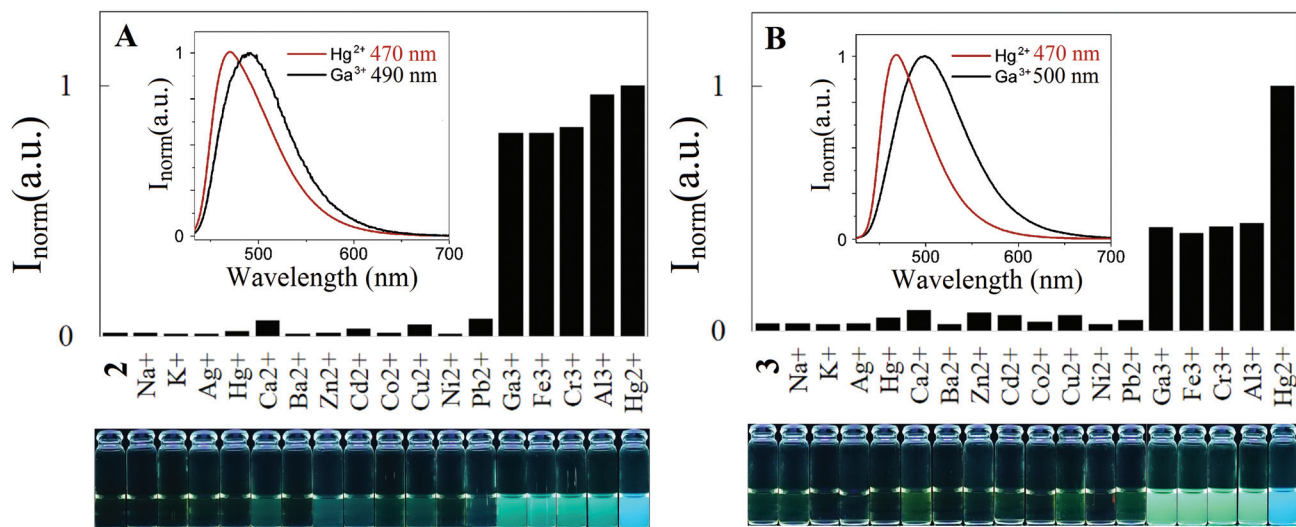


Fig. 4 Relative emission intensity of 2 (A) and 3 (B) upon addition of 4 equiv. of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  in acetonitrile ( $[\text{A}] = [\text{B}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $\lambda_{\text{exc}} = 362 \text{ nm}$ ). Inset: Normalized emission displacement between the complexes of  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Ga}^{3+}$  for 2 (A) and 3 (C). Bottom: Visual changes of 2 (left) and 3 (right) under UV light after addition of metallic ions ( $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ ).

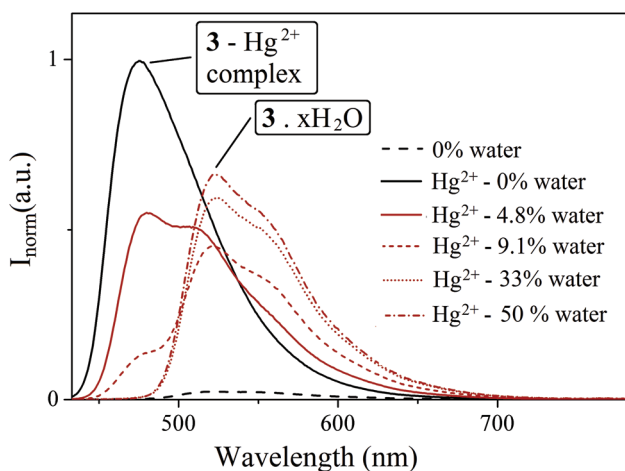


Fig. 5 Progress of emission spectra of the complex  $3\text{-Hg}^{2+}$  (4 equiv.) in solutions with different amounts of water in acetonitrile ( $[\text{3}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $\lambda_{\text{exc}} = 423 \text{ nm}$ ).

quenching of the fluorescence emission, due to that the coordination sphere of the ions is substituted by water molecules. The presence of water in the metal complex  $3\text{-Hg}^{2+}$  was studied by fluorescence analysis in different percentages of water (4.8%, 9.1%, 33% and 50%) in acetonitrile. The emission band at 470 nm (black solid line), related to complex  $3\text{-Hg}^{2+}$  is completely quenched up to 9.1% of water. Up to 4.8% of water, the main emission band is not that observed for the complex  $3\text{-Hg}^{2+}$  at 470 nm, but at 525 nm, which belongs to the species between compound 3 bounded to water molecules through hydrogen bonds, as shown in Fig. S15.†

In order to shed more light on the sensing ability of these systems, the minimal detectable and quantified amount of

Table 3 Minimal detectable and quantified amount ( $\mu\text{M}$ ) for  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Ga}^{3+}$  metal ions in acetonitrile. Relative standard deviation (RSD) of the values measured was below 10%,  $n = 3$

Compounds	Metal ions	Minimal detectable amount ( $\mu\text{M}$ )		Minimal quantified amount ( $\mu\text{M}$ )	
		Abs	Em	Abs	Em
2	$\text{Hg}^{2+}$	1.04	9.76	1.15	26.7
	$\text{Fe}^{3+}$	0.99	0.28	1.10	0.76
	$\text{Cr}^{3+}$	1.08	0.23	1.18	0.64
	$\text{Al}^{3+}$	0.95	0.20	1.05	0.55
	$\text{Ga}^{3+}$	1.09	0.34	1.20	0.93
	$\text{Hg}^{2+}$	0.97	0.86	1.07	1.43
3	$\text{Fe}^{3+}$	0.91	0.40	1.00	0.67
	$\text{Cr}^{3+}$	0.88	0.24	0.97	0.40
	$\text{Al}^{3+}$	0.82	0.22	0.91	0.37
	$\text{Ga}^{3+}$	0.99	0.31	1.10	0.52
	$\text{Hg}^{2+}$	0.97	0.86	1.07	1.43

$\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Ga}^{3+}$  was determined according to the procedure described in the Experimental section. The resulting values were gathered and are given in Table 3. The limit of detection by absorption for compounds 2 and 3 was obtained applying eq. (1),  $\text{LOD}_{\text{abs}} = 0.16 \pm 0.01$ ; and by emission the results are  $\text{LOD}_{\text{em}2} = 0.04 \pm 0.01$  and  $\text{LOD}_{\text{em}3} = 0.16 \pm 0.01$ . Regarding the limit of quantification using eq. (2), the  $\text{LOQ}_{\text{abs}} = 0.18 \pm 0.02$  for both compounds and  $\text{LOQ}_{\text{em}2} = 0.10 \pm 0.03$ , and  $\text{LOQ}_{\text{em}3} = 0.18 \pm 0.02$  were obtained by absorption and emission, respectively. The minimal detectable amount obtained by absorption for the metal ions studied ranges from 0.95–1.09  $\mu\text{M}$  and 0.88–0.99  $\mu\text{M}$  for compounds 2 and 3, respectively. Through emission spectra, the value ranges between 0.20–9.76  $\mu\text{M}$  (2) and 0.31–0.86  $\mu\text{M}$  (3) were determined.

It is clearly notable that compound **3** is more sensitive and reactive to the metal ions studied than **2**, showing lower detectable amounts. This fact is evident for  $\text{Hg}^{2+}$  metal ions, whereas a remarkable decrease from 9.76 to 0.97  $\mu\text{M}$  (10 times) in the detectable amount was determined (Table 3). Once more, this is attributed to the presence of the amino acid cysteine, which contains a sulphur atom with high affinity to this heavy metal ion.<sup>46</sup> Regarding the minimal quantified amount for  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Ga}^{3+}$  metal ions in acetonitrile, the values between 0.91 and 1.20  $\mu\text{M}$  were calculated by absorption; 0.55–26.7  $\mu\text{M}$  for **2** and 0.52–1.43  $\mu\text{M}$  for **3** were calculated by emission. This clearly makes compound **3** the best probe to be used as an analytical tool for trivalent and  $\text{Hg}^{2+}$  metal ion detection. Our systems show similar detection results to the one published previously by Barba-Bon and co-workers.<sup>30</sup> However for  $\text{Cr}^{3+}$  ions our probes showed to be more effective since the detectable amounts by absorption and emission are lower. In our systems, the lowest values of 0.88  $\mu\text{M}$  and 0.23  $\mu\text{M}$  are determined respectively, by absorp-

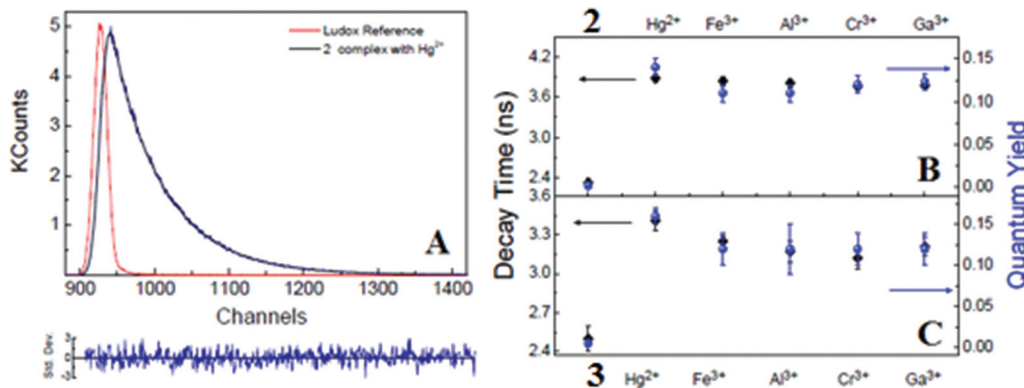
tion and emission, in comparison with the amounts of 2.5 and 0.5  $\mu\text{M}$  published previously.<sup>30</sup>

### Lifetime and fluorescence quantum yield of the metal complexes

Fluorescence decays of the ligands and complexes were measured in acetonitrile. The main data are depicted in Table 4. As a representative example, Fig. 6A shows the fluorescence decay of the **2**- $\text{Hg}^{2+}$  complex and also the correlation between the lifetime and quantum yield of **2**, **3** and the complexes (Fig. 6B and C). The fluorescence decays of both compounds and their metallic complexes were fitted with a double exponential law, suggesting two different conformers in the excited state.<sup>33,47</sup> However, in the case of the free ligands, the relative amplitudes (B ~ 3% and C ~ 97%, Table 4) indicate a predominant species in solution of a short lifetime and low quantum yield. On the other hand, by the analysis of the complexes, the higher values of amplitudes follow the higher lifetimes, indicating an effective complex formation. These

**Table 4** Fluorescence quantum yield and lifetime for compounds **2** and **3**. Fluorescence decays for **2** and **3** were fitted using  $A + B \text{Exp}(-t/\tau) + C \text{Exp}(-t/\tau^*)$ . The values presented are average of six independent measurements

Compounds	<b>2</b>			<b>3</b>		
	$\phi$	$\tau$	$\tau^*$	$\phi$	$\tau$	$\tau^*$
		(ns)			(ns)	
		B [Rel. amp. %]	C		B [Rel. amp. %]	C
Free ligand	$0.002 \pm 0.001$	2.3 [2.9]	0.13 [97.1]	$0.005 \pm 0.001$	2.5 [4.1]	0.37 [95.9]
$\text{Hg}^{2+}$	$0.14 \pm 0.01$	3.9 [96]	0.5 [4]	$0.16 \pm 0.01$	3.4 [91]	0.6 [9]
$\text{Fe}^{3+}$	$0.11 \pm 0.01$	3.8 [44]	0.06 [56]	$0.12 \pm 0.02$	3.2 [50]	0.10 [50]
$\text{Al}^{3+}$	$0.11 \pm 0.01$	3.8 [79]	0.11 [21]	$0.12 \pm 0.03$	3.2 [70]	0.24 [30]
$\text{Cr}^{3+}$	$0.12 \pm 0.01$	3.8 [5.4]	0.072 [46]	$0.12 \pm 0.02$	3.1 [60]	0.13 [40]
$\text{Ga}^{3+}$	$0.12 \pm 0.01$	3.8 [80]	0.09 [20]	$0.12 \pm 0.02$	3.2 [80]	0.31 [20]



**Fig. 6** (A) Fluorescence decays and global analysis of **2** (Flu-TMS) with 4 equivalents of  $\text{Hg}^{2+}$  and the Ludox reference. The decay time values obtained for fitting with a sum of two exponentials are 0.49 and 3.87 ns, Chisq 1.06. Decay time and quantum yield averages for (B) **2** and (C) **3** complexes are presented.



results are in accordance with the literature, where multiple (with two lifetimes of  $\sim 4$  ns and  $\sim 0.5$ – $2$  ns) and single decays have been reported to ligand coupled fluorescein structures.<sup>47</sup> The insertion of amino acid derivatives at the backbone of the xanthene unit in the precursor **1** leads to a decrease in the fluorescence quantum yield from  $\phi_1 = 0.024 \pm 0.001$  to  $\phi_2 = 0.002 \pm 0.001$  and  $\phi_3 = 0.005 \pm 0.001$  (*ca.* 10-times lower). However, upon complexation a strong CHEF takes place, resulting in values of fluorescence quantum yield between 0.11 and 0.16, which represents a huge increase ranging from 24 to 70 times, compared to the free ligands. The same behavior was observed in lifetime measurements, whereas higher values were obtained for the metal complexes ( $\tau = 3.1$ – $3.9$  ns) in comparison with the free ligands ( $\tau = 2.3$ – $2.5$  ns).

The lifetime values obtained showed no significant difference between compounds **2** and **3**. These results are in agreement with the ones obtained for the fluorescence quantum yield, once generally, emissive systems with higher fluorescence quantum yields are more stable in the excited state.

## Conclusions

Two new bio-inspired fluorescein derivatives were successfully synthesized and applied as probes for  $\text{Hg}^{2+}$  and trivalent metallic ions in acetonitrile solution. The complexation process promoted huge changes in the photophysical properties of free ligands. A strong CHEF, an absorption blue shift, an increase in extinction coefficient, longer lifetimes of the excited states and higher quantum yields of fluorescence were observed as result of the complex formation. DFT calculations suggested different models of interaction between the **3**– $\text{Al}^{3+}$  and **3**– $\text{Hg}^{2+}$  complexes, which were reflected in the green emission of the trivalent ion complexes and blue emission of the  $\text{Hg}^{2+}$  complex. The application of compounds **2** and **3** as analytical probes for  $\text{Al}^{3+}$  sensing reached the lowest detection and quantification limits in both absorption and fluorescence techniques, compared to other metals. The interaction constants of the complexes all showed very close values, except for **3**– $\text{Hg}^{2+}$ , which presented considerably higher values attributed to the soft–soft attraction between  $\text{Hg}^{2+}$  and S-cysteine, reinforcing the Pearson's acid–base concept. This result suggests the importance of the sulfur atom in the amino acid residue to modulate the metal–ligand interaction constants for soft metal ions. As the presence of water suppresses the sensing ability of the probes, these are very promising structures to be applied in the selective detection of the studied cations in biological aprotic environments, such as cell membranes or micellar systems. These further studies are under investigation in our group.

## Experimental section

### Chemicals and starting materials

The fluorescein (free acid) was purchased from Fluka, Boc-Cys-(4-MeBzl)-OH and metallic salts ( $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot$

$9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{BF}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{AgNO}_3$ ) were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. Boc-Ser(TBDMS)-OH was prepared as reported in the literature.<sup>48</sup>

### Instruments

Elemental analysis was performed using a Thermo-Finnigan CE Flash-EA 1112-CHNS instrument provided by the Chemical Analysis Service of the REQUIMTE, DQ, Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica, Portugal. Mass spectrometry characterization of compounds **1** and **2** was carried out in an Ultraflex II MALDI-TOF/TOF instrument from Bruker Daltonics (BIOSCOPE-PROTEOMASS Research Lab) and high-resolution mass spectrometry spectrum of compound **3** was recorded in an Electron Spray Ionization Time of Flight (ESI-TOF) microTOF-QII Bruker spectrometer (IQ-Universidade de São Paulo).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 200 (200 MHz,  $^1\text{H}$ ; 50 MHz,  $^{13}\text{C}$ ) spectrometer at Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. The lifetime of the excited state was measured using a Horiba Jobin-Yvon Temprom equipped with the light source NanoLED at 460 nm, PROTEOMASS Scientific Society, Portugal. The infra-red spectra were recorded on a Spectrum BX Perkin-Elmer FT-IR System.

### Spectrophotometric and spectrofluorometric measurements

Absorption spectra were recorded on a Jasco V-650 spectrophotometer and fluorescence emission on a Horiba-Yvon-Spex Fluoromax-4 spectrofluorometer. A correction for the absorbed light was applied when necessary. All spectrofluorometric titrations were performed as follows: the stock solutions of the ligands (*ca.*  $5 \times 10^{-4}$  M) were prepared by dissolving an appropriate amount of the ligands in 25 mL volumetric flasks to the mark with acetonitrile. The titration solutions were prepared by dilution of stock solutions at a final concentration of  $1 \times 10^{-5}$  M in acetonitrile. Titrations of the ligands were conducted by the addition of microliters of standardized metal solutions in acetonitrile. The absorption and emission spectra of these solutions were recorded after additions ( $\lambda_{\text{exc}} = 428$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 546$  nm for **2** and **3**). The stock solutions of the metallic ions were prepared by dissolving an appropriate amount of the salts in 10 mL volumetric flasks to the mark with water (*ca.* 0.05 M). The titration solutions of metals were obtained by the dilution of the stock solution to the concentration of  $1.5 \times 10^{-3}$  M in acetonitrile. The solid-state emission spectra of **2** and **3** were recorded on a Horiba-Scientific Fluoromax-4 spectrofluorometer using an external fiber-optic device. The fluorescence quantum yield of compounds **1**, **2** and **3** was measured using a solution of acridine yellow in absolute ethanol as the standard ( $\phi = 0.47$ )<sup>49</sup> and was corrected for different refraction indexes of solvents. The detection (LOD) and quantification (LOQ) limits for the metal ions were determined, having in mind their use for real metal ion detection and for analytical applications. For these measurements, ten

different analyses for the selected receptor were performed in order to obtain the LOD and LOQ.

The LOD and LOQ were obtained by applying the equations:

$$\text{LOD} = y_{\text{blank}} + 3 \text{ std} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = y_{\text{blank}} + 10 \text{ std}; \quad (2)$$

where  $y_{\text{blank}}$  = signal detection limit and std = standard deviation.

### Theoretical calculations

All calculations were performed with Gaussian09 (19) using Density Functional Theory with the B3LYP functional and the 6-31G\*\* (C, H, N, O, S, Al) and LanL2DZ (Hg) basis set, as implemented in Gaussian09. Default optimization parameters were used throughout the calculations.

### Synthesis of organic compounds

**Synthesis of 2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (1).** In a 500 mL round bottomed flask, concentrated sulfuric acid (15 mL) was added dropwise to a solution of fluorescein (30.09 mmol, 10 g) in ethanol (200 mL) at room temperature. After stirring and refluxing for 18 hours, the solvent was removed in a rotatory evaporator and the resulting mixture was diluted in chloroform and transferred to a 1000 mL beaker. Solid sodium bicarbonate was added to the mixture until evolution of carbon dioxide ceased. The heterogeneous mixture was filtered through a Buchner funnel and the organic phase was evaporated. The crude product was dissolved in 400 mL of ethanol (96%) at boiling temperature. The volume was reduced to 100 mL by boiling and the resulting solution was allowed to stand for 12 hours at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , yielding 8.90 g of pure product as brown crystals, with a greenish glow. Yield 90%. Melting point:  $242\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz, DMSO)  $\delta$  8.18 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 8.00–7.61 (m, 2H), 7.50 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 6.80 (d,  $J = 9.6$  Hz, 2H), 6.56 (d,  $J = 6.6$  Hz, 4H), 3.96 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 0.86 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz, DMSO)  $\delta$  173.93, 165.02, 156.13, 150.49, 133.66, 132.91, 130.61, 130.06, 129.87, 121.75, 114.39, 103.24, 60.83, 13.29. UV-vis in acetonitrile;  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon_{\text{max}}$ ,  $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ): 452 (19 953). Fluorescence emission in acetonitrile ( $\lambda_{\text{exc}} = 452$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 519$  nm).

**Synthesis of (S)-ethyl 2-(6-((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)propanoyl)oxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (2).** In a round bottomed flask of 50 mL under an inert atmosphere, Boc-Ser(TBDMS)-OH (3.0 mmol, 1.05 g); *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 3 mmol, 0.6 mL) and dichloromethane (20 mL) were added while stirring for 15 minutes. Subsequently, **1** was added (1.1 mmol, 0.386 g) and the reaction was followed until all the fluorescein derivative was consumed. After 18 hours, the reaction medium was filtered to remove the urea generated by the consumption of DCC, and the solvent was removed under reduced pressure in a rotatory evaporator. The product was purified in a chromatographic column using flash silica as the stationary phase and an ethyl acetate/hexane mixture in the ratio 2:1 as the

eluent. The pure product was obtained as an orange solid in 86% yield.

RF in EtOAc/hexane 2:1 = 0.50. Melting point:  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Elemental analysis (found: C, 65.1; H, 6.7; N, 2.2% CHNS requires: C, 65.3; H, 6.6; N, 2.1)  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.36–8.20 (m, 1H), 7.72 (td,  $J = 6.7, 1.6$  Hz, 2H), 7.42–7.28 (m, 1H), 7.08–6.80 (m, 3H), 6.64–6.40 (m, 2H), 5.41 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 4.62 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 4.33–3.83 (m, 4H), 1.48 (s, 9H), 0.98 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 0.90 (d,  $J = 0.8$  Hz, 9H), 0.16–0.02 (m, 6H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  186.19, 169.19, 165.41, 158.74, 155.65, 154.09, 152.90, 149.16, 134.07, 132.94, 131.60, 130.99, 130.90, 130.68, 130.57, 130.07, 128.91, 119.95, 119.42, 118.22, 110.23, 106.46, 80.61, 63.95, 61.69, 56.18, 28.52, 25.98, 18.45, 13.78, 0.20,  $-5.28$ . MALDI-TOF-MS [calcd (found)]: 662.28 (662.28) [M + H]. UV-vis [acetonitrile;  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon_{\text{max}}$ ,  $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ): 337 (10 727), 428 (16 019), 444 (15 835). Fluorescence emission in acetonitrile ( $\lambda_{\text{exc}} = 428$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 546$  nm). IR (BaF<sub>2</sub> windows,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2954, 2933, 2859, 1774, 1717, 1645, 1598, 1523, 1367, 1259, 1153, 1106, 838, 777.

**Synthesis of (R)-ethyl 2-(6-((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-((4-methylbenzyl)thio)propanoyl)oxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (3).** The same procedure was performed as for obtaining **2**, replacing Boc-Ser(TBDMS)-OH by Boc-Cys(4methylbenzyl)-OH. The pure product was obtained as an orange solid in 90% yield. RF in EtOAc/hexane 2:1 = 0.54. Melting point:  $66\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Elemental analysis (found: C, 68.1; H, 5.7; N, 2.1; S, 4.7% CHNS requires: C, 68.4; H, 5.6; N, 2.1; S, 4.8).  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.43–8.17 (m, 3H), 7.92–7.55 (m, 6H), 7.04 (ddd,  $J = 19.0, 15.8, 12.5$  Hz, 28H), 6.69–6.41 (m, 4H), 5.33 (d,  $J = 7.6$  Hz, 3H), 4.74 (d,  $J = 7.6$  Hz, 4H), 4.06 (q,  $J = 7.1$  Hz, 7H), 3.77 (s, 5H), 2.98 (d,  $J = 5.4$  Hz, 5H), 2.33 (s, 9H), 1.47 (s, 30H), 0.99 (t,  $J = 7.1$  Hz, 8H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  186.01, 172.95, 169.19, 165.09, 158.64, 157.50, 155.13, 153.74, 152.64, 149.54, 137.09, 134.15, 133.75, 132.70, 131.35, 130.59, 130.47, 130.38, 129.89, 129.74, 129.36, 129.14, 128.79, 121.87, 119.63, 119.26, 118.10, 115.21, 110.06, 106.08, 103.81, 80.59, 61.45, 53.49, 36.39, 33.11, 28.24, 21.06, 13.57. MALDI-TOF-MS [calcd (found)]: 668.23 (668.23) [M + H]. UV-vis [acetonitrile;  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon_{\text{max}}$ ,  $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ): 336 (9360), 428 (14 425), 445 (14 350). Fluorescence emission in acetonitrile ( $\lambda_{\text{exc}} = 428$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 546$  nm). IR (BaF<sub>2</sub> windows,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2974, 2918, 1771, 1715, 1639, 1598, 1509, 1263, 1158, 860.

### Acknowledgements

E. Oliveira acknowledges the post-doctoral grant from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT-MEC) (Portugal) SFRH/BPD/72557/2010. A. Gonçalves and V. Pilla thank CNPq/Brazil for the PhD and post-doctoral (202553/2014-0) grant respectively. C. Lodeiro thanks the CNPq program, Science without borders 2014–2016 grant (Brazil). Financial support from the Scientific PROTEOMASS Association (Portugal), the University of São Paulo through the NAP-CatSinQ (Research Core in Catalysis and Chemical Synthesis), FAPESP, CAPES and FAPEMIG (Brazil) (APQ-00360-14) is acknowledged. This work

was supported by the Unidade de Ciências Biomoleculares Aplicadas-UCIBIO which is financed by national funds from FCT/MEC (UID/Multi/04378/2013) and co-financed by the ERDF under the PT2020 Partnership Agreement (POCI-01-0145-FEDER-007728). Part of this work was developed within the scope of the project CICECO-Aveiro Institute of Materials, POCI-01-0145-FEDER-007679 (FCT Ref. UID/CTM/50011/2013), financed by national funds through the FCT/MEC and when appropriate co-financed by FEDER under the PT2020 Partnership Agreement. S. M. S. thanks FCT for the FCT Investigator starting grant IF/00973/2014.

## References

- G. Hungerford, J. Benesch, J. F. Mano and R. L. Reis, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, **6**, 152–158.
- K. Kaur, R. Saini, A. Kumar, V. Luxami, N. Kaur, P. Singh and S. Kumar, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 1992–2028.
- X.-F. Zhang, J. Zhang and L. Liu, *J. Fluoresc.*, 2014, **24**, 819–826.
- R. Sjöback, J. Nygren and M. Kubista, *Spectrochim. Acta, Part A*, 1995, **51**, L7–L21.
- L. Zhang and X. Zhang, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2014, **133**, 54–59.
- X.-F. Yang, Y. Li and Q. Bai, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **584**, 95–100.
- E. Oliveira, J. Lorenzo, A. Cid, J. L. Capelo and C. Lodeiro, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2013, **269**, 17–26.
- H. Zheng, X.-Q. Zhan, Q.-N. Bian and X.-J. Zhang, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 429–447.
- C. Lodeiro, J. L. Capelo, J. C. Mejuto, E. Oliveira, H. M. Santos, B. Pedras and C. Nuñez, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 2948.
- E. Oliveira, J. L. Capelo, J. C. Lima and C. Lodeiro, *Amino Acids*, 2012, **43**, 1779–1790.
- M. Mameli, V. Lippolis, C. Caltagirone, J. L. Capelo, O. N. Faza and C. Lodeiro, *Inorg. Chem.*, 2010, **49**, 8276–8286.
- H. N. Kim, W. X. Ren, J. S. Kim and J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 3210–3244.
- W.-Y. Liu, S.-L. Shen, H.-Y. Li, J.-Y. Miao and B.-X. Zhao, *Anal. Chim. Acta*, 2013, **791**, 65–71.
- D. W. Boening, *Chemosphere*, 2000, **40**, 1335–1351.
- J. Hu, J. Li, J. Qi and J. Chen, *New J. Chem.*, 2015, **39**, 843–848.
- S. Ekino, M. Susa, T. Ninomiya, K. Imamura and T. Kitamura, *J. Neurol. Sci.*, 2007, **262**, 131–144.
- C. Núñez, M. Diniz, A. a. Dos Santos, J. L. Capelo and C. Lodeiro, *Dyes Pigm.*, 2014, **101**, 156–163.
- W. Mertz, *J. Nutr.*, 1993, **123**, 626–633.
- K. N. Jeejeebhoy, *Nutr. Rev.*, 1999, **57**, 329–335.
- a. D. Dayan and a. J. Paine, *Hum. Exp. Toxicol.*, 2001, **20**, 439–451.
- B. Gordon, P. Callan and C. Vickers, *WHO Chron.*, 2008, **38**, 564.
- D. Krewski, R. a. Yokel, E. Nieboer, D. Borchelt, J. Cohen, J. Harry, S. Kacew, J. Lindsay, A. M. Mahfouz and V. Rondeau, *J. Toxicol. Environ. Health, Part B*, 2007, **10** (Suppl 1), 1–269.
- S. Han, J. Lemire, V. P. Appanna, C. Auger, Z. Castonguay and V. D. Appanna, *Cell Biol. Toxicol.*, 2013, **29**, 75–84.
- V. Rondeau, D. Commenges, H. Jacqmin-Gadda and J. F. Dartigues, *Am. J. Epidemiol.*, 2000, **152**, 59–66.
- B. Daly, J. Ling and a. P. de Silva, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 4203–4211.
- S. Das, M. Dutta and D. Das, *Anal. Methods*, 2013, **5**, 6262.
- J. Chan, S. C. Dodani and C. J. Chang, *Nat. Chem.*, 2012, **4**, 973–984.
- K. P. Carter, A. M. Young and A. E. Palmer, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 4564–4601.
- X. Li and J. S. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, **12**, 545–552.
- A. Barba-bon, A. M. Costero, S. Gil, M. Parra and J. Soto, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 3000–3002.
- R. M. Silverstein, F. X. Webster and D. J. Kiemle, *Spectrometric identification of organic compounds*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2005.
- J. Olmsted, *J. Phys. Chem.*, 1979, **83**, 2581–2584.
- T. Ueno, Y. Urano, K. I. Setsukinai, H. Takakusa, H. Kojima, K. Kikuchi, K. Ohkubo, S. Fukuzumi and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 14079–14085.
- T. Peng and D. Yang, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 496–499.
- E. M. Nolan and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 3443–3480.
- A. Tamayo, B. Pedras, C. Lodeiro, L. Escriche, J. Casabo, L. Capelo, B. Covelo, R. Kiveka and R. Sillanpa, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 159–165.
- Y. Zhang, Y. Yang, J. Hao, C. Yin, F. Huo, J. Chao and D. Liu, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2014, **132**, 27–31.
- Y. Yang, K. Yook and J. Tae, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **1**, 16760–16761.
- G. Zhang, D. Zhang, S. Yin, X. Yang, Z. Shuai and D. Zhu, *Chem. Commun.*, 2005, **6**, 2161–2163.
- X. Guo, X. Qian and L. Jia, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 2272–2273.
- G. Hennrich, W. Walther, U. Resch-genger and H. Sonnenschein, *Inorg. Chem.*, 2001, **40**, 641–644.
- Y. Zhao, Z. Lin, C. He, H. Wu and C. Duan, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 10013–10015.
- H. Arakawa, R. Ahmad and M. Naoui, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 10150–10153.
- J. Ho Chang, Y. M. Choi and Y. K. Shin, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2001, **22**, 527–530.
- P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, 1996, **43**, 1739–1753.
- F. Huo, Y. Sun, J. Su, Y. Yang and C. Yin, *Org. Lett.*, 2010, 1257–1260.
- N. Klonis and W. H. Sawyer, *Photochem. Photobiol.*, 2003, **77**, 502–509.
- B. Grzeszczyk, S. Stecko, Ł. Mucha, O. Staszewska-Krajewska, M. Chmielewski and B. Furman, *J. Antibiot.*, 2013, **66**, 161–163.
- M. Montalti, A. Credi, L. Prodi and M. T. Gandolfi, *Handbook of Photochemistry*, Taylor & Francis, Boca Raton, 3rd edn., 2006.





# A seleno-pyrene selective probe for Hg<sup>2+</sup> detection in either aqueous or aprotic systems



Augusto C. Gonçalves<sup>a,b</sup>, José Luis Capelo<sup>a,c</sup>, Carlos Lodeiro<sup>a,c,\*</sup>, Alcindo A. Dos Santos<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> BIOSCOPE Group, UCIBIO-REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516, Caparica, Portugal

<sup>b</sup> Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, CxP. 26077, São Paulo, 05508-000, Brazil

<sup>c</sup> Proteomass Scientific Society, Rua dos Inventores, Madan Park, 2829-516, Caparica, Portugal

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 21 May 2016

Received in revised form 1 August 2016

Accepted 2 August 2016

Available online 3 August 2016

### Keywords:

Mercury (II) recognition

Fluorescence

Emission

Organic selenide

## ABSTRACT

A new fluorescent molecular probe (compound **7**) assembled from the amide bond between the 1-pyrenecarboxylic acid (**6**) and 2-(butylselenyl)ethanamine (**5**) was designed, synthesized and its structure accurately characterized. The photophysical properties of **7** were evaluated among a wide range of metallic cations (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup> and Cr<sup>3+</sup>) in water and in acetonitrile, which showed selective interaction with Hg<sup>2+</sup>. However, the sensing mechanism was found to be different in each solvent. Dynamic light scattering (DLS) studies revealed that compound **7** organizes itself as monodisperse aggregates in aqueous solution, nonetheless, as Hg<sup>2+</sup> was added to the aqueous solution, disruption of aggregates was observed, resulting in a coordination complex under strong CHEQ (Chelation-Enhanced Fluorescent Quenching). Conversely, in acetonitrile solution, **7** exhibited monomeric pyrene emissive pattern and, as the addition of Hg<sup>2+</sup> proceeded, a coordination compound of excimer-type fluorescence emission was observed. UV–vis absorption, steady state, and time-resolved emission spectroscopy were employed. The stoichiometry of the **7**-Hg<sup>2+</sup> complexes was found to be 1:1 for both aqueous ( $\log \beta = 6.19 \pm 0.009$ ) and acetonitrile ( $\log \beta = 8.59 \pm 0.04$ ) solutions. The lowest value of a detectable amount of 0.15  $\mu\text{mol/L}$  for Hg<sup>2+</sup> was achieved for fluorescence measurements in aqueous solution. The aqueous system was applied for the detection of Hg<sup>2+</sup> in real samples of spring water, where the added amounts of the analyte could be detected and quantified.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

Fluorescent probes capable of selectively interact with a given analyte in both aqueous or organic systems are a challenge in the synthetic planning of new molecular emissive structures. This characteristic allows extending the application of an analytical method to different matrix systems without the need of sample pre-treatment, leading to easy handling and reducing the number of possible random and systematic errors. Sensible, selective and accurate analytical methods for metallic ion detection or quantification still a considerable demand for food safety, industrial wastewater control, and environmental monitoring. Fluorimetry, is so far, one of the most accurate, sensible and non-destructive analytical implement for the detection and quantification of a myr-

iad of entities, including metallic ions [1,2]. Mercury cation (Hg<sup>2+</sup>) is considered one of the most impacting pollutants in respect to environmental contamination and toxicity to living organisms [3,4]. The element may occur in metallic, ionic, organometallic and the complex form [5,6]. Many toxic effects are attributed to the divalent ion, including oxidative-assisted damages, neuro-toxicological disorders, and carcinogenicity [7–9]. Owing to the high affinity of Hg<sup>2+</sup> by sulphur and especially selenium-containing amino acids, the ion is readily bio-accumulated as stable complexes in living organisms even under environmental exposure conditions [10–14]. Taking into account the observations in nature, fluorescent probes can be inspired and designed in the way to contain a fluorophore scaffold covalently attached to an organic moiety of particular affinity for a given analyte. In the last two decades, pyrene core has been extensively applied as a building block for the synthesis of molecular probes [15–21]. Because the nonpolar and flat sp<sup>2</sup>-conjugated structure of pyrene, it presents considerable  $\pi$ -stacking intermolecular forces. Depending on the polarity of the solvent and concentration of a given solution, pyrene can dis-

\* Corresponding author at: Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Avenida Professor Lineu Prestes, 748 São Paulo 05508-000, Brazil.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [cle@fct.unl.pt](mailto:cle@fct.unl.pt) (C. Lodeiro), [alcindo@iq.usp.br](mailto:alcindo@iq.usp.br) (A.A. Dos Santos).

play monomeric, dimeric or aggregate forms. In nonpolar-solvent solutions, pyrenes display a high structured emissive spectrum of monomeric characteristics. However, in aqueous solution  $\pi$ -stacking forces usually become dominant, resulting in hydrophobic aggregates [22,23] or excimers [24], being both structureless presenting red-shifted emission. Besides, the presence of a linker agent between two identical pyrene monomeric units is further able to induce the excited state dimer (excimer) formation [25,26]. The stable interaction between  $\text{Hg}^{2+}$  and seleno-amino acids suggests the employment of this organic moiety as a receptor for  $\text{Hg}^{2+}$  in fluorescent probes [10–14]. Considering the experience of our group in the synthesis and application of pyrene-based fluorescent probes for metallic ion recognition [18,20,26], in this work we presented the preparation and analytical studies of a new alkyl seleno-pyrene derivative for  $\text{Hg}^{2+}$  detection in pure water or acetonitrile solution. The sensing mechanism in each solvent was also subject to investigation in this work. The relevance of our results is argued on solvent aggregation of pyrene, excimer and metallic complex formation related to the respective photophysical pattern.

## 2. Experimental section

### 2.1. Chemicals and starting materials

The elemental selenium, di-*tert*-butyl dicarbonate ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ), methanesulfonyl chloride ( $\text{MsCl}$ ), *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), Amberlyst<sup>®</sup> 15, trifluoroacetic acid (TFA) and 1-pyrenecarboxylic (**6**) acid were purchased from Sigma-Aldrich. Ethanolamine (**1**) was purchased from Vetec and *n*-butyllithium from Fluka. Metallic salts:  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{BF}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  and  $\text{AgNO}_3$  were purchased from Sigma-Aldrich, and  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  were purchased from Alpha Aesar and used as received.

### 2.2. Instruments and materials

Elemental analysis was performed using a Thermo-Finnigan CE Flash-EA 1112-CHNS and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 400 instrument provided by the Chemical Analysis Service of the REQUIMTE, DQ, Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica, Portugal and Bruker Avance III 200 (200 MHz,  $^1\text{H}$ ; 50 MHz,  $^{13}\text{C}$ ) spectrometer provided by LocSin, IQ, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. The lifetime of the excited state was measured using a Horiba Jobin-Yvon Tempro equipped with the light source NanoLED of 279 nm (Proteomass Scientific Society lab), the infrared spectra were recorded on a Spectrum BX Perkin-Elmer FT-IR System. Mass spectrometry characterization of compound **4** was recorded in an Electron Spray ionization Time of Flight (ESI-TOF) microTOF-QII Bruker spectrometer provided by IQ, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. The ligand **7** spectrum was recorded in an Ultraflex II MALDI-TOF/TOF instrument from Bruker Daltonics (BIOSCOPE Research Lab at UCIBIO-REQUIMTE).

### 2.3. Spectrophotometric and spectrofluorimetric measurements

Absorption spectra were recorded on a Jasco V-650 spectrophotometer and fluorescence emission on a Horiba Jobin-Yvon Fluoromax-4 spectrofluorimeter (BIOSCOPE-PROTEOMASS facility Research Lab). All spectrofluorimetric titrations were performed as follows: the stock solution of compound **7** (ca.  $5 \times 10^{-3}$  mol/L) was prepared by dissolving an appropriated amount of the ligands in 5 mL volumetric flask to the mark with acetonitrile. The work solution was prepared by dilution of the stock solution of

**7** at a final concentration of  $1 \times 10^{-5}$  mol/L in water or acetonitrile. The stock solutions of the metallic ions were prepared by dissolving an appropriate amount of the salts in a 10 mL volumetric flasks to the mark with water (ca. 0.05 mol/L). The work solutions of metallic ions were prepared by dilution of the respective stock solutions at a final concentration of  $1.5 \times 10^{-3}$  mol/L in water or acetonitrile. Titrations (triplicate) of **7** were performed in water and acetonitrile by the addition of microliters of mercury perchlorate solutions ( $1.5 \times 10^{-3}$  mol/L). The absorbance and emission spectra of these solutions were recorded after each addition of  $\text{Hg}^{2+}$  ( $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm in acetonitrile and  $\lambda_{\text{exc}} = 357$  nm in water). A correction for the dilution and absorbed light was applied. Fluorescence quantum yield of compound **7** was measured using a solution of 1-Pyrenecarboxylic acid (**6**) in acetonitrile as a standard ( $\varphi = 0.11$ ) [27] and was corrected for different refraction indexes of solvents. The detection (LOD) and quantification (LOQ) limits were performed, having in mind analytical applications for real samples. For these measurements, ten different analyses, for the selected receptor, were conducted to obtain the LOD and LOQ. The LOD and LOQ were obtained by applying the following equations:

$$\text{LOD} = y_{\text{blank}} + 3\text{std} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = y_{\text{blank}} + 10\text{std}; \quad (2)$$

Where  $y_{\text{blank}}$  = signal detection limit and std = standard deviation.

### 2.4. Synthesis of *tert*-butyl (2-hydroxyethyl)carbamate (2)

In a mortar were sequentially added di-*tert*-butyl dicarbonate ( $\text{Boc}_2\text{O}$ , 2.18 g, 10 mmol), Amberlyst 15<sup>®</sup> (0.12 g, 15% m/m) and ethanolamine (0.76 mL, 10 mmol). The resulting mixture was grinded for 10 min. Dichloromethane (5 mL) was added to the mixture, and the resulting suspension was filtered and the residue was washed with dichloromethane ( $3 \times 10$  mL); the resulting organic solution was dried and concentrated on a rotary evaporator giving analytically pure compound **2** as a colorless viscous liquid in 95% isolated yield. NMR  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.4–1.5 (s, 9H);  $\delta$  3.4–3.5 (quart.;  $J = 6\text{ Hz}$ , 2H);  $\delta$  3.6–3.7 (quart.;  $J = 5.74$  Hz, 2H);  $\delta$  3.8–3.9 (trip.,  $J = 5.74$ , 1H);  $\delta$  4.9–5.5 (s.; 1H). NMR  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  28.43;  $\delta$  37.37;  $\delta$  39.5;  $\delta$  59.48;  $\delta$  79.42;  $\delta$  157.04. (CAS: 26690-80-2).

### 2.5. Synthesis of 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl methanesulfonate (3)

In a 15 mL round-bottomed flask under  $\text{N}_2$  atmosphere, were added **2** (9 mmol, 1.45 g) and dry triethylamine (1.53 mL, 1.2 eq., 10.8 mmol) in dry tetrahydrofuran (THF, 15 mL). The mixture was cooled to  $0^\circ\text{C}$  and mesyl chloride (0.693 mL, 9 mmol) was added drop wise. The reaction was kept in an ice bath for 30 min and after 2 h the reaction mixture was quenched by addition of aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{sat.})}$  solution (15 mL); the resulting mixture was extracted with ethyl acetate ( $3 \times 15$  mL). The organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and the solvent was removed under reduced pressure in a rotatory evaporator. Compound **3** was obtained as a white solid in 92% yield after a mere filtration over a plug of silica flash eluting with an ethyl acetate/hexanes 2:1 mixture. NMR  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.4–1.5 (s., 9H);  $\delta$  3.1–3.2 (s.; 3H);  $\delta$  3.2–3.3 (quart.;  $J = 6.22$  Hz, 2H);  $\delta$  3.6–3.7 (trip.;  $J = 5.74$  Hz, 2H);  $\delta$  4.9–5.5 (s.; 1H). NMR  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  28.43;  $\delta$  37.37;  $\delta$  39.5;  $\delta$  59.48;  $\delta$  79.42;  $\delta$  157.04. (CAS: 96628-67-0).

### 2.6. Synthesis of *tert*-butyl (2-(*butylselenanyl*)ethyl)carbamate (4)

In a 50 mL round-bottomed flask under  $\text{N}_2$  atmosphere, elemental selenium (0.632 g, 8 mmol) was suspended in dry THF (15 mL).

Then *n*-butyllithium (ca. 5.33 mL, 1.5 mol/L solution in hexanes) was drop wise added (the reaction was accompanied by a colour change from intense red to pale yellow). Compound **3** was dissolved in dry THF (10 mL) and the resulting solution was transferred to the reaction flask containing the selenolate nucleophile, and stirring was kept for 30 min. The reaction was quenched by addition of aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{sat.})}$  solution; the phases were separated, and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate ( $3 \times 15$  mL). The resulting organic phases were combined and dried over  $\text{MgSO}_4$  then filtered. The solvent was removed under reduced pressure in a rotatory evaporator, and the crude product was purified by chromatographic column using flash silica as stationary phase eluting with an hexanes/ethyl acetate (4:1) mixture, giving compound **4** as a yellow oil in 75% yield. NMR  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.8–1.0 (t.; 3H;  $J=7.2$ );  $\delta$  1.2–1.4 (m.; 2H);  $\delta$  1.4–1.5 (s.; 9H);  $\delta$  1.5–1.7 (m.; 2H);  $\delta$  2.5–2.7 (m.; 4H);  $\delta$  3.3–3.5 (quart.; 2H;  $J=6.59$ );  $\delta$  4.8–5.1 (s.; 1H). NMR  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  13.74; 23.13; 23.88; 24.13; 28.56; 32.84; 40.76; 78.52; 155.87. RMN  $^{77}\text{Se}$  (38.31 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  131.2.  $\delta$  46.8. IV  $\text{cm}^{-1}$  (film): 3348; 2958; 2924; 2873; 1689; 1504; 1365; 1249; 1165; 1037; 941; 864; 775. HRMS calculated:  $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_2\text{SeNa} = 304.0792$  [ $\text{M}^+\text{Na}$ ], found: 304.0784 [ $\text{M}^+\text{Na}$ ].

### 2.7. Synthesis of 2-(butylselanyl)ethanamine (**5**)

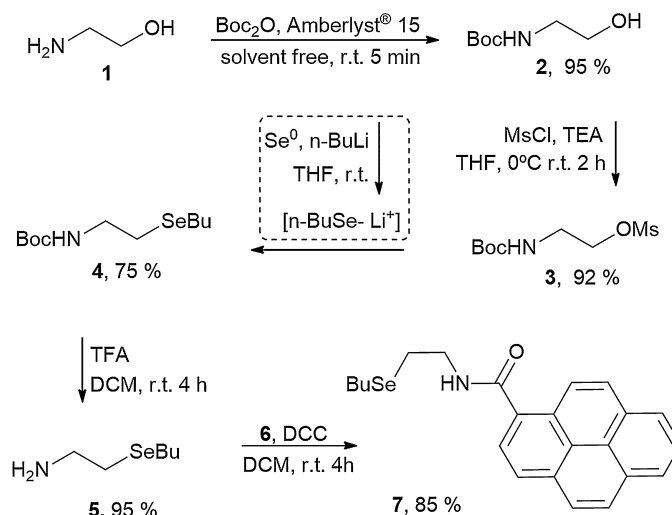
Trifluoroacetic acid (TFA, 2 mL) was added to **4** (7 mmol; 1.68 g) in dichloromethane (10 mL) contained in a round-bottomed flask. The mixture was kept under stirring until all the starting material was consumed (4 h – monitored by TLC). The resulting acidic solution was neutralized with aqueous  $\text{NaHCO}_{3(\text{sat.})}$  solution, and the pH was adjusted to 8. Compound **5** was extracted with dichloromethane ( $5 \times 5$  mL).  $\text{CaSO}_4$  was added to the combined organic fractions, which was filtered and finally the solvent was removed in a rotatory evaporator. Compound **5** was used in the next reaction step without purification.

### 2.8. Synthesis of N-(2-(butylselanyl)ethyl)pyrene-2-carboxamide (**7**)

Compound **4** (2.0 mmol; 0.561 g), 1-pyrenecarboxylic acid **6** (1.0 mmol; 0.246 g) and DCC (1.2 mmol; 0.248 g) were added to the reaction flask, which was kept under stirring for 4 h. The solvent was removed under reduced pressure in a rotatory evaporator and the crude product was submitted to purification by chromatographic column using flash silica as stationary phase and hexanes/ethyl acetate (2:1) as eluent, giving compound **7** as a pale yellow solid in 85% yield. Melting point: 112 – 113 °C. Elemental analysis (found: C, 67.23; H, 3.33; N, 5.56%. CHNS requires: C, 67.64; H, 3.43; N, 5.68%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.59 (d,  $J=9.3$  Hz, 1H), 8.27–7.97 (m, 3H), 6.56 (s, 1H), 3.85 (dd,  $J=12.5, 6.5$  Hz, 1H), 2.91 (t,  $J=6.6$  Hz, 1H), 2.64 (t,  $J=7.5$  Hz, 1H), 1.67 (dt,  $J=15.1, 7.4$  Hz, 1H), 1.40 (dq,  $J=14.6, 7.3$  Hz, 1H), 0.90 (t,  $J=7.3$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.86, 132.58, 131.15, 130.85, 130.69, 128.71, 128.68, 128.60, 127.10, 126.32, 125.81, 125.73, 124.77, 124.58, 124.43, 124.39, 124.33, 39.80, 32.68, 23.83, 23.65, 22.98, 13.57. MALDI-TOF-MS [calcd (found)]: 409.09 (409.07). UV–vis [Acetonitrile;  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon_{\text{max}}$ ,  $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ): 237 (41800), 271 (23100), 340 (23300). Fluorescence emission in acetonitrile ( $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm,  $\lambda_{\text{emis}} = 379; 398, 419$  nm).

## 3. Results and discussion

**Synthetic Approach.** As shown in Scheme 1, we started the synthesis of compound **7** from ethanolamine (**1**). The first step consisted on the “solvent free” N-Boc protection of the primary amine employing Amberlyst® 15 as an acid heterogeneous catalyst [28], leading to compound **2** in its analytically pure form. In a second



Scheme 1. Synthesis of probe 7.

step, the hydroxyl group was converted into the methanesulfonate derivative **3** [29]. A lithium *n*-butyllithium solution was previously generated in situ by the addition of *n*-butyllithium solution to a THF-elemental selenium suspension, then compound **3** was added to form **4** through a  $\text{S}_{\text{N}}2$  reaction mechanism [29]. After a trifluoroacetic acid-assisted N-Boc removal from **4**, probe **7** was assembled from the 2-(butylselanyl)ethanamine (**5**) and 1-pyrenecarboxylic (**6**) amide coupling mediated by *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC).

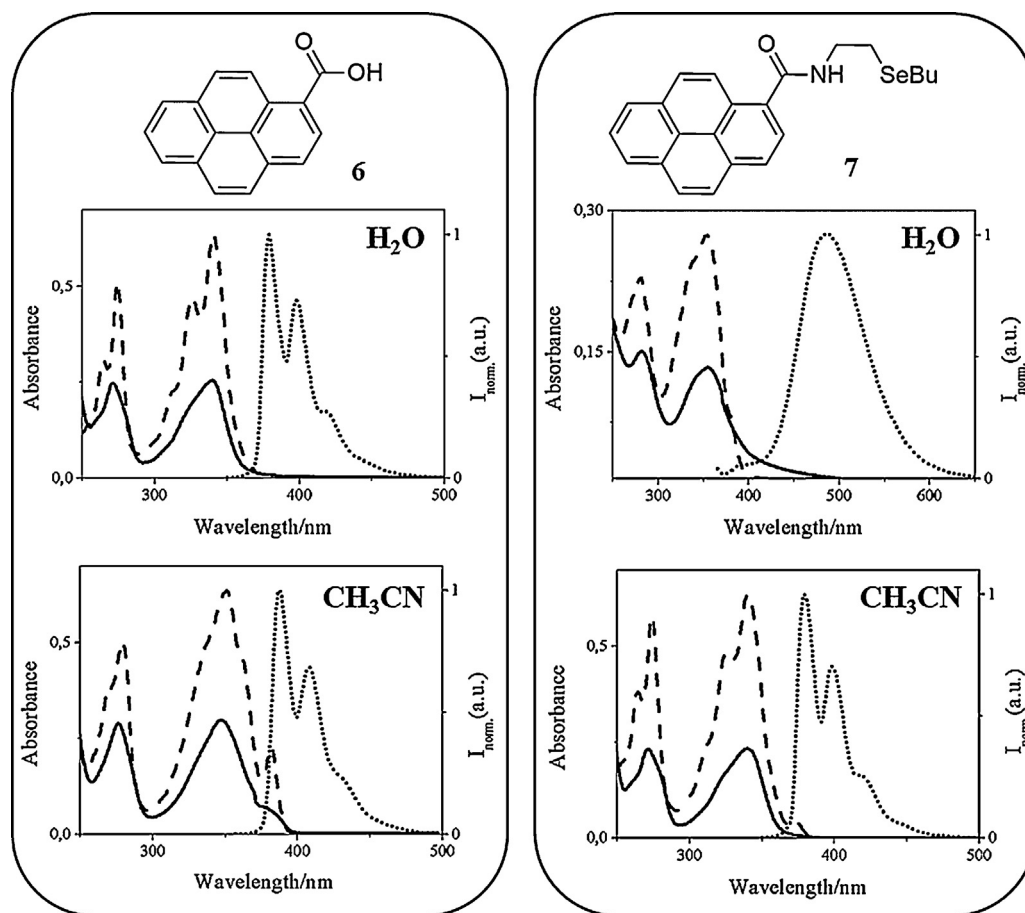
Compound **7** was properly characterized by  $^1\text{H}$  (Fig. S5) and  $^{13}\text{C}$  NMR (Fig. S6), elemental analysis, MALDI-TOF-MS (Fig. S7), infrared spectroscopy, fluorescence emission and UV–vis spectroscopy (Fig. 1). The  $^1\text{H}$  NMR spectra of **7** presented a triplet (2.64 ppm), quintet (1.67 ppm), sextet (1.40 ppm) and a triplet (0.90 ppm) signals assigned to the *n*-butyl group attached to selenium atom. The quartet (3.85 ppm) and triplet (2.91 ppm) signals were assigned to the  $\alpha$  and  $\beta$  ethylene group between the nitrogen and selenium atoms. The broad singlet at 6.56 ppm corresponds to the N–H changeable hydrogen and the multiplet, in the aromatic region (7.8–8.7 ppm) corresponds to the hydrogens of the pyrene core. Analysing the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, it can be observed the amide carboxyl carbon at 170 ppm, the aromatic carbons of the pyrene core as well as the signal referent to the  $\text{CH}_2$  group connected to the nitrogen atom at 40 ppm [30]. All other signals are corresponding to the  $\text{sp}^3$  carbons of the butyl group attached to the selenium atom. Moreover, from the MALDI-TOF-MS analysis, it is possible to identify the molecular ion peak consistent to the structure of **7** at 409.07  $m/z$ .

### 3.1. Photophysical characterization

Compound **6** and **7** were characterized in water, and acetonitrile at 298 K and the primary data are given in Table 1.

**Footnote Table 1.** The fluorescence quantum yields for **5** and **6** in water and acetonitrile were calculated from the 1-pyrenecarboxylic acid (**6**) as standard ( $\phi = 0.11$  in acetonitrile).

Fig. 1 presents the absorption, emission and excitation spectra of **6** and **7** in both solvents. By the individual analysis of each compound, there is an interesting observation concerning the displacement of the absorption and emission bands by varying the solvent. In acetonitrile solution we observed the absorption and structured emission bands at  $\lambda_{\text{abs}} = 347$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 387$  nm and lifetime of 3.55 ns. It was expected longer wavelengths of absorption and emission for compound **6** in aqueous solution, due



**Fig. 1.** Absorption (solid line), emission (dotted line) and excitation (dashed line) spectra of compounds **6** (left) and **7** (right) in water and acetonitrile as assigned in the charts.  $[6] = [7] = 1 \times 10^{-5}$  mol/L;  $\lambda_{exc} = 340$  nm.

**Table 1**

Photophysical characterization of compounds **6** and **7** in acetonitrile and water.

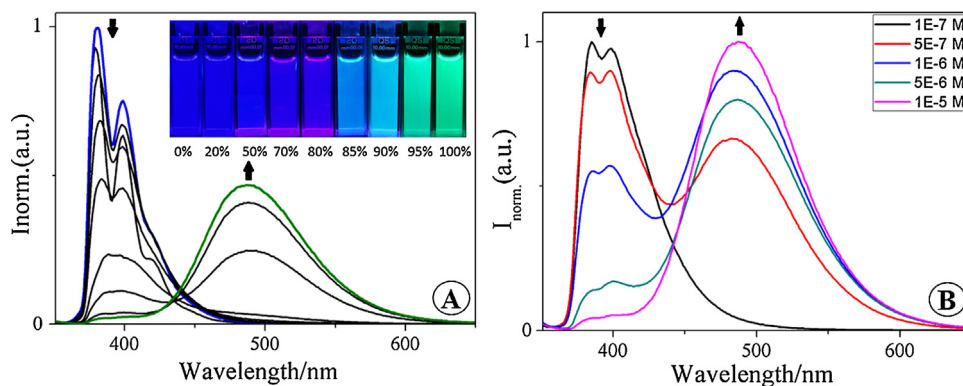
Compounds	Solvent	UV-vis		Fluorescence			
		$\lambda_{abs}$ (nm)	Log $\epsilon$	$\lambda_{em}$ (nm)	Stokes shift (nm)	Quantum Yield	Lifetime
<b>6</b>	CH <sub>3</sub> CN	347	4.47	387	40	0.11	3.55
<b>6</b>	H <sub>2</sub> O	339	4.41	379	40	0.11	37.9
<b>7</b>	CH <sub>3</sub> CN	340	4.37	379	39	0.024	9.78
<b>7</b>	H <sub>2</sub> O	354	4.12	486	133	0.036	37.5

to the better stabilization of the polarized and enhanced dipole moment of the excited state by water [31]. However, the opposite was observed. Because the highly electron delocalized side chain, the carboxylic acid **6** presents a considerable acid strength behaviour ( $pK_a = 4.0$ ), being mostly in the anionic form in water [32]. The observed absorption ( $\lambda_{abs} = 339$  nm) and emission wavelength ( $\lambda_{em} = 379$  nm) were therefore attributed to the anionic specie. The solvent did not affect the quantum yield; nonetheless the lifetime of the anion is about ten times greater. Regarding the acetonitrile solution of **7**, it was observed the same type of absorption and structured emission band as those seen for **6**, corresponding to the monomeric pyrene [33]. The transformation of compound **6** to **7** was accompanied by fluorescence quenching from 11% to 2.4%. The fluorescence quenching is attributed to the photo-induced electron transfer [34] and the heavy atom effect [35] imputed by the selenium atom. In water, compound **7** presented an entirely different emissive pattern compared to that observed before, as evidenced by the red shifted broadband at 487 nm (Fig. 1). Concerning the acetonitrile solution, the Stokes shift increased sub-

stantially from 39 nm to 133 nm, the quantum yield was slightly incremented from 2.4% to 3.6% and the lifetime increased about four times, from 9.78 ns to 37.5 ns. Because the highly hydrophobic structure of **7**, the  $\pi$ -stacking forces plays an important role, prevailing on solvation energy. As a consequence, compound **7** was found mostly as aggregates in aqueous solution. Dynamic light scattering studies (DLS) proved the presence of monodisperse aggregates of **7** with an average size of 210 nm, while no particles were detected in acetonitrile solution (Fig. S1). Furthermore, the concentration of **7** do not affect the size of the aqueous aggregates, suggesting that the aggregation process is not random, but there is an energetically most stable range of particles sizes.

In order to obtain more information about solvent polarity and solute concentration in the aggregation process, we preceded a fluorescence experiment of **7** in different mixtures of acetonitrile/water. This experiment consists in the measurement of the spectra in solution ranging the concentration of **7** in pure water, as shown in Fig. 2A and B, respectively. In Fig. 2A we observed the structured band at 379 nm attributed to the monomeric **7** in





**Fig. 2.** A) Normalized emission spectra of **7** in different water/acetonitrile mixtures from 0% water (blue line) to 100% water (green line).  $[7] = 1.0 \times 10^{-5}$  mol/L;  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm. Inset: visual changes of **7** from 0% to 100% of water under UV light ( $[7] = 1.0 \times 10^{-5}$  mol/L;  $\lambda_{\text{exc}} = 365$  nm). B) Normalized emission spectra of **7** from  $1 \times 10^{-7}$  mol/L to  $1 \times 10^{-5}$  mol/L in pure water.  $[7] = 1.0 \times 10^{-5}$  mol/L;  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 2**  
**Lifetimes (T1, T2) and relative amplitudes (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) of **7** in different water/acetonitrile mixtures ( $[7] = 1.0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>).**

Entry	Water content (%)	T1 (ns)	B <sub>1</sub> (Rel. Amp.%)	T2 (ns)	B <sub>2</sub> (Rel. Amp.%)
1	0	9.78	100		
2	20	8.85	100		
3	50	6.93	100		
4	70	4.77	100		
5	80	3.60	95.1	15.54	4.9
6	85	3.34	77.1	21.50	22.9
7	90	3.81	56.1	27.01	43.9
8	100			34.8	100

pure acetonitrile (blue line). As the water content of the mixture was increased we noted the simultaneous attenuation of the monomer band and the appearance of a new structureless band at 486 nm (green line), attributed to the aggregate formation. The emissive dynamics from 0 to 100% water could be monitored by visual changes under UV light, as shown in the inset of Fig. 1A. The observations were supported by time-resolved fluorescence measurements presented in Table 2. Up to 70% of water, compound **7** was fitted with a mono-exponential law (9.78 ns). From 80%, **7** fitted with a double-exponential law, being the smaller lifetime (7.89 ns) related to the monomeric pyrene and the larger (37.7 ns) to the aggregate. In pure water, the relative amplitude of the aggregate lifetime reached the maximum value of 93.1% versus 6.9% of the monomeric component. The Fig. 1 B highlights the importance of the concentration in the monomer/aggregate equilibrium in water. At  $1 \times 10^{-7}$  mol/L only the monomeric emissive band of **7** was observed and the lifetime decay was fitted with one exponential law (3.65 ns). At intermediate concentrations ( $5 \times 10^{-7}$  mol/L to  $5 \times 10^{-6}$  mol/L) both monomeric and aggregate bands are observed, and the lifetime decay was fitted with two exponentials, being 4.02 ns related to the monomeric pyrene and 36.5 ns due to the aggregate. Finally, at  $1 \times 10^{-5}$  mol/L the aggregate form is far predominant.

### 3.2. Metallic ion sensing

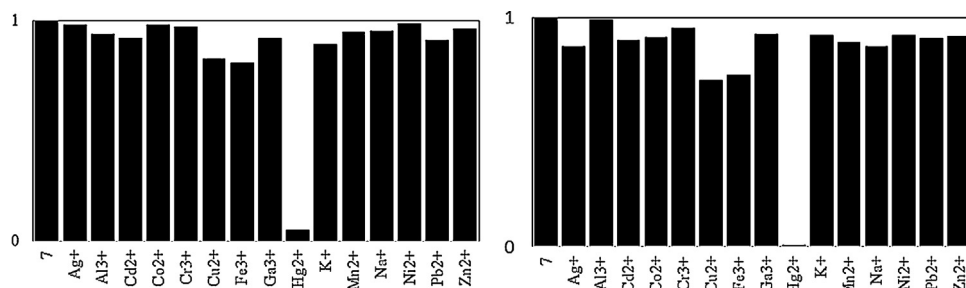
As shown in Scheme 1, the structure of compound **7** was designed within the framework to contain a selenide subunit attached to a pyrene core through a spacer. Such structure aimed to build a high-affinity device for Hg<sup>2+</sup>, which could result in emission changes in the presence of this analyte. The sensing ability of **7** toward a wide range of metallic ions (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup> and Cr<sup>3+</sup>) in water

and in acetonitrile was evaluated. Fig. 3 shows the normalized fluorescence emission in the presence of 5 molar equiv. of each metal ion in water and acetonitrile at 486 nm and 379 nm, respectively.

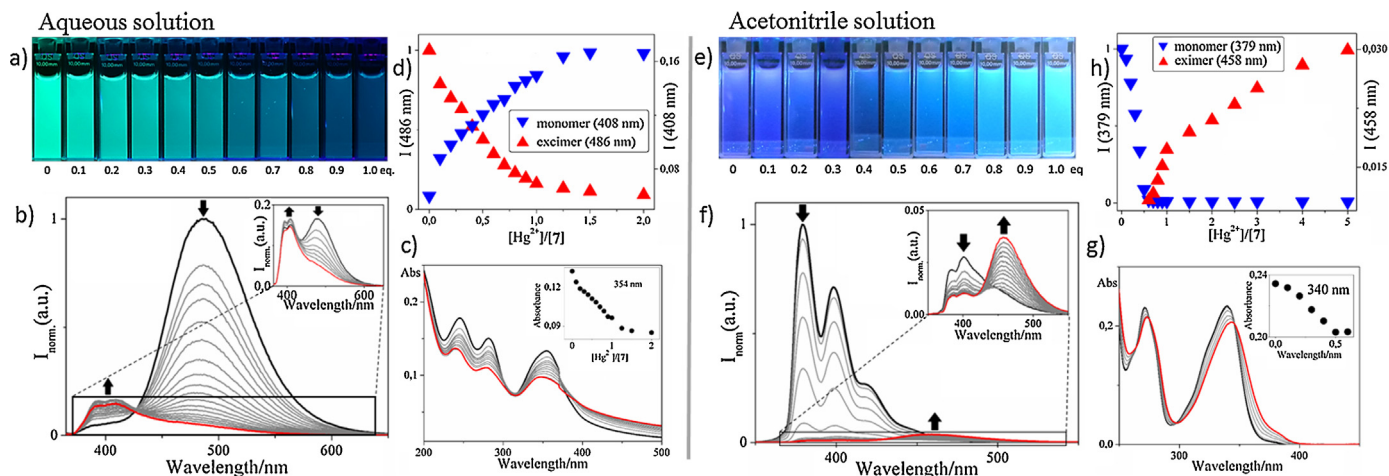
From these results, we proceeded the spectrophotometric and spectrofluorimetric titrations of compound **7** with Hg<sup>2+</sup> solutions. In aqueous media (Fig. 4C), as Hg<sup>2+</sup> solution was added, we observed the attenuation of the main absorption band at 354 nm and a slight blue shift. On the other hand, fluorescence data provided more accurate analytical information. An expressive quenching of emission at 486 nm was noted even after the first addition of Hg<sup>2+</sup>, as shown in Fig. 4B. Concomitantly, it was observed the appearance of a new structured emissive band at 408 nm (expansion area in Fig. 4B). In Fig. 4A, it is presented the visual changes of solutions of **7** by the addition of Hg<sup>2+</sup> (from 0 to 1.0 equiv.), which exhibit the transition from green to the near-UV blue. Fig. 4D showed the dynamics of the quenched (486 nm) and enhanced (408 nm) bands.

Due to the poor solubility of **7** in water, when the acetonitrile stock solution of **7** is diluted with water to give the work aqueous solution,  $\pi$ -stacking forces of pyrene are dominant over solvation energy, and monodisperse aggregates of 210 nm were formed, which was evidenced by DLS analysis (Fig. S1). However, in the presence of Hg<sup>2+</sup>, the aggregates are dismantled, giving the aqueous coordination complex **7**-Hg<sup>2+</sup> of 1:1 stoichiometry, as presented in Fig. 5 and confirmed by HRMS data (Fig. S9). The quantum yield of the aqueous **7**-Hg<sup>2+</sup> complex declined considerably (15 times), from 3.6% to 0.24%. Very intense chelation-enhanced fluorescent quenching (CHEQ) takes place as a result of the heavy atom effect imputed by Hg<sup>2+</sup> to the pyrene moiety. The fluorescence quenching was reflected directly in the lifetime, which decreases gradually about 10 times, from 38.02 ns to 3.70 ns (Table S1 and Fig. S2). From this result, we could conclude that the aggregate structure was disassembled upon the addition of Hg<sup>2+</sup>, resulting in a 1:1 metal/ligand complex under CHEQ (Fig. 5A). The stability constant of the complex ( $\log \beta = 6.19 \pm 0.03$ ), the detectable (0.1  $\mu$ mol/L) and quantifiable (0.17  $\mu$ mol/L) minimum amounts were calculated from emission data.

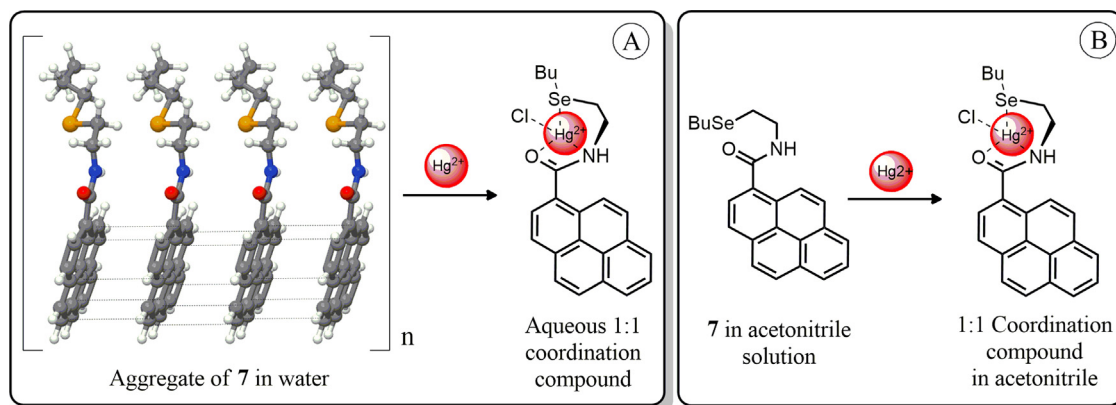
Regarding the titration in acetonitrile, we observed a slight absorption attenuation and red shift from 340 nm to 343 nm, as shown in Fig. 4G. A strong CHEQ and concurrently, the appearance of the exciplex structureless band at 458 nm was observed, as shown in Fig. 4F. Fig. 4E shows the visual changes from near-UV blue to blue-greenish. The analysis of the fitting presented in Fig. 4H shows that the band at 379 nm was completely suppressed by the addition of 0.5 molar equiv. of Hg<sup>2+</sup>. An intense fluorescence quenching, from 2.4% to 0.14% (17 times), accompanied by a



**Fig. 3.** Normalized fluorescence emission of compound **7** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L) in the presence of 5 molar equiv. of different metallic ions in A) water at 486 nm and in B) acetonitrile at 379 nm.



**Fig. 4.** a), e): visual changes of the aqueous and acetonitrile solution of **7** under UV light (365 nm) upon the addition from 0 to 1 molar equiv. of Hg<sup>2+</sup> ( $[7] = 1.10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>). b), f): spectrofluorimetric titrations of **7** in aqueous and acetonitrile solutions upon addition of increasing amounts of Hg<sup>2+</sup> (b)  $\lambda_{exc.} = 354$  nm; (f)  $\lambda_{exc.} = 340$  nm;  $[7] = 1.10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>). Inset: expansions of the emerging emission bands. c), g) spectrophotometric titrations of **7** in aqueous and acetonitrile solutions upon addition of increasing amounts of Hg<sup>2+</sup> ( $[7] = 1.10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>). d) Normalized emission variation at 486 nm and 408 nm as a function of  $[Hg^{2+}]/[7]$ . e) Normalized emission variation at 458 nm and 379 nm as a function of  $[Hg^{2+}]/[7]$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 5.** Proposed binding models of **6** with Hg<sup>2+</sup> in A) water and B) acetonitrile.

decrease in the lifetime of the excited state from 9.84 ns to 4.10 ns was also observed (Table S2 and Fig. S2).

The sensing mechanism in acetonitrile is quite different from that found in the aqueous solution. Acetonitrile is capable of dissolving the highly nonpolar pyrene derivative **7**, which was evidenced by the highly structured emission band (Fig. 4F). In the presence of Hg<sup>2+</sup>, **7** binds to the ion giving the **7**-Hg<sup>2+</sup> complex, as evidenced by the exciplex non-structured band (Fig. 4f). High resolution Mass Spectrometry (HRMS) studies showed the formation of the coordination complex with 1:1 stoichiometry (Fig. S8).

In summary, compound **7** coordinates to Hg<sup>2+</sup> giving high stable **7**-Hg<sup>2+</sup> complex in acetonitrile solution.

The interaction constant of the complex in acetonitrile ( $\log \beta = 8.59 \pm 0.04$ ) is much superior to that observed in the aqueous medium. The detectable and quantifiable minimum amounts are 2.0  $\mu$ mol/L and 4.0  $\mu$ mol/L in acetonitrile solution, respectively.

Based on the stoichiometry of **7**-Hg<sup>2+</sup> complexes in each solvent and the respective emission band patterns, we have proposed a binding model for the pair **7**-Hg<sup>2+</sup> in water (Fig. 5A) and acetonitrile (Fig. 5B).

**Table 3**  
Quantitative spectrofluorimetric analysis of Hg<sup>2+</sup> added to commercial spring waters.

Entry	[Hg <sup>2+</sup> ] added (10 <sup>-7</sup> M)	Detected					
		S1	408 nm S2	S3	S1	486 nm S2	S3
1	1.0	1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.4	1.31 ± 0.05	1.33 ± 0.02	0.6 ± 0.1
2	2.0	1.82 ± 0.06	2.04 ± 0.04	1.7 ± 0.4	2.7 ± 0.2	2.1 ± 0.1	1.08 ± 0.03
3	3.0	3.14 ± 0.09	2.9 ± 0.2	2.6 ± 0.3	3.4 ± 0.2	2.5 ± 0.3	1.65 ± 0.06

In order to apply the probe in a real situation, we conducted an analytical experiment with three different brands of spring water from Portugal of different pH values (S1 = 5.7; S2 = 6.6; S3 = 9.5). The objective was to detect and quantify Hg<sup>2+</sup> using **7** as a fluorescent probe following both aggregate (486 nm) and complex (408 nm) maximum of emission in aqueous solution. The results are summarized in Table 3, and the linear regression at 408 nm and 486 nm are presented in Figs. S3 and S4, respectively. The best measurement accuracy was achieved by monitoring the complex band (408 nm) due to the complex is a defined chemical species while the aggregates have its size reduced randomly as Hg<sup>2+</sup> acts in the pickling of the surface.

#### 4. Conclusions

In summary, we synthesized a new seleno-pyrene derivative capable of detecting Hg<sup>2+</sup> in either aqueous or acetonitrile solution. The adopted synthetic strategy allows, in few steps and high overall yield, the linkage of an alkyl-selenoamine to the 1-pyrenecarboxylic acid through an amide bond. The compound showed stable and selective interaction with Hg<sup>2+</sup> among a wide range of metallic ions in pure aqueous or pure acetonitrile solution. However, the sensing mechanism was found to be different in each solvent. Compound **7** is in the form of aggregates in aqueous solution; nonetheless, as Hg<sup>2+</sup> is added, disruption of aggregates is observed resulting in the formation of a complex under strong CHEQ. Conversely, in acetonitrile solution, **7** presents the monomeric pyrene emissive pattern, and as the addition of Hg<sup>2+</sup> proceeds, the excimer formation is observed, also accompanied by strong CHEQ. The complex formation exhibited intense interaction constant values, especially in acetonitrile solution. The detection and quantification limits are under the μmol/L range. The aqueous system was applied in the detection of Hg<sup>2+</sup> in real samples of spring water, where the added amounts of the analyte could be detected using **7** as a fluorescent probe. The versatility of the probe **7** in solvents of such different characteristics, makes the compound a useful candidate probe to be used in studies on the role of Hg<sup>2+</sup> in both protic or aprotic biological environments.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Unidade de Ciências Biomoleculares Aplicadas-UCIBIO, which is financed by national funds from FCT/MEC (UID/Multi/04378/2013), Scientific PROTEOMASS Association (Portugal), LAQV/REQUIMTE (UID/QUI/50006/2013 co-financed by theERDF under the PT2020 Partnership Agreement (POCI-01-0145-FEDER-007728)). A. Gonçalves thanks to CNPq/Brazil for his PhD grant. C. Lodeiro thanks to the CNPq program, Science without borders 2014–2016 for the “Special Guest Researcher” grant (Brazil). All authors are also grateful to the financial and structural support offered by the University of São Paulo through the NAP-CatSinQ (Research Core in Catalysis and Chemical Synthesis), FAPESP andCAPES for financial support (Brazil).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.014>.

#### References

- [1] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, sixth edition, 1998, [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)84936-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(00)84936-3).
- [2] S. Goswami, A.K. Das, S. Maity, PET vs. push-pull induced ICT: a remarkable coumarinyl-appended pyrimidine based naked eye colorimetric and fluorimetric sensor for the detection of Hg<sup>2+</sup> ions in aqueous media with test trips, Dalton Trans. 42 (2013) 16259–16263, <http://dx.doi.org/10.1039/c3dt52252k>.
- [3] W.H.O. WHO, WHO, (2013). | Mercury and health, Fact Sheet N 361. 1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/en/>.
- [4] S. Goswami, S. Maity, A.C. Maity, A. Kumar Das, B. Pakhira, K. Khanra, et al., ESIP based Hg<sup>2+</sup> and fluoride chemosensor for sensitive and selective turn on red signal and cell imaging, RSC Adv. 5 (2015) 5735–5740, <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA07838A>.
- [5] D.W. Boening, Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review, Chemosphere 40 (2000) 1335–1351, [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00283-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00283-0).
- [6] W.-Y. Liu, S.-L. Shen, H.-Y. Li, J.-Y. Miao, B.-X. Zhao, Fluorescence turn-on chemodosimeter for rapid detection of mercury (II) ions in aqueous solution and blood from mice with toxicosis, Anal. Chim. Acta. 791 (2013) 65–71, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.022>.
- [7] M. Mamelì, V. Lippolis, C. Caltagirone, J.L. Capelo, O.N. Faza, C. Lodeiro, Hg<sup>2+</sup> detection by new anthracene pendant-arm derivatives of mixed N/S- and N/S/O-donor macrocycles: fluorescence, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and density functional theory studies, Inorg. Chem. 49 (2010) 8276–8286, <http://dx.doi.org/10.1021/ic1007439>.
- [8] H.N. Kim, W.X. Ren, J.S. Kim, J. Yoon, Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions, Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 3210–3244, <http://dx.doi.org/10.1039/C1CS15245A>.
- [9] J. Fernández-Lodeiro, C. Nuñez, A.F. Lodeiro, E. Oliveira, B. Rodríguez-González, A. a. Dos Santos, et al., New-coated fluorescent silver nanoparticles with a fluorescein thiol ester derivative: fluorescent enhancement upon interaction with heavy metal ions, J. Nanoparticle Res. 16 (2014) 2315, <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-014-2315-4>.
- [10] S. Ekino, M. Susa, T. Ninomiya, K. Imamura, T. Kitamura, Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning, J. Neurol. Sci. 262 (2007) 131–144, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2007.06.036>.
- [11] C. Nuñez, M. Diniz, A. a. Dos Santos, J.L. Capelo, C. Lodeiro, New rhodamine dimer probes for mercury detection via color changes and enhancement of the fluorescence emission: fast recognition in cellulose supported devices, Dye. Pigment. 101 (2014) 156–163, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.09.019>.
- [12] F. Dang, W.-X. Wang, Antagonistic interaction of mercury and selenium in a marine fish is dependent on their chemical species, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 3116–3122, <http://dx.doi.org/10.1021/es103705a>.
- [13] I. Falnoga, M. Tušek-Žnidarič, Selenium-mercury interactions in man and animals, Biol. Trace Elem. Res. 119 (2007) 212–220, <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-007-8009-3>.
- [14] N.V.C. Ralston, L.J. Raymond, Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity, Toxicology 278 (2010) 112–123, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2010.06.004>.
- [15] R. Ludwig, N.T.K. Dzung, Calixarene-based molecules for cation recognition, Sensors 2 (2002) 397–416, <http://dx.doi.org/10.3390/s21000397>.
- [16] J.-S. Wu, J.-H. Zhou, P.-F. Wang, X.-H. Zhang, S.-K. Wu, New fluorescent chemosensor based on exciplex signaling mechanism, Org. Lett. 7 (2005) 2133–2136, <http://dx.doi.org/10.1021/ol0504648>.
- [17] N.J. Youn, J.S. Kim, K.C. Song, S.H. Kim, S. Ahn, S. Chang, 2005. Cyclam Based Hg (II) – and Cu (II) –selective Fluoroionophore Having Appended Pyrene Function 26 849–851.
- [18] C. Lodeiro, J.C. Lima, J. a. Parola, J.S. Seixas de Melo, J.L. Capelo, B. Covelo, et al., Intramolecular excimer formation and sensing behavior of new fluorimetric probes and their interactions with metal cations and barbituric acids, Sens.



- Actuators B Chem. 115 (2006) 276–286, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2005.09.010>.
- [19] H.J. Kim, S.H. Kim, D.T. Quang, J.H. Kim, I. Suh, J.S. Kim, 2007. Highly Selective Fluorescent Signaling for Al<sup>3+</sup> in Bispyrenyl Polyether 28 811–815.
- [20] D. Pinheiro, C.S. De Castro, J.S. Seixas De Melo, E. Oliveira, C. Nuñez, A. Fernández-Lodeiro, et al., From yellow to pink using a fluorimetric and colorimetric pyrene derivative and mercury (II) ions, *Dye. Pigment.* 110 (2014) 152–158, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2014.04.012>.
- [21] H.F. Wang, S.P. Wu, A pyrene-based highly selective turn-on fluorescent sensor for copper(II) ions and its application in living cell imaging, *Sens. Actuators B Chem.* 181 (2013) 743–748, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.01.054>.
- [22] O.a. Khakhel, Absorption spectra of pyrene aggregates in saturated solutions, *J. Appl. Spectrosc.* 68 (2001) 280–286.
- [23] Z. Zhao, S. Chen, J.W.Y. Lam, Z. Wang, P. Lu, F. Mahtab, et al., Pyrene-substituted ethenes: aggregation-enhanced excimer emission and highly efficient electroluminescence, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 7210, <http://dx.doi.org/10.1039/c0jm04449k>.
- [24] E.M.S. Castanheira, J.M.G. Martinho, Thermochromic shifts of pyrene excimer fluorescence, *Chem. Phys. Lett.* 206 (1993) 45–48, [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2614\(91\)85067-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2614(91)85067-7).
- [25] P. Singla, P. Kaur, K. Singh, A fluorescent probe for the detection of Hg<sup>2+</sup>: Shift from on-state A to on-state B, *Talanta* 130 (2014) 571–576, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.050>.
- [26] J. Fernández-Lodeiro, C. Núñez, C.S. de Castro, E. Bértolo, J.S. Seixas de Melo, J.L. Capelo, et al., Steady-state and time-resolved investigations on pyrene-based chemosensors, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 121–129, <http://dx.doi.org/10.1021/jc301365y>.
- [27] Y. Niko, Y. Hiroshige, S. Kawauchi, G. Konishi, Fundamental photoluminescence properties of pyrene carbonyl compounds through absolute fluorescence quantum yield measurement and density functional theory, *Tetrahedron* 68 (2012) 6177–6185, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2012.05.072>.
- [28] S.U. TEKALE, S.S. KAUTHALE, R.P. PAWAR, Solvent free n-boc protection of amines using amberlyst r a 21 solid base resin as a reusable heterogeneous catalyst, *J. Chil. Chem. Soc.* 58 (2013) 1619–1623, <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072013000100025>.
- [29] A.L. Braga, L.A. Wessjohann, P.S. Taube, F.Z. c Galletto, F.M. De Andrade, Straightforward method for the synthesis of selenocysteine and selenocysteine derivatives from L-serine methyl ester, *Synthesis (Stuttg.)* (2010) 3131–3137, <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1258188>.
- [30] R.M. Silverstein, F.X. Webster, D.J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7 ed., Silverstein, Webster & Kiemle, 2005, [http://dx.doi.org/10.1016/0026-265X\(76\)90069-2](http://dx.doi.org/10.1016/0026-265X(76)90069-2) (pdf).
- [31] M.J. Wirth, Solvation effects on spectroscopic measurements, *TrAC Trends Anal. Chem.* 1 (1982) 383–386, [http://dx.doi.org/10.1016/0165-9936\(82\)88008-4](http://dx.doi.org/10.1016/0165-9936(82)88008-4).
- [32] M.B. Lerner, J.M. Reszczynski, A. Amin, R.R. Johnson, J.I. Goldsmith, a.T.C. Johnson, Toward quantifying the electrostatic transduction mechanism in carbon nanotube molecular sensors, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 14318–14321, <http://dx.doi.org/10.1021/ja306363v>.
- [33] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2006), <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- [34] J. Fernández-Lodeiro, M.F. Pinatto-Botelho, A. a. Soares-Paulino, A.C. Gonçalves, B. a. Sousa, C. Princival, et al., Synthesis and biological properties of selenium- and tellurium-containing dyes, *Dye. Pigment.* 110 (2014) 28–48, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2014.04.044>.
- [35] N.J. Turro, V. Ramamurthy, J.C. Scaiano, *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules* (2012), <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01178.x>.

## Biographies

**Augusto Cesar Gonçalves** was born in 1986 in Cambé, Brazil. From 2004–2008, he studied chemistry at the State University of Londrina (UEL). In 2012 he obtained his MSc, under the supervision of prof. Alcindo A. Dos Santos at University of São Paulo (USP, Brazil). After he obtained his MSc 2012, he worked as professor at North Paraná University. In 2013 he started the PhD under the supervision of professor Alcindo A. Dos Santos (USP) and Carlos Lodeiro Espiño (Nova university of Lisbon, Portugal). Currently he is attending the last year of the Ph.D which is devoted to the synthesis and applications of fluorescent probes for metallic ion detection.

**Jose Luis Capelo Martinez** graduated by the University of Santiago de Compostela (Spain), obtained his PhD by the University of Vigo (Spain), and his post-doc by the Instituto Superior Tecnico (Portugal). Currently he is Assistant Professor at the Nova University of Lisbon where Co-leads the BioscopeGroup ([www.bioscopegroup.org](http://www.bioscopegroup.org)). Professor Capelo has published about 200 manuscripts, one book, several book chapters, one patent and he has mentored 18 doctorates. His research interests comprise nanotechnology, bacterial resistance to antibiotics, splicing, medical and environmental proteomics and ultrasonics applied to bioanalysis.

**Carlos Lodeiro** graduated in Chemistry in 1995, received his PhD in chemistry in 1999 by the University of Santiago de Compostela, Spain. In 1999 he moved to the University NOVA of Lisbon (UNL) in Portugal as European Marie Curie postdoctoral researcher in a project concerning molecular devices and machines and in 2004 he became a fellow researcher and invited assistant lecturer at the REQUIMTE-CQFB, Chemistry Department (UNL). In 2009 Dr. Lodeiro moved to the University of Vigo, Faculty of Sciences of Ourense (FCOU), Spain as IPP (Isidro Parga Pondal) researcher-lecturer. Since 2012 he is assistant Professor at the Chemistry Department UCIBIO-REQUIMTE Laboratory in the Faculty of Science and Technology, University NOVA of Lisbon. Dr. Lodeiro is Fellow of the Royal Society of Chemistry since 2014 and member of the Portuguese Chemistry Society. Presently he is a co-head of the BIOSCOPE research group and Co-CEO of the PROTEOMASS Scientific Society. His research interest comprises (i) physical-organic and physical-inorganic chemistry of fluorescence chemosensors, (ii) Nanoparticles and Applications, (iii) supramolecular analytical proteomics, (iv) Onco and Nanoproteomics. C. Lodeiro is author or co-author of more than 200 manuscripts, 15 book chapters, and 4 books.

**Alcindo A. Dos Santos** was born in 1971 in Siqueira Campos, Brazil. From 1993–1998, he studied chemistry at the Federal University of Paraná (UFPr). In 2003 he obtained his PdD, which was developed under the supervision of prof. Alfredo R. M. de Oliveira (UFPr, Brazil) and prof. Wittko Francke (Hamburg University, Germany). After he obtained his Ph.D. in 2003, he worked under the guidance of Professor João V. Comasseto at the University of São Paulo, Brazil, as a FAPESP postdoctoral fellow (2003–2006). Professor Dos Santos was appointed Adjunct Professor of Chemistry at the Federal University of São Carlos in 2006 and in 2009 he moved to University of São Paulo. In 2016 he was appointed as Associated Professor at University of São Paulo. His research interest is focused on the synthesis of chalcogen-containing fluorescent compounds for sensing of varied analytes.