





UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

"ESTUDO DA APLICAÇÃO DE DERIVADOS OXAZOLÔNICOS COMO SONDAS FLUORESCENTES E SOLVATOCRÔMICAS NA INVESTIGAÇÃO DE SOLVENTES PUROS"

Taianne D`Angelo dos Santos

Toledo – PR 2018







UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

"ESTUDO DA APLICAÇÃO DE DERIVADOS OXAZOLÔNICOS COMO SONDAS FLUORESCENTES E SOLVATOCRÔMICAS NA INVESTIGAÇÃO DE SOLVENTES PUROS"

Taianne D`Angelo dos Santos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr.Maurício Ferreira da Rosa Coorientador: Cleber Antônio Lindino

Toledo – PR 2018

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Santos, Taianne D´Angelo dos ESTUDO DA APLICAÇÃO DE DERIVADOS OXAZOLÔNICOS COMO SONDAS FLUORESCENTES E SOLVATOCRÔMICAS NA INVESTIGAÇÃO DE SOLVENTES PUROS / Taianne D´Angelo dos Santos; orientador(a), Maurício Ferreira da Rosa; coorientador(a), Cleber Antonio Lindino, 2018. 93 f. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018. 1. oxazolona. 2. sensores. 3. polaridade. 4. fluorescência. I. Rosa, Maurício Ferreira da. II. Lindino, Cleber

Antonio . III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Taianne D' Ângelo Santos

"Estudo da aplicação de derivados oxazolônicos como sondas fluorescentes e sondas solvatocrômicas na investigação de solventes puros"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química - Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Química, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

en

Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa (Presidente-Orientador)

llar Profa. Dra. Kelen Menezes Flores Rossi de Aguiar (UTFPR)

Prof. Dr. Reinaldo Aparecido Bariccatti (Unioeste)

Aprovada em: 13 de dezembro de 2018. Local de defesa: Sala 01 do Bloco E - Unioeste/Campus de Toledo.

Dedico esse trabalho aos meus pais Francisco e Valdete, que lutaram ao meu lado para que esse sonho fosse realizado. A minha vitória também é de vocês"

Agradecimentos

Primeiramente, para aquele, o qual, sem sua benção não realizaria nada nesta vida. Pode-se chamar-lo das mais variadas formas, mas o chamo de DEUS.

Gostaria de agradecer á minha família, especialmente aos meus pais, Francisco e Valdete e minha vó Marlene, que sempre me deram apoio e incentivo nesta jornada.

Ao meu orientador, prof. Dr^o Maurício Ferreira da Rosa, por sua orientação, dedicação, paciência, amizade e pelos ensinamentos que contribuíram tanto para a vida profissional quanto pessoal.

Aos meus colegas e amigos do laboratório GIPeFEA.

Aos professores e funcionários da UNIOESTE que de uma maneira ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos que encontrei durante o mestrado, pelas conversas, ajuda e por estarem sempre presentes tanto nos momentos de alegria quanto de tristeza.

Ao prof. Drº Reinaldo Baricatti pela ajuda, ensinamentos, contribuições e por toda a paciência para operar o fluorímetro, fazendo acreditar que tudo daria certo.

Ninguém vence sozinho....Obrigada a todos

Santos, Taianne D'Angelo. <u>Estudo da aplicação de derivados oxazolônicos como</u> <u>sondas fluorescentes e solvatocrômicas na investigação de solventes puros</u>. 2018. Dissertação (Mestrado em Química). **Universidade Estadual do Oeste do Paraná**.

Orientador: Maurício Ferreira da Rosa

Resumo

Este trabalho relata inicialmente o emprego de dois derivados oxazolônicos, 4-(4-(N,N)-dimetilaminobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (AZA2) e 4-(4-nitrobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (AZA8) como sondas fluorescentes na detecção de histamina. Entretanto esses compostos apresentaram baixa reatividade do núcleo oxazolônico frente ao analito em condições amenas. Logo, aproveitando-se das propriedades absortivas e emissivas dos derivados oxazolônicos, pensou-se na utilização destes derivados como sondas solvatocrômicas na investigação de solventes puros. Assim, além dos derivados para esta finalidade, o 4- (4-metoxi-benzilideno) -2-fenil-1,3-oxazol-5 (4H) –ona (AZA10) e 4- (3-clorobenzilideno) -2-fenil-4H-oxazol-5-ona (AZA13). Utilizando-se das estratégias multiparamétricas de KamletAbboud-Taft (KAT) e Catalán, verificou-se que o parâmetro que possui maior influência no comportamento solvatocrômico foi a polarizabilidade

Santos, Taianne D'Angelo. <u>Study of the application of oxazolonic</u> <u>derivatives as fluorescent and solvatocromic probes in the investigation of</u> <u>pure solvents</u>. 2018. Dissertation (Master in Chemistry). **State University of Western Paraná**.

Advisor: Maurício Ferreira da Rosa

Abstract

This work reports the use of two oxazolonic derivatives, 4- (4- (N, N) - dimethylaminobenzylidene) -2-phenyl-1,3-oxazol-5 (4H) -one (AZA2) and 4- (4- nitrobenzylidene) -2-phenyl-1,3-oxazol-5 (4H) -one (AZA8) as fluorescent probes in the detection of histamine. However, these compounds showed low reactivity of the oxazolonic nucleus against the analyte under mild conditions. Therefore, taking advantage of the absorptive and emissive properties of the oxazolonic derivatives, it was thought to use these derivatives as solvatochromic probes in the investigation of pure solvents. Thus, in addition to the aforementioned derivatives (AZA2 and AZA8), two further derivatives for this purpose were also tested for 4- (4-methoxy-benzylidene) -2-phenyl-1,3-oxazol-5 (4H) - (AZA10) and 4- (3-chlorobenzylidene) -2-phenyl-4H-oxazol-5-one (AZA13). Using the multiparametric strategies of KamletAbboud-Taft (KAT) and Catalán, it was verified that the parameter that has the greatest influence on the solvatocromic behavior was the polarizability

SUMÁRIO

RESUMO	. 4
ABSTRACT	5
SUMÁRIO	. 6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	. 12
LISTA DE ABREVIAÇÕES	. 13
INTRODUÇÃO	. 14
OBJETIVOS	. 16
OBETIVO GERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	. 16
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA	. 17
1.1. SENSORES FLUORESCÊNTES	. 17
1.2. HISTAMINA	26
1.3. SOLVATOCROMISMO	. 28
1.3.1. EQUAÇÕES MULTIPARAMÉTRICAS DE KAMLET-ABBO	UD-
TAFT E DE CATALÁN	. 34
CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL	. 36
2.1. MATERIAIS E MÉTODOS	. 36
2.1.1.PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO D	OS
COMPOSTO OXAZOLÔNICOS	. 36
2.1.2. TESTE DE SOLUBILIDADE	36
2.1.3. PREPARO DE SOLUÇÃO PADRÃO AZALACTONA	. 37
2.1.4. PREPARO DE SOLUÇÃO PADRÃO DE HISTAMINA	. 37
2.1.5. ESTUDO FOTOFÍSICO	. 37
2.1.6. CONSTRUÇÃO DO SENSOR FLUORESCENTE A BASE	DE
REAÇÃO PARA DETECÇÃO DE HISTAMINA	. 37
2.1.7. CONSTRUÇÃO DO SENSOR FLUORESCENTE PA	٨RA
DETEÇÃO DE ÍONS	. 39
2.1.8. MEDIDAS DE POLARIDADE DE SOLVENTES PUROS	. 39
2.1.8.1. ESTUDOS DE FOTOISOMERIZAÇÃO DOS CORANTES	39
2.1.8.2. ESTUDOS DE AUTOAGREGAÇÃO DOS CORANTES	. 40

2.1.8.3. APLICAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS MULTIPARAMÉTRICAS
CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÕES 41
3.1. ESTUDO FOTOFÍSICO 41
3.1.2. ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS DERIVADOS OXAZOLÔNICOS
COM A HISTAMINA 45
3.1.2.1- APLICAÇÃO AZA 2 45
3.1.2.2- APLICAÇÃO AZA 8 49
3.2. ESTUDO DA APLICAÇÃO DE DERIVADOS OXAZOLÔNICOS
PARA DETEÇCÃO DE ÍONS57
3.3. ESTUDOS SOLVATOCRÔMICOS DOS CORANTES
OXAZOLÔNICOS EM SOLVENTES PUROS
3.3.1. ESTUDOS DE FOTOISOMERIZAÇÃO DOS CORANTES AZA
3.3.2. ESTUDOS DE AUTOAGREGAÇÃO DOS CORANTES AZA 72
3.3.3. INTERPRETAÇÕES DO SOLVATOCROMISMO REVERSO DOS
COMPOSTOS AZA BASEADA NA ESTABILIZAÇÃO DIFERENCIAL DE
FORMAS DE RESSONÂNCIA 75
3.4. APLICAÇÃO DAS EQUAÇÕES MULTIPARAMÉTRICAS DE
KAMLET-ABBOUD-TAFT E DE CATALÁN
CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS
ANEXOS
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do Diagrama de Jablonskiv 17
Figura 2: Estrutura do composto 4-(2-furil-metileno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-
ona, utilizado como sonda na detecção de Fe ³⁺
Figura 3: Estrutura do composto 2-(4-tolil)-4-[4-(1,4,7,10-tetraoxa-13-
azaciclopentadecil)-benzilideno]-1,3-oxazol-5(4H)-ona utilizado como sonda na
detecção de glicose oxidase (GOx)
Figura 4: Estrutura do composto 2,1,3-benzotiadiazola
Figura 5: Estrutura do composto oxazolônico
Figura 6: Síntese do composto azalactônico pelo método de Ploch-Erlenmeyer
Figura 7: Estrutura do composto 4-(4-(N,N)-dimetilaminobenzilideno)-2-fenil-
1,3-oxazol-5(4H)-ona utilizado como indicador de pH (2005), na detecção de
glicose oxidase (2005) e no monitoramento de dióxido de carbono (2006) 24
Figura 8: Estruturas dos derivados oxazolônicos aplicados na otimização do
biossensor para detecção de enzimas 25
Figura 9: Estrutura do composto [2-(4-imidazoil) etilamina]
Figura 10: Estrutura molecular do composto betaina 30 conhecida como corante
de Reichardt
Figura 11: Representação do solvatocromismo negativo e positivo (Marcus,1998).31
Figura 12: Solvatocromismo positivo apresentado pela merocianina. O gráfico
foi montado pelo autor a partir dos dados obtidos por Ischchenko e colaboradores
(2008)
Figura 13: Solvatocromismo negativo exibido pela merocianina derivada da 7-
hidroxicumarina. O gráfico foi montado pelo autor a partir dos dados obtidos por
Cha e colaboradores (2011)
Figura 14: Solvatocromismo reverso exibido pelo 4-nitroestiril fenóis. Gráfico
obtido por Stock e colaboradores (2015)
Figura 15: Estrutura molecular dos derivados oxazolônicos AZA8 e AZA2 41

 Figura 16: Construção do sensor fluorescente a base de reação química entre derivados oxazolônicos e histamina em DMSO
 42

 Figura 17: Espectro de absorção e de emissão do composto oxazolônico (4- (N,N)-dimetilaminobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (AZA 2) [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] e histamina (-)[1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] em DMSO.
 43

 Figura 18: Espectro de absorção e de emissão do composto oxazolônico 4- (4- nitrobenzilideno) -2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (AZA 8) [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] em DMSO

Figura 22: Espectro de absorção na região no UV-Vis em DMSO para o composto AZA8 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] após a adição de 1 equivalente de histamina em Figura 23: Espectro de absorção na região no UV-Vis em DMSO para o composto AZA8 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] após a adição de 1 equivalente de histamina em Figura 24: Espectro de absorção na região no UV-Vis em DMSO para o composto AZA8 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] após a adição de 2,4,6,9 equivalente de histamina em 20 minutos53 Figura 25: Espectro de absorção na região no UV-Vis em DMSO para o composto AZA8 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] após a adição de 2,4,6,9 equivalente de histamina em 120 minutos......53 Figura 26: Espectro de absorção na região no UV-Vis para o composto AZA 8 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] após a adição de 8,9,20,40,60 equivalentes de histamina em 120 minutos sob luz UV em DMSO......55 Figura 27: Gráfico da concentração de histamina em função da absorbância do produto formado na reação entre a histamina e a AZA 8...... 56

Figura 28: Repetição da análise de absorção na região no UV-Vis para o composto AZA8 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] em DMSO após a adição de 8,9,20,40,60 equivalentes de histamina em 120 minutos Figura 29: Exemplos de propostas da formação de complexo do composto AZA Figura 30: Soluções aquosas dos íons metálicos (Cu(II), Co(II), Mn(II), Fe(II), Ni(II), Zn(II), Pb(II)) adicionadas a sondas (AZA 8) 60 Figura 31: Estrutura molecular dos derivados oxazolônicos AZA 10 e AZA1361 **Figura 33:** Valores de E_T(30) em função de E_T(corante) para o composto AZA2 **Figura 34:** Valores de $E_T(30)$ em função de $E_T(corante)$ para o composto Figura 35: Espectros de UV-Vis para o composto AZA2 (A) e AZA10 (B) em Figura 36: Espectros de UV-Vis para o composto AZA8 (A) e AZA 13(B) em metanol (—), hexano (—) e DMSO (—) 66 Figura 37: Forma benzenoide e quinonoide do composto merocianínico 70 Figura 38: Estruturas de ressonância benzenoide e quinonoide para o corante Figura 39: Investigação da possível fotoisomerização do corante AZA2 [1.10⁻⁵ mo.L⁻¹] em metanol (A) e *n*-hexano (B)......71 Figura 40: Espectros de UV-Vis do corante AZA2 em metanol (A) e n-hexano Figura 41: Gráfico da absorbância em função da concentração do corante AZA2 em metanol (A) e *n*-hexano (B)......74 Figura 42: Espectro de fluorescência do composto AZA2 em DMSO em diferentes concentrações75 Figura 44: Relação entre E⊺ calculado e mensurado para o composto AZA10, Figura 45: Relação entre E_T calculado e mensurado para o composto AZA2, considerando as estratégias de Catalán e KAT.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Obtenção de amostras com volumes variáveis de histamina e suas Tabela 2: Otimização da condição reacional do desenvolvimento do sensor **Tabela 3:** Valores de $E_T(30)$ e $E_T(corante)$ para o composto AZA2, AZA8, Tabela 4: Coeficientes de correlação, a, b, c, d e s obtidos nas análises multiparamétricas de Catalán através dos valores experimentais de ET do corante AZA 2 e AZA10 em 17 solventes puros......77 Tabela 5: Coeficientes de correlação, a, b, e s obtidos nas análises multiparamétricas de KAT através dos valores experimentais de ET do corante Tabela 6: Influência dos parâmetros a, b, c, d (acidez, basicidade, polarizabilidade e polaridade) do solvente usando a estratégia multiparamétrica de Catalán para o composto AZA281 Tabela 7: Influência dos parâmetros a, b, c, d (acidez, basicidade, polarizabilidade e polaridade) do solvente usando a estratégia multiparamétrica de Catalán para o composto AZA10 82

LISTA DE ABREVIAÇÕES

- AZA 2- 4-(4-(N,N)-dimetilaminobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona
- AZA 8- 4-(4-nitrobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona
- AZA10- 4- (4-metoxi-benzilideno) -2-fenil-1,3-oxazol-5 (4H) -ona
- AZA13-4-(3-clorobenzilideno)-2-fenil-4H-oxazol-5-ona
- Abs Absorbância
- DMF- Dimetilformamida
- DMSO- Dimetilsulfóxido
- ET- Energia de transição molar
- ET (30)- Energia de transição da escala de polaridade de Reichardt
- **KAT -** Kamlet-Abboud-Taft
- r- Coeficiente de correlação
- SA- Parâmetro de acidez do solvente segundo a estratégia de Catalán
- SB- Parâmetro de basicidade do solvente segundo a estratégia de Catalán
- SPP- Parâmetro de polaridade/polarizabilidade do solvente segundo a estratégia

de Catalán

- So Nível vibracional no estado fundamental
- S1- Primeiro nível vibracional no estado excitado
- S2- Segundo nível vibracional no estado excitado
- a Parâmetro de acidez do solvente segundo a estratégia de KAT
- β- Parâmetro de basicidade do solvente segundo a estratégia de KAT
- $\lambda_{máx}$ Comprimento de onda de absorção máxima

 π^* - Parâmetro de polaridade/polarizabilidade do solvente segundo a estratégia de KAT

INTRODUÇÃO

Os derivados oxazolônicos são compostos que tem despertado grande interesse para a comunidade científica, uma vez que eles possuem propriedades emissivas, sendo essa, uma característica que permite o desenvolvimento de novos métodos analíticos a fim de quantificar e qualificar uma vasta classe de substâncias químicas, com uma alta sensibilidade de detecção.

Esses compostos apresentam grande versatilidade estrutural e uma fácil preparação sintética, onde várias metodologias já foram propostas para obtenção dos mesmos. Porém a metodologia mais citada e estudada é o método clássico de Plochl- Erlemmeyer que consiste na condensação de um ácido carboxílico, geralmente utilizado o ácido hipúrico e um aldeído, na presença de uma base fraca sob aquecimento convencional e refluxo [1].

Uma grande parte dos compostos orgânicos exercem a função de sonda, que são espécies capazes de identificar a presença de algum analito. Assim, os derivados oxazolônicos por apresentarem propriedades emissivas podem ser empregados como sondas fluorescentes. Essa aplicabilidade de sondas fluorescentes tem se tornado uma metodologia alternativa e atrativa devido à alta seletividade e sensibilidade.

Logo para que um composto seja aplicado como uma sonda fluorescente, o mesmo, além das propriedades emissivas precisa ser sensível a um analito, ou seja, ele deve apresentar sítios que permitam essa interação analitosubstrato, consequentemente essa interação deverá modificar as propriedades espectrais da respectiva sonda e indicar quantitativamente ou qualitativamente a presença do analito [2,3].

Outro fenômeno que também possibilita a utilização de sondas além da técnica de fluorescência é o fenômeno conhecido como solvatocromismo, que permite uma completa compreensão a respeito das influências dos efeitos do solvente e das interações soluto-solvente [4].

É sabido que o solvente pode influenciar de forma significativa a velocidade e equilíbrio de uma reação, assim como os parâmetros de

temperatura, pressão e tempo de reação, nas quais já são fatores extremamente estudados. Desta forma, muitos pesquisadores estão em busca constante tentando compreender os efeitos do solvente e procurando determinar a polaridade dos solventes por meios de escalas empíricas, para isso é necessário a aplicação das chamadas sondas solvatocrômicas, que são compostos que devem apresentar sensibilidade ao microambiente [5,6].

Neste sentido, investigou-se a aplicação de derivados oxazolônicos como sondas fluorescentes e como sondas solvatocrômicas, onde serão apresentados e discutidos sua interação frente à uma amina primária e frente a íons metálicos. Além de se investigar o fenômeno de solvatocromismo fornecendo informações importantes a respeito das interações soluto-solvente dessa classe de corantes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo a investigação de derivados oxazolônicos para serem empregados como sondas fluorescentes e como sondas solvatocrômicas em solventes puros.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a interação dos derivados oxazolônicos frente a uma amina primária
- Estudar uma possível aplicação dos compostos oxazolônicos como sonda fluorescente na detecção de histamina.
- Estudar a aplicação dos compostos na detecção de íons metálicos
- Realizar estudo de solvatocromismo em solventes puros.
- Interpretar o comportamento solvatocrômico dos compostos baseados na escala E_T (30) e nas estratégias multiparamétricas de KAT e de Catalán.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA

1.1 - SENSORES FLUORESCENTES

De modo geral, sensores são dispositivos que sinalizam a presença de matéria ou energia na qual ela tenha capacidade de interagir, gerando sinais que podem ser registrados. Em particular os sensores fluorescentes são baseados em sistemas luminescentes, onde ocorre a emissão de luz de moléculas eletronicamente excitadas [2,7].

A teoria que explica esses sensores fluorescentes é fundamentada pelo fenômeno da fluorescência, que é a perda de energia por meio de processos radiativos, em que não ocorre inversão na multiplicidade dos spins, diferentemente do que observa-se no fenômeno da fosforescência [7,8]. Esses fenômenos são ilustrados no Diagrama de Jablonski (FIG.1), que descreve o sistema fotoluminescente.



Figura 1: Representação do Diagrama de Jablonskiv [9]

Podemos observar na parte inferior do diagrama a representatividade do estado fundamental da molécula, denominado estado singlete, pelo fato dos spins estarem emparelhados, sendo este representado pela sigla S₀. Após a

absorção de um fóton a molécula passa para níveis eletrônicos distintos S₁, S₂ e a direita do diagrama está representado o estado triplete T₁, onde os spins encontram-se desemparelhados, ou seja, com inversão da multiplicidade. Essa absorção citada é representada pelas setas verticais. Subsequente ao processo de absorção, onde as moléculas assumem níveis mais energéticos, as mesmas retomam ao seu estado fundamental por meio de processos radiativos (fosforescência, fluorescência) ou por meio de processos não radiativos (relaxação vibracional, conversão interna, e cruzamento intersistema) [7–9].

Logo, durante o processo de absorção e emissão, verifica-se que nem toda energia absorvida é emitida, devido à perda de energia pelos processos não radiativos, portanto a energia da emissão é menor que a energia de absorção [9]. Essa diferença de energia que consequentemente acarreta diferença nos comprimentos de onda de absorção e emissão é chamada de Deslocamento de Stokes [7,9], cujo deslocamento é um parâmetro preliminar para análises, pois espécies que apresentam pequenos deslocamentos de Stokes são de difícil detecção, enquanto as moléculas que apresentam grande deslocamento são facilmente detectáveis [10].

Cabe ressaltar que o processo de desativação é observado pelo fenômeno que apresenta menor tempo no estado excitado, ou seja, se a desativação por fluorescência é rápida em relação aos demais processos, sua emissão é favorecida, sendo assim observada [8]. Entretanto, se os processos radiativos não forem favorecidos não haverá emissão de luminescência.

Vários estudos e desenvolvimento de métodos analíticos para detecção química já foram relatados na literatura, como por exemplo sensores eletroquímicos, porém um método bastante simples e satisfatório é a geração de um sinal óptico, onde a presença de um analito alvo ocasiona mudança na banda de absorção e de emissão do composto utilizado como sonda, sendo comumente conhecidos como sensores ópticos, químicos ou fluorescentes [11].

Um sensor químico detecta qualitativamente e quantitativamente a presença de substâncias específicas, uma classe de produtos químicos ou uma reação química, por meio de um sinal óptico [2]. Contudo, para que esse sinal venha a transcorrer é necessário que a molécula possua um grupo funcional denominado cromóforo, e no caso de um sensor químico fluorescente um

fluoróforo. Esse grupo funcional absorve energia de um comprimento de onda intrínseco e logo emite luz em um comprimento de onda diferente [12,13].

Assim para que um sistema atue como sensor a molécula deve apresentar um sítio de interação com o analito caracterizado como um hospedeiro, na qual a molécula receptora modifique suas propriedades espectrais de forma que o mesmo possa ser detectado. [3].

Se a molécula receptora for um fluoróforo, como é o caso do objeto de estudo, a sua interação com o analito modificará a sua capacidade de fluorescer. Em contrapartida se o sítio de sinalização for um cromóforo acarretará mudança de coloração na solução e consequentemente mudanças no espectro de absorção[14].

No caso de um sensor fluorescente, além do grupo fluoróforo, a molécula também deve apresentar características peculiares à fotoluminescência, quando se trata de compostos orgânicos, ressaltando: (i) rigidez estrutural, (ii) planaridade e (III) ligações conjugadas π , as quais normalmente são formados por grupos funcionais aromáticos e/ou anéis condensados [15]. Assim compostos contendo grupos funcionais aromáticos são mais favorecidos, apresentando fluorescência mais intensa comparados com compostos alifáticos.

Neste contexto, a rigidez também apresenta grande influência na fluorescência do composto, um dos fatos que explica essa interferência, é que provavelmente a ausência de rigidez em uma molécula ocasiona um aumento na constante de conversão interna, aumentando a possibilidade de uma desativação não-radiativa, desfavorecendo a fluorescência [8]. Diante disso, muitas pesquisas com sondas fluorescentes são desenvolvidas em matrizes sólidas, por proporcionarem maior estabilidade na molécula. Ozturk e colaboradores (2007), por exemplo, detectaram a presença de Fe³⁺ através da imobilização do derivado oxazolônico 4-(2-furil-metileno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (FIG. 2) em matrizes de cloreto de polivinila, o analito foi detectado por meio da supressão de fluorescência da sonda empregada [16].



Figura 2: Estrutura do composto 4-(2-furil-metileno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)ona, utilizado como sonda na detecção de Fe³⁺

Um outro trabalho desenvolvido com matrizes sólidas foi apresentado por Yildirim e colaboradores (2010), na qual, realizaram a preparação de um biossensor para detecção de glicose oxidase (GOx), utilizando matrizes sol-gel para a encapsulação do corante oxazolônico 2-(4-tolil)-4-[4-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azaciclopentadecil)-benzilideno]- 1,3-oxazol-5(4H)-ona (FIG.3) [17].

Ambos os exemplos de matrizes (cloreto de polivinila e sol-gel) mencionados nos respectivos trabalhos apresentaram bons resultados como agentes encapsulantes proporcionando grande estabilidade as moléculas.



Figura 3: Estrutura do composto 2-(4-tolil)-4-[4-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azaciclopentadecil)-benzilideno]-1,3-oxazol-5(4H)-ona utilizado como sonda na detecção de glicose oxidase (GOx)

Um outro fator interessante acerca do fenômeno da fluorescência é a eficiência quântica dos hidrocarbonetos, na qual, hidrocarbonetos aromáticos não-substituídos aumenta com o número de anéis e com seu grau de condensação, cujo a maioria fluoresce em solução, em contrapartida os heterocíclicos simples não apresentam fluorescência [8].

Além desse, um outro fator que também influência na eficiência da fluorescência é a substituição no anel benzênico de uma molécula. Logo, a natureza e a posição de um substituinte podem alterar as características fluorescentes de um composto [7].

Portanto, quando um composto possui estrutura que pode sofrer substituição em qualquer uma das posições do anel aromático é de grande valia o conhecimento das propriedades eletrônicas e geométricas desses materiais.

Como, por exemplo, o núcleo do 2,1,3-benzotiadiazola (FIG.4), que apresenta uma estrutura que possibilita a formação de diferentes derivados, esse composto apresenta características favoráveis a luminescência dependendo do substituinte, podendo sofrer variações com relação a intensidade de fluorescência, de modo a ser favorecida ou não dependendo da substituição e inserção de grupos [15]. Neste aspecto, uma característica importante do efeito de substituição do anel na fluorescência é que a intensidade da mesma é favorecida quando o grupo for doador de elétrons, em contraste com grupos retiradores que afetam a eficácia da fluorescência [7]



Figura 4: Estrutura do composto 2,1,3-benzotiadiazola

Além destas peculiaridades outros fatores também podem influenciar na emissão de fluorescência como: polaridade, ligação de hidrogênio, pH, pressão, viscosidade, temperatura, supressão, potencial elétrico e presença de íons [7]. Todavia, apesar desses inúmeros fatores influentes que foram mencionados, devido ao fato de ser um método bastante seletivo, simples e principalmente por sua sensibilidade, vários estudos estão sendo desenvolvidos utilizando sensores ópticos, na qual, estão apresentando grande potencial de aplicação nas áreas de química, biologia, análises clínicas, a fim de analisar e classificar uma série de compostos [18,19].

Pesquisadores como Wang e colaboradores (2017), já estão desenvolvendo sensores fluorescentes empregando nanopartículas como sondas fluorescentes, fazendo aplicação na detecção da dopamina, obtendo resultados satisfatórios, além de apresentarem melhores desempenhos comparados com métodos tradicionais [20].

Já Li e colaboradores (2009), desenvolveram um quimiossensor utilizando a cumarina como sonda fluorescente para detecção de íons de $Zn^{2+,}$ logo para garantir que a cumarina poderia realmente atuar como sonda colorimétrica deste íon, o grupo realizou o experimento com outros íons metálicos, cujos resultados mostraram-se pouco eficientes, pois demonstraram pouca sensibilidade, resultando em um quimiossesnor seletivo para Zn^{2+} [2].

Dentre esses compostos estudados e aplicados como sondas, a oxazolona conhecida também como azalactona é uma classe de heterocíclicos (FIG. 5) [21], que vem sendo bastante explorados na aplicação como sensores.



Figura 5: Estrutura do composto oxazolônico

Sua síntese é conhecida desde o século XIX ,quando foram obtidas pela primeira vez através de uma variação da reação de Perkin, que consiste na condensação de um ácido carboxílico e um aldeído na presença de uma base fraca, geralmente acetato de sódio, acetato de potássio ou trietilamina [1,22].

A partir daí várias metodologias foram sendo propostas para a preparação dos derivados oxazolônicos, porém o método mais conhecido é o método de Plochl-Erlenmeyer, que baseia-se na reação de um N-derivado de glicina e um aldeído, utilizando anidrido acético como solvente e como catalisador o acetato de sódio, conforme apresentado na (FIG. 6) [23].





A oxazolona é uma classe de corante que devido suas propriedades fluorescentes apresenta uma ampla gama de aplicações, como no desenvolvimento de sensores fluorescentes de glicose [24], sensores fluorescentes de íon de Fe³⁺[16], indicadores fluorescentes de pH em filmes poliméricos e em matrizes sol-gel[25], nas quais veremos detalhadamente adiante. Além de diversas outras aplicações como intermediários em síntese de α - aminoácidos e α - cetoácidos [1], inibidores de corrosão [21], imobilização de enzimas [26], entre outras.

Para empregarem esses compostos orgânicos no desenvolvimento de sensores fluorescentes é necessário determinar os parâmetros de fluorescência e para isso é de grande valia conhecer as características fotofísicas e fotoquímicas do composto. Neste contexto, uma série de estudos estão sendo desenvolvidos para determinar propriedades fotofísicas e fotoquímicas da

oxazolona em matrizes sólidas de sol-gel, em filmes poliméricos e em solução por meio de técnicas espectroscópicas[27].

Ozturk e colaboradores (2007) basearam seus estudos no composto 4-(2furil-metileno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (FIG. 2), na qual, analisaram suas características em solventes orgânicos e em matriz sólida de cloreto de polivinila, apresentando boa fotoestabilidade do derivado oxazolônico em ambos os estudos. Assim o grupo empregou o derivado como sonda fluorescente na detecção de íons de Fe³⁺, uma vez que as análises de metais pesados são de grande interesse para áreas ambientais, o sensor desenvolvido apresentou grande potencial na determinação do íon [16].

Em contraste, Ertekin e colegas de trabalho (2003) relataram as características fotofísicas e fotoquímicas do 4-(4-N,N-dimetilaminofenilmetileno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (FIG. 7) em uma matriz sol-gel comparando-as com medições em soluções de acetonitrila (MeCN) e tetrahidrofurano (THF). Logo, a fotoestabilidade da oxazolona ficou mais evidente em matrizes sólidas, apresentando valores de rendimento quânticos 100 vezes maiores do que em solventes orgânicos, podendo ser atribuído pela mobilidade do corante nas matrizes. O baixo rendimento quântico de fluorescência e fotoestabilidade da oxazolona em solução são evidentemente efeitos de solvatação, resultante da vibração molecular. Contudo o derivado oxazolônico foi tido como um indicador de pH, apresentando respostas reprodutíveis na gama de pH 3,0-7,0 [25]. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam o que já foi mencionado a respeito da mobilidade apresentada nas matrizes sólidas.



Figura 7: Estrutura do composto 4-(4-(N,N)-dimetilaminobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona utilizado como indicador de pH (2005), na detecção de glicose oxidase (2005) e no monitoramento de dióxido de carbono (2006)

De acordo com Ozturk; Alp; Timur (2008), a oxazolona também apresenta aplicabilidade como biossensores na detecção de enzimas do tipo acetilcolinesterase (AChE) e acetilcolina (ACh), as mesmas foram acopladas em matrizes de PVC, inibidas com donepezil, a fim de inibir atividades biológicas das enzimas, resultando em indicadores alternativos de neurotransmisor e do agente inibidor. Os autores otimizaram o biossensor aplicando três diferentes derivados oxazolônicos apresentados na FIG. 8 [28].



Figura 8: Estruturas dos derivados oxazolônicos aplicados na otimização do biossensor para detecção de enzimas

Um outro derivado oxazolônico também aplicado na detecção de glicose oxidase (GOx) é o 4-(4-(N,N)-dimetilaminobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)ona (FIG.7) devido à excelente fotoestabilidade e alta absorção molar da oxazolona.

Um fato característico na construção de sensores enzimáticos é que o processo requer a imobilização das enzimas em matrizes apropriadas, pois elas retêm as atividades biológicas das enzimas proporcionando um microambiente rígido, favorecendo assim a fluorescência. O sensor desenvolvido para detecção de glicose baseia-se na fluorescência do corante derivado da oxazolona, cujo o corante é encapsulado em uma matriz juntamente com a enzima, utilizando métodos espectrofotometricos para quantificar. Ertekin e colaboradores realizaram o estudo variando a concentração de glicose nas matrizes preparadas. A partir dos resultados apresentados, dentre os parâmetros

considerados, o corante oxazolônico, demonstrou que pode ser um indicador alternativo na detecção da glicose, pois apresentaram sinais analíticos satisfatórios[24].

Outra aplicabilidade dos derivados oxazolônicos foi apresentada por Ertekin e Alp (2006), na busca de monitorar níveis de dióxido de carbono, eles propuseram a utilização do 4-(4-(N,N)-dimetilaminobenzilideno)-2-fenil-1,3oxazol-5(4H)-ona (FIG. 7) em matrizes de etilcelulose, obtendo êxito nos resultados obtidos [29].

Assim concluímos o quão vasta é a área do desenvolvimento de sensores fluorescentes, sobretudo utilizando essa classe de corantes.

1.2 - HISTAMINA

A histamina [2-(4-imidazoil) etilamina] (FIG.9) é uma classe das aminas biogênicas, caracterizada como amina primária, sintetizada pela descarboxilação do aminoácido L-histidina pela enzima histidina-descarboxilase [30,31], tendo como cofator o fosfato de piridoxal [32]. Além do seu poder de síntese do organismo, ela pode estar presente pela absorção intestinal da amina, contidas principalmente em alimentos, ou até mesmo por meio de metabolismo bacteriano originada no trato intestinal [32].



Figura 9: Estrutura do composto [2-(4-imidazoil) etilamina]

As aminas em alimentos são resultantes de alguns fatores responsáveis pelo seu desenvolvimento nessas matrizes, como por exemplo a preparação de alimentos fermentados, onde se pode esperar a presença de muitos tipos de microrganismos, sendo alguns capazes de produzir aminas biogênicas, sobre tudo a histamina [33].

De acordo com Gomes e colaboradores, esses microrganismos presentes podem ser inseridos intencionalmente no alimento como cultura *starter* (processo onde são adicionados microrganismo visando o melhoramento das propriedades de alguns produtos industrializados sobre tudo os embutidos) ou ser contaminante no processo de produção [34].

Neste contexto, a formação de histamina também aumenta devido as condições de manuseios e estocagens inadequadas, uma vez que ocorre a multiplicação de bactérias que produzem a enzima histidina descarboxilase (HDC). Todavia, sua formação é um fator muito variável dependente do tempo, temperatura, tipo e quantidade dos microrganismos presentes [35].

Alguns alimentos são mais suscetíveis de conter aminas biogênicas incluindo principalmente a histamina, dentre esses alimentos podemos citar os peixes, produtos à base de carne, ovos, queijos, vegetais, produtos de soja, cerveja, vinhos, uma vez que são produtos mais suscetíveis a ação microbiana durante o armazenamento e envelhecimento [35,36].

A intoxicação histamínica é conhecida como escombrotoxicose, sendo manifestada após alguns minutos ou algumas horas depois da ingestão da amina. A doença geralmente tem curta duração, porém há casos nas quais se estendem a alguns dias[30].

Os históricos de casos de intoxicação por histamina na maioria das vezes é proveniente ao consumo de peixe ou queijo [33,35]. Sua intoxicação é geralmente manifestada por sintomas como diarréia, cãibras abdominais, inflamação localizada, náuseas, dor de cabeça, palpitação e desconforto respiratório [37].

Neste contexto, vários países estabeleceram limites de tolerância para a presença de aminas, sobre tudo da histamina. No Brasil há apenas uma legislação que trata a respeito, determinando concentrações máximas de 100 ppm de histamina em pescados frescos e em seus derivados, estabelecido na Portaria de nº 185 de 1997 [38].

Na literatura encontramos inúmeros métodos de detecção e quantificação desta classe de aminas, principalmente métodos cromatográficos e métodos enzimáticos, porém a busca por métodos cada vez mais simples, rápidos e de menor custo, ainda chama a atenção dos pesquisadores [30].

27

1.3 – SOLVATOCROMISMO

O solvatocromismo, como o próprio nome já diz, está diretamente relacionado com o efeito de solvatação. Tal efeito é observado quando as moléculas do solvente são capazes de interagir com elas mesmas ou com o soluto por meio de interações intermoleculares [5,6].

Essas interações podem ser específicas, que incluem as ligações de hidrogênio e aquelas que envolvem grupos doadores e aceitadores de pares de elétrons, como também podem ser interações não específicas que envolvem forças direcionais de indução e de dispersão, na qual engloba as forças de van de Walls, íon/dipolo, dipolo/dipolo e dipolo/dipolo induzido [5,6].

Neste contexto, a necessidade de se investigar o meio em que ocorre as reações químicas está cada vez mais fundamental para o entendimento das mesmas, uma vez, que o solvente pode influenciar de forma significativa a velocidade e equilíbrio de uma reação, assim como os parâmetros de temperatura, pressão e tempo de reação, nas quais já são extremamente estudados.

Muitos pesquisadores então concentraram seus estudos na tentativa de compreender melhor a interação soluto-solvente em nível microscópico-molecular, a fim de se obter respostas que podem contribuir no âmbito científico.

Como mencionado, o solvente exerce grande influência no meio reacional, porém a classificação de solventes é um pouco mais trabalhosa do que se imagina, visto que a definição de polaridade do solvente não pode ser descrita apenas por parâmetros físicos, ou seja, em muitos estudos não se pode utilizar apenas as propriedades físicas, como índice de refração, constante dielétrica ou momento dipolo é necessário que se faça um estudo mais aprofundado, em que se pode levar em consideração as interações específicas e não específica soluto-solvente. Logo para isso o método mais empregado nos estudos das propriedades dos solventes é a utilização de compostos solvatocrômicos [5].

Os compostos solvatocrômicos conhecidos também como sondas solvatocrômicas, possuem geralmente grupos doadores e grupos aceitadores de elétrons ligados por meio de ligações insaturadas. Esses compostos podem ser

descritos na forma quinoidal e *zwitteriônica*, na quais geralmente são estruturas não polarizada e polarizada, respectivamente[39].

Assim o solvatocromismo é um termo usado para descrever as mudanças na posição dos máximos de absorção das bandas ($\lambda_{máx}$) em função da polaridade do meio. Essas mudanças podem ocorrer tanto na posição quanto na forma e intensidade das bandas. Desta forma, compostos solvatocrômicos são substâncias capazes de interagir com o solvente e promover essas mudanças espectrais, atuando assim como sondas [4,39].

Esse termo foi introduzido na década de 90 por Arthur Rudolf Hantzsh para relatar mudanças de cor em algumas substâncias dependendo do meio em que se encontravam sem que houvesse quebra ou formação de ligações químicas, de acordo com Reichardt [4].

Um parâmetro muito importante para o estudo e aplicação das sondas solvatocrômicas é a energia de transição molar (E⊤), que se baseia na energia de transição eletrônica do estado fundamental para o estado excitado da sonda.

A partir dessa energia de transição molar é possível construir escalas empírica de polaridade E_T, na qual pode ser calculada por meio da equação (1), proposta por Reichardt [6].

$$E_T(kcal \cdot mol^{-1}) = \frac{h \cdot c \cdot N_A}{\lambda m \acute{a} x} = \frac{28591}{\lambda m \acute{a} x}$$
(1)

Nesta equação, *h* é a constante de Planck (1,58367x10⁻³⁴ cal s), c é a velocidade da luz no vácuo (2,99792x10⁸ m s⁻¹), N_A é a constante de Avogadro (6,02 x 10²³ mol⁻¹) e o $\lambda_{máx}$ representa o comprimento de onda máximo de absorção da banda da transição envolvida na excitação eletrônica, dada geralmente em nm. Assim o valor de E_T é calculada em kcal mol⁻¹ [4].

Deste modo, vários compostos foram sendo estudados em função da dependência do solvente, consequentemente fazendo com que inúmeras escalas de polaridade de solvente fossem publicadas.

Uma das primeiras e mais estudada até os dias atuais é a escala elaborada por Reichardt, baseada em uma sonda denominada 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-1piridino), comumente conhecida como betaina 30, apresentada na FIG.10.

A sonda empregada por Reichardt foi responsável pela elaboração de uma escala uniparamétrica na qual recebeu o nome de E_T(30), onde foram

determinados valores para mais de 360 solventes puros além de misturas binárias, este composto apresentou um pronunciado solvatocromismo negativo [4–6].



Figura 10: Estrutura molecular do composto betaina 30 conhecida como corante de Reichardt

Assim, com base nesses valores obtidos pela escala de Reichardt, os solventes foram ordenados por ordem de polaridade, onde pequenos valores de $E_T(30)$ e valores grandes indicam que a energia de transição da betaina foi medida em um solvente de baixa polaridade e em solvente de alta polaridade respectivamente [40].

Um exemplo de valores obtidos nesta escala é $E_T(30) = 30,9$ kcal mol⁻¹ referente ao solvente ciclohexano, esse valor indica um solvente menos polar, já para água foi obtido um valor maior que o duplicado de $E_T(30) = 63,1$ kcal mol⁻¹, tratando-se de um solvente extremamente polar [40].

Ainda neste contexto, para entender melhor esse efeito de solvatocromismo é necessário que se compreendam algumas designações:

- Um deslocamento do máximo de absorção para menores comprimentos de onda (ou maiores energias) com o aumento da polaridade do solvente caracteriza um solvatocromismo negativo (deslocamento hipsocrômico), este, geralmente ocorre quando o aumento da polaridade do meio resulta em um estado fundamental mais estabilizado do que o estado excitado. Em contrapartida, um deslocamento para maiores comprimentos de onda (menores energia) comumente conhecido como deslocamento batocrômico caracteriza o efeito de solvatocromismo positivo, que ocorre quando se observa uma melhor estabilização do estado excitado do soluto em comparação com o estado fundamental [41,42]. A FIG.11 ilustra o solvatocromismo negativo e positivo que pode ocorrer em um composto solvatocrômico.



Figura 11: Representação do solvatocromismo negativo e positivo (Marcus, 1998).

Esses tipos de solvatocromismo podem ser observados, por exemplo, nos trabalhos de Ishchenko e colaboradores [43], que mostraram que algumas merocianinas apresentavam solvatocromismo positivo, onde as energias de transição dos compostos diminuíam com o aumento da polaridade do solvente. Este comportamento pode ser observado no gráfico da FIG. 12, no qual os valores de E_T (corante) obtidos experimentalmente confrontam-se com os valores de E_T (30).



Figura 12: Solvatocromismo positivo apresentado pela merocianina. O gráfico foi montado pelo autor a partir dos dados obtidos por Ischchenko e colaboradores (2008).

O comportamento do solvatocromismo negativo pode ser observado no trabalho de Cha e colaboradores [44] (FIG. 13), no qual verifica-se um aumento no valor da energia de transição molar com o aumento da polaridade do meio, sendo que esse comportamento também é evidenciado pelo gráfico de E_T (corante) em função de E_T (30), empregaram-se também corante de merocianinas derivadas da 7-hidroxicumarina. Vale ressaltar que os autores não apresentaram a ocorrência do comportamento solvatocrômico na forma de gráfico, no entanto, a partir dos dados experimentais obtidos pelos mesmos, é possível construir os gráfico de E_T (corante) versus E_T (30) com o intuito de verificar por meio de gráficos os respectivos comportamentos exibidos pela sonda.





Existe ainda um fenômeno conhecido como solvatocromismo reverso, onde primeiramente observa-se um deslocamento batocrômico na banda de absorção característico do solvatocromismo positivo e posteriormente observase um solvatocromismo negativo (descolamento hipsocrômico), na medida que aumenta a polaridade do solvente, ou seja, uma mesma sonda apresenta solvatocromismo positivo e negativo [45]. Este comportamento pode ser verificado pelo gráfico da FIG. 14 proposto por Stock e colaborados (2015), no seu estudo utilizando o composto 4-nitroestiril fenóis como sonda, onde é ilustrado claramente os dois fenômenos exibidos pelo composto [46].


Figura 14: Solvatocromismo reverso exibido pelo 4-nitroestiril fenóis. Gráfico obtido por Stock e colaboradores (2015)

Neste âmbito o solvatocromismo resulta da solvatação diferencial do estado fundamental e do primeiro estado excitado do composto solvatocrômico [4].

1.3.1 - EQUAÇÕES MULTIPARAMÉTRICAS DE KAMLET-ABBOUD-TAFT E DE CATALÁN

Entretanto, como quase tudo, existem limitações, a escala de polaridade de Reichardt se tratava de uma escala uniparamétrica que englobava todas as possíveis interações soluto-solvente. Logo, com o passar do tempo, houve a necessidade de uma escala mais detalhada, que trouxesse consigo mais informações, além da energia de transição molar. Assim foram introduzidas equações multiparamétricas, a fim de abranger uma maior elucidação das interações soluto-solvente [47].

Foi desenvolvida então a equação multiparamétrica Kamlet-Abboud-Talf (KAT) (Equação 2), onde é possível avaliar quais parâmetros tem maior influência no efeito de solvatação do soluto.

$$E_T(\text{corante}) = E_T(\text{corante})_0 + a\alpha + b\beta + s(\pi^* + d\delta)$$
(2)

Nesta equação é possível avaliar parâmetros como acidez (α), que está relacionada com a capacidade do solvente em doar prótons para o soluto para formar ligações de hidrogênio, basicidade (β) relacionada à capacidade do solvente em receber prótons do soluto, além de um parâmetro extremamente significativo de polaridade/polarizabilidade (π^*), que é a capacidade do solvente de estabilizar uma carga do soluto. Ainda na equação, δ representa a correção de polarizabilidade do solvente, sendo designados 0 para solventes alifáticos não clorados, 0,5 para solventes alifáticos policlorados e 1,0 para solventes aromáticos. Os termos a, b, s são coeficientes característicos do processo e indicativo da sensibilidade do sistema frente as propriedades do solvente e por fim E_T(corante)₀ representa o valor de E_T(corante) em um solvente inerte [47].

Uma outra escala multiparamétrica de polaridade foi desenvolvida por Catalán e colaboradores, representada pela Equação 3 [48].

$$E_T(\text{corante}) = E_T(\text{corante})_0 + aSA + bSB + sSPP$$
(3)

Sendo SPP, termo utilizado para descrever polaridade/polarizabilidade, SA acidez e SB parâmetro usado para descrever basicidade [48]. No entanto, Catalán e colaboradores com novos estudos separaram os termos de polaridade e polarizabilidade, propondo assim uma nova equação (4).

$$E_T(\text{corante}) = E_T(\text{corante})_0 + aSA + bSB + cSP + dSdP$$
(4)

Onde os parâmetros consistem em polarizabilidade (SP) e SdP em polaridade. Essas equações apresentadas são as mais utilizadas nos estudos de interação soluto-solvente, proporcionando grande embasamento para os estudos atuais.

CAPÍTULO 2 - METODOLOGIA

2.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os solventes utilizados neste trabalho foram obtidos de fontes comerciais (Sigma-Aldrich, Merck, Vetec, Synth, Neon) e os compostos utilizados como sondas foram obtidos de forma sintética.

As análises espectrofotométricas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro de UV-Vis modelo Shimadzu-1800 e software UVProbe, sendo analisadas na faixa de 250-650 nm, em cubeta de quartzo de campinho óptico de 10mm. Os espectros de emissão de fluorescência, por sua vez, foram obtidos em um espectrofluorímetro SPF-500C da Aminco e software 500, equipado com uma lâmpada de descarga Xenon de 300 kW.

2.1.1- PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO DOS COMPOSTO OXAZOLÔNICOS

Para obtenção dos derivados oxazolônicos, foi empregado o método clássico de Plochl-Erlenmeyer[23]. Dessa forma, em um balão reacional de 100 mL adicionou-se ácido hipúrico e os respectivos aldeídos na proporção esquetiométrica de 1:1. Adicionaram -se 10 mL de anidrido acético, juntamente com acetato de sódio. A reação foi mantida a agitação e temperatura constante de aproximadamente 80 °C. Após a solução se liquefazer, deixou-se durante duas horas, nas mesma condições reacionais. Quando cessada a reação, esperou-se esfriar a solução e mergulhou-se a mesma num banho de gelo, adicionou-se aproximadamente 20 mL de álcool etílico. Esperou-se algum tempo e guardou-se na geladeira por 24 horas. O produto reacional foi purificado por recristalização e por cromatografia em coluna.

2.1.2- TESTE DE SOLUBILIDADE

Inicialmente foi realizado testes de solubilidade em temperatura ambiente com os seguintes solventes: Dimetilformamida, Dimetilsulfóxido, Isopropanol, Álcool etílico, Álcool metílico, Acetona, Acetonitrila e Tetrahidrofurano. Pesou-se uma pequena quantidade dos compostos oxazolônicos macerados em tubos de ensaio, e posteriormente adicionou-se 10 mL dos respectivos solventes. As amostras foram submetidas à técnica de agitação por ultrassonicação (Frequência de 60 Hz) por 60 segundos.

O mesmo teste foi aplicado para o analito em estudo (histamina).

2.1.3- PREPARO DE SOLUÇÃO PADRÃO OXAZOLÔNICA PARA CONSTRUÇÃO DO SENSOR FLUORESCENTE

Foi preparada uma solução padrão na concentração de 1.10⁻³ mol L⁻¹ para ambos os derivados 4-(4-(N,N)-dimetilaminobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (AZA 2) e 4-(4-nitrobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (AZA 8) em balões volumétricos de 25 mL. O volume foi completado com DMSO.

2.1.4 - PREPARO DE SOLUÇÃO PADRÃO DE HISTAMINA

Primeiramente pesou-se 0,0278 g de histamina, que foi solubilizada em 25 mL de DMSO, obtendo-se uma solução na concentração de 1.10⁻³ mol L⁻¹. Após este procedimento, retirou-se dessa solução uma alíquota de 0,25 mL para preparação de uma solução estoque em DMSO de concentração de 1.10⁻⁵ mol L⁻¹ em um balão volumétrico de 25 mL. Esta solução foi utilizada como solução estoque para posteriores testes.

2.1.5 - ESTUDO FOTOFÍSICO

A avaliação da fotofísica dos corantes oxazolônicos e do analito (histamina) foi realizada mediante a análise de absorção UV-Vis e espectrofluorimetria, utilizando as respectivas soluções padrão, em temperatura ambiente.

2.1.6 - CONSTRUÇÃO DO SENSOR FLUORESCENTE A BASE DE REAÇÃO PARA DETECÇÃO DE HISTAMINA

A partir da solução estoque do corante AZA2 na ordem de 1.10⁻³mol.L⁻¹, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e transferidas para cinco balões volumétricos de 10 mL, a fim de se obter uma concentração fixa de 1.10⁻⁵ mol. L⁻¹ da sonda fluorescente em cada uma das amostras. Posteriormente foram adicionados nas

amostras diferentes volumes de solução de histamina, obtendo assim concentrações variáveis do analito como mostrado na TAB.1

Amostra	Volume Histamina (mL)	Concentração final de histamina (x10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹)	Concentração da sonda AZA2 (x 10 ⁻⁵ mol. L ⁻¹)
1	2	2,0	1,0
2	4	4,0	1,0
3	6	6,0	1,0
4	8	8,0	1,0
5	9	9,0	1,0

Tabela 1: Obtenção de amostras com volumes variáveis de histamina e suas respectivas concentrações finais (mol. L⁻¹)

Após preparadas as amostras, as mesmas foram submetidas a duas condições reacionais diferentes, empregando-se aquecimento convencional a 65 °C sob agitação magnética por 3 horas conforme a metodologia proposta por Deng e colaboradores (2017) e com o objetivo de reduzir o tempo reacional foi empregado o uso de irradiação por microondas em um minuto e meio. Posteriormente foi realizada as análises no espectrofluorímetro, onde se observou a necessidade de melhorar as condições reacionais. Diante disso, estabeleceu-se um estudo sistemático das condições reacionais, além da substituição do derivado AZA2 pelo AZA8 para obtenção de melhores respostas do sensor. Sendo a otimização apresentada na (TAB. 2).

Reação	Técnica	Tempo máximo (min)	Concentração de histamina (x 10⁻⁵ mol L⁻¹)	Concentração da sonda AZA8 (x 10⁻⁵ mol. L⁻¹)
1	Irradiação luz ultravioleta	120	1,0	1,0
2	-	120	1,0	1,0
3	-	20	2,0-9,0	1,0
4	-	120	2,0-9,0	1,0
5	-	20	20,0-60,0	1,0
6	-	20	2,0-9,0	10,0
7	-	20	2,0-9,0	5,0

Tabela 2: Otimização da condição reacional do desenvolvimento do sensor fluorescente

2.1.7 - CONSTRUÇÃO DO SENSOR FLUORESCENTE PARA DETEÇÃO DE ÍONS

Para a realização das análises de detecção de íons, foram preparadas soluções aquosas de diferentes íons de concentração na ordem de 1.10⁻³ mol. L⁻¹. Os íons explorados foram: Cu(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Fe(II), Zn(II) e Pb(II). Posteriormente adicionou-se 100 µL destas respectivas soluções em balões volumétricos de 10 mL juntamente com 100 µL da solução padrão oxazolônica utilizada como sonda. Completou-se com água até a marca de aferição e realizaram-se as análises de espectrometria de UV-Vis.

2.1.8- MEDIDAS DE POLARIDADE DE SOLVENTES PUROS

Foram preparadas soluções estoques dos derivados AZA2, AZA8, AZA10 e AZA13 em diclorometano na concentração de 1.10⁻² mol.L⁻¹. Adicionaram-se alíquotas de 10 μL dessas soluções em 17 balões volumétricos de 10 mL, para cada sonda empregada, deixando-se evaporar o solvente. Após a evaporação do diclorometano, cada sonda foi dissolvida nos 17 solventes puros selecionados (álcool etílico, álcool isopropílico, álcool metílico, acetonitrila, DMSO, DMF, nhexano, acetato de etila, cicloexano, THF, acetona, dioxano, cicloexanona, clorofórmio, diclometano, tetraclorometano e tolueno), resultando em concentrações finais de 1.10⁻⁵ mol.L^{-1.} Realizaram-se então as leituras no espectrofotômetro de UV-Vis e a partir dos espectros foram obtidos os comprimentos de onda de absorção máxima, cujo valores permitiu calcular as energias de transição molar dos compostos em cada solvente, usando a Equação 1.

2.1.8.1 - ESTUDOS DE FOTOISOMERIZAÇÃO DOS CORANTES

Foram preparadas soluções do composto AZA2 em *n*-hexano e metanol ambos nas mesmas concentrações (1.10⁻⁵mol L⁻¹), submetendo-as a irradiação ultravioleta gerando espectros de absorção no UV-Vis a cada 10 minutos durante 1 hora em temperatura ambiente.

2.1.8.2 - ESTUDOS DE AUTOAGREGAÇÃO DOS CORANTES

Para o estudo de autoagregação foram preparadas soluções estoque do corante AZA2 na concentração de 1.10⁻⁵ mol L⁻¹ em dois solventes diferentes, *n*-hexano e metanol. Posteriormente foram realizadas diversas diluições fazendose a leitura espectrofotométrica a cada diluição. Os valores de absorbância correspondentes aos máximos nos comprimentos de onda em cada solvente foram coletados e utilizados para a realização de uma curva analítica, a fim de verificar a linearidade do sistema através de uma regressão linear.

2.1.8.3 - APLICAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS MULTIPARAMÉTRICAS

As estratégias multiparamétricas foram calculadas a partir dos valores de E_T (corante), previamente calculados, utilizando as equações de KAT e Catalán com o auxílio do *software* Origin 8.5, obtendo-se os parâmetros de acidez, basicidade, polaridade e polarizabilidade

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Primeiramente, serão apresentados os resultados referentes aos estudos fotofísicos de dois candidatos à sonda fluorescente AZA2 e AZA8, posteriormente será discutida a aplicação das mesmas na detecção de histamina. A seguir serão apresentados os resultados do estudo da aplicação das sondas como sensores de íons e na terceira parte, serão discutidos os resultados do estudo de solvatação dos corantes em solventes puros.

3.1 - ESTUDOS FOTOFÍSICOS

Inicialmente, foram realizadas avaliações fotofísicas de dois derivados oxazolônicos AZA 2 e AZA 8, sendo que o substituinte na porção benzilidênica é a principal diferença existente entre eles, conforme as estruturas apresentadas na FIG. 15, onde os mesmos apresentam grupos doadores e retiradores de elétrons respectivamente. Avaliou-se também a fotofísica da histamina empregada como analito no estudo.



Figura 15: Estrutura molecular dos derivados oxazolônicos AZA8 e AZA2

A avaliação foi realizada mediante as análises de absorção e emissão de fluorescência, utilizando DMSO como solvente.

Nesta etapa do estudo fotofísico tanto os derivados oxazolônicos quanto a histamina foram analisados em solução com concentração na ordem de 1.10⁻⁵ mol L⁻¹.

O λ_{max} de absorção na região do UV-Vis foi utilizado como comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) para obtenção dos espectros de emissão de fluorescência. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente.

Cabe ressaltar que foi realizado um teste de solubilidade, a fim de verificar a solubilidade dos reagentes em diferentes solventes, com o intuito de escolher um solvente que fosse favorável para o analito e para sonda empregada, tendo em vista que os mesmos serão submetidos à uma reação química, conforme apresentada na FIG.16.



Figura 16: Construção do sensor fluorescente a base de reação química entre derivados oxazolônicos e histamina em DMSO

No entanto, dentre os solventes analisados, a histamina apresentou-se solúvel apenas em DMSO, logo os demais solventes testados foram descartados para o estudo fotofísico.

Nas FIG. 17 e 18 são apresentados os espectros de absorção e emissão dos derivados oxazolônicos e do analito em estudo (histamina).



Figura 17: Espectro de absorção e de emissão do composto oxazolônico (4-(N,N)-dimetilaminobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (AZA 2) [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] e histamina (-)[1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] em DMSO.



Figura 18: Espectro de absorção e de emissão do composto oxazolônico 4- (4nitrobenzilideno) -2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (AZA 8) [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] em DMSO

Realizou-se uma varredura nos comprimentos de onda de 250 a 650 nm, onde observou-se um máximo de absorção (λ_{abs}), localizado entre 478-480 nm para o derivado AZA 2 e entre 383-384 nm para o AZA 8.

A variação do deslocamento entre os máximos de absorção entre os dois compostos foi de aproximadamente 100 nm, indicando que o efeito do substituinte acarreta em uma mudança espectral significativa.

Considerando que os comprimentos de onda do espectro eletromagnético estão associados à uma certa quantidade de energia, quando inserimos um grupo retirador de elétrons a uma molécula a energia necessária para que um elétron seja promovido para um nível mais energético é maior, sendo assim é observado menores comprimentos de onda, comportamento este observado no derivado AZA 8, que contêm como substituinte um grupamento nitro. Em contrapartida, se uma molécula contiver grupamentos doadores de elétrons, como é o caso do derivado AZA 2, a energia necessária para que ocorra essa transição é menor, acarretando assim em maiores comprimentos de onda. Esses efeitos justificam a significativa mudança espectral observada entre os dois derivados oxazolônicos.

De modo geral, quando se tem um substituinte doador de elétrons o grupo cromóforo é estabilizado com mais elétrons π , acarretando em uma maior conjugação na estrutura, deslocando os máximos de absorção para maiores comprimentos de onda (efeito batocrômico) ao contrário do que ocorre quando se têm um grupamento retirador de elétrons que diminui o efeito de conjugação e ocorre o deslocamento hipsocrômico para menores comprimentos de onda.

Analisando ainda os estudos fotofísicos, conforme a FIG. 17, a histamina, analito de estudo, não apresenta absorção nesta faixa que foi realizado a varredura (250 a 650 nm), o que demonstra que o analito não absorve no mesmo comprimento de onda dos compostos candidatos a sondas fluorescentes, sendo assim possível a aplicação dos mesmos como sensores e da histamina como substância a ser detectada.

O estudo das propriedades fotofísicas dos compostos oxazolônicos foi realizado também mediante a técnica de espectrofluorimetria, apresentados nas FIG. 17 e 18.

No espectro de emissão de fluorescência da AZA 2, pode-se observar uma banda principal de emissão localizada entre 554-558 nm (FIG. 17). Para esse composto obteve-se um valor de deslocamento de Stokes na ordem de 78 nm.

Por outro lado, o composto AZA 8 apresenta seu máximo de emissão localizado entre 436 e 438 nm (FIG. 18), apresentando um deslocamento de Stokes de 52nm.

Sabe-se que baixos valores observados para o deslocamento de Stokes indicam que as moléculas no estado excitado apresentam estruturas eletrônicas muito similares as encontradas no estado fundamental, não sofrendo modificações significativas em sua estrutura química e eletrônica.

Quanto a intensidade de emissão de fluorescência verificou-se que o derivado AZA8, apresentou baixa intensidade comparado com o AZA2, fato esse que corrobora com a literatura, uma vez que o derivado AZA8 apresenta substituinte retiradores de elétrons, o que provavelmente proporciona outros meios de desativação, como aquelas expostas no diagrama de Jabloski (FIG.1), diminuindo assim a constante de decaimento envolvida no processo de emissão de fluorescência.

3.1.2 - ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS DERIVADOS OXAZOLÔNICOS COM A HISTAMINA

3.1.2.1- APLICAÇÃO AZA 2

A interação do composto oxazolônico com a histamina visando o desenvolvimento de um método quantitativo foi investigado pela técnica de espectroscopia de fluorescência, empregando o derivado AZA2 como sonda fluorescente, submetendo-o em diferentes condições reacionais com o analito.

A histamina foi escolhida dentre as aminas como objeto de detecção para a realização deste trabalho, pela sua característica de amina primária, o que consequentemente favorece a sua reação com o composto oxazolônico, devido ao seu menor efeito estérico comparado com aminas secundárias e terciárias e também por não serem encontrados artigos na literatura sobre métodos de detecção de histamina com sistemas fotoluminescentes.

Neste âmbito, visamos monitorar quantidades de histamina por meio do mecanismo de supressão de fluorescência, que ocorre quando é adicionado uma molécula que desativa o fluoróforo, esse efeito observado está relacionado com

o mecanismo de supressão de fluorescência de Stern- Volmer, dada pela equação 5 no caso de supressão colisional, onde um fluoróforo excitado interage (curto alcance) com átomo ou uma molécula supressora fazendo com que aumente as taxas de transições não radiativas para o estado fundamental.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0[Q] = 1 + K_D[D]$$
(5)

Nesta expressão, F_o e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente, k_q é a constante bimolecular de supressão; τ_o é tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor, K_D é constante de supressão de Stern- Volmer e [Q] é a concentração de supressor. As medidas de supressão são geralmente representadas em um gráfico F_o /F versus [Q]. Logo, espera-se que F_o /F seja linearmente dependente da concentração do supressor. [9]

Deng e colaboradores (2017) reportaram um efeito de supressão de fluorescência empregando o derivado oxazolônico 4-[(Z)-2,5-metoxibenzilideno]-2-metiloxazol-5(4H)–ona como sonda na detecção de dopamina (FIG.19). Foi observado uma redução de aproximadamente 16 e 18% na absorção e emissão da sonda na medida em que se aumentava a concentração da amina, em uma reação de aproximadante 3 horas. No entanto, com o objetivo de aumentar a reatividade entre a oxazolona e a amina, Deng e colaboradores empregaram aquecimento á reação, realizando-a em 65 °C , verificando agora a redução da absorção e emissão para 27 e 28% respectivamente.



Figura 19: Mecanismo proposto por Deng e colaboradores do sensor fluorescente baseado em reação para detecção de dopamina.

Diante disso, no estudo da interação do composto oxazolônico com a histamina, espera-se que o analito (histamina) atue como uma molécula supressora, na qual, à medida que aumente concentração de histamina a intensidade de fluorescência da sonda AZA2 diminua proporcionalmente.

A FIG. 20 mostra os espectros de fluorescência do sensor excitados em 480 nm, após o emprego de condições reacionais de 3 horas em aquecimento convencional a 65 °C sob agitação magnética e com o uso da irradiação por micro-ondas em um minuto e meio.



Figura 20: Espectro de fluorescência da reação AZA2 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] e histamina em DMSO (a) 3 horas aquecimento convencional à 65 °C em agitação magnética (b) uso do micro-ondas em um minuto e meio

Os resultados obtidos para a construção do sensor fluorescente apresentados acima, permitem afirmar que não houve interação do derivado oxazolônico com a histamina, uma vez que, as bandas de fluorescência da sonda permaneceram quase inalteradas após a adição de diferentes equivalentes do analito. A justificativa se dá pela estabilidade do núcleo oxazolônico do derivado AZA2, proporcionada principalmente pelo substituinte doador de elétrons contido na porção benzilidênica.

Procurou-se então explorar a potencialidade do composto AZA 8, por apresentarem algumas características que, de certo modo, favorece a interação da sonda com o analito.

3.1.2.2- APLICAÇÃO AZA 8

O derivado 4-(4-nitrobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (AZA8) diferente do AZA 2 apresenta na porção benzilidênica substituinte retirador de elétrons como já foi mencionado anteriormente, tal característica favorece a desestabilização do núcleo oxazolônico por efeito de indução, tornando a carbonila mais sucetível ao ataque nucleofílico da amina, como exemplificado pelo mecanismo de reação proposto na FIG.21.



Figura 21: Proposta mecanística para reação do derivado AZA e a histamina

Neste contexto, a reação procederia com o ataque nucleofílico da amina (NH₂) na carbonila do núcleo oxazolônico, acarretando na clivagem da ligação causando a ruptura do anel fluoróforo e instantaneamente desfavorecendo a fluorescência, devido à perca da rigidez estrutural.

Nesta etapa do estudo, para avaliar a aplicabilidade do derivado AZA8 foi utilizada apenas análises de absorção. Foram avaliadas diferentes condições reacionais para a interação da sonda com o analito, que será discutido posteriormente.

Influência da irradiação com luz ultravioleta

A princípio o estudo foi realizado utilizando uma proporção molar de 1:1 da respectiva sonda e do analito.

A reação foi processada mediante a irradiação com luz ultravioleta com o auxílio de um fotoreator em diferentes tempos, avaliou-se também como a reação se procederia nos mesmos tempos sem o uso de irradiação, conforme apresentada na tabela de otimização (TAB. 2), nas reações 1 e 2.

As FIG. 22 e 23 apresentam os espectros de absorção para o referido estudo. O espectro na ausência de histamina é apresentado para comparação.



Figura 22: Espectro de absorção na região no UV-Vis em DMSO para o composto AZA8 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] após a adição de 1 equivalente de histamina em diferentes tempos com o uso de irradiação ultravioleta



Figura 23: Espectro de absorção na região no UV-Vis em DMSO para o composto AZA8 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] após a adição de 1 equivalente de histamina em diferentes tempos sem o uso de irradiação ultravioleta

Avaliando o curso da reação nas diferentes condições reacionais (com/sem irradiação) observa-se que houve interação do composto oxazolônico com a histamina desde os primeiros 30 minutos de reação, em que, é observando uma diminuição da absorbância de aproximadamente 14%, no entanto, é verificado um comportamento similar para ambas condições.

É interessante notar, que no tempo determinado em 120 minutos nas duas análises apresentadas, a banda de absorção sofre além da diminuição da absorbância, um deslocamento hipsocrômico e uma mudança no formato da banda. Essas variações observadas confirmam a interação da sonda com o analito. Logo com base nestes dados, visando o desenvolvimento de um método analítico prático, eficaz e barato determinou-se que os estudos posteriores realizariam sem a utilização da irradiação com luz ultravioleta.

Ainda pensando na otimização da reação como mostrada na TAB.2, realizou-se um estudo variando a concentração de histamina utilizando dois tempos distintos 20 e 120 minutos.

Influência do tempo

O objetivo desta análise é estimar o melhor tempo de reação, através da diminuição da absorbância da sonda quando inserimos concentrações variadas do analito. Os espectros estão apresentados nas FIG. 24 e 25.



Figura 24: Espectro de absorção na região no UV-Vis em DMSO para o composto AZA8 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] após a adição de 2,4,6,9 equivalente de histamina em 20 minutos



Figura 25: Espectro de absorção na região no UV-Vis em DMSO para o composto AZA8 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] após a adição de 2,4,6,9 equivalente de histamina em 120 minutos

É possível observar na reação de 20 minutos (FIG.24) uma tendência decrescente na intensidade de absorbância da sonda com o aumento da concentração de histamina. Além disso, é observado também um deslocamento

hipsocrômico considerável, em que, a banda desloca seu máximo de 384 nm para aproximadamente 340 nm quando adicionado 9 equivalentes de histamina, provavelmente atribuído a formação de um produto da reação.

Por meio da análise do espectro da FIG.25 referente a reação de 120 minutos, observou-se que os deslocamentos das bandas para o azul ficaram mais destacados, confirmando assim a formação de um produto na faixa de 329 a 336 nm.

Logo, os resultados mostram o consumo da sonda AZA8 indicado pela seta vertical vermelha e a formação de um produto indicado pela seta vertical preta, que supostamente varia de acordo com a concentração de histamina.

Desta forma, ao plotar uma curva analítica da absorbância da sonda em função da concentração do analito, com o intuito de verificar a linearidade, obteve-se um valor de coeficiente de determinação extremamente baixo para o desenvolvimento de um método analítico.

Assim como conclusão parcial, podemos apontar que não é possível ter como resposta analítica a absorbância da sonda em função da concentração do analito.

No entanto, como a reação acarretou na formação de um produto, visouse estudar o comportamento desse produto em função da concentração de histamina, intencionando-se obter um comportamento proporcional. Logo com base nesses resultados, objetivou-se desenvolver o sensor com respostas baseadas na banda de absorção do produto.

Efeito da concentração de Histamina sob a formação do produto "C"

Para avaliar a correlação da concentração de histamina e o produto formado "C" realizou-se um teste aumentando a concentração de histamina de 2.10⁻⁵, 4.10⁻⁵, 6.10⁻⁵, 8.10⁻⁵, 9.10⁻⁵ mol.L⁻¹ para 2.10⁻⁴, 4.10⁻⁴, 6.10⁻⁴ mol. L⁻¹, permanecendo fixa a concentração inicial da AZA8, na ordem de 1.10⁻⁵ mol.L⁻¹. Os resultados estão apresentados na FIG. 26.



Figura 26: Espectro de absorção na região no UV-Vis para o composto AZA 8 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] após a adição de 8,9,20,40,60 equivalentes de histamina em 120 minutos sob luz UV em DMSO

Com o aumento na concentração de histamina verificou-se uma tendência crescente na absorbância do produto, apresentando indícios de um comportamento proporcional, conforme apresentado no espectro da FIG. 26. A formação do produto C é indicado pela seta preta e o consumo da sonda é indicado pela seta vermelha.

Um outro fator importante observado que confirma a formação do produto C é a presença do ponto isosbéstico, que indica a presença de duas espécies absorvedoras no curso da reação.

A linearidade foi avaliada pelo gráfico da absorbância do produto C em função da concentração de histamina sendo verificada a partir da equação da regressão linear FIG.27. O valor do coeficiente de determinação obtido foi 0,84, na qual indica, que dentro da faixa de concentração avaliada, as concentrações de histamina não foram proporcionais ás respostas do método.



Figura 27: Gráfico da concentração de histamina em função da absorbância do produto formado na reação entre a histamina e a AZA 8

Porém, apesar de ser resultados não esperados estimulou a realização de um novo planejamento para experimentos posteriores mais abrangentes, com um intuito de melhorar a linearidade do sistema dentro da faixa de concentração que apresenta a formação do produto C.

No entanto, antes de realizarmos este novo planejamento, foi realizado a reprodução do método, a fim de confirmar este comportamento da reação, representado na FIG. 26. Foi observado então que a reação apresentava comportamento variado, em que o produto C começou a ser formado somente a partir das concentrações de 4.10⁻⁴ e 6.10⁻⁴mol.L ⁻¹ (FIG.28).



Figura 28: Repetição da análise de absorção na região no UV-Vis para o composto AZA8 [1.10⁻⁵ mol.L⁻¹] em DMSO após a adição de 8,9,20,40,60 equivalentes de histamina em 120 minutos

Outro fator que confirma a variação do comportamento da reação é o desaparecimento do ponto isosbéstico, que indica agora a existência de apenas uma espécie absorvedora. Esses comportamentos discrepantes podem estar associados ao efeito de temperatura.

Logo, os resultados evidenciam que a reação não atingio equilíbrio químico, na qual consequentemente necessitará de um sistema controlado, que possibilita controlar principalmente a temperatura.

Diante do exposto, o sensor demonstrou-se altamente instável para a detecção de histamina.

3.2 - ESTUDO DA APLICAÇÃO DE DERIVADOS OXAZOLÔNICOS PARA DETECÇÃO DE ÍONS

Investigando ainda a aplicação dos derivados oxazolônicos como sondas no desenvolvimento de sensores, realizou-se a projeção de um novo objetivo para detecção de íons, sendo uma área de grande interesse na química ambiental, uma vez que, nos últimos anos com a expansão urbana houve o acúmulo significativo de resíduos industriais, resultante das atividades humanas, além de outras práticas inadequadas ao meio ambiente, que acarreta diferentes tipos de contaminação, sobretudo de metais pesados.

Apesar de inúmeras técnicas analíticas existentes, com bons limites de detecção utilizadas para a detecção de metais pesados como espectrometria de absorção atômica, espectrometria de emissão de plasma acoplada indutivamente, voltametria de decapagem anódica, são técnicas que apresentam alto custo o que as tornam inviáveis.

Assim, um dos sensores ópticos desenvolvidos para detecção de íons foi proposto por Ozturk e colaboradores [16], utilizando o derivado oxazolônico 4- (2-furilmetileno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona, onde o mesmo responde ao ferro por um aumento na intensidade da fluorescência. O sensor apresentou-se satisfatório, por fornecer respostas reprodutíveis e um limite de detecção de 3,8.10⁻⁶ mol L⁻¹, além de ser um método barato e rápido e que não requerer condições reacionais, como meio ácido, o que os torna com grande potencial de aplicação em amostras reais.

Neste contexto, a fim de explorar os derivados oxazolônicos, aplicou-se o derivado AZA8 como sonda na detecção de metais pesados. Tal composto despertou interesse devido à presença de dois sítios ativos para a formação do complexo, uma vez que, o derivado apresenta substituintes nitrogenado e as espécies iônicas estudadas exibem caráter catiônicas. Assim o composto apresenta duas propostas de formação de complexo, conforme apresentada na FIG. 29

58



Figura 29: Exemplos de propostas da formação de complexo do composto AZA 8 com metais (Fe)

Na investigação do desenvolvimento desse sensor a intensidade do sinal está associada com a formação de complexo, sendo que essa formação pode interferir no sinal de modo que diminua ou aumente a intensidade dos sinais de fluorescência da sonda empregada.

Assim foram preparadas diferentes soluções de diferentes sais, tais como nitrato de cobre, sulfato de mangânes, nitrato de cobalto, sulfato de níquel, sulfato de ferro, nitrato de zinco e nitrato de chumbo todos na concentração de 1.10⁻³ mol.L⁻¹ a fim de testar qual íon responderia melhor para o desenvolvimento do sensor.

Nas soluções iônicas foram adicionadas a sonda fluorescente investigada, sendo verificada instantaneamente uma coloração amarela na solução de ferro (FIG. 30).



Figura 30: Soluções aquosas dos íons metálicos (Cu(II), Co(II), Mn(II), Fe(II), Ni(II), Zn(II), Pb(II)) adicionadas a sondas (AZA 8)

A seguir as amostras foram analisadas por meio da técnica de espectroscopia de UV-Vis, na qual o íon de ferro apresentou melhor sensibilidade, podendo ser observada por meio da diminuição da absorbância da sonda. Tal comportamento era esperado, visto que, pelas análises preliminares foi verificado uma mudança na coloração da solução apenas quando se empregou os íons de ferro.

Porém quando realizado o ensaio quantitativo do sensor para a detecção de ferro o mesmo não apresentou resultados satisfatórios por não apresentar linearidade na faixa de trabalho do estudo de 2.10⁻⁶ mol L⁻¹ a 9.10⁻⁶ mol L⁻¹.

Isso pode ser justificado pela quantidade estequiométrica que possivelmente não foi favorável para formação do complexo.

3.3 - ESTUDOS SOLVATOCRÔMICOS DOS CORANTES OXAZOLÔNICOS EM SOLVENTES PUROS

Neste estudo foram investigados quatro derivados oxazolônicos, o 4- (4- (N,N)-dimetilaminobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (AZA2), 4-(4- nitrobenzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (AZA8) cuja as estruturas já foram apresentadas na FIG.15 Além desses foram utilizados o 4- (4-metoxi-

benzilideno)-2-fenil-1,3-oxazol-5 (4H)–ona (AZA10) e 4-(3-clorobenzilideno)-2fenil-4H-oxazol-5-ona (AZA13) apresentadas na FIG. 31.



Figura 31: Estrutura molecular dos derivados oxazolônicos AZA 10 e AZA13

De forma a obter o comportamento solvatocrômico desses derivados oxazolônicos em diferentes solventes, determinou-se a energia de transição molar E_T com auxílio da técnica de espectrofotometria no UV-Vis, para isso foi necessário determinar o comprimento de onda relativo aos máximos de absorção das sondas empregadas.

Assim aplicou-se a equação 1 e através desta foram obtidos os respectivos valores de $E_T(AZA)$ em kcal mol⁻¹ que se encontram apresentados da TAB. 3, juntamente com os valores de E_T (30).

Os ensaios foram realizados em 17 solventes orgânicos determinados a temperatura ambiente, incluindo 12 solventes apróticos, 3 próticos e 2 clorados.

Como podemos observar na FIG. 32, o composto AZA2 apresenta coloração amarela quando em solução independente do microambiente, assim como para os demais derivados, diferente do comportamento de algumas sondas solvatocrômicas, que exibem uma grande variedade de cores em solução dependendo do meio em que se encontram, como os compostos merocianínicos.



Figura 32: Soluções do corante AZA2 em diferentes solventes

Solvente Er(30) a.b Er(AZA2) b Er(AZA8) b Er(AZA10) b Er(AZA13) b Ciclohexano 30,9 62,42 76,03 74,84 78,98 n-Hexano 31,0 62,83 76,44 75,23 79,41 Tolueno 33,9 61,08 74,65 73,87 78,11 Dioxano 36,0 62,15 75,43 74,06 78,98 THF 37,4 61,35 75,04 74,06 78,98 Acetato de etila 38,1 62,01 75,83 75,04 79,41 Cicloexanona 39,8 60,31 75,04 74,06 78,98 Tretracloreto de carbono 39,1 61,35 75,43 73,68 78,98 Clorofórmio 39,1 60,44 75,04 73,49 78,33 Diclorometano 40,7 60,57 75,05 73,68 78,54 Acetona 42,2 61,22 75,83 74,45 79,41 DMF 43,2 60,31		— (aa) ah		h		
Ciclohexano 30,9 62,42 76,03 74,84 78,98 n-Hexano 31,0 62,83 76,44 75,23 79,41 Tolueno 33,9 61,08 74,65 73,87 78,11 Dioxano 36,0 62,15 75,43 74,06 78,98 THF 37,4 61,35 75,04 74,06 78,98 Acetato de etila 38,1 62,01 75,83 75,04 79,41 Cicloexanona 39,8 60,31 75,04 74,06 78,98 Tretracloreto de carbono 39,1 61,35 75,43 73,68 78,98 Clorofórmio 39,1 60,44 75,04 73,49 78,33 Diclorometano 40,7 60,57 75,05 73,68 78,54 Acetona 42,2 61,22 75,83 74,45 79,41 DMF 43,2 60,31 75,43 73,68 78,54 DMF 43,2 60,31 75,43	Solvente	ET(30) ^{a.b}	ET(AZA2) ^b	ET(AZA8) ^b	ET(AZA10) ^b	ET(AZA13) ^b
Ciclohexano 30,9 62,42 76,03 74,84 78,98 n-Hexano 31,0 62,83 76,44 75,23 79,41 Tolueno 33,9 61,08 74,65 73,87 78,11 Dioxano 36,0 62,15 75,43 74,06 78,98 THF 37,4 61,35 75,04 74,06 78,98 Acetato de etila 38,1 62,01 75,83 75,04 79,41 Cicloexanona 39,8 60,31 75,04 74,06 78,98 Tretracloreto de ass,1 61,35 75,04 73,68 78,98 Clorofórmio 39,1 61,35 75,04 73,49 78,33 Diclorometano 40,7 60,57 75,05 73,68 78,54 Acetona 42,2 61,22 75,83 74,45 79,41 DMF 43,2 60,31 75,43 73,68 78,54 DMSO 45,1 59,56 74,45 73,31						
n-Hexano 31,0 62,83 76,44 75,23 79,41 Tolueno 33,9 61,08 74,65 73,87 78,11 Dioxano 36,0 62,15 75,43 74,06 78,98 THF 37,4 61,35 75,04 74,06 78,98 Acetato de etila 38,1 62,01 75,83 75,04 74,06 78,98 Cicloexanona 39,8 60,31 75,04 73,68 78,98 Tretracloreto de Carbono 39,1 61,35 75,43 73,87 78,54 Clorofórmio 39,1 60,57 75,05 73,68 78,54 Clorofórmio 39,1 60,57 75,05 73,68 78,54 Diclorometano 40,7 60,57 75,05 73,68 78,54 DMF 43,2 60,31 75,43 73,68 78,54 DMSO 45,1 59,56 74,45 73,31 78,11 Acetonitrila 45,6 61,35	Ciclohexano	30,9	62,42	76,03	74,84	78,98
Tolueno33,961,0874,6573,8778,11Dioxano36,062,1575,4374,0678,98THF37,461,3575,0474,0678,98Acetato de etila38,162,0175,8375,0479,41Cicloexanona39,860,3175,0473,6878,98Tretracloreto de Carbono39,161,3575,4373,8778,54Clorofórmio39,160,4475,0473,4978,33Diclorometano40,760,5775,0573,6878,54Acetona42,261,2275,8374,4579,41DMF43,260,3175,4373,6878,54DMSO45,159,5674,4573,3178,11Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41	n-Hexano	31,0	62,83	76,44	75,23	79,41
Dioxano 36,0 62,15 75,43 74,06 78,98 THF 37,4 61,35 75,04 74,06 78,98 Acetato de etila 38,1 62,01 75,83 75,04 74,06 78,98 Acetato de etila 38,1 62,01 75,83 75,04 79,41 Cicloexanona 39,8 60,31 75,04 73,68 78,98 Tretracloreto de Carbono 39,1 61,35 75,43 73,87 78,54 Clorofórmio 39,1 60,44 75,04 73,49 78,33 Diclorometano 40,7 60,57 75,05 73,68 78,54 DMF 43,2 61,31 75,43 73,68 78,54 DMF 43,2 60,31 75,43 73,68 78,54 DMSO 45,1 59,56 74,45 73,31 78,11 Acetonitrila 45,6 61,35 76,03 74,84 79,41 Isopropanol 48,4 61,22	Tolueno	33,9	61,08	74,65	73,87	78,11
THF37,461,3575,0474,0678,98Acetato de etila38,162,0175,8375,0479,41Cicloexanona39,860,3175,0473,6878,98Tretracloreto de Carbono39,161,3575,4373,8778,54Clorofórmio39,160,4475,0473,6878,98Diclorometano40,760,5775,0573,6878,54DMF43,261,3275,4373,6878,54DMSO45,159,5674,4573,3178,11Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41	Dioxano	36,0	62,15	75,43	74,06	78,98
Acetato de etila38,162,0175,8375,0479,41Cicloexanona39,860,3175,0473,6878,98Tretracloreto de Carbono39,161,3575,4373,8778,54Clorofórmio39,160,4475,0473,4978,33Diclorometano40,760,5775,0573,6878,54Acetona42,261,2275,8374,4579,41DMF43,260,3175,4373,6878,54DMSO45,159,5674,4573,3178,11Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41	THF	37,4	61,35	75,04	74,06	78,98
Cicloexanona Tretracloreto de Carbono39,860,3175,0473,6878,9839,161,3575,4373,8778,54Clorofórmio39,160,4475,0473,4978,33Diclorometano40,760,5775,0573,6878,54Acetona42,261,2275,8374,4579,41DMF43,260,3175,4373,6878,54DMSO45,159,5674,4573,3178,11Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41	Acetato de etila	38,1	62,01	75,83	75,04	79,41
Cicloexanona39,860,3175,0473,6878,98Tretracloreto de Carbono39,161,3575,4373,8778,54Clorofórmio39,160,4475,0473,4978,33Diclorometano40,760,5775,0573,6878,54Acetona42,261,2275,8374,4579,41DMF43,260,3175,4373,6878,54DMSO45,159,5674,4573,3178,11Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41						
Tretracloreto de Carbono39,161,3575,4373,8778,54Clorofórmio39,160,4475,0473,4978,33Diclorometano40,760,5775,0573,6878,54Acetona42,261,2275,8374,4579,41DMF43,260,3175,4373,6878,54DMSO45,159,5674,4573,3178,11Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41	Cicloexanona	39,8	60,31	75,04	73,68	78,98
CarbonoClorofórmio39,160,4475,0473,4978,33Diclorometano40,760,5775,0573,6878,54Acetona42,261,2275,8374,4579,41DMF43,260,3175,4373,6878,54DMSO45,159,5674,4573,3178,11Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41	Tretracloreto de	39,1	61,35	75,43	73,87	78,54
Clorofórmio39,160,4475,0473,4978,33Diclorometano40,760,5775,0573,6878,54Acetona42,261,2275,8374,4579,41DMF43,260,3175,4373,6878,54DMSO45,159,5674,4573,3178,11Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41	Carbono					
Diclorometano40,760,5775,0573,6878,54Acetona42,261,2275,8374,4579,41DMF43,260,3175,4373,6878,54DMSO45,159,5674,4573,3178,11Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41	Clorofórmio	39,1	60,44	75,04	73,49	78,33
Acetona42,261,2275,8374,4579,41DMF43,260,3175,4373,6878,54DMSO45,159,5674,4573,3178,11Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41	Diclorometano	40,7	60,57	75,05	73,68	78,54
DMF43,260,3175,4373,6878,54DMSO45,159,5674,4573,3178,11Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41	Acetona	42,2	61,22	75,83	74,45	79,41
DMSO45,159,5674,4573,3178,11Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41	DMF	43,2	60,31	75,43	73,68	78,54
Acetonitrila45,661,3576,0374,8479,41Isopropanol48,461,2276,0374,2679,41	DMSO	45,1	59,56	74,45	73,31	78,11
lsopropanol 48,4 61,22 76,03 74,26 79,41	Acetonitrila	45,6	61,35	76,03	74,84	79,41
	Isopropanol	48,4	61,22	76,03	74,26	79,41
Etanol 51,9 60,95 76,03 74,06 79,19	Etanol	51,9	60,95	76,03	74,06	79,19
Metanol 55,4 61,08 89,90 74,26 79,41	Metanol	55,4	61,08	89,90	74,26	79,41

Tabela 3: Valores de $E_T(30)$ e $E_T(corante)$ para o composto AZA2, AZA8, AZA10, AZA13 em 17 solventes puros.

^a Valores obtidos de Reichardt, 1994 [4]

^b em kcal mol⁻¹

Correlacionando assim os valores de $E_T(AZA)$ e $E_T(30)$ é possível evidenciar o comportamento exibido pelas sondas nos solventes investigados, como apresentados nos gráficos das FIG. 33 e 34.



Figura 33: Valores de E_T(30) em função de E_T(corante) para o composto AZA2 (A) e AZA10 (B)



Figura 34: Valores de $E_T(30)$ em função de $E_T(corante)$ para o composto AZA8(A) e AZA13(B)

As FIG. 35 e 36 mostram os espectros de UV-Vis para os corantes AZA, em solventes selecionados com característica apolar, polar e polar próticos, reforçando o comportamento solvatocrômico das espécies estudada





Figura 35: Espectros de UV-Vis para o composto AZA2 (A) e AZA10 (B) em metanol (—), hexano (—) e DMSO (—)



Figura 36: Espectros de UV-Vis para o composto AZA8 (A) e AZA 13(B) em metanol (—), hexano (—) e DMSO (—)

Assim, por meio das análises dos dados, verifica- se que o composto AZA2 apresenta uma banda solvatocrômica $\lambda_{máx}$ em 455 nm em *n*-hexano (FIG.35-A) e valor de E_T(AZA 2) = 62,83 kcal.mol⁻¹. Em DMSO a banda se desloca para 480 nm e apresenta E_T(AZA2) = 59,56 kcal.mol⁻¹, enquanto que em metanol a banda sofre um deslocamento hipsocrômico comparado com o DMSO, apresentando $\lambda_{máx}$ em 468 nm e E_T(AZA2) = 61,08 kcal mol⁻¹.

Desta maneira, verifica-se que as bandas solvatocrômicas do derivado AZA2 apresentam um breve, porém considerável deslocamento dependendo da polaridade do solvente.

No gráfico da FIG 33-A, onde os valores de E_T(AZA2) confronta-se com o valores de E_T(30), revela que o corante apresenta um comportamento de solvatocromismo reverso, isto é, à medida que a polaridade do solvente aumenta de *n*-hexano para DMSO a energia de transição molar diminui e os espectros de absorção exibem um descolamento batocrômico, tal comportamento é característico do solvatocromismo positivo. Porém, observa-se que esse comportamento se limita até o DMSO, onde é evidenciada a região que apresenta reversão do solvatocromismo. A partir dessa região, o aumento da polaridade do meio faz com que ocorra também um aumento da energia de transição molar, consequentemente deslocando a banda solvatocrômica para menores comprimentos de onda (deslocamento para o azul ou deslocamento hispsocrômico), apresentando assim um solvatocromismo negativo.

Neste caso, não se pode afirmar que o estado fundamental é mais estabilizado por solvatação do que o estado excitado ou que o estado excitado é mais estabilizado pelo solvente do que o estado fundamental, como aconteceria se a sonda tivesse comportamento solvatocrômico negativo ou positivo, respectivamente.

Um ponto importante a ser ressaltado é que o aumento da energia de transição molar, ocorreu quando foi empregado solventes hidroxílicos. Este comportamento sugere que esteja ocorrendo a formação de ligação de hidrogênio do soluto com o solvente.

O derivado AZA10 apresenta um comportamento similar ao encontrado no AZA2, conforme apresentado no gráfico da FIG.33-B, no entanto, esse derivado apresenta um deslocamento de banda menos acentuado, em que, a banda apresenta λ_{max} em 380 nm em n-hexano, 390 nm em DMSO, deslocando para 385 nm em metanol (FIG.35-B).

Verificando ainda o gráfico da FIG. 33-B, observa-se que a energia de transição molar do AZA10 em *n*-hexano é de aproximadamente 75,23 kcal.mol⁻¹, com o aumento da polaridade do solvente a energia de transição molar diminui para 73,31 kcal mol⁻¹ em DMSO e empregando um solvente polar prótico como o metanol a energia de transição volta a aumentar para 74,26 kcal mol⁻¹, características essas que confirmam o solvatocromismo reverso exibido também pela sonda AZA10.

Esse comportamento semelhante entre esses dois derivados estudados, é resultado da característica dos substituintes, na qual, ambos apresentam substituintes doadores de elétrons, proporcionando a presença de sistemas aceitadores e doadores, fazendo com que a transferência de carga fique altamente sensíveis aos solventes, apresentando assim variações nos comprimentos de onda máximo.

No entanto, o composto AZA2 apresenta dois grupos metilas como substituinte, isso resulta em um deslocamento mais evidenciado em comparação com o derivado AZA10 que apresenta apenas um grupamento metila, isso ocorre pelo aumento na transferência de cargas entre o grupo elétron-doador e o grupo aceitador de elétrons. Outro fator responsável pelo deslocamento menos acentuado do AZA10 em relação ao AZA2, é a presença do átomo de oxigênio também presente no substituinte do AZA10, uma vez que, esse átomo apresenta maior eletronegatividade comparado com o átomo de nitrogênio presente na estrutura do AZA2, desfavorecendo assim a transferência de cargas.

Analisando o comportamento dos derivados AZA8 e AZA13 os dados mostram que o emprego de derivados oxazolônicos como sondas solvatocrômicas apresentam limitações. Usando o composto AZA13 como exemplo, é possível observar que a banda solvatocrômica não sofreu deslocamento quando empregado solventes com polaridades distintas (FIG. 36-B), observa-se o $\lambda_{máx}$ = 360 nm em *n*-hexano e em metanol. Já a composto AZA8 apresenta um deslocamento considerável (FIG.36-A), no entanto não apresenta comportamento evidenciado (FIG.34-A) como os exibidos pelos compostos AZA2 e AZA10,

68

Desta forma, torna-se inaplicável o emprego desses derivados como sondas solvatocrômicas.

Esse fato ocorre, pois, o grupo nitro contido na molécula da AZA8 e o cloro na estrutura da AZA13, são poderosos aceitadores de elétrons, afetando diretamente a transferência de carga intramolecular, devido a isso esses compostos não apresentaram comportamento (FIG.34) como os exibidos pelos outros derivados.

No caso do solvatocromismo reverso exibido pelos derivados AZA2 e AZA10, existem três possíveis explicações que a literatura aborda, dentre elas está a autoagregação dos corantes dependendo do meio que se encontra, onde os diferentes valores de $\lambda_{máx}$ estão associados com a formação de dímeros ou até agregados maiores, como observado no trabalho de Niebdalska e Gruda [49], na qual estudaram os efeitos do substituintes no solvatocromismo de merocianinas e verificaram um deslocamento hipsocrômico do composto em solventes de menor polaridade, que está associada com a formação de agregados, e o surgimento de uma banda batocrômica do mesmo composto em solventes de maior polaridade, tal banda é pertencentes aos monômeros .

Outra explicação trazida na literatura para esse tipo de comportamento é que o composto sofreu termo ou fotoisomerização *cis/trans*, sendo que a forma *cis* é mais bem estabilizada em solventes apolares e a forma *trans* em solventes polares [4,39,50,51].

E por fim a explicação mais aceita, baseadas em compostos derivados de merocianinas, diz respeito a capacidade do solvente para estabilizar diferentemente as formas de ressonância, a quinonoide (menos polar) e a benzenoide (mais polar). Onde, solventes menos polares são capazes de estabilizar as formas quinonoide, sendo que esta forma contribui mais para a estabilização do estado fundamental. Em contrapartida, com o aumento da polaridade do meio, o estado fundamental deixa de ser estabilizado e os solventes polares são capazes de estabilizar melhor a forma benzenoide, fato esse que acarreta a reversão do solvatocromismo.[4,39,50]. A FIG. 37 apresenta as estruturas de ressonância para uma das merocianinas utilizadas no respectivo estudo.


Figura 37: Forma benzenoide e quinonoide do composto merocianínico

Porém a polaridade nas estruturas de ressonância são particularidades, uma vez que, a forma benzenoide dos composto oxazolônicos é menos polar e a forma quinonoide é mais polar, conforme apresentadas nas estruturas propostas na FIG.38.



Figura 38: Estruturas de ressonância benzenoide e quinonoide para o corante AZA 2

Neste contexto, para verificar qual desses fatores mencionados é responsável pelo comportamento reverso exibido pelos compostos são necessários experimentos que analisem a possibilidade de ocorrência de autoagregação dos corantes e de ensaios que verifiquem a possibilidade de isomerização. Estes estudos são relatados a seguir.

3.3.1 - ESTUDOS DE FOTOISOMERIZAÇÃO DOS CORANTES AZA

A isomerização *cis/trans* foi descartada pelo fato de que durante o experimento utilizando a irradiação com luz ultravioleta, não houve mudanças significativas no formato da banda de absorção, absorbância e no comprimento de onda máximo, o que evidencia que a fotoisomerização não foi induzida. A

FIG. 39 apresenta espectros de UV-Vis para o corante em *n*-hexano e metanol, em diferentes tempos de irradiação, confirmando a inexistência de fotoisomerização.



Figura 39: Investigação da possível fotoisomerização do corante AZA2 [1.10⁻⁵ mo.L⁻¹] em metanol (A) e *n*-hexano (B)

3.3.2 - ESTUDOS DE AUTOAGREGAÇÃO DOS CORANTES AZA

Dentre a classe orgânica, os corantes são compostos que apresentam tendências para auto associação, que consequentemente conduz a formação de agregados e um dos fortes influentes neste fenômeno é o solvente utilizado na solução [52]. A espectroscopia de absorção UV-Vis é um dos métodos quantitativos mais adequados para o estudo do fenômeno de agregação de corantes em função da concentração, uma vez que, o aumento na agregação pode ocorrer com o aumento da concentração do corante na solução. Desta forma, a agregação molecular foi sugerida pela primeira vez para explicar os desvios da Lei de Lambert- Beer, isto porque, quando se tem mais de uma substância absorvedora geralmente a absorbância total apresenta um desvio da linearidade [53–55].

Desta forma, para analisar o estudo da autoagregação dos compostos AZA, foram obtidos os espectros eletrônicos de absorção do derivado AZA2 em função da concentração em dois solventes com polaridades bem distintas (*n*-hexano e metanol) (FIG. 40), onde verificou-se que a banda solvatocrômica não sofreu alterações na forma e no comprimento de onda máximo. Logo, se observou que em ambos os casos a curva apresentou comportamento linear (FIG.41), apresentando valores de R² satisfatório, descartando assim a possibilidade de autoagregação na faixa de concentração estudada.



Figura 40: Espectros de UV-Vis do corante AZA2 em metanol (A) e *n*-hexano (B) com concentrações na faixa de 8.10^{-5} mol.L⁻¹ a 1.10^{-6} mol.L⁻¹



Figura 41: Gráfico da absorbância em função da concentração do corante AZA2 em metanol (A) e *n*-hexano (B).

Além disso, a fim de confirmar a ausência de agregados foi realizado também uma análise utilizando a técnica de espectrometria de fluorescência, por apresentar maior sensibilidade. O resultado está apresentado na FIG.42, que apesar de um pequeno deslocamento da banda de emissão demonstra que não ocorreu a formação de agregados.



Figura 42: Espectro de fluorescência do composto AZA2 em DMSO em diferentes concentrações

Logo, o comportamento solvatocrômico reverso não pode ser atribuído à fenômenos de agregação, mas sim à capacidade do solvente para estabilizar diferentemente as formas de ressonância benzonoide e quinonoide do corante, que será abordada no próximo tópico.

3.3.3 - INTERPRETAÇÕES DO SOLVATOCROMISMO REVERSO DOS COMPOSTOS AZA BASEADA NA ESTABILIZAÇÃO DIFERENCIAL DAS FORMAS DE RESSONÂNCIA

Descartada as possibilidades de autoagregação e fotoisomerização o comportamento solvatocrômico reverso exibido pelos compostos pode ser explicado pela hipótese da estabilização diferencial das formas de ressonância, ou seja, na habilidade dos solventes menos polares e mais polares para estabilizarem o estado fundamental e o estado excitado dos corantes.

Em solventes menos polares como *n*-hexano e ciclohexano por exemplo, a forma benzenoide traz uma contribuição maior para o estado fundamental, porém com o aumento gradativo da polaridade do solvente, a diferença entre o estado fundamental e o estado excitado diminui, fazendo com que o solvente seja menos capaz de solvatar o estado fundamental do composto ocorrendo consequentemente uma melhor estabilização do estado excitado. Esse fato explica o solvatocromismo positivo entre o *n*-hexano e o DMSO. Em solventes mais polares, como o metanol, a forma quinonoide é melhor estabilizada por ser mais polar, logo nesta região de maior polaridade a diferença entre o estado fundamental e o estado excitado é maior, ocorrendo maior estabilização do estado fundamental, sendo assim observado o solvatocromismo negativo (FIG.43)



Figura 43: Solvatocromismo reverso exibido pelo composto AZA 2

3.4 - APLICAÇÃO DAS EQUAÇÕES MULTIPARAMÉTRICAS DE KAMLET-

ABBOUD-TAFT E DE CATALÁN

Com o objetivo de avaliar qual ou quais parâmetros do solvente afetam diretamente a solvatação do corante AZA2 e AZA10 comprometendo assim a banda de absorção, empregou-se as equações multiparamétricas que levam em consideração os parâmetros de acidez, basicidade, polaridade e polarizabilidade dos solventes. Os resultados são analisados por meio dos valores obtidos na regressão linear múltipla.

A escala de polaridade de Reichardt $E_T(30)$, leva em consideração apenas um parâmetro (energia de transição molar) para evidenciar o comportamento solvatôcromico exibido pelo corante. Logo, se faz necessário a aplicação de estratégias que consigam elucidar as interações soluto-solvente. Para isso, neste trabalho, foram aplicadas as equações multiparamétricas de KAT (Equação 2) e de Catalán (Equação 4). Os valores dos coeficientes a,b, d e s responsáveis por caracterizar a sensibilidade do soluto frente ao solvente estão apresentado nas Tabelas 4 e 5, tais valores foram obtidos por meio de regressão linear múltipla, onde $E_T(corante)$ é uma variável dependente e os parâmetros propostos por Catalán e KAT são variáveis independentes. O valor de $E_T(corante)_0$ que corresponde a energia de transição do sistema em solvente inerte é o ponto intercepto também obtido estatisticamente.

Os parâmetros dos solventes das equações multiparamétricas de KAT e Catalán, utilizados para obtenção dos dados das Tabelas 4 e 5, foram coletados a partir de trabalhos da literatura e encontram-se no anexo [47,56].

Tabela 4: Coeficientes de correlação, a, b, c, d e s obtidos nas análises multiparamétricas de Catalán através dos valores experimentais de E_T do corante AZA 2 e AZA10 em 17 solventes puros.

Corante	E⊤ (corante)₀	а	b	С	d	R ²
AZA2	68,45	-1,56	0,32	-8,91	-1,54	0,90
AZA10	80,38	-1,50	-0,18	-8,32	-0,20	0,88

Tabela 5: Coeficientes de correlação, a, b, e s obtidos nas análises multiparamétricas de KAT através dos valores experimentais de E_T do corante AZA2 e AZA10 em 17 solventes puros.

Corante	E⊤ (corante)₀	а	В	S	R ²
AZA2	62,61	-0,46	0,36	-2,64	0,64
AZA10	74,86	-0,21	0,44	-1,41	0,29

A partir desses dados é possível comparar os valores de energia de transição molar calculados, por meio das equações multipamétricas de KAT e Catalán com os valores de energia de transição molar obtidos experimentalmente para os compostos oxazolônicos e verificar a relação entre eles, assim as FIG. 44 e 45 mostram os gráficos da relação de E_T calculado pelas equações de Catalán e KAT em função de E_T mensurado.



Figura 44: Relação entre E_T calculado e mensurado para o composto AZA10, considerando as estratégias de Catalán e KAT.



Figura 45: Relação entre E_T calculado e mensurado para o composto AZA2, considerando as estratégias de Catalán e KAT.

Assim, as informações da Tabela 4 mostram que os parâmetros de Catalán oferecem um melhor ajuste para os dados, cujo valor de R^2 foi mais elevado para ambos os corantes, esse fato é confirmado nos gráficos da FIG. 40 e 41, onde os valores do coeficiente de determinação também apresentam-se mais elevados, quando comparados com os ajustes obtidos pela equação de KAT, na qual apresentou o valor de R^2 =0,69 para AZA2 e R^2 =0,38 para AZA10, deste modo, a equação de Catalán revela que os valores de energia de transição molar obtidos experimentalmente foram bastante próximos aos que se esperaria teoricamente, descrevendo assim melhor o sistema.

Outra observação feita, diz respeito às interações soluto solvente, que é o grande objetivo das equações, verifica-se que o coeficiente c nas análises de Catalán e o coeficiente s na análise de KAT apresentaram os valores mais baixos, em ambas as equações. Tais coeficientes estão relacionado com o parâmetro polaridade e polarizabilidade, indiciando que são os parâmetros mais prepotentes nas interações soluto solvente.

Entretanto, os dados sugerem pela equação de Catalán que o parâmetro polarizabilidade é ainda o mais influente na solvatação do composto, uma vez que os valores de c relativo ao parâmetro SP, ficou estimado em -8,91 para AZA2 e -8,32 para AZA10. Logo, com a finalidade de confirmar qual parâmetro é mais atuante na solvatação, aplicou-se a equação multiparamétrica de Catalán, excluindo cada parâmetro de uma vez, acompanhando o coeficiente de determinação. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela	6:	Influência	dos	parâmetros	a,	b,	С,	d	(acidez,	basicidade	э,
polarizat	oilida	ade e polari	dade)	do solvente	usar	ndo	a es	stra	tégia mult	iparamétric	a
de Catal	án p	ara o comp	osto A	AZA2							

E⊤ (corante)₀	а	b	С	D	R^2
68,45	-1,56	0,32	-8,91	-1,54	0,90
67,28	-	0,11	-7,19	-1,72	0,83
68,58	-1,49	-	-9,05	-1,39	0,90
69,11	0,35	0,78	-	-2,08	0,41
69,24	-2,13	-1,08	-10,50	-	0,65

Tabela 7: Influência dos parâmetros a, b, c, d (acidez, basicidade, polarizabilidade e polaridade) do solvente usando a estratégia multiparamétrica de Catalán para o composto AZA10

E⊤ (corante)₀	а	b	С	D	R^2
80,38	-1,50	-0,18	-8,32	-0,20	0,88
79,25	-	-0,38	-6,66	-0,36	0,73
80,30	-1,55	-	-8,24	-0,28	0,88
74,46	0,28	0,25	-	-0,70	-0,07
80,30	-1,58	-0,36	-8,53	-	0,88

Verifica-se que o parâmetro polarizabilidade, c, apresenta grande influência na solvatação dos dois corantes estudados, uma vez que, quando se faz a exclusão deste parâmetro do sistema, os valores de R² declinam. O parâmetro polaridade, d, apresenta comportamento parecido no derivado AZA2, porém não tão expressivo quanto a polarizabilidade.

É notável por meio dos resultados obtidos para o coeficiente de determinação que o efeito da polarizabilidade foi mais expressivo para o composto AZA10, esse fato pode ser justificado pelo momento dipolo apresentado pelos compostos, uma vez que, o parâmetro polarizabilidade está relacionado com a capacidade do solvente em estabilizar uma carga do soluto.

Por meio de dados experimentais o AZA10 apresentou o momento dipolo igual a 9,37µ Debye, em contraste o AZA2 resultou em 7,21µ Debye, logo o composto AZA2 é mais facilmente estabilizado comparado com o AZA10, acarretando em um menor efeito da polarizabilidade sobre o soluto.

Outra observação feita é que em ambos os derivados o parâmetro basicidade referente a capacidade do solvente em receber prótons do soluto não influência na solvatação, visto que, os valores de R² permaneceram-se inalterados. Esses resultados corroboram com as estruturas dos compostos, pois os mesmos não apresentam sítios ácidos para doarem prótons para o solvente.

A influência do parâmetro polarizabilidade na solvatação do AZA2 e AZA10 também pode ser observado nos gráficos das FIG.46 e 47 por meio da regressão linear quando aplicado a estratégia multiparamêtrica de Catalán com todos os parâmetros analisados e com a exclusão do parâmetro SP.



Figura 46: Relação entre os valores de E_T mensurado e calculado para o composto AZA2 considerando as estratégias de Catalán (Equação 4) usando todos os parâmetros (A) e sem o parâmetro SP (polarizabilidade) (B)



Figura 47: Relação entre os valores de E_T mensurado e calculado para o composto AZA10 considerando as estratégias de Catalán (Equação 4) usando todos os parâmetros (A) e sem o parâmetro SP (polarizabilidade) (B)

Assim, os valores confirmam que a solvatação ocorre principalmente por meio de interações não específicas, enquanto que as interações específicas como ligações de hidrogênio não apresentam influências na solvatação do corante.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste trabalho conclui-se que os resultados obtidos foram satisfatórios, apesar das dificuldades de resposta dos sensores fluorescente propostos.

Constatou-se que os compostos oxazolônicos estudados, possuem grande estabilização frente a uma amina primária nas condições reacionais estudadas, assim não foi possível obter uma resposta favorável e reprodutiva do sensor, logo para reverter esse quadro são necessários estudos mais sistemáticos das condições de reação, no intuito de aumentar a reatividade dos compostos, ficando como ideia para posteriores trabalhos.

No estudo solvatocrômico proposto com esses compostos, constatou-se que os derivados AZA2 e AZA10 apresentam comportamento solvatocrômico, logo eles podem ser utilizados para o estudo da polaridade do meio. Na investigação de polaridade de solventes puros verificou-se que esses corantes apresentam solvatocromismo reverso, onde observou-se que na faixa de concentrações das soluções estudadas não ocorreu agregação do soluto. Verificou-se também que os compostos não sofrem fotoisomerização, uma vez que não houve modificações espectrais da banda solvatocrômica, quando submetidos a irradiação com luz ultravioleta. Assim o solvatocromismo reverso exibido pelo composto, pode ser atribuído a diferentes estabilizações das formas de ressonância (benzenoide e quinonoide).

Conclui-se também, que os derivados AZA8 e AZA13 apresentaram inaplicabilidade como sondas devido a característica aceitador de elétrons dos substituintes, diminuindo a possibilidade de transferência de cargas entres os grupos.

E através dos estudos das estratégias multiparamétricas, foi constatado que a estratégia de Catalán revelou-se mais adequada para descrever os sistemas estudados e que o parâmetro de polarizabilidade representa uma parcela significativa de contribuição para a interação soluto-solvente dos dois derivados analisados.

86

ANEXOS

Tabela A1 : Valores dos parâmetros das estratégias multiparamétricas de KATe Catalán

SOLVENTE	SA ^a	SB ^a	SdP ^a	SP ^a	π* ^b	β ^b	αa
Acetona	0	0,475	0,907	0,651	0,651	0,651	0,651
Álcool etílico	0,4	0,658	0,783	0,633	0,633	0,633	0,633
Cichohexano	0	0,073	0	0,683	0,683	0,683	0,683
Clorofórmio	0,047	0,071	0,614	0,783	0,783	0,783	0,783
Diclorometano	0,04	0,178	0,769	0,769	0,769	0,769	0,769
Dioxano	0	0,444	0,312	0,737	0,737	0,737	0,737
Triclorometano	0	0,044	0	0,768	0,768	0,768	0,768
THF	0	0,591	0,634	0,714	0,714	0,714	0,714
Tolueno	0	0,128	0,284	0,782	0,782	0,782	0,782
Metanol	0,605	0,545	0,904	0,608	0,608	0,608	0,608
2-isopropanol	0,283	0,83	0,808	0,633	0,633	0,633	0,633
Acetonitrila	0,044	0,286	0,974	0,645	0,645	0,645	0,645
DMSO	0,072	0,647	1	0,83	0,83	0,83	0,83
DMF	0,031	0,613	0,977	0,759	0,759	0,759	0,759
Acetato de etila	0	0,542	0,603	0,656	0,656	0,656	0,656
n- hexano	0	0,056	0	0,616	0,616	0,616	0,616
Ciclohexanona	0	0,482	0,745	0,766	0,766	0,766	0,766

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ROSEN, T. 1.12 Perkin Reaction. **Comprehensive Organic Synthesis**, v. 0, n. 2, p. 395–408, 1883.

[2] FAN, L. J. et al. Fluorescent conjugated polymer molecular wire chemosensors for transition metal ion recognition and signaling. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 3–4, p. 410–422, 2009.

[3] WISKUR, S. L. et al. Teaching old indicators new tricks. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, n. 12, p. 963–972, 2001.

[4] REICHARDT, C. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. **Chemical Reviews**, v. 94, p. 2319–2358, 1994.

[5] REICHARDT, C. Solvatochromism, thermochromism, piezochromism, halochromism, and chiro-solvatochromism of pyridinium N-phenoxide betaine dyes. **Chemical Reviews**, v. 21, p. 147–153, 1992.

[6] CHRISTIAN REICHARDT. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry. [s.l: s.n.].

[7] VALEUR, B. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. [s.l: s.n.]. v. 8

[8] SKOOG, D.A; HOLLER, F.J.;NIEMAN, T.A. Princípios de Análise Instrumental. 5^a edição ed. Porto Alegre: [s.n.].

[9] LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy. [s.l: s.n.].

[10] PAVONI, J. . et al. Uma montagem experimental para a medida de fluorescencia. v. 4501, 2014.

[11] MÁÑEZ, M. R.; SANCENÓN, F. Fluorogenic and chromogenic chemosensors and reagents for anions. [s.l: s.n.]. v. 103

[12] LICHTMAN, J. W.; CONCHELLO, J. Fluorescence microscopy. v. 2, n. 12, 2005.

[13] COMBS, C. A. NIH Public Access. Computer, v. 144, n. 5, p. 724–732, 2008.
[14] MARINI, V. G.; MARIA, L.; GAGEIRO, V. Ensaios analíticos baseados em quimiossensores cromogênicos e fluorogênicos para a detecção de cianeto Analytical assays based on chromogenic and fluorogenic chemosensors for the

detection of cyanide Introdução. v. 2, n. 1, p. 1-40, 2010.

[15] MOTA, A. A. R. et al. Fotofísica Teórica (DFT) de Sondas Fluorescentes Benzotiadiazólicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 357, 2015.

[16] OZTURK, G.; ALP, S.; ERTEKIN, K. Fluorescence emission studies of 4-(2-furylmethylene)-2-phenyl-5-oxazolone embedded in polymer thin film and detection of Fe3+ ion. **Dyes and Pigments**, v. 72, n. 2, p. 150–156, 2007.

[17] YILDIRIM, N. et al. Sol-gel encapsulated glucose oxidase arrays based on a pH sensitive fluorescent dye. **Dyes and Pigments**, v. 89, n. 2, p. 144–148, 2011.
[18] BAI, Y. et al. Fluorescent molecular probes for the detection of chemical warfare agents and their mimics. **Frontiers of Chemistry in China**, v. 5, n. 2, p. 123–133, 2010.

[19] BURNWORTH, M.; ROWAN, S. J.; WEDER, C. Fluorescent sensors for the detection of chemical warfare agents. **Chemistry - A European Journal**, v. 13, n. 28, p. 7828–7836, 2007.

[20] WANG, Y. et al. Near-infrared excitation of CdTe quantum dots based on fluorescence resonance energy transfer and their use as fluorescent sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 246, p. 127–135, 2017.

[21] SALARINI, B. et al. Síntese e avaliação de uma oxazolona na inibição de corrosão e de seu comportamento de adsorção em aço-carbono A36. n. lc, p. 36–37, 2010.

[22] CARTER, H.E. Azlactones. Org. React., New York, v.3, p. 198-239, 1946.
[23] ROSA, M.F. et al. Fotodegradação De Um Derivado Azalactônico Em Diferentes Solventes Utilizando Radiação Ultravioleta Em Fotorreator. Var. Sci., Cascavel, v. 10, n.5, p. 75–85, 2005a.

[24] ERTEKIN, K. et al. Glucose sensing employing fluorescent pH indicator: 4-[(p-N,N-dimethylamino)benzylidene]-2-phenyloxazole-5-one. Dyes andPigments, v. 67, n. 2, p. 133–138, 2005.

[25] ERTEKIN, K. et al. Photophysical and photochemical characteristics of an azlactone dye in sol-gel matrix; a new fluorescent pH indicator. **Dyes and Pigments**, v. 56, n. 2, p. 125–133, 2003.

[26] HEILMANN, S. M. et al. Azlactone-reactive polymer supports for immobilizing synthetically useful enzymes: Part I. Pig liver esterase on dispersion polymer supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 1, p. 33–42, 2004.

[27] ERTEKIN, K.; ALP, S.; YALCIN, I. Determination of pKa values of azlactone dyes in non-aqueous media. **Dyes and Pigments**, v. 65, n. 1, p. 33–38, 2005.

[28] OZTURK, G.; ALP, S.; TIMUR, S. Photophysical characterization of fluorescent oxazol-5-one derivatives in PVC and their application as biosensors in the detection of ACh and AChE inhibitor: Donepezil. **Dyes and Pigments**, v. 76, n. 3, p. 792–798, 2008.

[29] ERTEKIN, K.; ALP, S. Enhanced emission based optical carbon dioxide sensing in presence of perfluorochemicals (PFCs). Sensors and Actuators, B: Chemical, v. 115, n. 2, p. 672–677, 2006.

[30] TAYLOR, S.; EITENMILLER, R. Histamine Food Poisioning: Toxicology and Clinical Aspecits. [s.l: s.n.]. v. 17

[31] LOURIVAL LARINI. **Fármacos e Medicamentos**. Artmed ed. Porto Alegre: [s.n.].

[32] LUCIA, R. DE. Farmacologia integrada. 5. ed. São Paulo: [s.n.].

[33] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675–690, 1996.

[34] GOMES, M. B. et al. O risco das aminas biogênicas nos alimentos. Ciência& Saúde Coletiva, v. 19, n. 4, p. 1123–1134, 2014.

[35] SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: Their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 2–3, p. 213–231, 1995.

[36] SMITH, T. A. Amines in food. Food Chemistry, v. 6, n. 3, p. 169–200, 1981.
[37] BRINK, B. TEN et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. International Journal of Food Microbiology, v. 11, n. 1, p. 73–84, 1990.

[38] BRASIIL, Portaria Nº 185, DE 13 de maio de 1997 do Ministro de estado da agricultura e do abastecimento. , 1997.

[39] BUNCEL, E.; RAJAGOPAL, S. Solvatochromism and Solvent Polarity Scales. Accounts of Chemical Research, v. 23, n. 7, p. 226–231, 1990.

[40] DAMASCENO, M. V. A. Estudos Teóricos dos Efeitos de Solvente no Espectro De Absorção Eletrônica da Merocianina de Brookere Derivados. Instituto de Física da Universidade de São Paulo. p. 174, 2009.

[41] BUCKINGHAM, A. D.; LIPPERT, E.; BRATOS, S. Organic Liquids:
Structure, dynamics, and chemical properties. John Wiley ed. [s.l: s.n.].
[42] MARCUS, Y. The properties of solvents. John Wiley ed. [s.l: s.n.].

[43] ISHCHENKO, A. A. et al. Electronic structure and fluorescent properties of malononitrile-based merocyanines with positive and negative solvatochromism.

Optics and Spectroscopy (English translation of Optika i Spektroskopiya), v. 104, n. 1, p. 57–68, 2008.

[44] CHA, S. et al. Negative solvatochromism of merocyanine dyes: Application as water content probes for organic solvents. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 157, n. 1, p. 14–18, 2011.

[45] CATALÁN, J. Do stilbazolium betaine dyes exhibit inverted solvatochromism by changes in solvent dipolarity? **Dyes and Pigments**, v. 95, n. 2, p. 180–187, 2012.

[46] STOCK, R. I. et al. Synthesis and Solvatochromism of Substituted 4- (Nitrostyryl) phenolate Dyes. p. 1–40, [s.d.].

[47] KAMLET, M. J. et al. Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, .pi.*, .alpha., and .beta., and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. **Journal of organic chemistry**, v. 48, p. 2877–2887, 1983.

[48] CATALÁN, J.; LÓPEZ, V.; PÉREZ, P. Solvent dipolarity/polarizability (SPP) of alcoholic solvents. Liebigs Annalen, v. 1995, n. 5, p. 793–795, 1995.

[49] NIEDBALSKA, M.; GRUDA, I. Effect of substituents on the solvatochromism of stilbazolium merocyanines. Canadian journal of chemistry, v. 68, n. 3, 1990.
[50] MACHADO, V. G.; STOCK, R. I.; REICHARDT, C. Pyridinium N-phenolate betaine dyes. Chemical Reviews, v. 114, n. 20, p. 10429–10475, 2014.

[51] TSUKADA, M.; MINEO, Y.; ITOH, K. Resonace Raman and surfaceenhanced resonance Raman scattering study on the structure of a merocyanine dye, 4-(2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl)-1-methylpyridinium. **Journal of Physical Chemistry**, v. 93, n. 24, p. 7989–7992, 1989.

[52] PETERS, A. T.; FREEMAN, H. S. **Physico-Chemical Principles of color Chemistry**. Blackie Ac ed. London: [s.n.].

[53] INGLE, J.D. JR.; CROUCH, S. R. Spectrochemical analysis. [s.l: s.n.].

[54] GREEN, B. et al. Aggregation phenomena in xanthene dyes. **Accounts of Chemical Research**, v. 22, n. 5, p. 171–177, 1989.

[55] PENZKOFER, A.; SPERBER, P. Measurement of absorption cross sections in the long-wavelength region of the S₀-S₁ absorption band of dyes. **Chemical Physics**, v. 88, n. 2, p. 309–313, 1984. [56] CATALÁN, J. Toward a generalized treatment of the solvent effect based on four empirical scales: Dipolarity (SdP, a new scale), polarizability (SP), acidity (SA), and basicity (SB) of the medium. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 17, p. 5951–5960, 2009.