

WALYSSON FERREIRA DE PAIVA

SÍNTESE DE DERIVADOS DE JULOLIDINAS COMO SENSORES QUÍMICOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Sergio Antonio Fernandes

Coorientador: Ângelo de Fátima

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Paiva, Walysson Ferreira de, 1994-
P149s Síntese de derivados de julolidinas como sensores químicos
2021 / Walysson Ferreira de Paiva. – Viçosa, MG, 2021.
84 f.: il. (algumas color.).

Orientador: Sergio Antonio Fernandes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Química, 2021.
Referências bibliográficas: f. 80-84.

1. Benzimidazol. 2. Benzotiazol. 3. Sondas fluorescentes.
I. Fernandes, Sergio Antonio. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação
em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 547.611

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

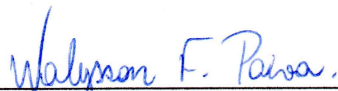
WALYSSON FERREIRA DE PAIVA

SÍNTESE DE DERIVADOS DE JULOLIDINAS COMO SENSORES QUÍMICOS

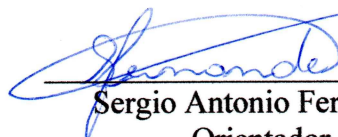
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 04 de março de 2021.

Assentimento:



Walysson Ferreira de Paiva
Autor



Sergio Antonio Fernandes
Orientador

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e dar forças para vencer mais esta etapa.

Ao professor e orientador Sergio, por tudo que me ensinou nesses últimos anos, pela oportunidade de aprendizado, pela confiança, pelos ensinamentos e broncas que contribuíram significativamente no meu crescimento pessoal e acadêmico, pela motivação e pelo exemplo.

Aos meus pais por todo apoio e amor incondicional.

À Isabella, por todo amor, carinho, companheirismo, cuidado e paciência durante toda minha vida acadêmica e por sempre torcer e acreditar no meu potencial.

Aos amigos do GQSB pelo companheirismo no dia a dia no laboratório, em especial ao Gabriel por ser sempre muito prestativo e pela ajuda nos experimentos finais e à Anna Luísa, amiga em todos os momentos de vitória ou de derrota desde o início da graduação até aqui, serei eternamente grato pela sua amizade. À Amanda pela amizade e por ouvir minhas reclamações e rir dos meus surtos, que não foram poucos nestes últimos tempos. À Sarah pela amizade e por estar sempre presente.

Ao Mathews pela condução dos experimentos analíticos, sua ajuda foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Ao Castelo pela ajuda nos experimentos e ao Professor Willian pela oportunidade de execução dos experimentos.

Aos professores Eduardo, Josué, Willian e Vagner por aceitarem fazer parte da banca avaliadora.

A todos que torceram por mim e contribuíram de alguma forma nesse processo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*"Together we stand, divided we fall."
(Pink Floyd)*

RESUMO

PAIVA, Walysson Ferreira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Síntese de derivados de julolidinas como sensores químicos**. Orientador: Sergio Antonio Fernandes. Coorientador: Ângelo de Fátima.

Compostos heterocíclicos são moléculas orgânicas que possuem no anel um átomo diferente do carbono, como enxofre, oxigênio ou nitrogênio, podendo este anel ser aromático ou não. A química de compostos heterocíclicos é uma importante área da química orgânica que vem recebendo grande atenção da comunidade científica ao longo dos anos, por serem compostos amplamente distribuídos pela natureza e serem essenciais para a vida, desempenhando um papel vital no metabolismo das células. As julolidinas e os benzimidazóis são duas classes de compostos heterocíclicos que vem recebendo destaque nos últimos anos, devido às suas diversas aplicações e atividades biológicas reportadas na literatura. Outra área da química que vem recebendo atenção da comunidade científica nos últimos anos é a de sensores químicos fluorogênicos ou cromogênicos, que se baseiam no desenvolvimento de sistemas de detecção de espécies químicas, mediante mudança espontânea de cor ou emissão de radiação (fluorescência). Neste trabalho foram sintetizados oito derivados de julolidinas – quatro delas inéditas – que serão avaliados como sensores químicos fluorogênicos e/ou cromogênicos em diversas análises, como na detecção de fosfatase alcalina, detecção de espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso e na detecção de íons metálicos em solução. Quatro das moléculas sintetizadas tiveram sua capacidade de complexação com diferentes metais avaliada e uma delas se mostrou seletiva para a complexação de Cu(II) em meio básico. Com isso, foram avaliados diversos parâmetros – concentração ótima de NaOH e ligante, cinética reacional, razão estequiométrica metal/ligante, seletividade, recuperação e precisão – e foi desenvolvida uma metodologia rápida, de baixo custo e de fácil acesso para determinação do teor de cobre em cachaças, que apresentou boa exatidão e precisão (CV = 4,5%).

Palavras-chave: Benzimidazois. Benzotiazois. Sondas fluorescentes.

ABSTRACT

PAIVA, Walysson Ferreira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2021. **Synthesis of julolidines derivatives as chemical sensors**. Adviser: Sergio Antonio Fernandes. Co-adviser: Ângelo de Fátima.

Heterocyclic compounds are organic molecules that have another atom in their ring instead of carbon, such as sulfur, oxygen, or nitrogen. Besides, this molecules ring may be aromatic or not. The chemistry of heterocyclic compounds is an important area of organic chemistry that has received great attention from the scientific community over the years, since these compounds are widely available in nature and they are essential for life, providing a vital role in the metabolism of cells. Julolidines and benzimidazoles are two classes of heterocyclic compounds that are in the spotlight in recent years, due to their various applications and biological activities, which were reported in the literature. There is another area of chemistry receiving attention from the scientific community in recent years, which is fluorogenic or chromogenic chemical sensors. These sensors are based on the development of chemical species detection systems, through spontaneous color change or radiation emission (fluorescence). In this work, eight derivatives of julolidines were synthesized – four of them unpublished – and will be evaluated as fluorogenic and/or chromogenic chemical sensors in some analyzes, such as in the detection of alkaline phosphatase, detection of reactive oxygen species such as hydrogen peroxide and hypochlorous acid, and in the detection of metal ions in solution. We evaluated four of the synthesized molecules in their ability to complex with different metals. Furthermore, we proved that one of them is selective in complexing Cu(II) in an alkaline solution. Moreover, several parameters of these molecules were evaluated – optimal concentration of NaOH and ligand, reaction kinetics, stoichiometric metal/ligand ratio, selectivity, recovery, and precision – and a fast, low cost, and easily accessible methodology was developed for copper determination in cachaças, which presented good accuracy and precision (CV = 4.5%).

Keywords: Benzimidazoles. Benzothiazoles. Fluorescent probes.

SUMÁRIO

1.	Introdução	10
1.1.	Julolidinas	10
1.2.	Benzimidazois e benzotiazois	12
1.3.	Sondas fluorogênicas latentes.....	13
1.4.	Métodos digitais de análise.....	16
1.4.1.	Teoria das cores.....	16
1.4.2.	Modelo de cor RGB em imagens digitais	17
1.4.3.	Métodos analíticos baseados em imagens digitais	18
2.	Objetivos	18
3.	Resultados e discussão	19
3.1.	Síntese da benzimidazoljulolidina	19
3.2.	Síntese da benzotiazoljulolidina.....	23
3.3.	Síntese das sondas fluorogênicas latentes	30
3.3.1.	Síntese das sondas fluorogênicas latentes para detecção de ERO.....	30
3.3.2.	Síntese das sondas fluorogênicas latentes para detecção de fosfatase	30
3.3.3.	Caracterização das sondas fluorogênicas latentes sintetizadas.....	31
3.4.	Síntese das imino-julolidinas.....	44
3.5.	Ensaio de complexação com metais	52
3.6.	Otimização das condições reacionais e procedimentos operacionais	53
3.7.	Determinação da razão estequiométrica Cu(II)/IJN.....	56
3.8.	Validação analítica – determinação de Cu(II) em amostras de cachaça.....	58
4.	Conclusão.....	65
5.	Perspectivas	65
6.	Parte Experimental.....	66
6.1.	Metodologia geral.....	66
6.2.	Síntese da benzimidazoljulolidina (BIJ).....	66

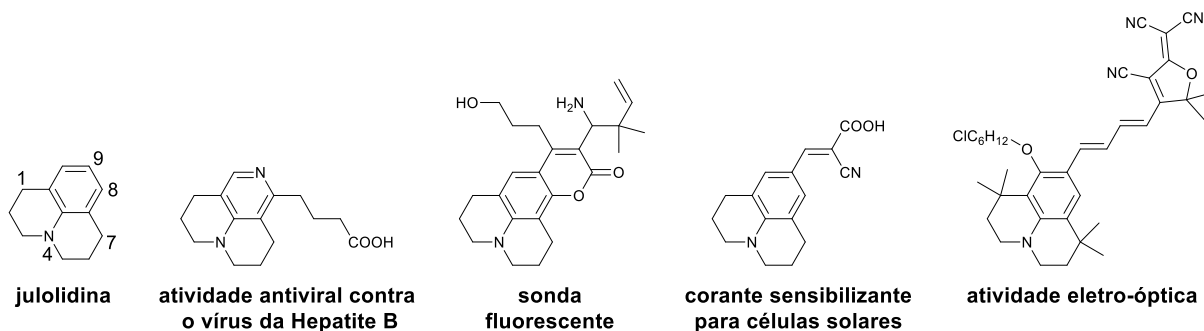
6.3.	Síntese da benzotiazoljulolidina (BTJ).....	67
6.4.	Síntese da sonda fluorogênica latente para detecção de fosfatase (BIJ-F2).....	67
6.5.	Síntese da sonda fluorogênica latente para detecção de fosfatase (BTJ-F2).....	68
6.6.	Procedimento geral para a síntese das sondas fluorogênicas latentes para detecção de ERO (BIJ-H e BTJ-H)	69
6.7.	Procedimento geral para a síntese das imino-julolidinas IJN e IJO	69
6.8.	Soluções e amostras.....	69
6.9.	Aparato para aquisição dos dados RGB	70
6.10.	Otimização dos parâmetros operacionais	71
7.	Dados espectroscópicos.....	72
8.	Referências bibliográficas	80

1. Introdução

1.1. Julolidinas

Julolidinas são compostos *N*-heterocíclicos, derivados da 2,3,6,7-tetraidro-1*H*,5*H*-benzo[*ij*]-quinolizina, que são conhecidas e estudadas há mais de um século. A julolidina e seus derivados são uma importante classe de *N*-heterocíclicos e vêm recebendo enorme atenção da comunidade científica nas últimas décadas devido às suas diversas propriedades e aplicações, sendo reportadas como substâncias com atividade antiviral (ZHANG *et al.*, 2018), sondas fluorescentes (SCHULZ-FINCKE *et al.*, 2018), corantes sensibilizantes para células solares (WU *et al.*, 2013), antidepressivos (VEJDĚLEK; PROTIVA, 1990) e materiais ópticos não-lineares (LIU *et al.*, 2016) (**Figura 1**).

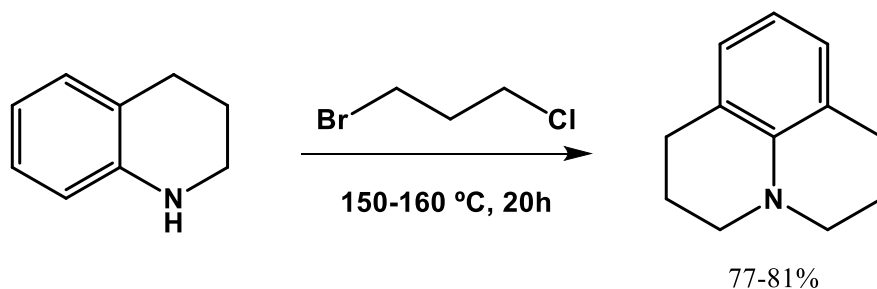
Figura 1 – Algumas estruturas químicas e propriedades das julolidinas.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Em 1892, Pinkus descreveu a primeira rota sintética para acessar a estrutura básica das julolidinas (PINKUS, 1892). O método clássico para a síntese da julolidina consiste na *N*-alquilação de tetraidroquinolinas, formilamidas ou anilinas, geralmente utilizando 1-bromo-3-cloropropano (VAREJÃO; VAREJÃO; FERNANDES, 2019). Uma desvantagem deste método é a limitação quanto à introdução de substituintes no esqueleto da julolidina, mas por conta de sua simplicidade segue sendo utilizado até os dias atuais. Um exemplo do uso do método clássico na síntese de julolidinas foi reportado por Glass e Weissberger em 1955, onde, partindo da 1,2,3,4-tetraidroquinolina e 1-bromo-3-cloropropano sob aquecimento, obtiveram a julolidina com rendimentos variando de 77 a 81%. (GLASS; WEISSBERGER, 1955) (**Esquema 1**).

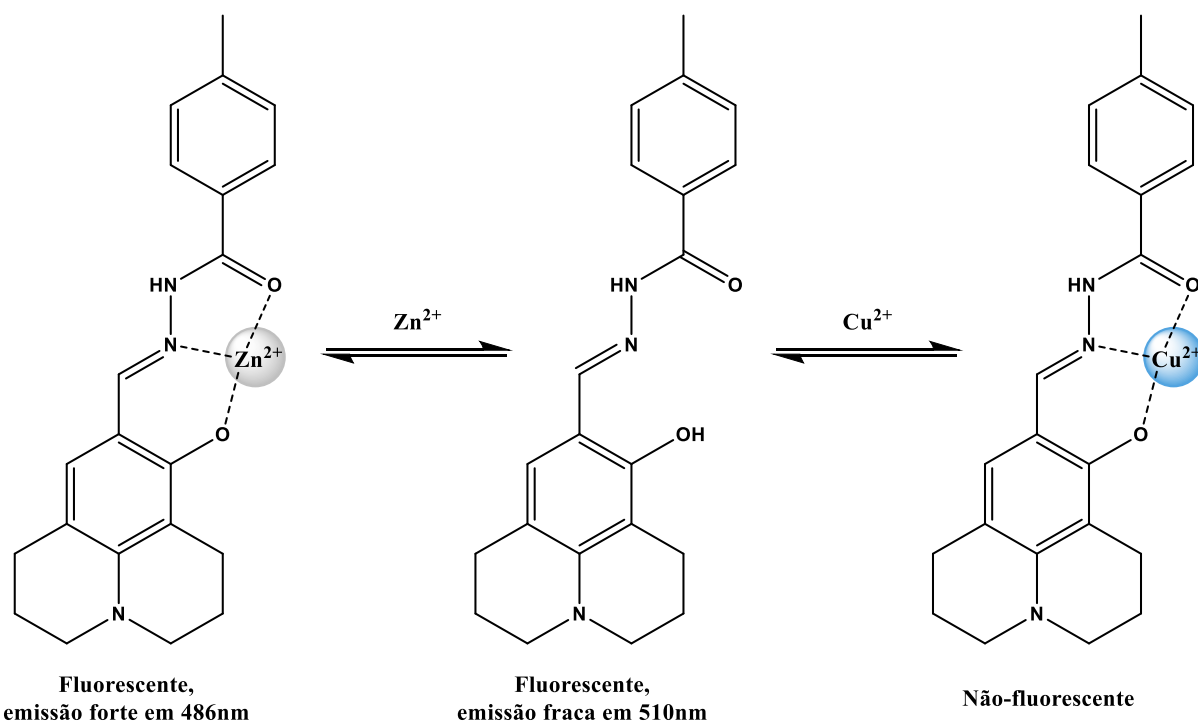
Esquema 1 – Rota sintética clássica para a obtenção da julolidina.



Fonte: Adaptado de Glass e Weissberger (1955).

A partir destes trabalhos, novas metodologias vêm sendo desenvolvidas para a síntese de julolidinas. Por conta de suas propriedades fluorescentes, as julolidinas vêm sendo estudadas como sensores químicos para diversas aplicações (VAREJÃO; VAREJÃO; FERNANDES, 2019), como detecção de íons em solução aquosa (**Esquema 2**) (GANESAN *et al.*, 2019), detecção de compostos orgânicos voláteis (MARTINI *et al.*, 2015) e na obtenção de imagens em células vivas (JI; DAI; ZHOU, 2019).

Esquema 2 – Sensor químico fluorescente para detecção de Zn^{2+} e Cu^{2+} baseado em julolidina reportado por Ganesan *et al.* (2019).

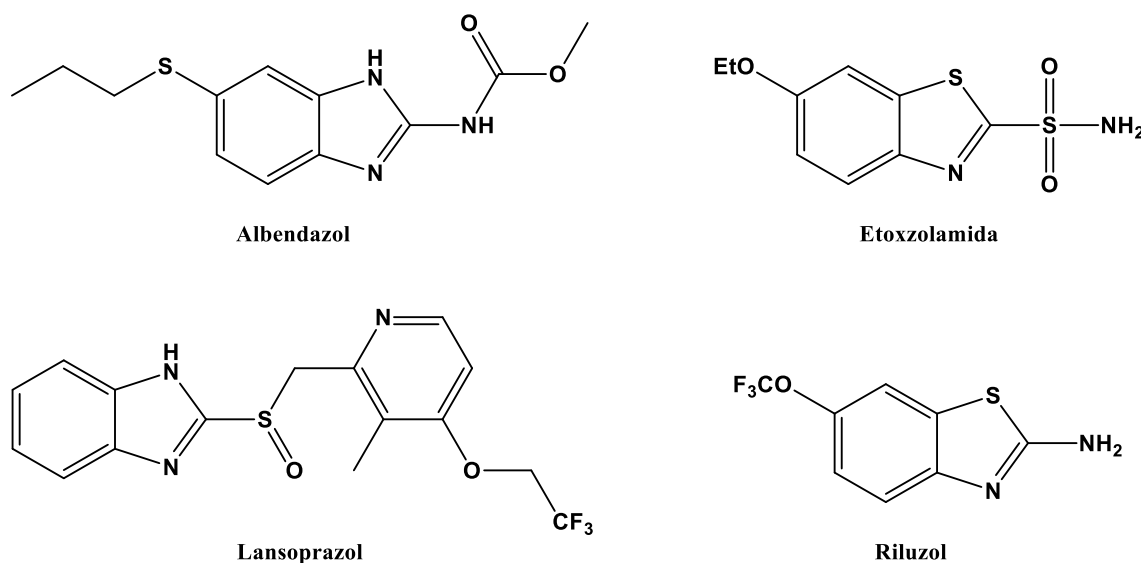


Fonte: Adaptado de Ganesan *et al.* (2019).

1.2. Benzimidazois e benzotiazois

Os benzimidazois e os benzotiazois são compostos caracterizados pela presença de um sistema bicíclico heteroaromático e desempenham um importante papel no planejamento de novos fármacos, visto que este grupo se faz presente na estrutura química de diversos produtos naturais com atividades biológicas reportadas, como atividade antiviral, antibacteriana, antidepressiva, anticâncer e antiparkinson (BACHHAV; BHAGAT; TELVEKAR, 2011; KHOSRAVI; KAZEMI, 2012). Estes compostos também são encontrados em diversos fármacos comerciais como o albendazol, um anti-helmíntico utilizado no tratamento de verminoses; o lansoprazol, um inibidor da bomba de prótons utilizado no tratamento de úlceras e refluxo gastroesofágico; o riluzol, utilizado no tratamento da esclerose lateral amiotrófica; e a etoxzolamida, utilizada no tratamento de glaucoma e de úlceras duodenais (**Figura 2**) (SANTOSH; PANDEYA; PATHAK, 2012; VELÍK *et al.*, 2004).

Figura 2 – Estruturas químicas do albendazol, da etoxzolamida, do lansoprazol e do riluzol.

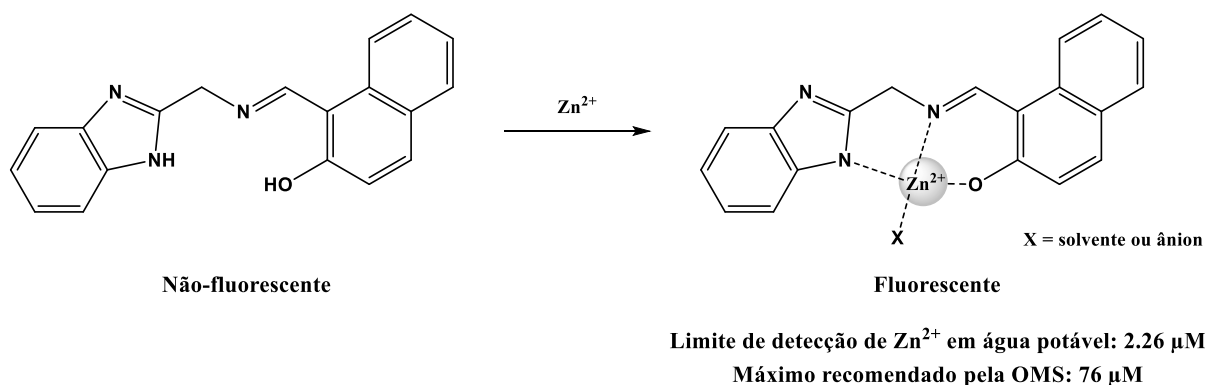


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Além do uso como fármacos, os derivados dos benzimidazois e benzotiazois vêm sendo bastante explorados como sondas fluorescentes em diversas aplicações. Kim *et al.* reportaram em 2013 a síntese de uma sonda fluorescente baseada em benzimidazol para a detecção de H⁺ para o monitoramento de pH em tecidos e células vivas (KIM; HEO; KIM, 2013). Outra sonda fluorescente, contendo o núcleo benzimidazólico, foi reportada em 2019 por Yun *et al.* para a detecção de Zn²⁺ em solução aquosa (**Esquema 3**) (YUN *et al.*, 2019). Ainda em 2019, Yangyang *et al.* desenvolveram a partir de um derivado do benzotiazol uma sonda fluorescente

com alta sensibilidade para a detecção de fosfatase alcalina (YANGYANG *et al.*, 2019). Em 2020, outra sonda fluorescente derivada do benzotiazol foi sintetizada por Wang *et al.*, desta vez, para a detecção de ácido hipocloroso (HClO) (WANG *et al.*, 2020).

Esquema 3 – Sonda fluorescente baseada em benzimidazol desenvolvida por Yun *et al.* (2019) para detecção de Zn^{2+} em água potável, com alta sensibilidade.



Fonte: Adaptado de Yun *et al.* (2019).

1.3. Sondas fluorogênicas latentes

Os sensores químicos fluorogênicos e cromogênicos vêm recebendo grande atenção no meio científico devido às diversas aplicações e pela alta sensibilidade dos métodos. As técnicas que envolvem fluorescência são significativamente mais sensíveis que as técnicas que envolvem colorimetria, o que desperta um maior interesse pelo desenvolvimento de novas metodologias de análise (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012).

O controle do sinal fluorescente é baseado em diferentes tipos de mecanismos como, por exemplo, a transferência de elétrons fotoinduzida (do inglês “*photoinduced electron transfer*” - PET), a fluorescência intensificada por quelação (do inglês “*chelation-enhanced fluorescence*” - CHEF), a transferência de energia de ressonância por fluorescência (do inglês “*fluorescence resonance energy transfer*” - FRET) e a transferência intramolecular de prótons no estado excitado (do inglês “*excited state intramolecular proton transfer*” - ESIPT) (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012).

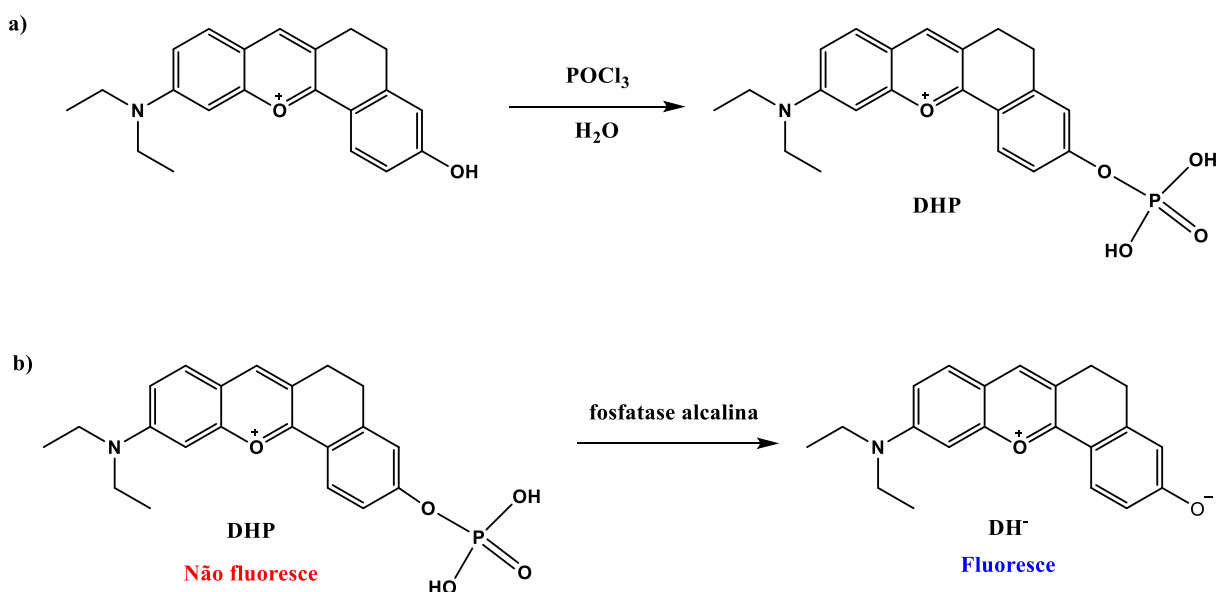
Baseados nos diferentes tipos de mecanismos de fluorescência, os sensores químicos fluorogênicos podem ser caracterizados como *on-off* (ligado-desligado) ou *off-on* (desligado-ligado). Sensores químicos baseados no conceito *off-on* são moléculas que não apresentam fluorescência e que, ao interagir com o analito de interesse, irão formar um complexo fluorescente ou sofrerão mudanças conformacionais ou estruturais, fazendo com que

apresentem fluorescência. Já sensores químicos baseados no conceito *on-off* são moléculas fluorescentes que, ao interagir com o analito de interesse, sofrerão uma redução ou anulação no sinal fluorescente (GONÇALVES; MARSAIOLI, 2014).

Sondas fluorogênicas latentes são sensores químicos baseados no conceito *off-on*, ou seja, são capazes de desenvolver fluorescência somente após uma série de reações desencadeadas pela ação do analito de interesse, e assim podem auxiliar na visualização em tempo real da detecção do analito (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012).

Um exemplo de sonda fluorogênica latente foi descrita por Xu *et al.* (2018) para detecção de fosfatase alcalina (**Esquema 4**) (XU *et al.*, 2018). Diversas doenças como câncer, diabetes e Alzheimer são associadas com atividades anormais de fosfatase no organismo. Portanto, monitorar a atividade dessa enzima é de grande interesse para a área de pesquisa em biomedicina (KIM *et al.*, 2009).

Esquema 4 – a) Síntese da sonda fluorogênica latente para detecção de fosfatase (DHP) reportada por Xu *et al.* (2018). b) Reação da sonda DHP (não fluorescente) com fosfatase alcalina gerando a espécie DH^- (fluorescente).

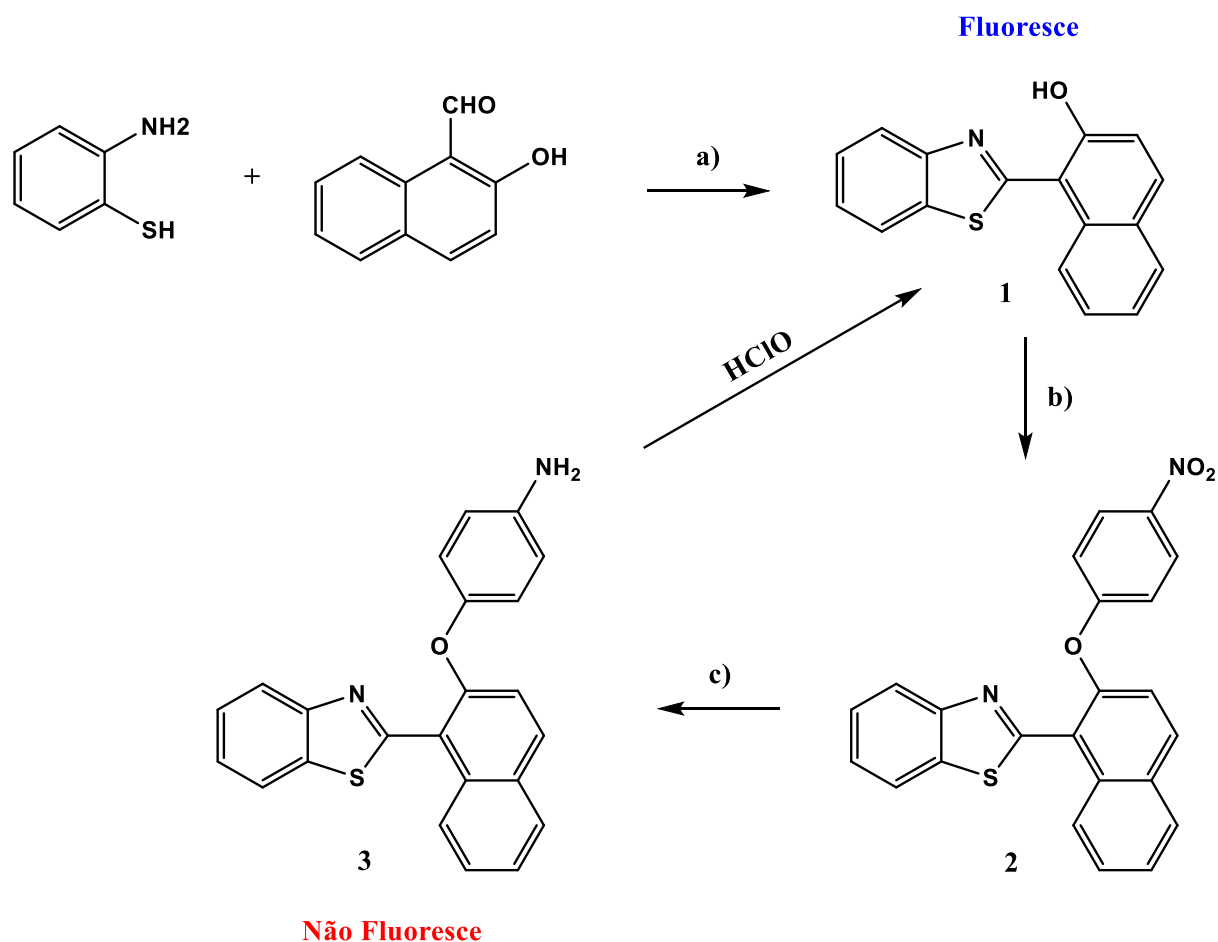


Fonte: Adaptado de Xu *et al.* (2018).

Outras espécies que merecem atenção são as chamadas espécies reativas de oxigênio (**ERO**), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HClO$). Essas espécies desempenham um papel importante na saúde humana. As **ERO**, quando em excesso, levam ao estresse oxidativo, o que causa danos irreversíveis aos tecidos ou células vivas. Níveis anormais

dessas espécies estão associadas a desordens degenerativas, diabetes, câncer e doenças inflamatórias. Um exemplo de sonda fluorogênica latente para detecção de ácido hipocloroso foi descrita por Liao *et al.* (2015) (**Esquema 5**) (LIAO *et al.*, 2015).

Esquema 5 – Síntese da sonda fluorogênica latente (3) para detecção de HClO reportada por Liao *et al.* (2015) e a reação entre 3 e HClO. a) Na₂S₂O₅, DMF, 120 °C; b) 4-cloronitrobenzeno, 60% NaH, DMF, 90 °C; c) H₂, Pd/C, MeOH, 25 °C, “overnight”.



Fonte: Adaptado de Liao *et al.* (2015).

Logo, é de grande importância o estudo e desenvolvimento de novos métodos de detecção e monitoramento das espécies citadas e o método de detecção por sondas fluorogênicas latentes é um dos mais promissores nesse sentido devido à sua alta sensibilidade e seletividade.

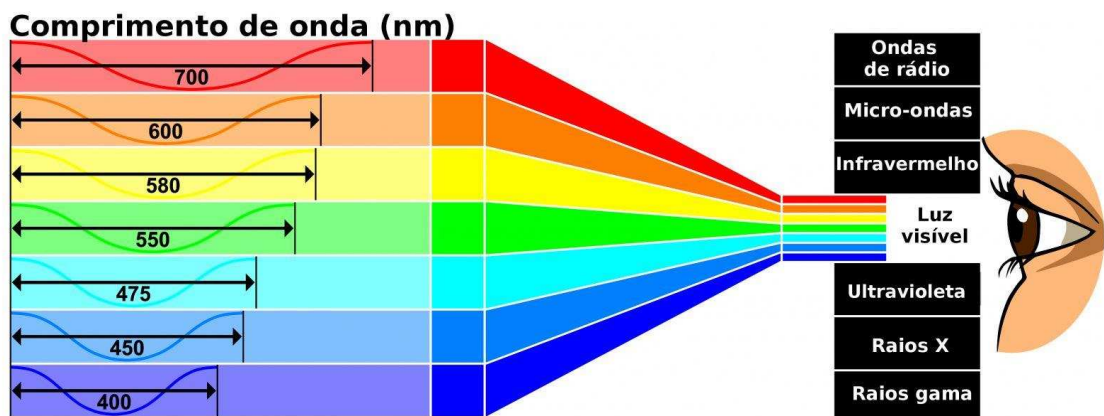
1.4. Métodos digitais de análise

Para que seja possível compreender o funcionamento dos métodos digitais como ferramenta de detecção de analitos, é preciso observar esse processo sob dois aspectos muito importantes. Primeiramente, entender como decorre o processo de formação das cores e sua primordial relação com as radiações incidente, absorvida e refletida. Em seguida, de que forma a radiação eletromagnética resultante (refletida) chega ao detector da câmera digital, para gerar a resposta analítica que, por sua vez, é originária dos modelos de decomposição de cores, especialmente o RGB.

1.4.1. Teoria das cores

Podemos definir a cor de uma imagem como a combinação de comprimentos de onda no espectro eletromagnético, na região do visível, que reflete sobre uma superfície (DAMASCENO *et al.*, 2015). O sistema visual humano é sensível à faixa do espectro eletromagnético que se estende aproximadamente de 400 a 700 nm, essa região é conhecida como região do espectro visível, conforme mostrado na **Figura 3** (TILLEY, 2010).

Figura 3 – Espectro eletromagnético destacando a região da luz visível.



Fonte: <<https://s5.static.brasilescuela.uol.com.br/img/2017/08/espectro-eletromagnetico.jpg>>

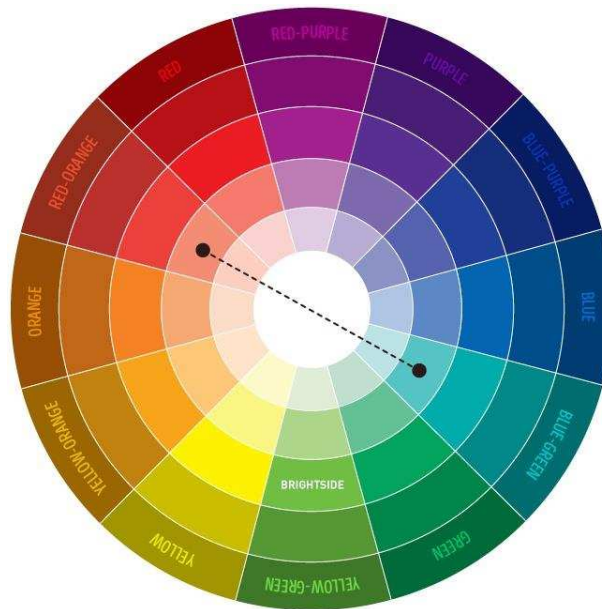
Acesso em: 21 fev. 2021.

Uma substância colorida absorve comprimentos de onda seletivos na região visível do espectro eletromagnético. A coloração resultante, chamada de cor complementar, é composta pelos comprimentos de onda que são refletidos por essa substância.

Se a cor exibida por uma determinada solução é azul, por exemplo, o canal que tem a maior absorção é o laranja (cor complementar). Nesse caso a cor laranja é absorvida pela

solução e a cor azul refletida até os nossos olhos ou até o detector digital. Na **Figura 4** é demonstrado um diagrama de cores complementares.

Figura 4 – Círculo cromático representando as cores e suas cores complementares.



Fonte: <<https://www.publicitarioscriativos.com/uploads/2016/12/publicitarioscriaitvos1.jpg>>
Acesso em: 21 fev. 2021.

1.4.2. Modelo de cor RGB em imagens digitais

Podemos representar as imagens digitais coloridas por diferentes modelos de cores, tais como: RGB (do inglês *Red*, *Green*, *Blue*), CMY (do inglês *Cyan*, *Magenta*, *Yellow*), HSL (do inglês *Hue*, *Saturation*, *Lightness*) e HSV (do inglês *Hue*, *Saturation*, *Value*) (PACIORNIK *et al.*, 2006).

O modelo RGB é reconhecido como o sistema de cor mais amplo e mais aceito (LOPEZ-MOLINERO *et al.*, 2010). As cores primárias – vermelha, verde e azul – são empregadas nesse modelo e a luz transmitida é utilizada para exibição das cores (YAM; PAPADAKIS, 2004). As demais cores são geradas pela combinação linear destas três, motivo pelo qual o modelo é dito aditivo.

As intensidades das cores geradas são armazenadas em 256 níveis, adotando, para isso, uma escala de 0 a 255. Dessa forma, a cor preta pura representa a escala 0, enquanto a escala 255 é representada pela cor branca pura (PACIORNIK *et al.*, 2006).

1.4.3. Métodos analíticos baseados em imagens digitais

Os avanços significativos nos métodos de análise buscam alcançar não apenas resultados satisfatórios, mas também acessíveis e práticos aos usuários. Nos últimos anos, a busca por métodos simples, precisos, exatos e de baixo custo tem sido um grande desafio para esse campo de pesquisa. A descoberta e os avanços em métodos de análises de custo reduzido e de fácil manuseio possibilitam uma forte interação entre o meio acadêmico e a sociedade.

Nesse sentido, podemos afirmar que o desenvolvimento da tecnologia de dispositivos digitais tem se aperfeiçoado consideravelmente nos últimos anos, como, por exemplo, nas câmeras fotográficas, webcams, scanners e celulares com câmeras embutidas, de forma que, mesmo os aparelhos de menor valor, exercem hoje as funções necessárias para a realização de um procedimento de análise (PACIORNIK *et al.*, 2006).

Em virtude da rápida captura de imagens, estabilidade de fundo e boa linearidade, o uso de câmeras com sensores CCD (do inglês, *Charge Coupled Device*) e CMOS (do inglês, *Complementary Metal Oxide Semicondutor*) propiciam o desenvolvimento de novos métodos analíticos com alta sensibilidade, robustez, rapidez e baixo custo de implementação (CACIANO DE SENA *et al.*, 2011).

Estes sensores são capazes de converter a intensidade da luz incidente em valores digitais armazenáveis – bits – e a resposta analítica gera uma imagem baseada em um modelo de decomposição de cor, no qual são utilizadas matrizes para armazenar as informações contidas em uma imagem (FRANCO *et al.*, 2017).

O uso de imagens digitais representa uma oportunidade atual para o desenvolvimento de determinações quantitativas rápidas e diretas, principalmente quando combinadas com métodos colorimétricos ou cromogênicos, que podem ser analisados a partir de dados do modelo de cores RGB, HSV, HSY, entre outros (LOPEZ-MOLINERO *et al.*, 2010). Dessa forma, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos empregando imagens digitais para quantificação de analitos.

2. Objetivos

- Sintetizar a benzimidazoljulolidina a partir da 9-formil-8-hidroxiulolidina e *o*-fenilenodiamina;
- Sintetizar a benzotiazoljulolidina a partir da 9-formil-8-hidroxiulolidina e 2-aminobenzenotiol;
- Sintetizar imino-julolidinas;

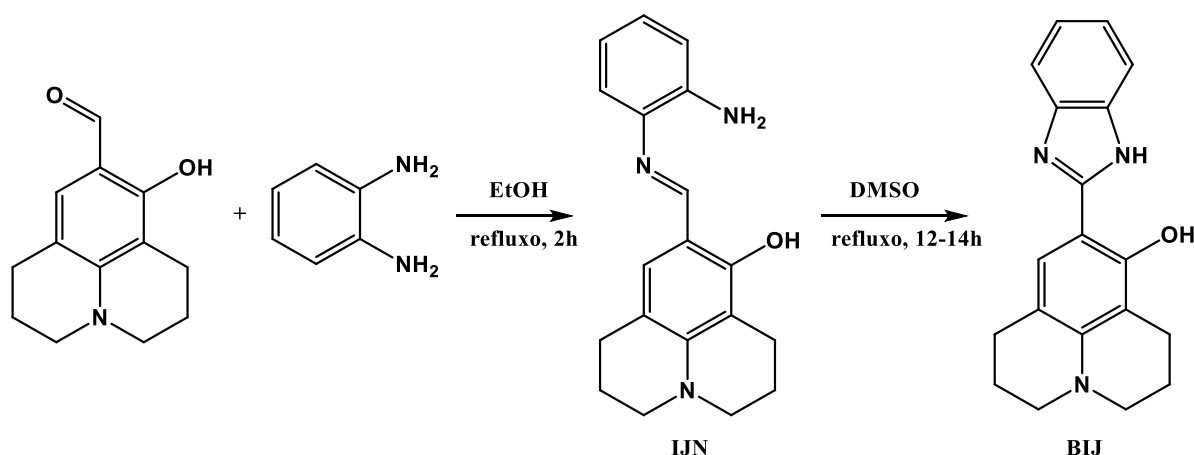
- Sintetizar sondas fluorogênicas latentes para detecção de fosfatase e espécies reativas de oxigênio (**ERO**) a partir da benzimidazoljulolidina e benzotiazoljulolidina;
- Avaliar a capacidade de complexação das imino-julolidinas com diferentes metais.

3. Resultados e discussão

3.1. Síntese da benzimidazoljulolidina

Shreykar e Sekar (2017) reportaram pela primeira vez a síntese da benzimidazoljulolidina (**BIJ**) em duas etapas com rendimento total de 42% (**Esquema 6**) (SHREYKAR; SEKAR, 2017).

Esquema 6 – Síntese da **BIJ** reportada por Shreykar e Sekar (2017).



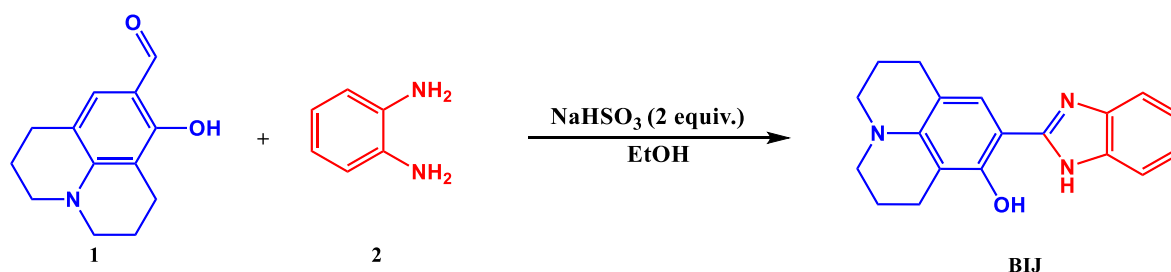
Na tentativa de reproduzir a metodologia descrita por Shreykar e Sekar (2017), em nosso laboratório o produto foi obtido com rendimento de apenas 12%. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que na primeira etapa da reação proposta pelos autores, o tempo de 2 horas não foi suficiente para que toda a 9-formil-8-hidroxi julolidina fosse convertida à imino-julolidina (reação acompanhada por CCD), e na segunda etapa da reação é necessário realizar diversas lavagens e extrações líquido-líquido com o bruto reacional, a fim de remover todo o dimetilsulfóxido do meio reacional e recuperar o produto.

Buscando melhores resultados, decidiu-se avaliar a metodologia descrita por Araújo (2015) na síntese de derivados benzimidazólicos, na qual foi empregado o bissulfito de sódio como catalisador, dimetilacetamida como solvente e irradiação de micro-ondas como fonte de aquecimento, obtendo rendimentos de cerca de 90% (ARAÚJO, 2015). Na tentativa de reproduzir a metodologia para a síntese da **BIJ**, este produto foi obtido com rendimento de apenas 30%, visto que a 9-formil-8-hidroxi julolidina é menos reativa que os aldeídos

aromáticos utilizados no trabalho de Araújo (2015) e não foi completamente consumida na reação (reação acompanhada por CCD). Além disso, a imino-julolidina (**IJN**) (**Esquema 6**), intermediária da reação de formação da **BIJ**, foi recuperada com 25% de rendimento. Sendo assim, decidiu-se adaptar a metodologia descrita por Araújo (2015) a fim de obter a **BIJ** em apenas uma etapa reacional.

Para adaptar a metodologia de Araújo (2015), foram avaliadas diferentes temperaturas, tempo e, por fim, a proporção dos reagentes (**Tabela 1**). Foram avaliadas três temperaturas (**Tabela 1**, entradas 1-3) e foi observado que o rendimento aumenta com o aumento da temperatura, sendo o melhor rendimento de 31 % obtido quando aquecido à temperatura de 120 °C (**Tabela 1**, entrada 3). Outro parâmetro avaliado foi o tempo de reação de 2, 6, 8 e 24 horas (**Tabela 1**, entradas 3-6), sendo observado que o rendimento aumenta com o aumento do tempo de reação, sendo obtido rendimento de 76% após 24 horas (**Tabela 1**, entradas 6). Por fim, foi avaliado a proporção de 1:2 dos substratos 9-formil-8-hidroxiulolidina e *o*-fenilenodiamina chegando ao rendimento de 81% (**Tabela 1**, entrada 7).

Tabela 1 – Avaliação do tempo de reação, temperatura e proporção dos reagentes na síntese da **BIJ**^a.



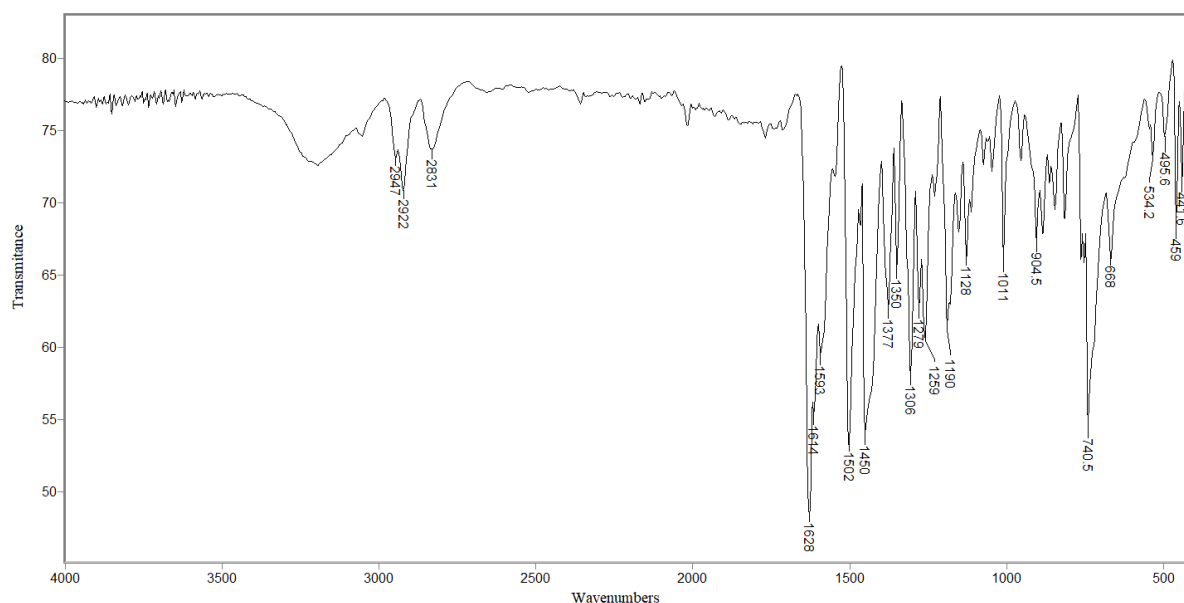
Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Equivalentes	Rendimento (%) ^b
1	80	2	1:1	15
2	100	2	1:1	24
3	120	2	1:1	31
4	120	6	1:1	37
5	120	8	1:1	44
6	120	24	1:1	76
7	120	24	1:2	81

^aReagentes e condições: 9-formil-8-hidroxiulolidina **1**, *o*-fenilenodiamina **2**, tubo selado. ^bRendimento isolado.

Após estabelecer as melhores condições de reação para a síntese da benzimidazoljulolidina, são discutidos abaixo os dados de caracterização.

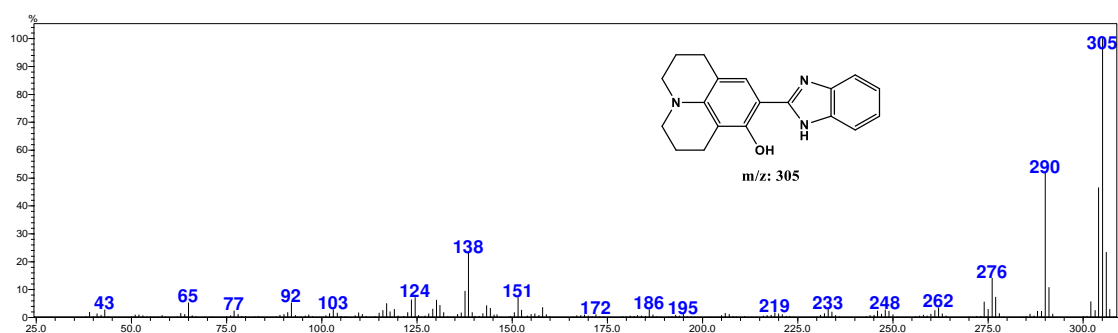
No espectro obtido na região do infravermelho (**Figura 5**), foram observadas bandas características de absorção do estiramento das ligações $C_{sp^3}\text{-H}$ em 2947 e 2833 cm^{-1} . A banda em 1628 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação $C=C$, e em 1505 cm^{-1} ao estiramento da ligação $C=N$. Em 1450 e 1377 cm^{-1} foi possível observar as bandas correspondentes ao estiramento e à deformação angular da ligação $C-N$, respectivamente. Em 740 e 688 cm^{-1} notam-se duas bandas de deformação angular das ligações $C_{sp^2}\text{-H}$ e $C=C$.

Figura 5 – Espectro no infravermelho (reflectância) de **BIJ**.



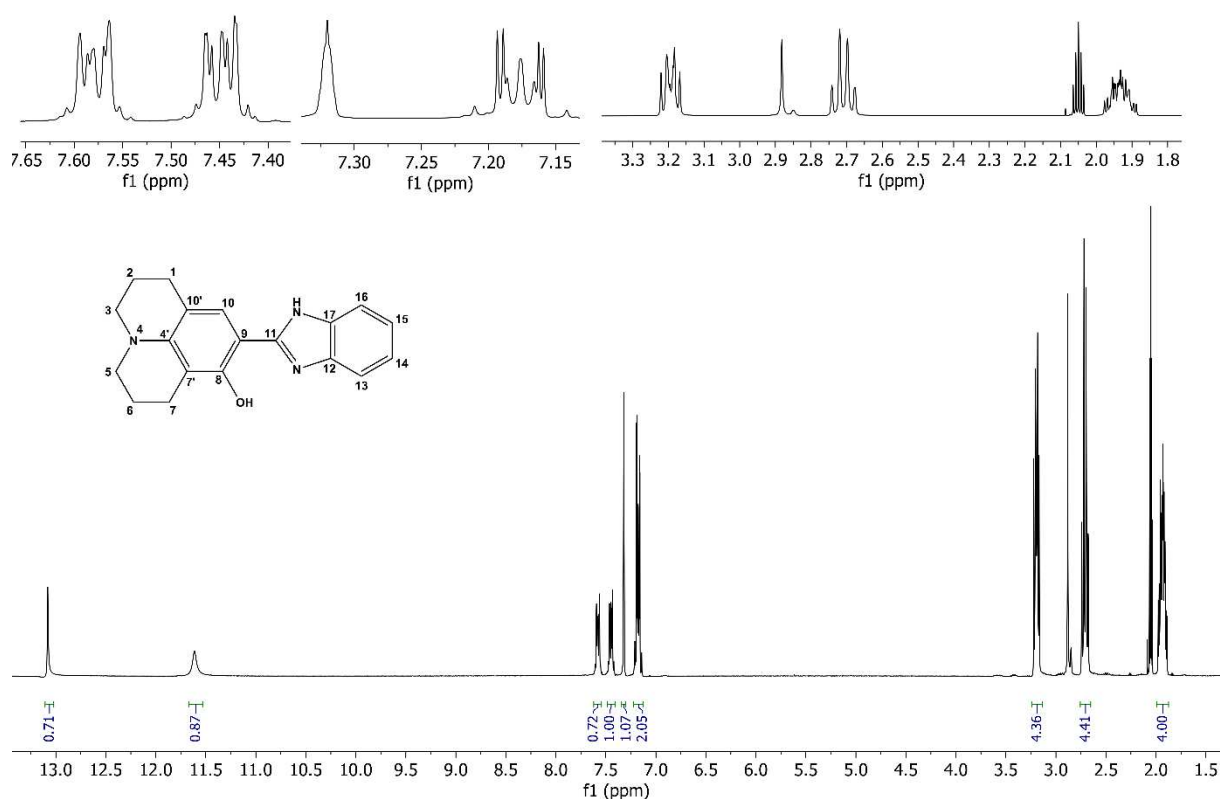
Analisando o espectro de massas (CG-EM), foi observada a presença do pico do íon molecular em m/z 305 (**Figura 6**). A massa ímpar está de acordo com a presença de três átomos de nitrogênio na estrutura química.

Figura 6 – Espectro de massas (CG-EM, 70 eV) de **BIJ**.



No espectro de RMN de ^1H (**Figura 7**) foram observados dois simpletos em δ 13,08 e 11,61 integrados para um hidrogênio cada, que foram atribuídos à hidroxila fenólica e ao NH do anel benzimidazólico, respectivamente. Em δ 7,73 – 7,53 e 7,52 – 7,38 foram observados dois multipletos com integrais equivalentes a um hidrogênio cada, que foram atribuídos aos hidrogênios H13 e H16, respectivamente. O sinal observado em δ 7,32 como um simpleto largo, integrado para um hidrogênio, foi atribuído ao H10. O multipletto em δ 7,25 – 7,13, integrado para dois hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios H14 e H15. Na região alifática foram observados três multipletos em δ 3,25 – 3,14, 2,77 – 2,65 e 2,01 – 1,86, todos integrados para quatro hidrogênios, que foram atribuídos aos hidrogênios (H3a, H3b, H5a e H5b), (H7a, H7b, H1a e H1b) e (H2a, H2b, H6a e H6b), respectivamente.

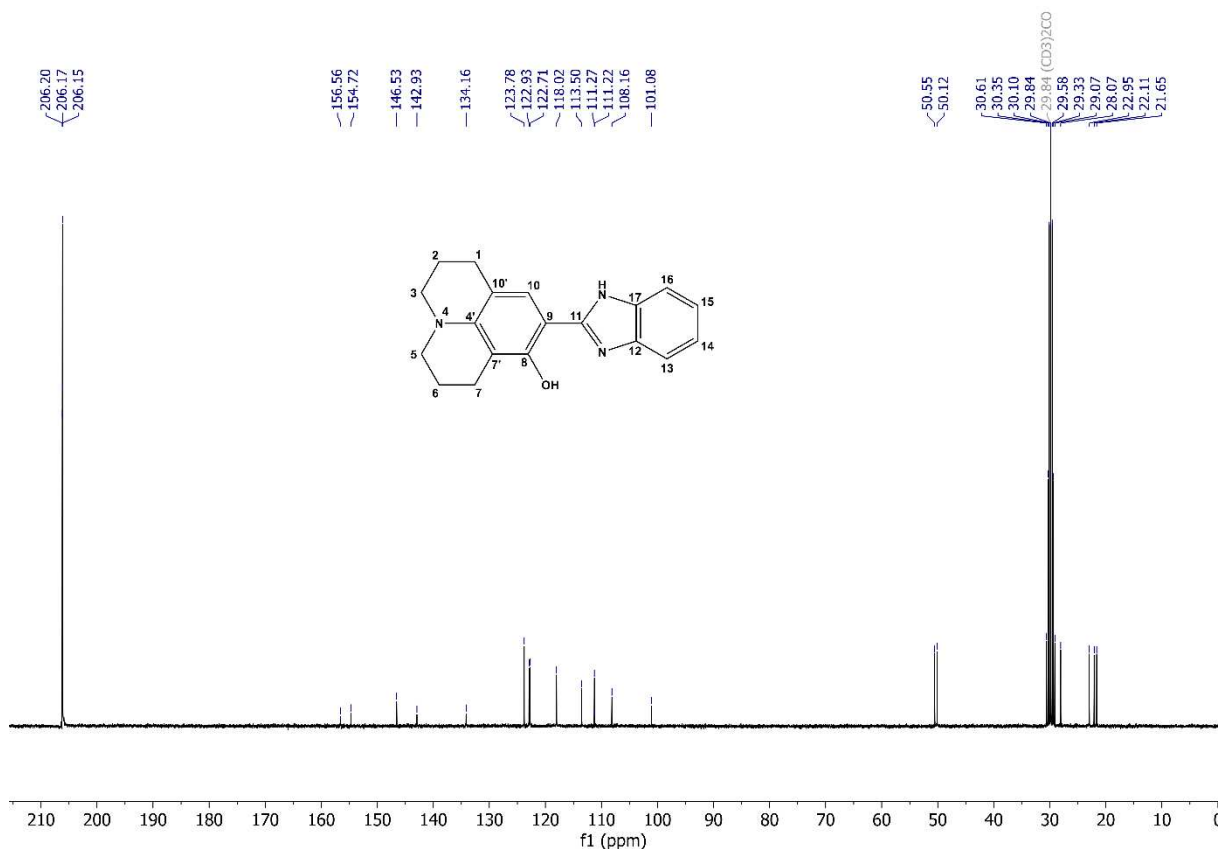
Figura 7 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, Acetona- d_6 , δ_{acetona} 2,05) de **BIJ**.



No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar a presença de dezenove sinais, conforme esperado para a estrutura química de **BIJ** (**Figura 8**). Na região de carbonos alifáticos foram observados seis sinais em δ 21,65, 22,11, 22,95, 28,07, 50,12 e 50,55 que foram atribuídos aos carbonos C7, C2, C6, C1, C3 e C5, respectivamente. Na região de carbonos

aromáticos foram observados 13 sinais em δ 101,08, 108,16, 111,22, 113,50, 118,02, 122,71, 122,93, 123,78, 134,16, 142,93, 146,53, 154,72 e 156,56 que foram atribuídos aos carbonos C9, C10', C7', C13, C16, C15, C10, C14, C17, C4', C12, C8, e C11, respectivamente.

Figura 8 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz Acetona- d_6 , δ_{acetona} 29,84) de **BIJ**.



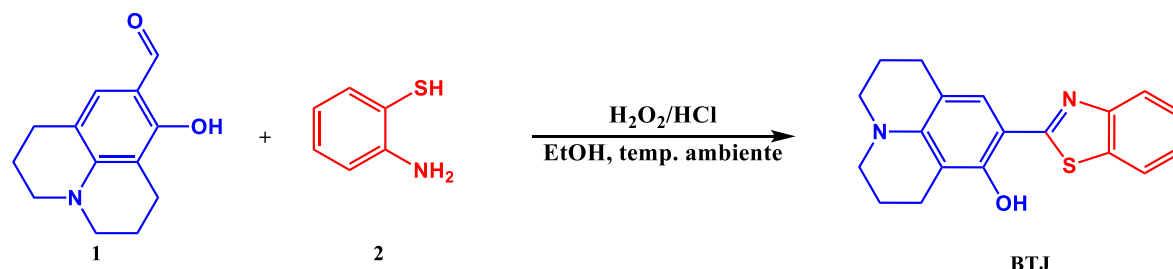
3.2. Síntese da benzotiazoljulolidina

Inicialmente decidiu-se avaliar a metodologia adaptada de Araujo (2015) que foi empregada anteriormente para a síntese da **BIJ** (página 11), na síntese da benzotiazoljulolidina (**BTJ**), sendo obtido **BTJ** com 52% de rendimento. Neste ponto, decidimos avaliar também a metodologia descrita por Guo et al., 2009 para a síntese benzotiazóis e derivados na tentativa de obter **BTJ** em melhores rendimentos (GUO; LI; SHANG, 2009).

A metodologia adaptada de Guo et al., 2009, consistiu no emprego da 9-formil-8-hidroxiulolidina, 2-aminotiofenol, ácido clorídrico (37%) e peróxido de hidrogênio (30%), dissolvidos em etanol em temperatura ambiente (**Tabela 2**, experimentos 1 e 2). Porém, os tempos reacionais de 45 e 60 minutos descritos pelos autores não foram satisfatórios na conversão dos reagentes, sendo obtido rendimento de apenas 8% em ambos os tempos de reação

descritos. Assim, decidiu-se otimizar o tempo de reação e proporção dos reagentes, na busca de melhores rendimentos de **BTJ**.

Tabela 2 – Avaliação do tempo de reação e proporção dos reagentes na síntese da **BTJ**^a



Experimento	Tempo	Equivalentes	Rendimento (%) ^b
1	45min	1:1	8
2	1h	1:1	8
3	2h	1:1	19
4	2h	1:2	22
5	6h	1:1	42
6	6h	1:2	46
7	8h	1:1	51
8	8h	1:2	52
9	24h	1:1	79
10	24h	1:2	86
11 ^c	24h	1:2	85

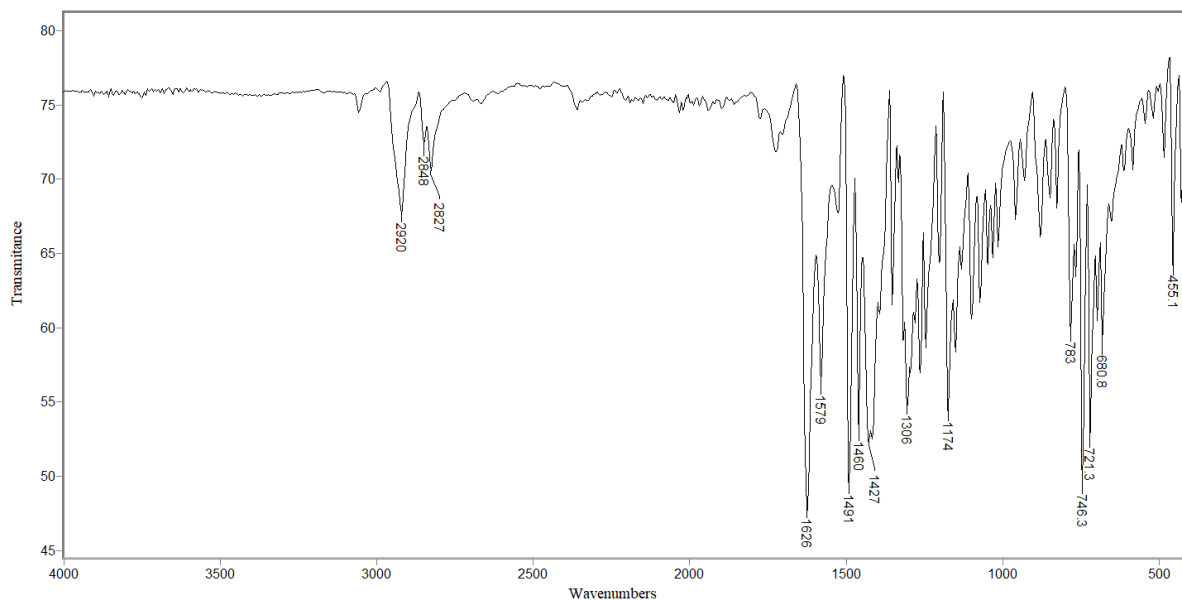
^aReagentes e condições: 9-formil-8-hidroxiulolidina **1**, *o*-fenilenodiamina **2**, HCl (15 equiv.), H₂O₂ (6 equiv.), etanol (5 mL). ^bRendimento determinado por CG-EM. ^cReação conduzida à 80 °C.

Para os tempos de reação de 2, 6, 8 e 24 horas, foram avaliados em todos os casos a proporção dos reagentes de 1:1 e 1:2 (**Tabela 2**, experimentos 3-10) também as proporções de reagentes para a síntese de **BTJ**. De acordo com os dados apresentados na **Tabela 2**, o tempo de reação foi fator crucial para o aumento do rendimento de **BTJ**, enquanto a proporção dos reagentes não foi tão relevante. A reação na temperatura de 80 °C foi avaliada e não houve alteração do rendimento de **BTJ** (**Tabela 2**, experimento 11). Após avaliar alguns parâmetros de reação para a síntese de **BTJ**, as melhores condições de reação foram HCl (15 equiv.), H₂O₂ (6 equiv.), temperatura ambiente, etanol como solvente e 24 h. A seguir, são discutidos os dados de caracterização espectroscópica e espectrométrica da molécula **BTJ**.

No espectro obtido na região do infravermelho (**Figura 9**) foram observadas bandas características de absorção do estiramento das ligações C_{sp3}-H em 2920 e 2827 cm⁻¹. A banda em 1625 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento da ligação C=C, e em 1580 cm⁻¹ ao estiramento da ligação C=N. Em 1491 e 1428 cm⁻¹ foi possível notar as bandas correspondentes ao estiramento

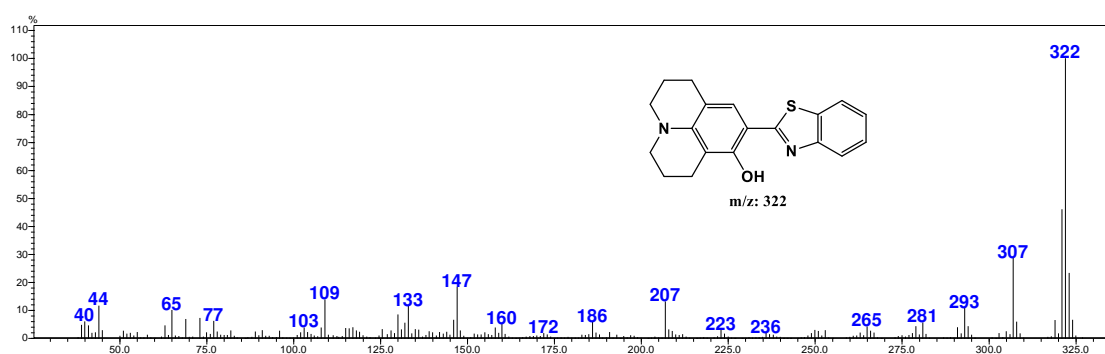
e à deformação angular da ligação C-N, respectivamente. Em 783 e 746 cm^{-1} nota-se duas bandas de deformação angular das ligações $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ e $\text{C}=\text{C}$.

Figura 9 – Espectro no infravermelho (reflectância) de **BTJ**.



De acordo com o espectro de massas (CG-EM), foi observada a presença do íon molecular em m/z 322 (**Figura 10**). A massa par está de acordo com a presença de dois átomos de nitrogênio na estrutura.

Figura 10 – Espectro de massas (CG-EM, 70 eV) de **BTJ**.



No espectro de RMN de ^1H (**Figura 11**) foi observado um simpleto em δ 12,70 integrado para um hidrogênio, que foi atribuído a hidroxila fenólica. Foram observados quatro duplo duplo dupletos, em δ 7,81 ($J = 4,0, 1,3, 0,6$ Hz), 7,79 ($J = 3,9, 1,3, 0,7$ Hz), 7,40 ($J = 8,2, 7,3, 1,3$ Hz) e 7,27 ($J = 8,0, 7,3, 1,2$ Hz), com integrais equivalentes a um hidrogênio cada que foram

atribuídos aos hidrogênios H13, H16, H14 e H15, respectivamente. O sinal observado em δ 7,08 como um simpleto, integrado para um hidrogênio foi atribuído ao H10. Na região alifática foram observados um multipletto em δ 3,30 – 3,13 integrado para quatro hidrogênios, que foi atribuído aos hidrogênios H3a, H3b, H5a e H5b, dois tripletos em δ 2,80 ($J = 6,5$ Hz) e δ 2,74 ($J = 6,1$ Hz) com integrais equivalentes a dois hidrogênios cada, referentes aos hidrogênios H7a, H7b e H1a, H1b, respectivamente, e um multipletto em δ 2,18 – 1,89 integrado para quatro hidrogênios que foi atribuído aos hidrogênios H2a, H2b, H6a e H6b. A atribuição dos sinais de ^1H foi baseada no mapa de contornos COSY (**Figuras 12 e 13**), onde podemos observar as correlações entre hidrogênios vizinhos por ordem de até três ligações.

Figura 11 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ_{CHCl_3} 7,26) de **BTJ**.

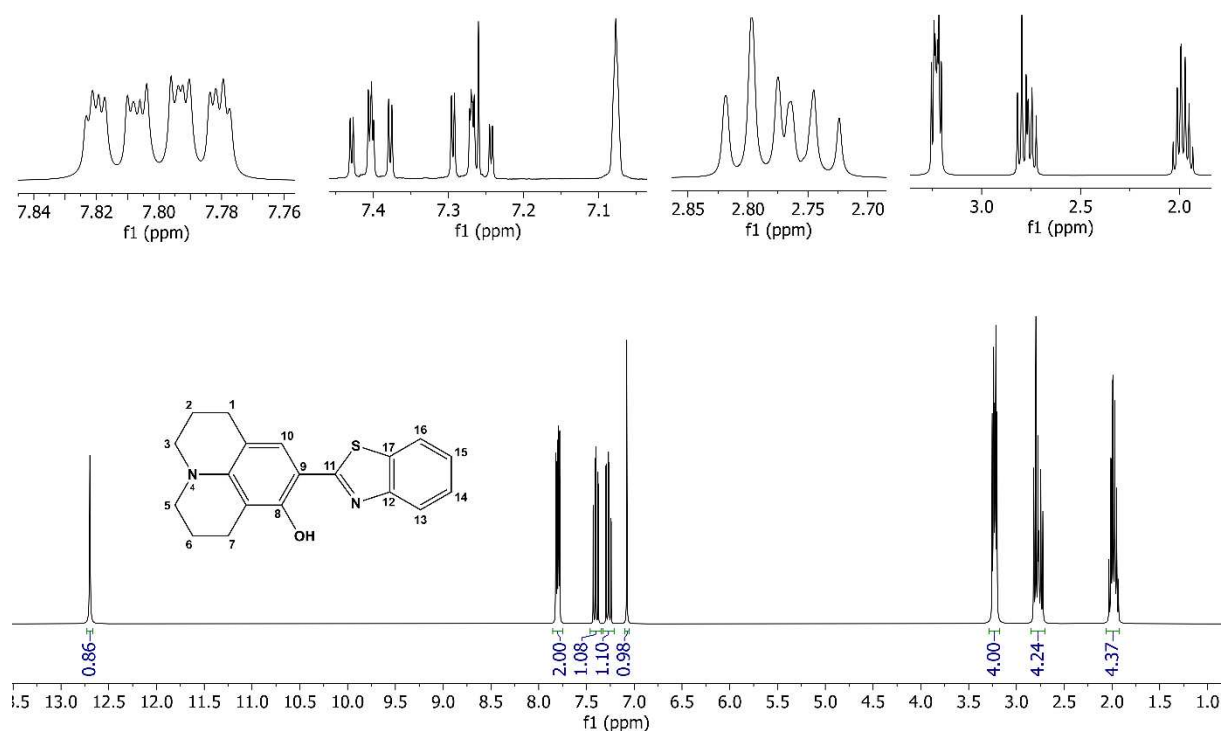


Figura 12 – Mapa de contornos COSY (CDCl_3) destacando a região entre δ 1,70 – 3,40 ppm de BTJ.

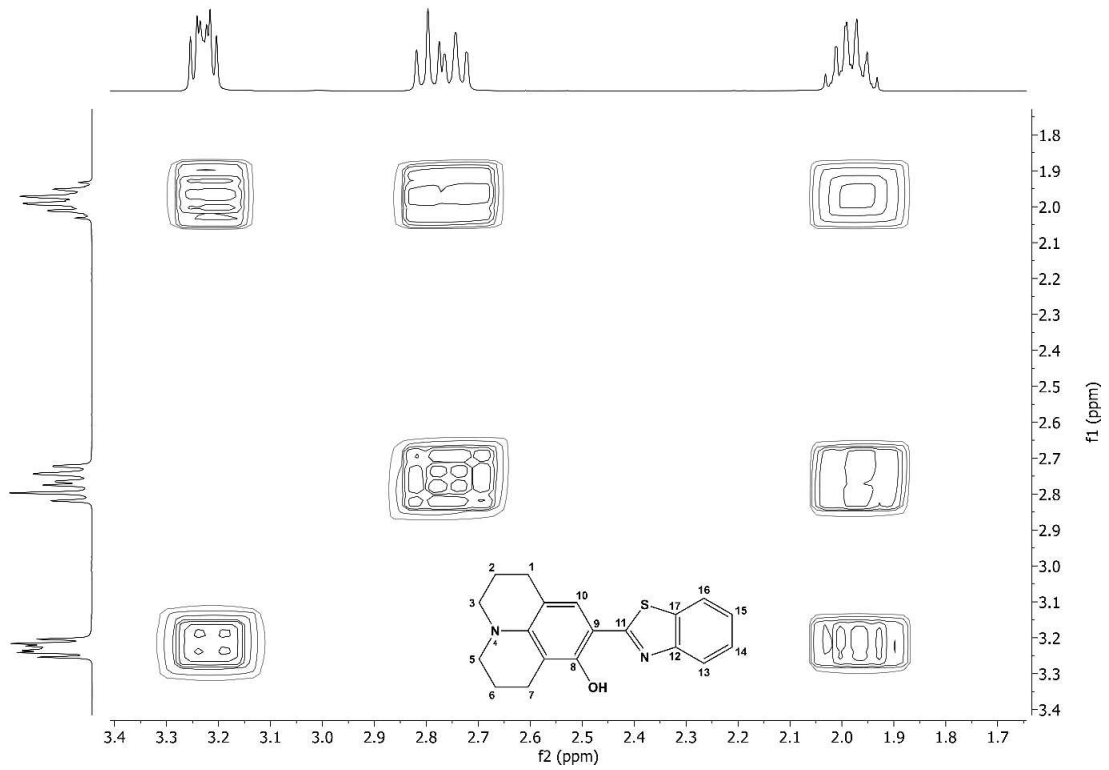
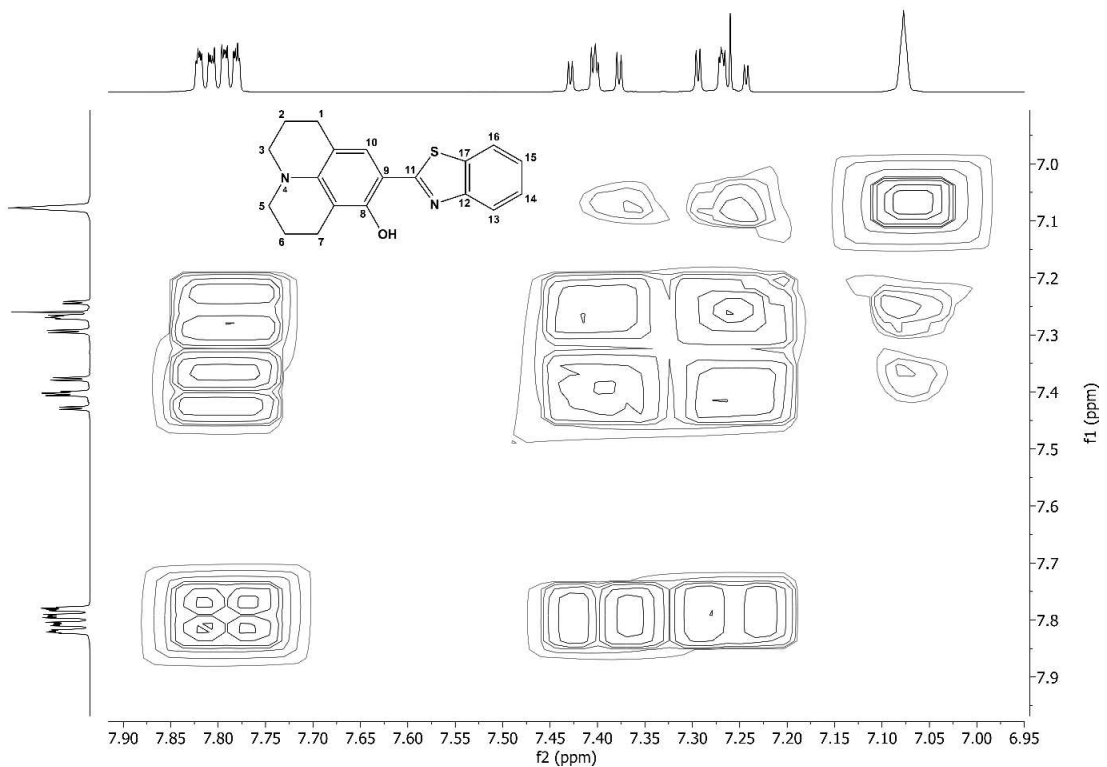


Figura 13 – Mapa de contornos COSY (CDCl_3) destacando a região entre δ 6,95 – 7,90 ppm de BTJ.



A atribuição dos carbonos foi realizada a partir do mapa de contornos HSQC (**Figuras 14 e 15**), onde são observadas as correlações entre carbonos e hidrogênios diretamente ligados. No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar a presença de dezenove sinais, conforme esperado para a estrutura química de **BTJ** (**Figura 16**). Na região de carbonos alifáticos foram observados seis sinais em δ 20,81, 21,34, 22,17, 27,45, 49,80 e 50,19 que foram atribuídos aos carbonos C7, C2, C6, C1, C3 e C5, respectivamente. Na região de carbonos aromáticos foram observados 13 sinais em δ 105,39, 106,97, 113,53, 120,96, 121,28, 124,08, 126,08, 126,28, 132,11, 146,50, 152,44, 154,97 e 170,11 que foram atribuídos aos carbonos C9, C10', C7', C13, C16, C15, C10, C14, C17, C4', C12, C8, e C11, respectivamente.

Figura 14 – Mapa de contornos HSQC (CDCl_3), destacando a região entre δ 1,80 – 3,80 ppm para o espectro de ^1H e 18 – 54 ppm para o espectro de ^{13}C , de **BTJ**.

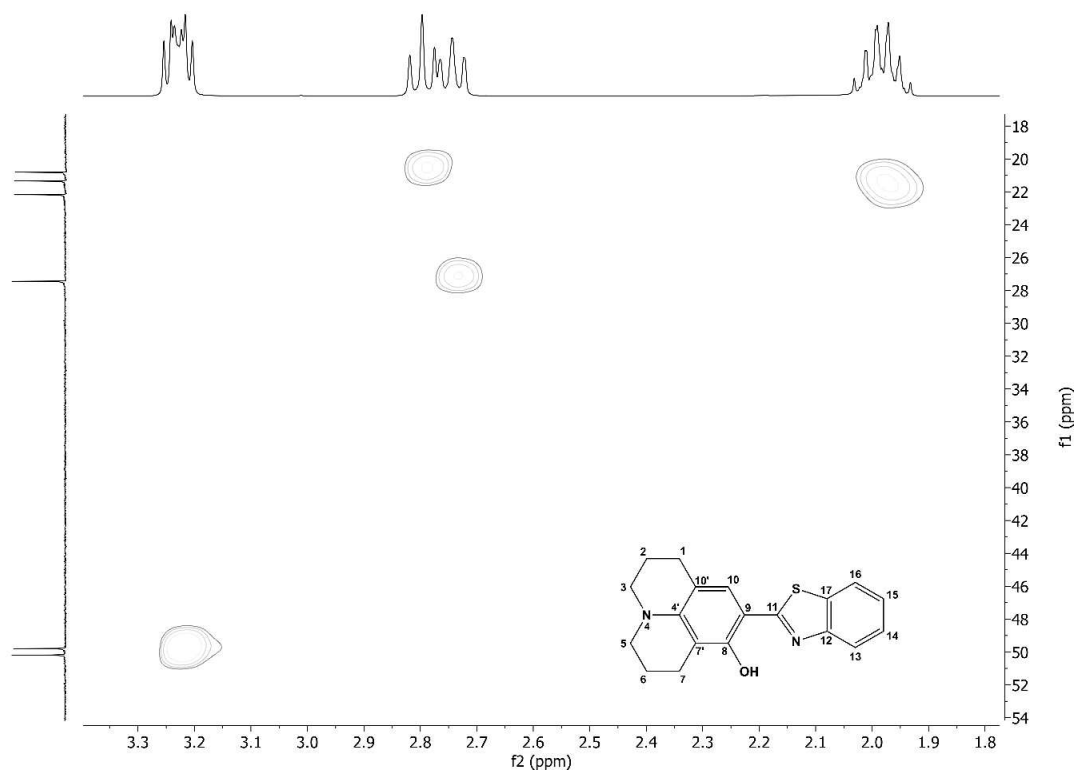


Figura 15 – Mapa de contornos HSQC (CDCl_3), destacando a região entre δ 6,90 – 7,95 ppm para o espectro de ^1H e 115 – 130 ppm para o espectro de ^{13}C , de **BTJ**.

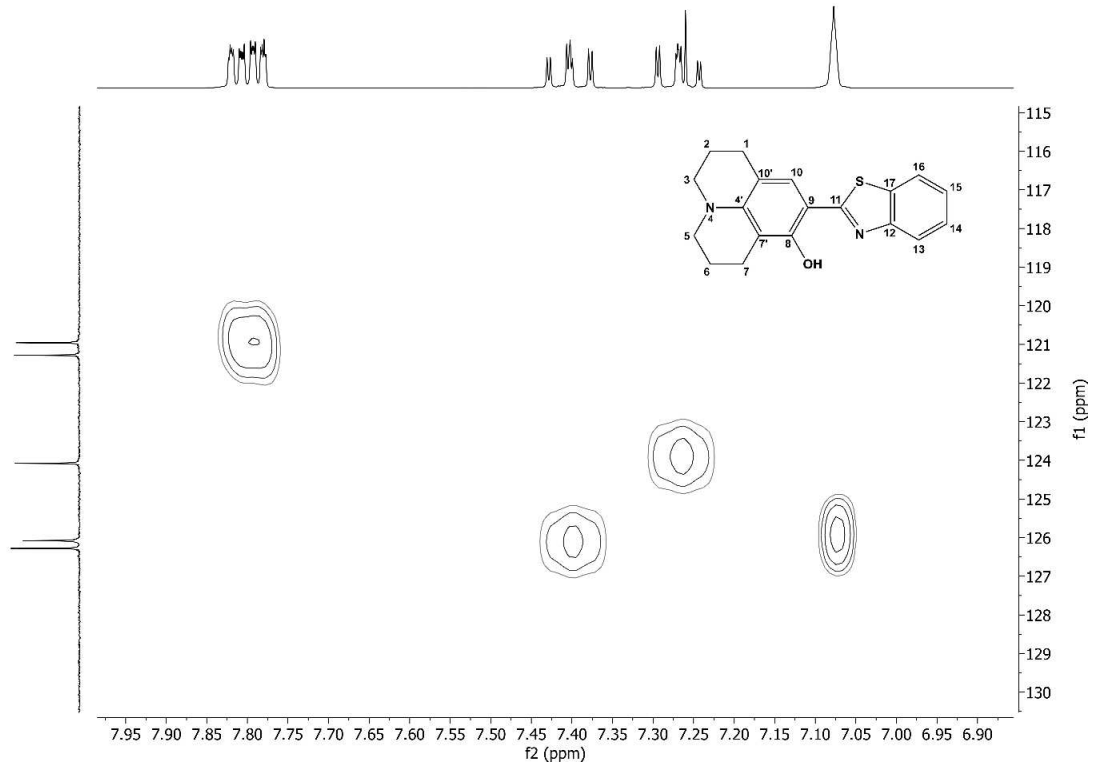
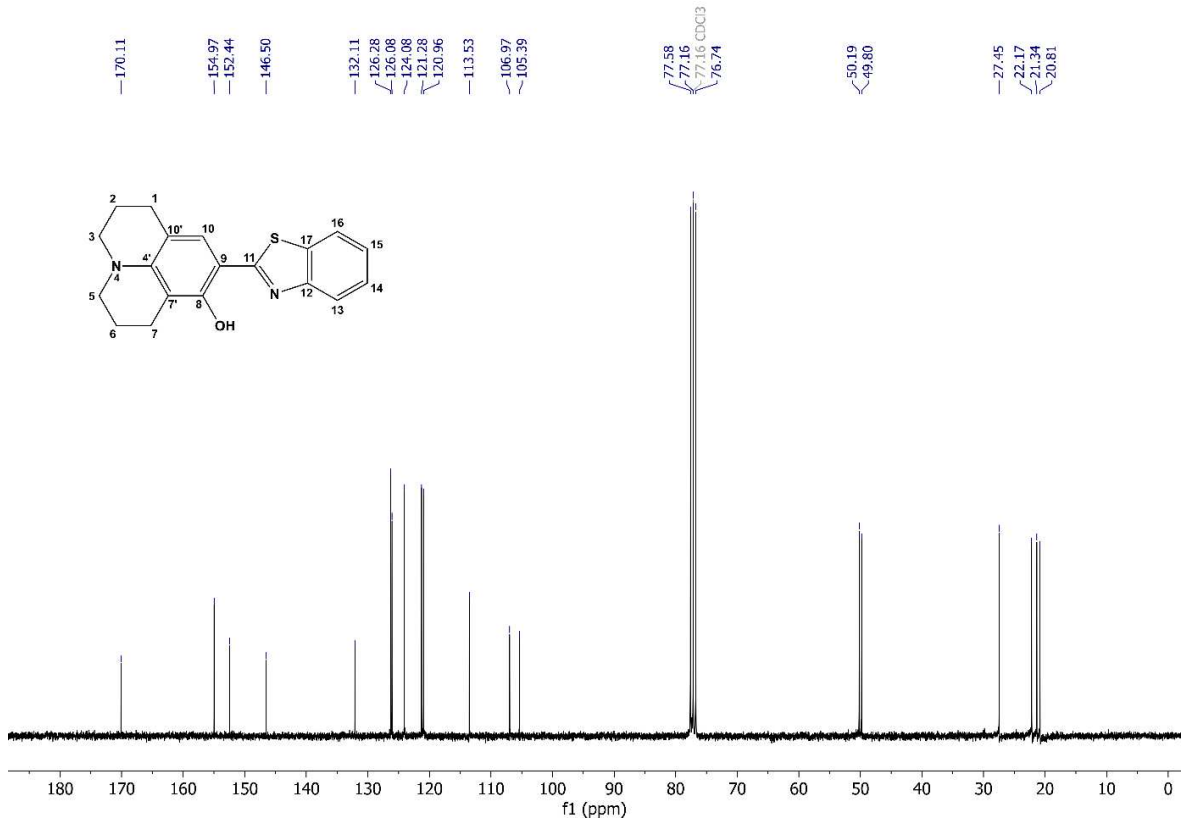


Figura 16 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CHCl_3} 77,16) de **BTJ**.

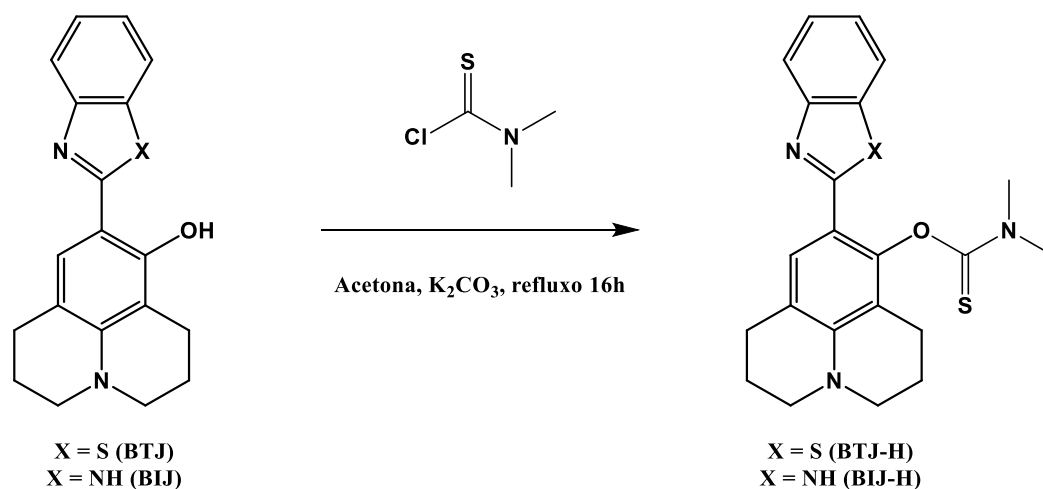


3.3. Síntese das sondas fluorogênicas latentes

3.3.1. Síntese das sondas fluorogênicas latentes para detecção de ERO

A metodologia utilizada na síntese das sondas fluorogênicas latentes para detecção de ERO está representada no **Esquema 7**, e foi adaptada de Dvořáková *et al.* (2007), onde reportaram a modificação nas hidroxilas de tiacalix[4]arenos (DVOŘÁKOVÁ *et al.*, 2007).

Esquema 7 – Síntese das sondas fluorogênicas latentes para detecção de ERO (**BTJ-H** e **BIJ-H**)



Os dois produtos obtidos foram purificados em coluna cromatográfica e sílica-gel, sendo que o produto **BTJ-H** foi obtido com um rendimento de 65% e o produto **BIJ-H** foi obtido com um rendimento de 59%.

3.3.2. Síntese das sondas fluorogênicas latentes para detecção de fosfatase

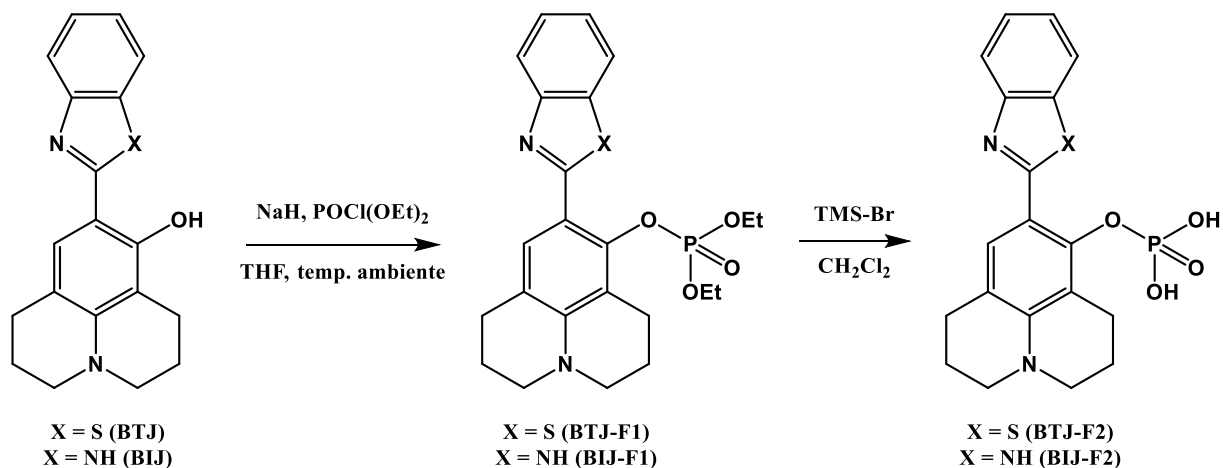
A metodologia utilizada na síntese das sondas fluorogênicas latentes para detecção de fosfatase está representada no **Esquema 8**. Esta metodologia também foi utilizada por Hu *et al.* na síntese de uma sonda para detecção de fosfatase alcalina (HU *et al.*, 2015).

A reação ocorre em duas etapas, onde na primeira etapa é utilizado o clorofosfato de dietila na presença de hidreto de sódio em tetrahydrofurano anidro, levando a formação do éster dietilfosfato. Os intermediários (**BTJ-F1** e **BIJ-F1**) foram purificados em coluna cromatográfica de sílica-gel e foram obtidos com rendimento de 72% e 81%, respectivamente.

A segunda etapa da reação consiste em converter o éster dietilfosfato em dihidrogenofosfato, utilizando bromotrimetilsilano em diclorometano anidro. Na tentativa de obter as sondas **BTJ-F2** e **BIJ-F2**, nenhum dos produtos desejados foi obtido. Em análises por

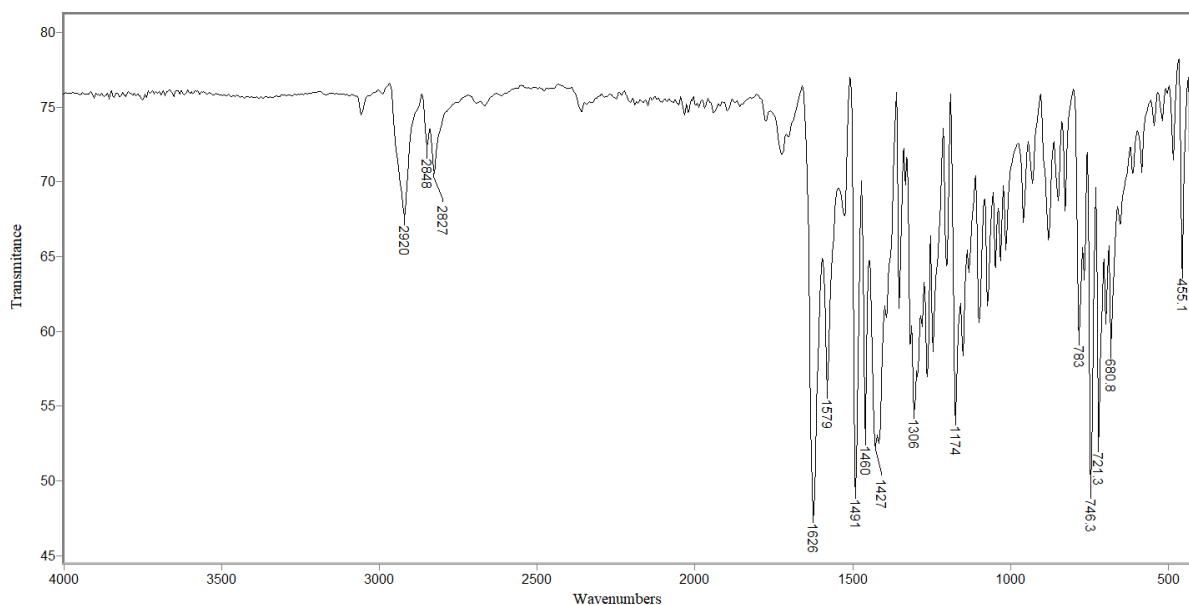
CG-EM e RMN de ^1H e ^{13}H , não foi possível elucidar e compreender qual o caminho seguido pela reação e quais os produtos formados, sendo necessário estudar e desenvolver novas abordagens para a síntese destas sondas.

Esquema 8 – Síntese das sondas fluorogênicas latentes para detecção de fosfatase.

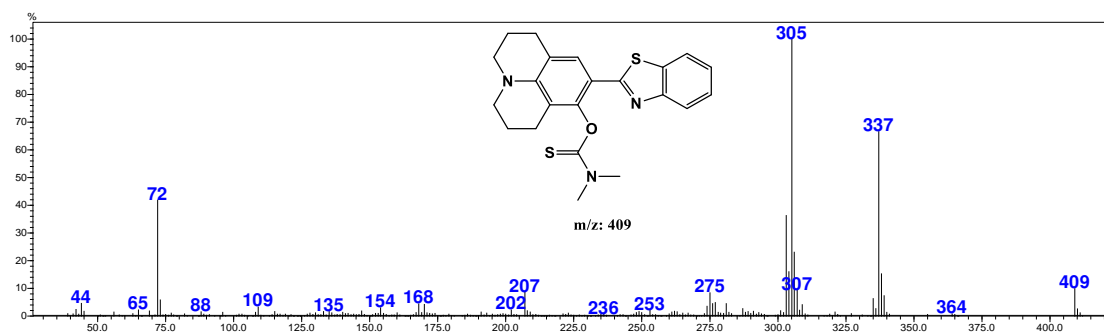


3.3.3. Caracterização das sondas fluorogênicas latentes sintetizadas

Para a sonda **BTJ-H**, no espectro obtido na região do infravermelho (**Figura 17**), foram observadas bandas características de absorção do estiramento das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ em 2930 e 2837 cm^{-1} . A banda em 1603 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{C}$, e em 1530 cm^{-1} ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{N}$. Em 1425 e 1393 cm^{-1} foi possível notar as bandas correspondentes ao estiramento e à deformação angular da ligação C-N , respectivamente. A banda observada em 1122 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{S}$. Em 760 e 729 cm^{-1} nota-se duas bandas de deformação angular das ligações $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ e $\text{C}=\text{C}$.

Figura 17 – Espectro no infravermelho (reflectância) de **BTJ-H**.

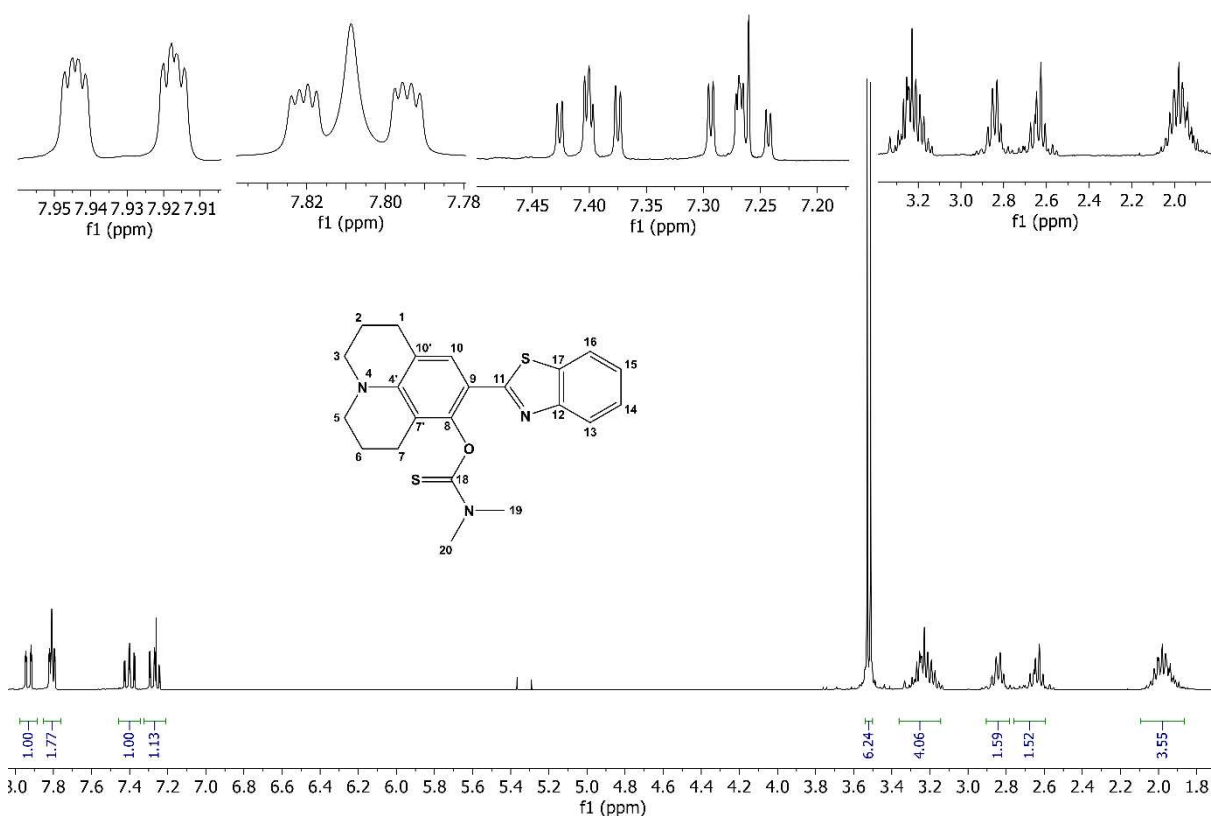
Analisando o espectro de massas (CG-EM), foi observada a presença do íon molecular em m/z 409 (**Figura 18**). A massa ímpar está de acordo com a presença de três átomos de nitrogênio na estrutura.

Figura 18 – Espectro de massas (CG-EM, 70 eV) de **BTJ-H**.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 19**) foram observados dois duplo duplo dupletos em δ 7,93 ($J = 8,1, 1,2, 0,6$ Hz) e 7,81 ($J = 7,9, 1,3, 0,7$ Hz) com integração para um hidrogênio cada, sendo atribuídos aos hidrogênios H13 e H16, respectivamente. O simpleto largo em δ 7,81, integrado para um hidrogênio foi atribuído hidrogênio H10. Os sinais em δ 7,40 ($J = 8,1, 7,2, 1,3$ Hz) e 7,27 ($J = 8,0, 7,2, 1,2$ Hz) foram observados como duplo duplo duplete e integrados para um hidrogênio cada e foram atribuídos aos H14 e H15, respectivamente. Os sinais em δ 3,53 e 3,51, foram observados com simpletos integrados para três hidrogênios cada

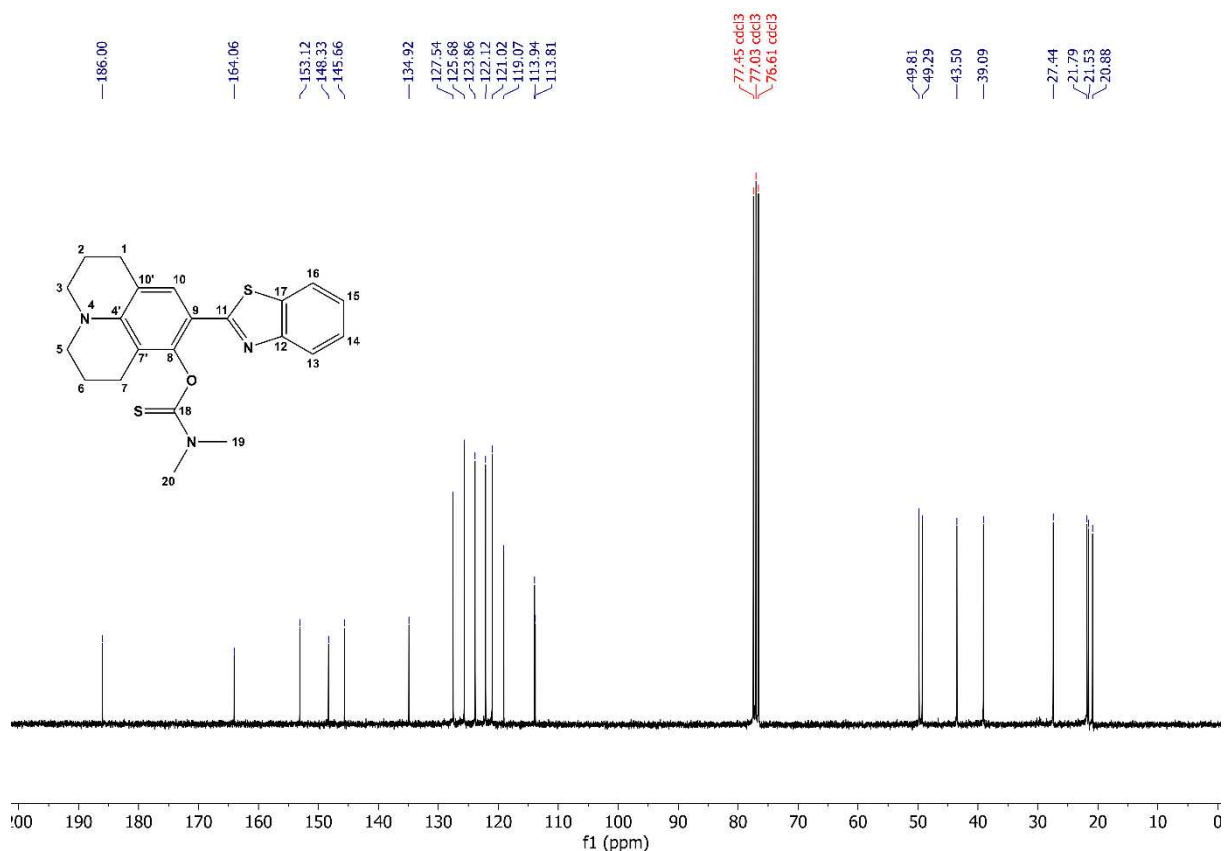
e foram atribuídos às metilas (C19 e C20). Os sinais em δ 3,31 – 3,14, 2,99 – 2,79, 2,69 – 2,48 e 2,09 – 1,82 observados como multipletos e integrados para quatro, dois, dois e quatro hidrogênios respectivamente foram atribuídos aos hidrogênios (H3a, H3b, H5a, H5b), (H7a, H7b, H1a, H1b) e (H2a, H2b, H6a, H6b).

Figura 19 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ_{CHCl_3} 7,26) de **BTJ-H**.



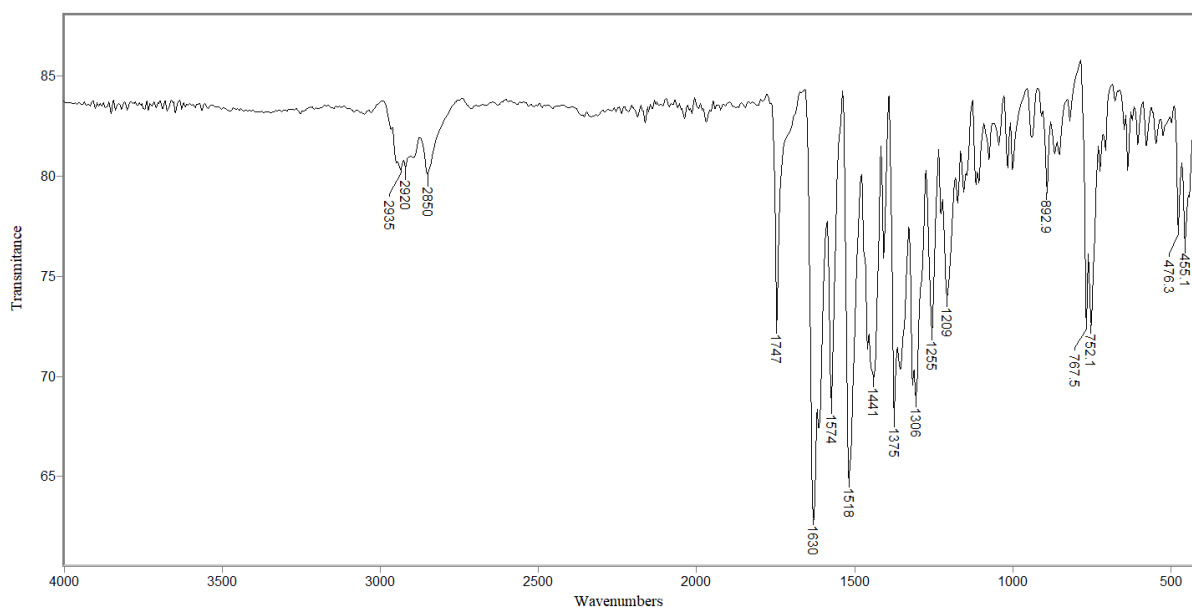
O espectro de RMN de ^{13}C apresentou um total de vinte e dois sinais (**Figura 20**). Os sinais dos carbonos alifáticos foram observados em δ 20,88, 21,53, 21,79, 27,44, 39,09, 43,50, 49,29 e 49,81 e foram atribuídos dos carbonos C7, C2, C6, C1, C19, C20, C5 e C3, respectivamente. Na região de carbonos aromáticos os deslocamentos químicos em δ 113,94, 119,07, 121,02, 122,12, 123,86, 125,68, 127,54, 134,92, 145,66, 148,33, 153,12, 164,06 e 186,00 ppm foram atribuídos aos carbonos C9, C10', C7', C16, C13, C14, C15, C10, C17, C4', C12, C8, C11 e C18 respectivamente.

Figura 20 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,16) de **BTJ-H**.



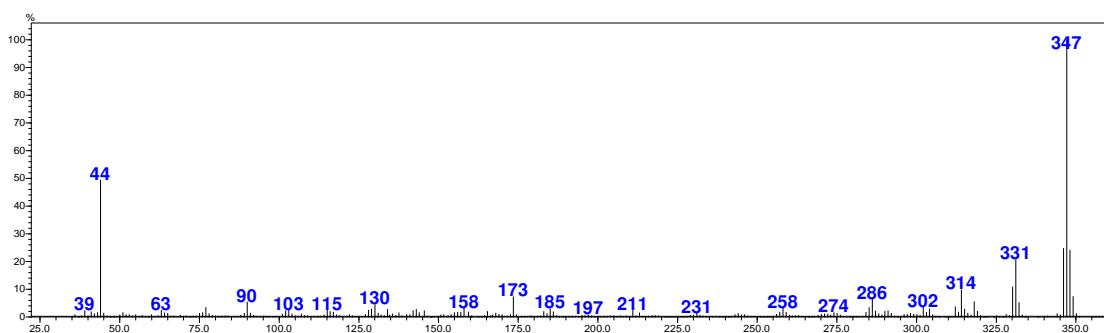
Para a molécula **BIJ-H**, no espectro obtido na região do infravermelho (**Figura 21**) foram observadas bandas características de absorção do estiramento das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ em 2920 e 2851 cm^{-1} . A banda em 1747 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{C}$, e em 1630 cm^{-1} ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{N}$. Em 1440 e 1375 cm^{-1} foi possível notar as bandas correspondentes ao estiramento e à deformação angular da ligação $\text{C}-\text{N}$, respectivamente. A banda observada em 1208 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{S}$. Em 767 e 752 cm^{-1} nota-se duas bandas de deformação angular das ligações $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ e $\text{C}=\text{C}$.

Figura 21 – Espectro no infravermelho (reflectância) de **BIJ-H**.



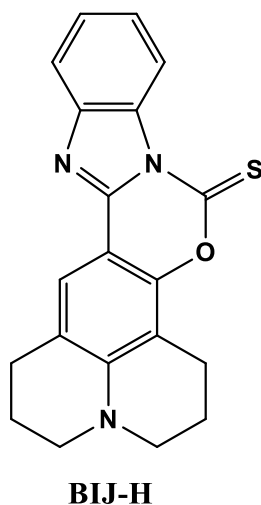
Analisando o espectro de massas (CG-EM), não foi observada a massa esperada para a molécula proposta (m/z 392), sendo observado o íon molecular em m/z 347 (**Figura 22**).

Figura 22 – Espectro de massas (CG-EM, 70 eV) de **BIJ-H**.



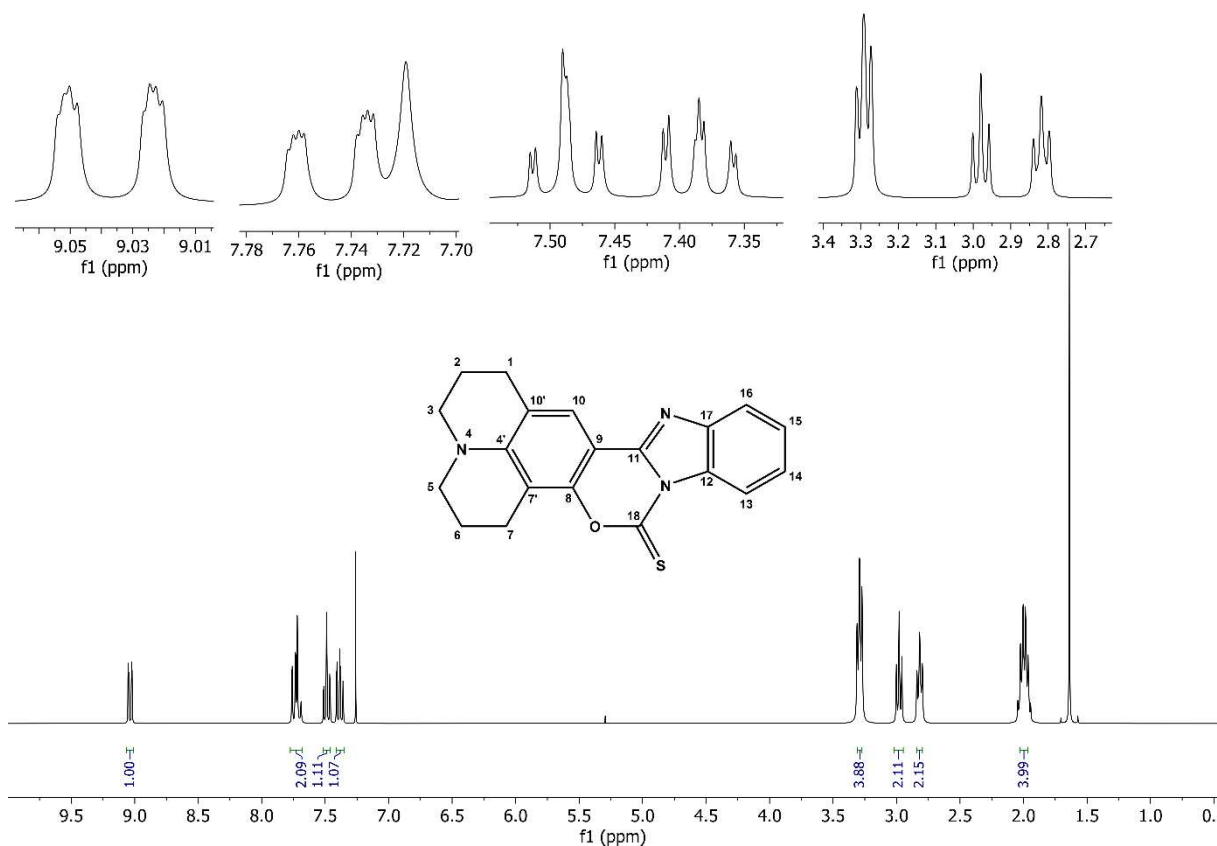
A massa ímpar indica a presença de um número ímpar de átomos de nitrogênio na estrutura. Junto a isso, a diferença de 45 unidades na massa indica a perda da dimetilamina na estrutura, que era objetivo da síntese proposta. Assim, foi proposta uma estrutura para a **BIJ-H** (**Figura 23**) e a seguir serão discutidos os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C para essa molécula.

Figura 23 – Estrutura proposta para a **BIJ-H** obtida.



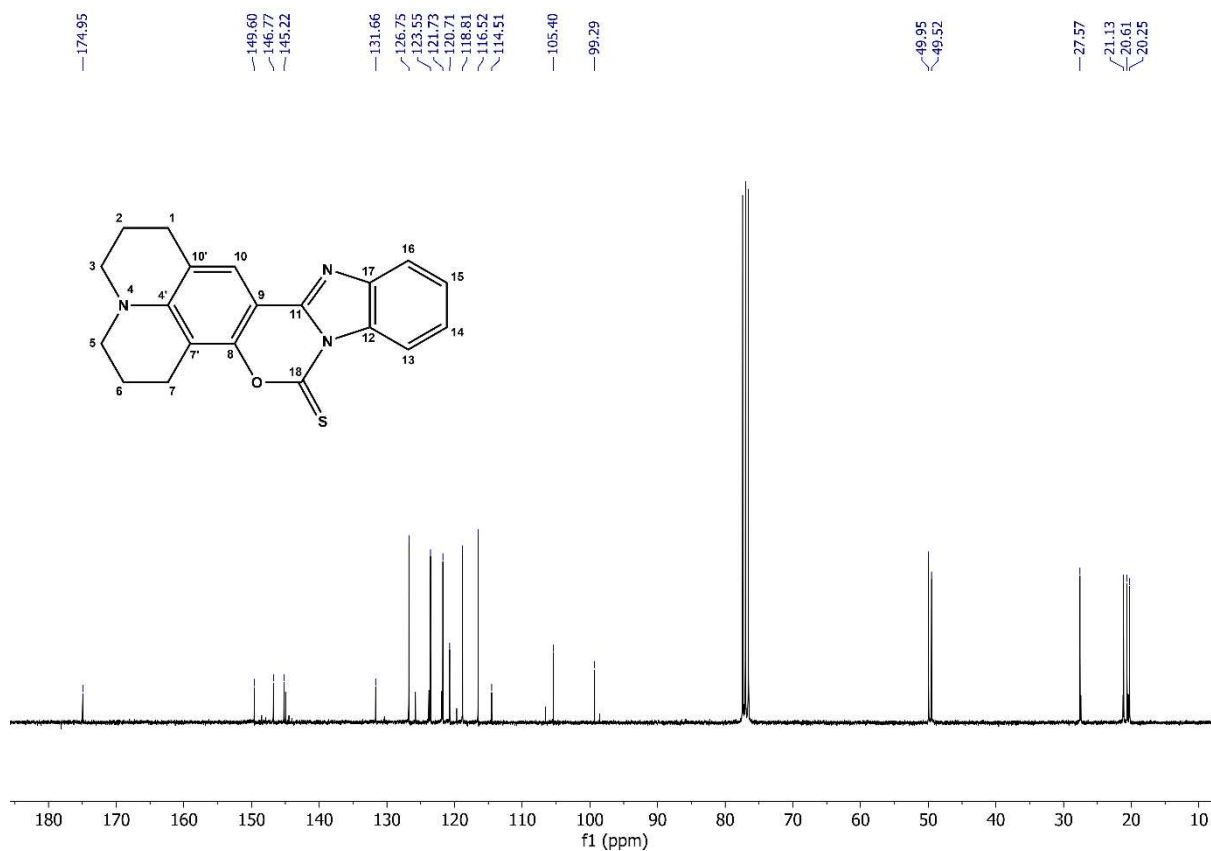
No espectro de RMN de ^1H (**Figura 24**) foram observados dois duplo duplo dupletos em δ 9,04 ($J = 8,2, 1,3, 0,6$ Hz) e 7,75 ($J = 7,9, 1,3, 0,7$ Hz) com integração para um hidrogênio cada, sendo atribuídos aos hidrogênios H13 e H16, respectivamente. O simpleto em δ 7,72, integrado para um hidrogênio foi atribuído hidrogênio H10. Os sinais em δ 7,49 ($J = 8,0, 7,4, 1,3\text{Hz}$) e 7,38 ($J = 8,6, 7,4, 1,3$ Hz) foram observados como duplo duplo dupletos e integrados para um hidrogênio cada e foram atribuídos aos H14 e H15, respectivamente. Os sinais em δ 3,29 ($J = 5,7$ Hz), 2,98 ($J = 6,5$ Hz), 2,82 ($J = 6,3$ Hz) foram observados como tripletos integrados para quatro, dois e dois hidrogênios, respectivamente e foram atribuídos aos hidrogênios (H3a, H3b, H5a e H5b), (H7a e H7b) e (H1a e H1b), respectivamente. O sinal em δ 2,08 – 1,89 foi observado como multipletto e integrado para quatro hidrogênios e foi atribuído aos hidrogênios (H2a, H2b, H6a e H6b).

Figura 24 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 7,26) de **BIJ-H**.



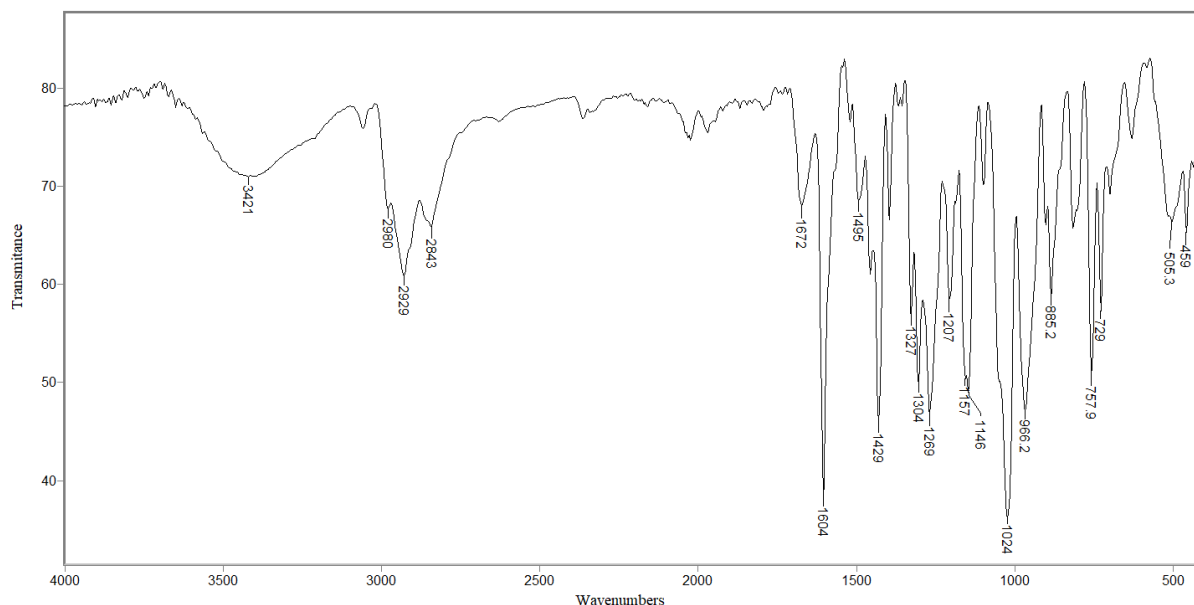
O espectro de RMN de ^{13}C apresentou um total de vinte sinais (**Figura 25**), o que condiz com a estrutura química proposta. Os sinais dos carbonos alifáticos foram observados em δ 20,25, 20,61, 21,13, 27,57, 49,52, 49,95 e foram atribuídos aos carbonos C2, C6, C1, C7, C5 e C3, respectivamente. Na região de carbonos aromáticos, os deslocamentos químicos em δ 99,29, 105,40, 114,51, 116,52, 118,81, 120,71, 121,73, 123,55, 126,75, 131,66, 145,22, 146,77, 149,60, 174,95 foram atribuídos aos carbonos C9, C10', C7', C16, C13, C14, C15, C10, C17, C4', C12, C8, C11 e C18, respectivamente.

Figura 25 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,16) de **BIJ-H**.



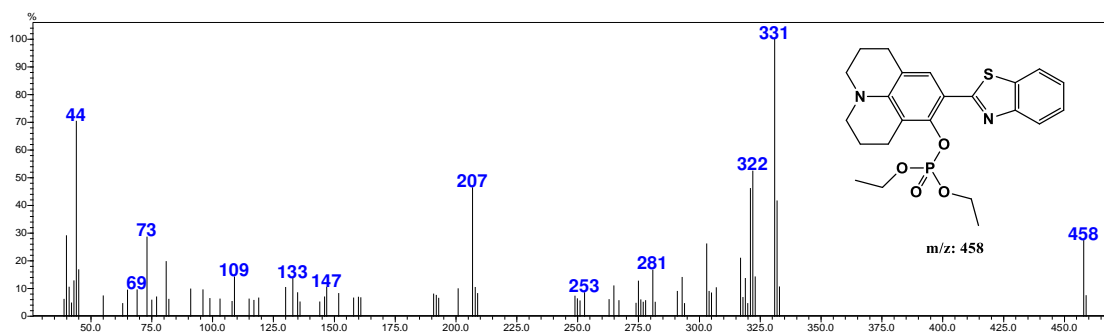
Para a molécula **BTJ-F1**, no espectro obtido na região do infravermelho (**Figura 26**) foram observadas bandas características de absorção do estiramento das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ em 2928 e 2943 cm^{-1} . A banda em 1672 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{C}$, e em 1605 cm^{-1} ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{N}$. Em 1430 e 1328 cm^{-1} foi possível notar as bandas correspondentes ao estiramento e à deformação angular da ligação C-N , respectivamente. Em 1146 cm^{-1} podemos notar uma banda referente ao estiramento da ligação $\text{P}=\text{O}$ e em 758 é possível observar uma banda referente ao estiramento das ligações P-O-C .

Figura 26 – Espectro no infravermelho (reflectância) de **BTJ-F1**.



Analisando o espectro de massas (CG-EM), foi observada a presença do íon molecular em m/z 458 (**Figura 27**). A massa par está de acordo com a presença de dois átomos de nitrogênio na estrutura.

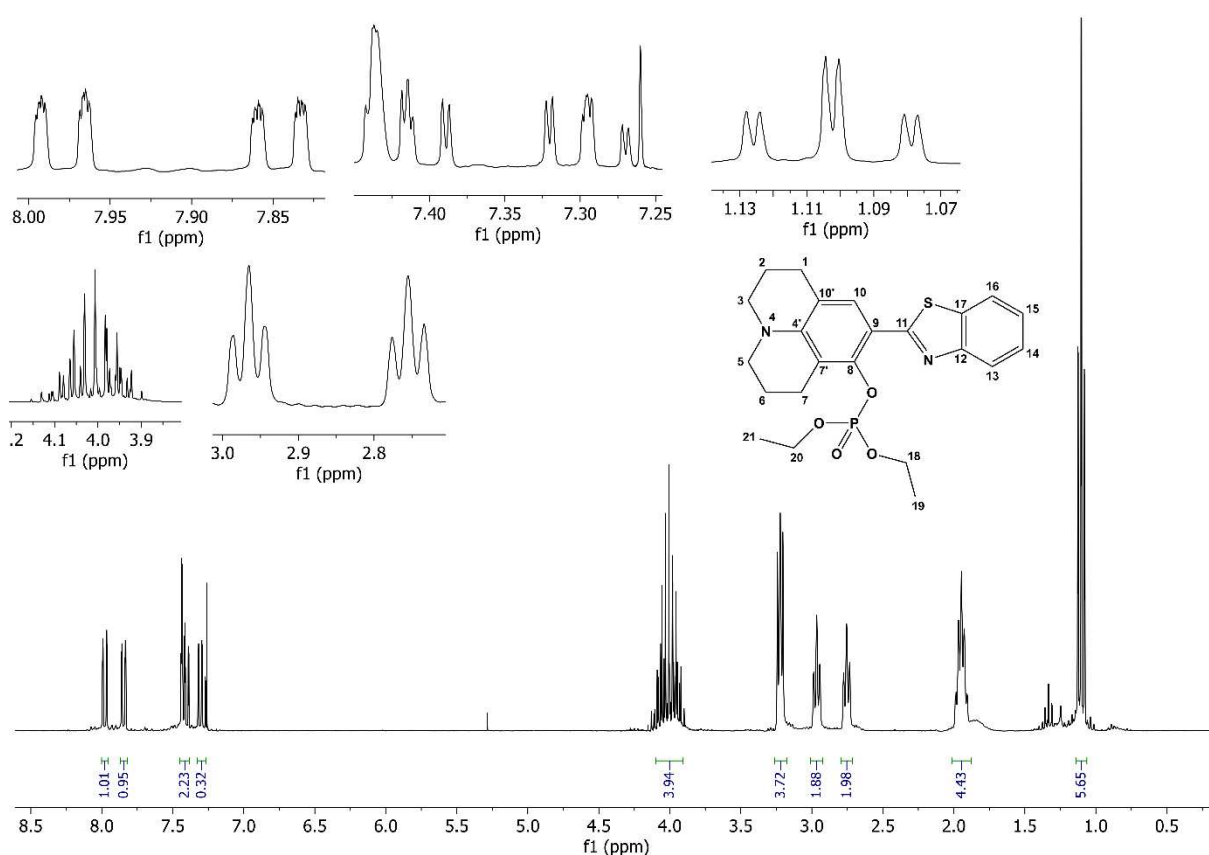
Figura 27 – Espectro de massas (CG-EM, 70 eV) de **BTJ-F1**.



No espectro de RMN de ^1H (**Figura 28**) foi observada a presença de dois duplo duplo duplete em δ 7,98 ($J = 8,1, 1,2, 0,6$ Hz) e 7,85 ($J = 7,9, 1,3, 0,7$ Hz) integrado para um hidrogênio cada, que foram atribuídos aos hidrogênios H13 e H16, respectivamente. Os sinais em δ 7,47 – 7,36 e 7,33 – 7,26 observados como multipletos e integrados para dois e um hidrogênio foram atribuídos aos hidrogênios (H14 e H10) e (H15) respectivamente. O multipletto em δ 4,25 – 3,82, integrado para quatro hidrogênios foi atribuído aos hidrogênios CH_2 das etilas (C18 e C20). Na região de hidrogênios alifáticos, em δ 3,22 ($J = 5,7$ Hz), 2,96

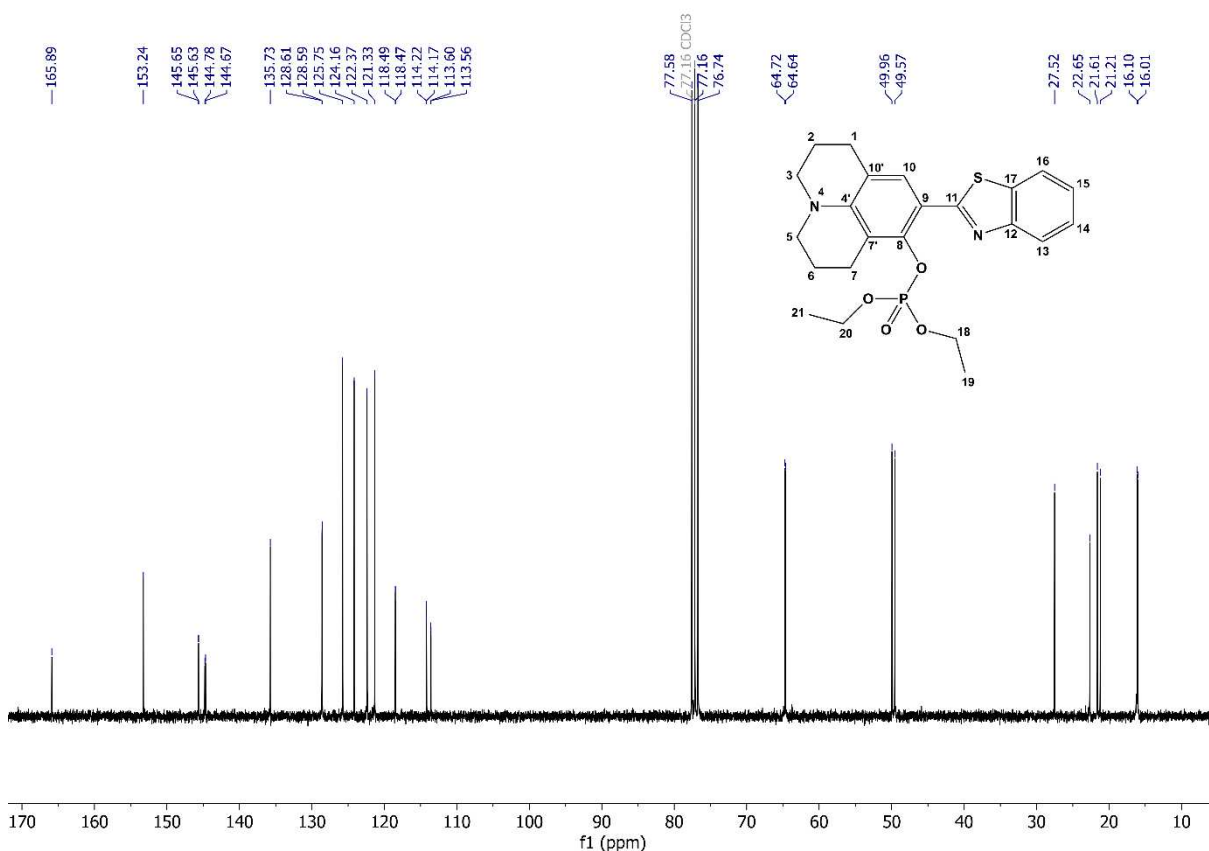
($J = 6,3$ Hz) e $2,76$ ($J = 6,3$ Hz), foram observados três tripletos com integração para quatro, dois e dois hidrogênios, respectivamente, que foram atribuídos aos hidrogênios (H3a, H3b, H5a e H5b) (H7a e H7b) e (H1a e H1b), respectivamente. O multipletto em $\delta 2,02 - 1,85$, integrado para quatro hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios (H2a, H2b, H6a e H6b). Em $\delta 1,23$ ($J = 7,1$ Hz) e $1,10$ ($J = 7,0$ Hz), foram observados dois tripletos integrado para três hidrogênios cada, atribuídos aos hidrogênios CH₃ das etilas (C19 e C21).

Figura 28 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ_{CHCl_3} 7,26) de **BTJ-F1**.



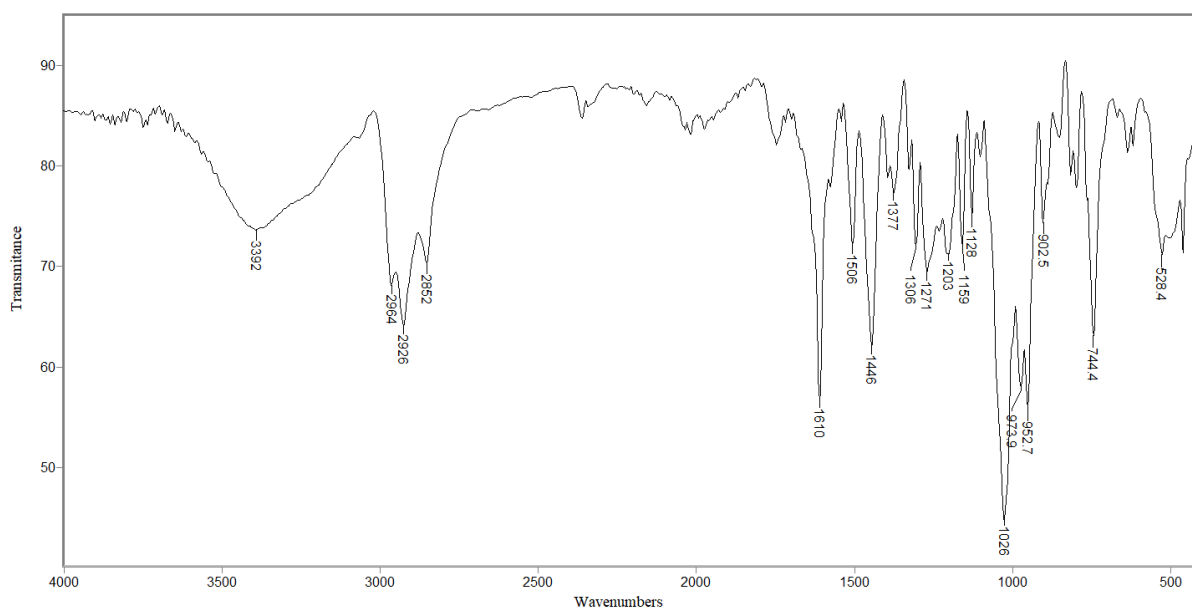
O espectro de RMN de ¹³C apresentou um total de vinte e três sinais (**Figura 29**). Os sinais dos carbonos alifáticos foram observados em $\delta 16,01, 16,10, 21,21, 21,61, 22,65, 27,52, 49,57, 49,96, 64,64$ e $64,72$ e foram atribuídos dos carbonos C19, C21, C2, C6, C1, C7, C5, C3, C18 e C20 respectivamente. Na região de carbonos aromáticos os deslocamentos químicos em $\delta 113,60, 114,17, 118,47, 121,33, 122,37, 124,16, 125,75, 128,59, 135,73, 144,67, 145,63, 153,24$ e 165.89 foram atribuídos aos carbonos C9, C10', C7', C16, C13, C14, C15, C10, C17, C4', C12, C8 e C11.

Figura 29 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,16) de **BTJ-F1**.



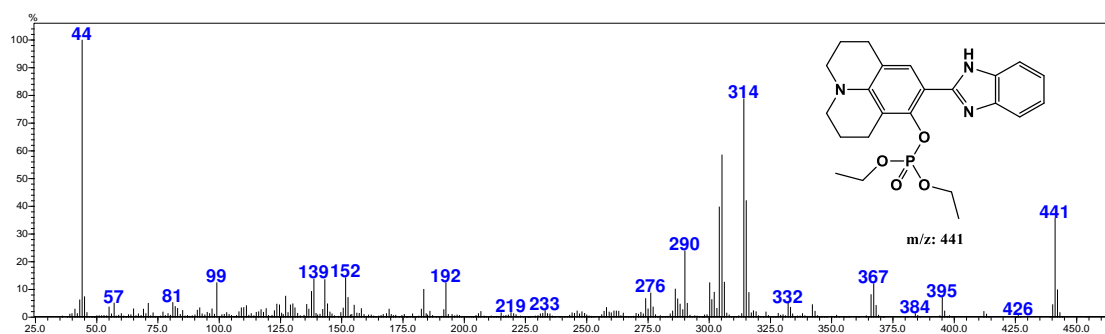
Para a molécula **BIJ-F1**, no espectro obtido na região do infravermelho (**Figura 30**), foram observadas bandas características de absorção do estiramento das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ em 2926 e 2853 cm^{-1} . A banda em 1610 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{C}$, e em 1506 cm^{-1} ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{N}$. Em 1446 e 1376 cm^{-1} foi possível notar as bandas correspondentes ao estiramento e à deformação angular da ligação $\text{C}-\text{N}$, respectivamente. Em 903 cm^{-1} podemos notar uma banda referente ao estiramento da ligação $\text{P}=\text{O}$ e em 744 é possível observar uma banda referente ao estiramento das ligações $\text{P}-\text{O}-\text{C}$.

Figura 30 – Espectro no infravermelho (reflectância) de **BIJ-F1**.



Analisando o espectro de massas (CG-EM), foi observada a presença do íon molecular em m/z 441 (**Figura 31**). A massa ímpar está de acordo com a presença de três átomos de nitrogênio na estrutura.

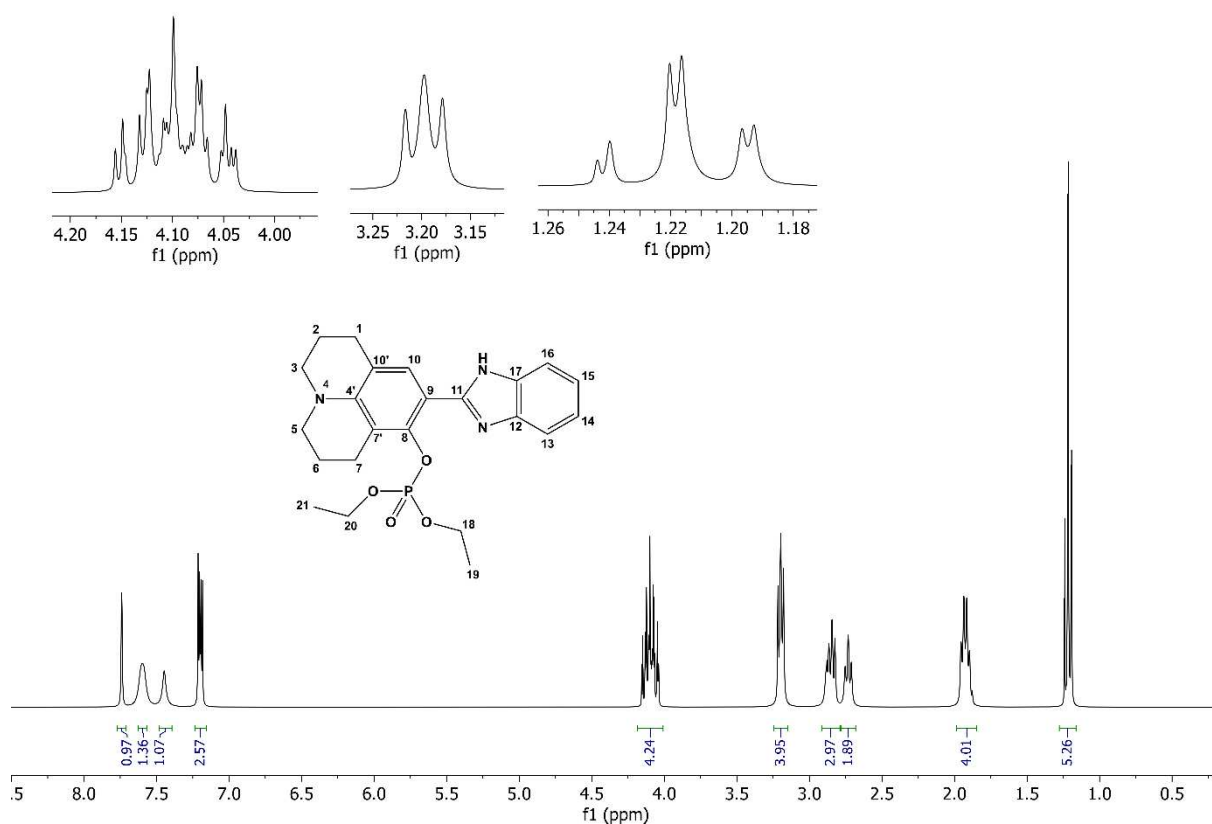
Figura 31 – Espectro de massas (CG-EM, 70 eV) de **BIJ-F1**.



No espectro de RMN de ^1H (**Figura 32**) foi observada a presença de um simpleto em δ 7,74 integrado para um hidrogênio, referente ao hidrogênio NH do anel benzimidazólico. Dois sinais largos foram observados em δ 7,63 – 7,57 e em δ 7,48 – 7,42, integrados para um hidrogênio cada, foram atribuídos aos hidrogênios H13 e H16, respectivamente. Um multipeto é observado em δ 7,24 – 7,15, integrado para três hidrogênios e foi atribuído aos hidrogênios H14, H15 e H10. O multipeto em δ 4,19 – 4,01, integrado para quatro hidrogênios foi atribuído aos hidrogênios CH_2 das etilas (C18 e C20). Na região de hidrogênios alifáticos, em δ 3,20 (J

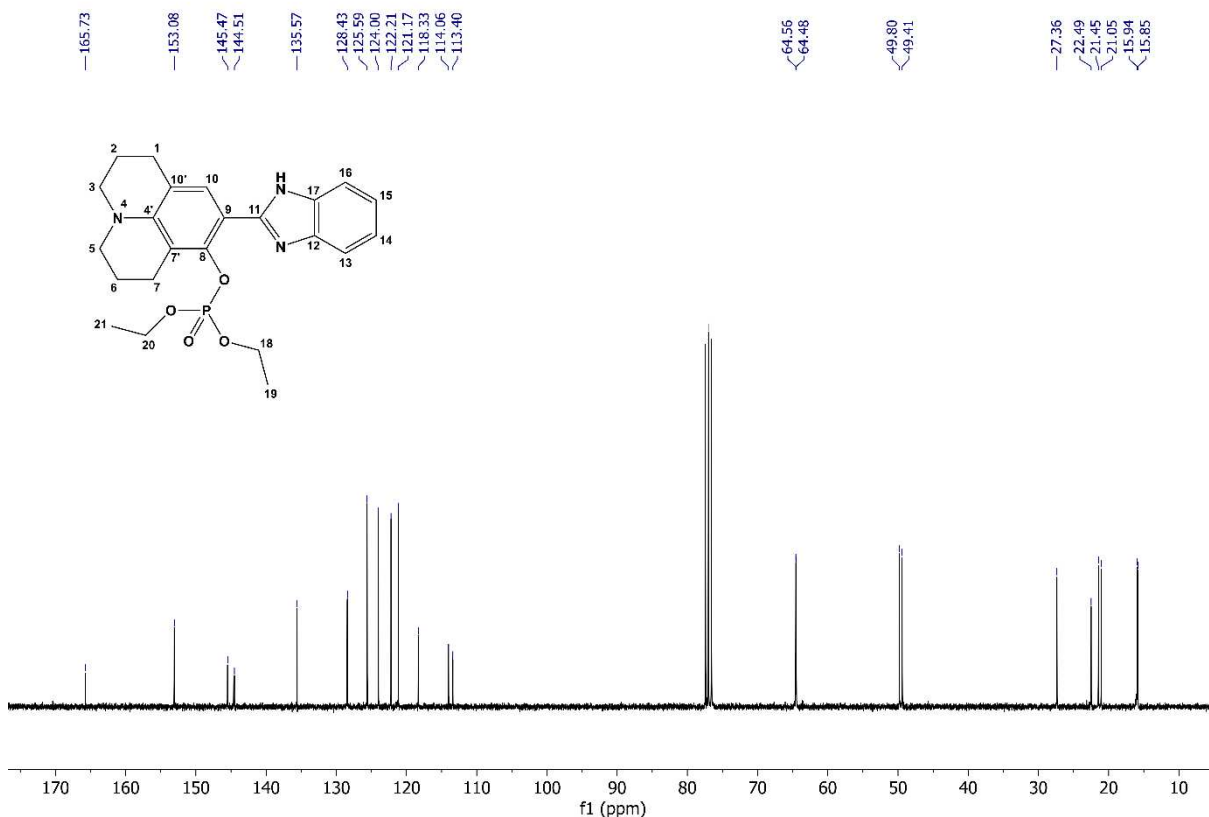
= 5,7 Hz), 2,85 ($J = 6,2$ Hz) e 2,73 ($J = 6,3$ Hz), foram observados três tripletos com integração para quatro, dois e dois hidrogênios, respectivamente, que foram atribuídos aos hidrogênios (H3a, H3b, H5a e H5b), (H7a e H7b) e (H1a e H1b). O multipletto em δ 1,98 – 1,85, integrado para quatro hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios (H2a, H2b, H6a e H6b). Em δ 1,23 ($J = 7,0$ Hz) e 1,22 ($J = 7,1$ Hz), foram observados dois tripletos integrados para três hidrogênios cada, atribuídos aos hidrogênios CH₃ das etilas (C19 e C21).

Figura 32 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ_{CHCl_3} 7,26) de **BIJ-F1**.



O espectro de RMN de ¹³C apresentou um total de vinte e três sinais (**Figura 33**). Os sinais dos carbonos alifáticos foram observados em δ 15,85, 15,94, 21,05, 21,45, 22,49, 27,36, 49,41, 49,80, 64,48 e 64,56 e foram atribuídos dos carbonos C19, C21, C2, C6, C1, C7, C5, C3, C18 e C20 respectivamente. Na região de carbonos aromáticos os deslocamentos químicos em δ 113,40, 114,06, 118,33, 121,17, 122,21, 124,00, 125,59, 128,43, 135,57, 144,51, 145,47, 153,08 e 165,73 foram atribuídos aos carbonos C9, C10', C7', C16, C13, C14, C15, C10, C17, C4', C12, C8 e C11.

Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CHCl_3} 77,16) de **BIJ-F1**.

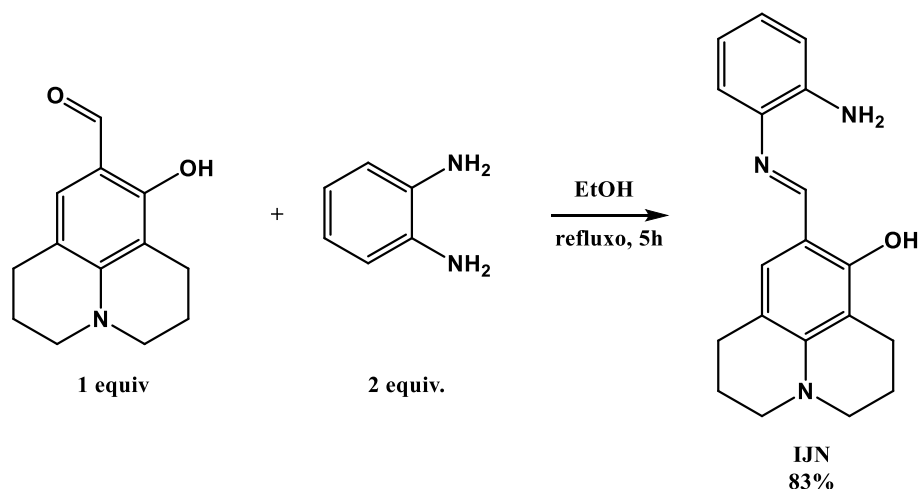


3.4. Síntese das imino-julolidinas

A imino-julolidina **IJN** foi obtida inicialmente como intermediário da reação para a síntese de **BIJ** empregando a metodologia descrita por Shreykar e Sekar (2017) com 62% de rendimento.

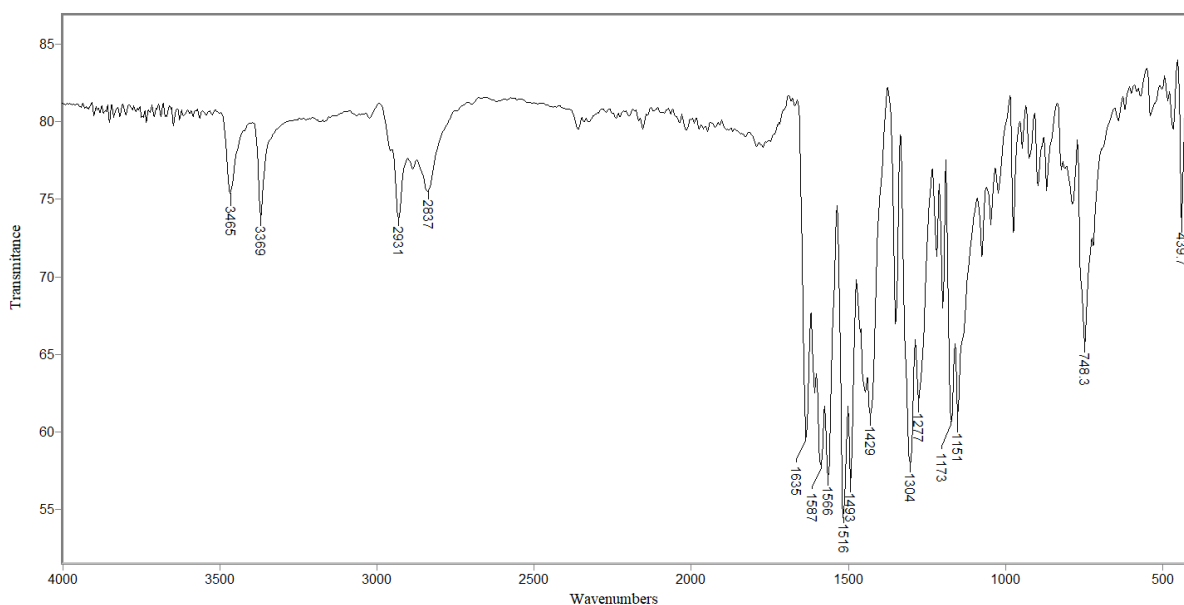
Com o intuito de melhorar o rendimento da reação para a síntese de **IJN**, foi realizada uma nova tentativa aumentando a proporção entre os reagentes e a reação foi monitorada por CCD de hora em hora. Com a proporção de 1 equivalente de 9-formil-8-hidroxiulolidina para 2 equivalentes de *o*-fenilenodiamina, foi obtido o rendimento de 83% de **IJN** após recristalização, sendo estabelecido que o tempo ótimo para a reação foi de 5 horas, para períodos de tempo superiores não foram observadas alterações no perfil da reação monitorada por CCD. (**Esquema 9**)

Esquema 9 – Síntese da imino-julolidina **IJN**.



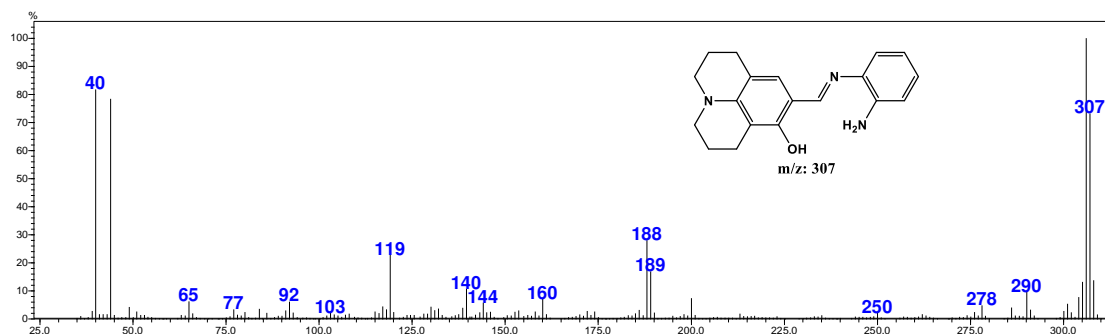
A seguir serão discutidos os dados espectroscópicos e espectrométricos para a **IJN**. No espectro obtido na região do infravermelho (**Figura 34**) foram observadas bandas características de absorção do estiramento das ligações $C_{sp^3}\text{-H}$ em 2931 e 2837 cm^{-1} . A banda em 3369 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação N-H , característico de aminas secundárias aromáticas. A banda em 1635 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C=C , e em 1516 cm^{-1} ao estiramento da ligação C=N . Em 1429 e 1303 cm^{-1} foi possível notar as bandas correspondentes ao estiramento e à deformação angular da ligação C-N , respectivamente. Em 749 cm^{-1} podemos notar uma banda de deformação angular da ligações $\text{C}_{sp^2}\text{-H}$.

Figura 34 – Espectro no infravermelho (reflectância) de **IJN**.



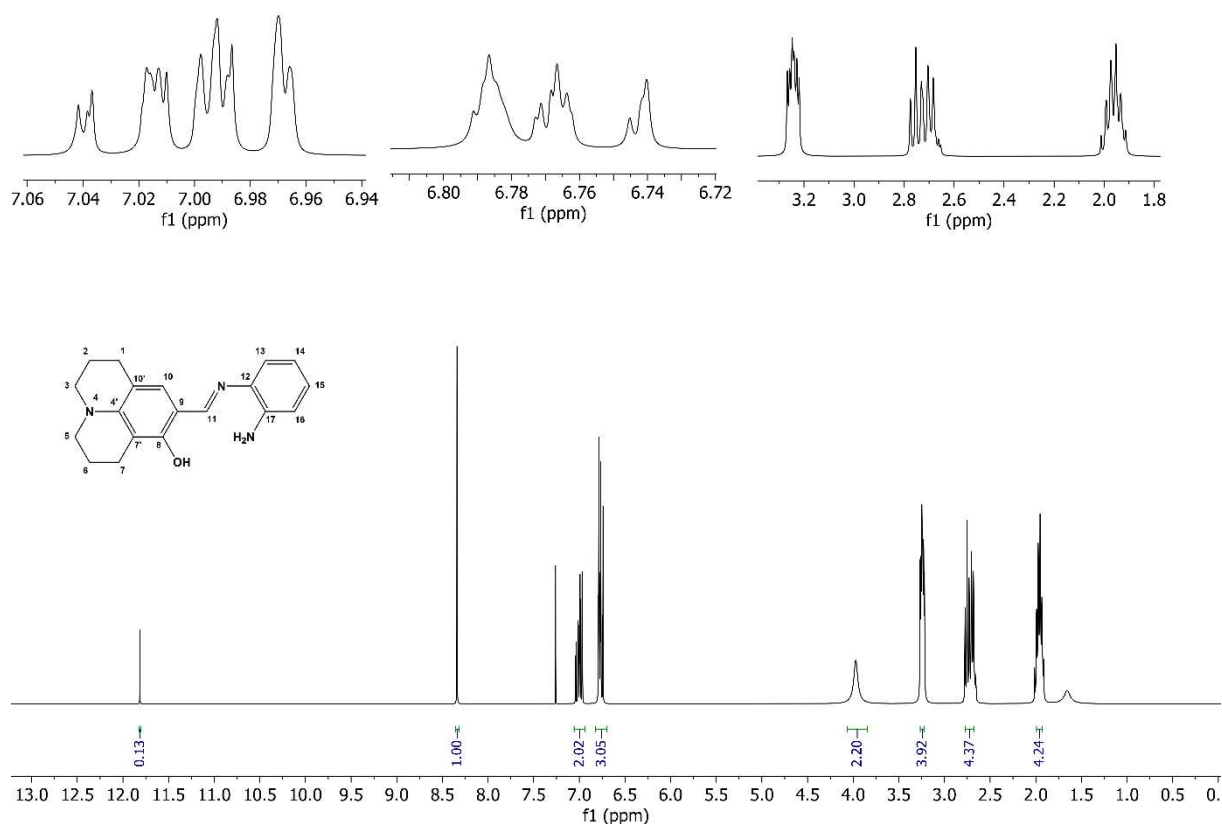
Analisando o espectro de massas (CG-EM), foi observada a presença do íon molecular em m/z 307 (**Figura 35**). A massa ímpar está de acordo com a presença de três átomos de nitrogênio na estrutura.

Figura 35 – Espectro de massas (CG-EM, 70 eV) de **LJN**.



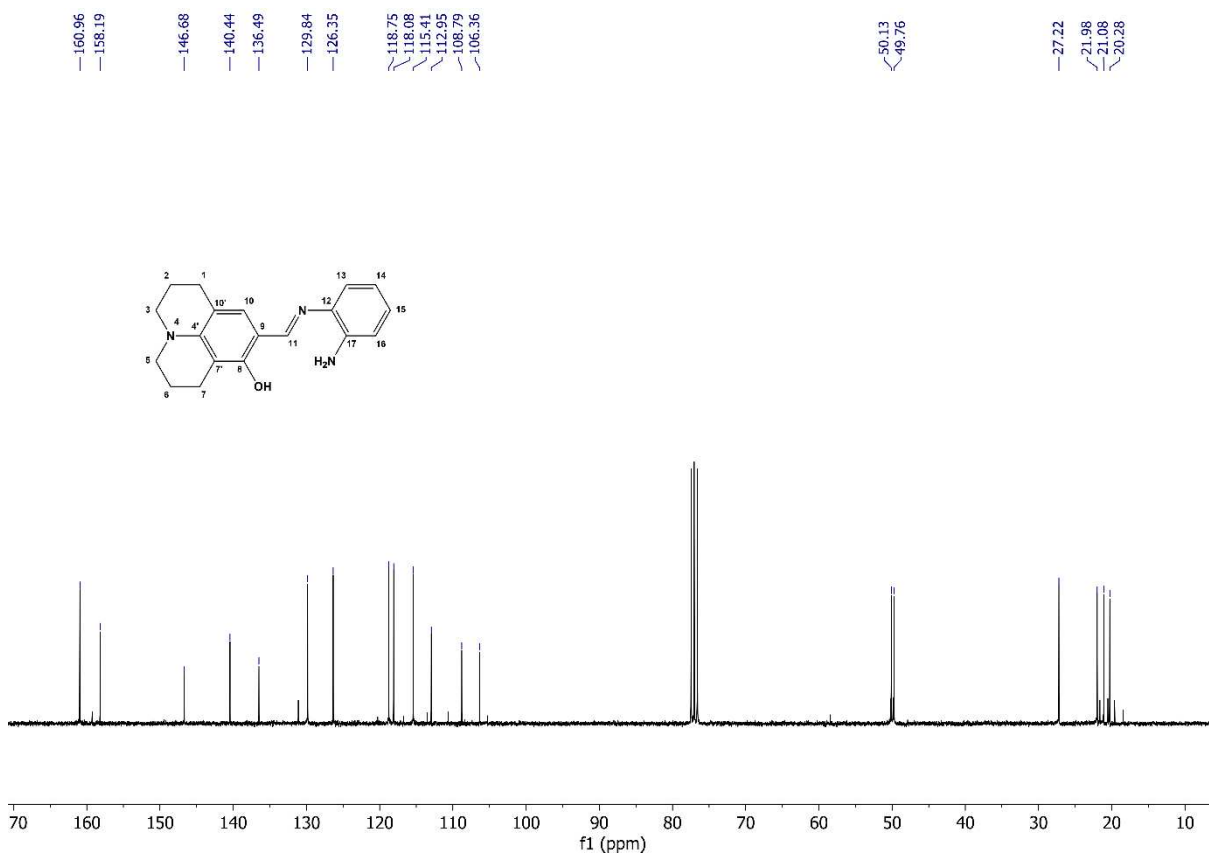
No espectro de RMN de ^1H (**Figura 36**) foram observados dois simpletos em δ 11,81 e 8,34, integrados para um hidrogênio cada que foram atribuídos à hidroxila e ao H11. Na região de hidrogênios aromáticos foram observados dois multipletos em δ 7,07 – 6,94 e 6,88 – 6,69 com integração para dois e três hidrogênios cada que foram atribuídos aos hidrogênios (H13, H16) e (H10, H14, H15), respectivamente. O sinal em δ 3,97, observado como um simpleto largo e com integração para dois hidrogênios foi atribuído ao NH_2 . Na região de hidrogênios alifáticos δ 3,33 – 3,19, 2,80 – 2,62 e 2,04 – 1,85 foram observados três multipletos, com integração para quatro hidrogênios cada que foram atribuídos aos hidrogênios (H3a, H3b, H5a e H5b), (H7a, H7b e H1a e H1b) e (H2a, H2b, H6a e H6b), respectivamente.

Figura 36 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz CDCl_3 , δ_{CHCl_3} 7,26) de **IJN**.



No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar um total de dezenove sinais, o que está de acordo com a estrutura química proposta (**Figura 37**). Os sinais dos carbonos alifáticos foram observados em δ 20,28, 21,08, 21,98, 27,22, 49,76 e 50,13 ppm e foram atribuídos dos carbonos C2, C6, C1, C7, C5 e C3, respectivamente. Na região de carbonos aromáticos os deslocamentos químicos em δ 106,36, 108,79, 112,95, 115,41, 118,08, 118,75, 126,35, 129,84, 136,49, 140,44, 146,68, 158,19 e 160,96 ppm foram atribuídos aos carbonos C9, C10', C7', C16, C13, C14, C15, C10, C17, C4', C12, C8, e C11, respectivamente.

Figura 37 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ_{CHCl_3} 77,16) de **IJN**.



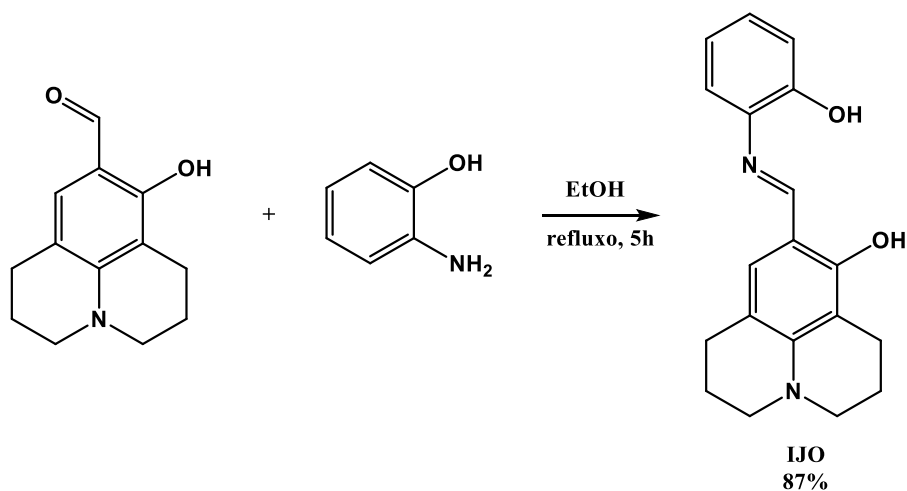
Na tentativa de obtenção da benzoxazoljulolidina partindo da 9-formil-8-hidroxijulolidina e do 2-aminofenol foram avaliadas as metodologias utilizadas na síntese da **BIJ** e da **BTJ** sendo obtido como produto, em todas as duas metodologias, a **IJO**, com rendimentos de 62 e 47%, respectivamente.

Como a síntese da **IJO** já havia sido reportada por Noh *et al.* (2013) partindo da 9-formil-8-hidroxijulolidina e do 2-aminofenol, utilizando metanol como solvente, em refluxo por 3h, sob atmosfera de nitrogênio, com rendimento de 82%, decidimos avaliar esta metodologia (NOH *et al.*, 2013), substituindo metanol por etanol, como na metodologia para a síntese de **IJN**.

Seguindo a metodologia adaptada de Noh *et al.* (2013) o produto **IJO** foi obtido com rendimento de 87%. Neste caso, além do melhor rendimento para o mesmo produto, o metanol – um solvente tóxico – foi substituído por etanol, um solvente verde e renovável.

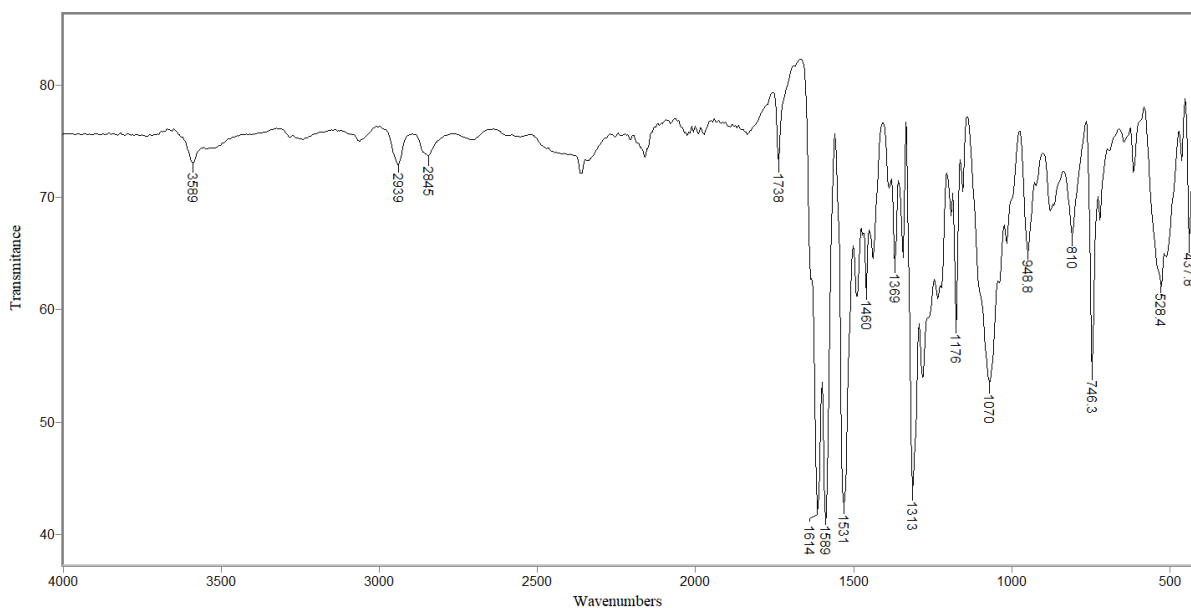
A molécula **IJO** foi caracterizada por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , espectroscopia no infravermelho e CG-EM.

Esquema 10 – Síntese da imino-julolidina **IJO** adaptada de Noh *et al.* (2013).



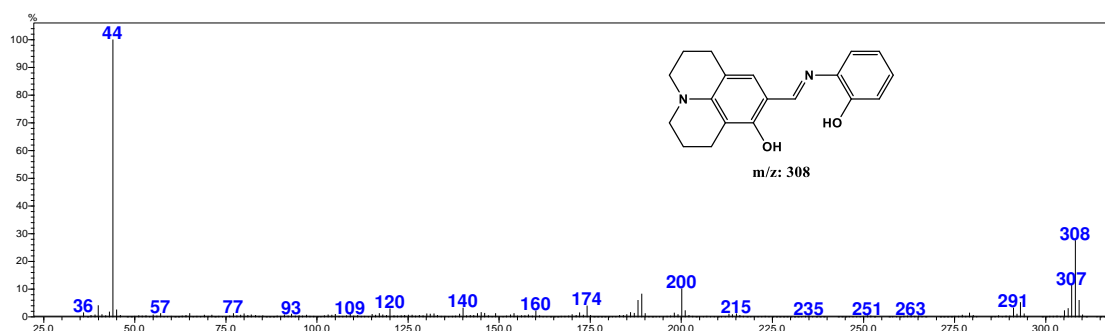
No espectro obtido na região do infravermelho (**Figura 38**) foram observadas bandas características de absorção do estiramento das ligações $C_{sp^3}\text{-H}$ em 2939 e 2845 cm^{-1} . A banda em 1614 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação $C=C$, e em 1589 cm^{-1} ao estiramento da ligação $C=N$. Em 1460 e 1370 cm^{-1} foi possível notar as bandas correspondentes ao estiramento e à deformação angular da ligação $C-N$, respectivamente. Em 746 e 528 cm^{-1} podemos notar duas bandas de deformação angular das ligações $C_{sp^2}\text{-H}$ e $C=C$.

Figura 38 – Espectro no infravermelho (reflectância) de **IJO**.



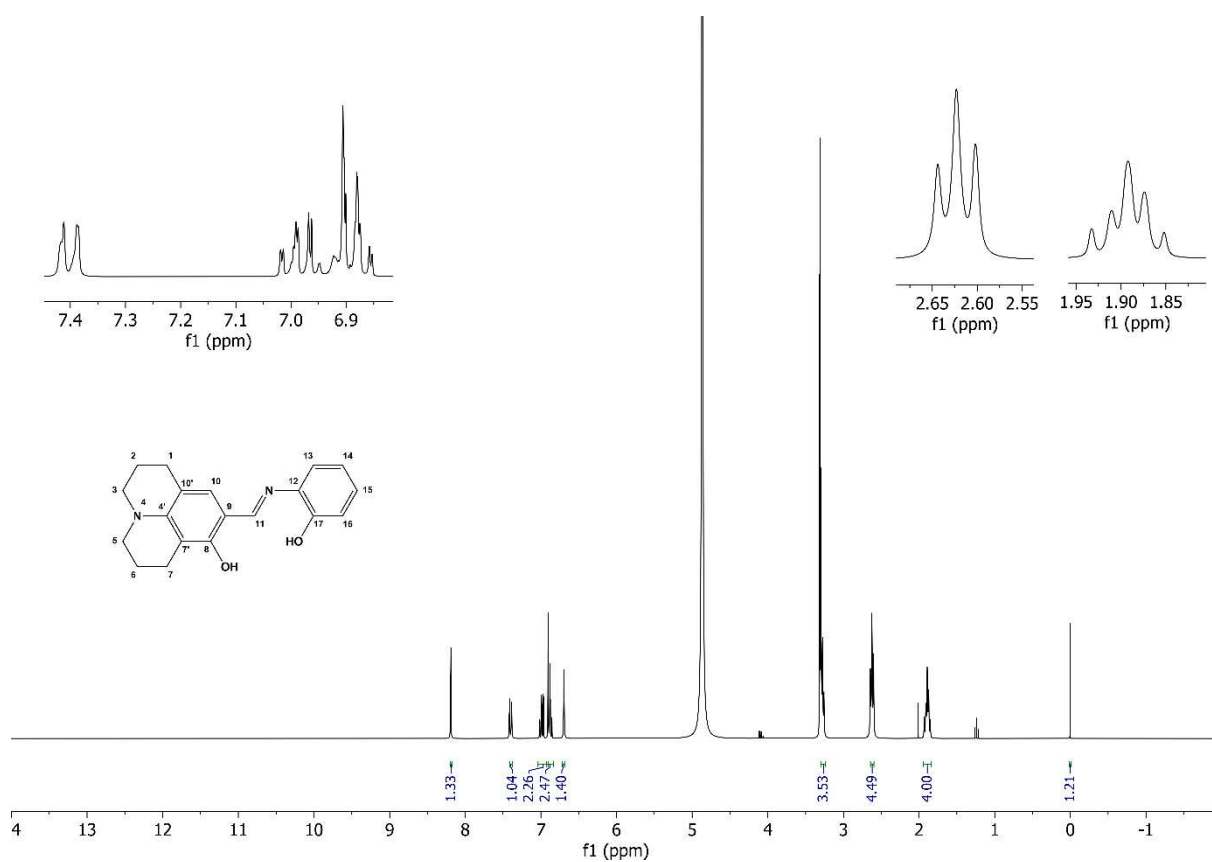
Analisando o espectro de massas (CG-EM), foi observada a presença do íon molecular em m/z 308 (**Figura 39**). A massa par está de acordo com a presença de dois átomos de nitrogênio na estrutura.

Figura 39 – Espectro de massas (CG-EM, 70 eV) de **IJO**.



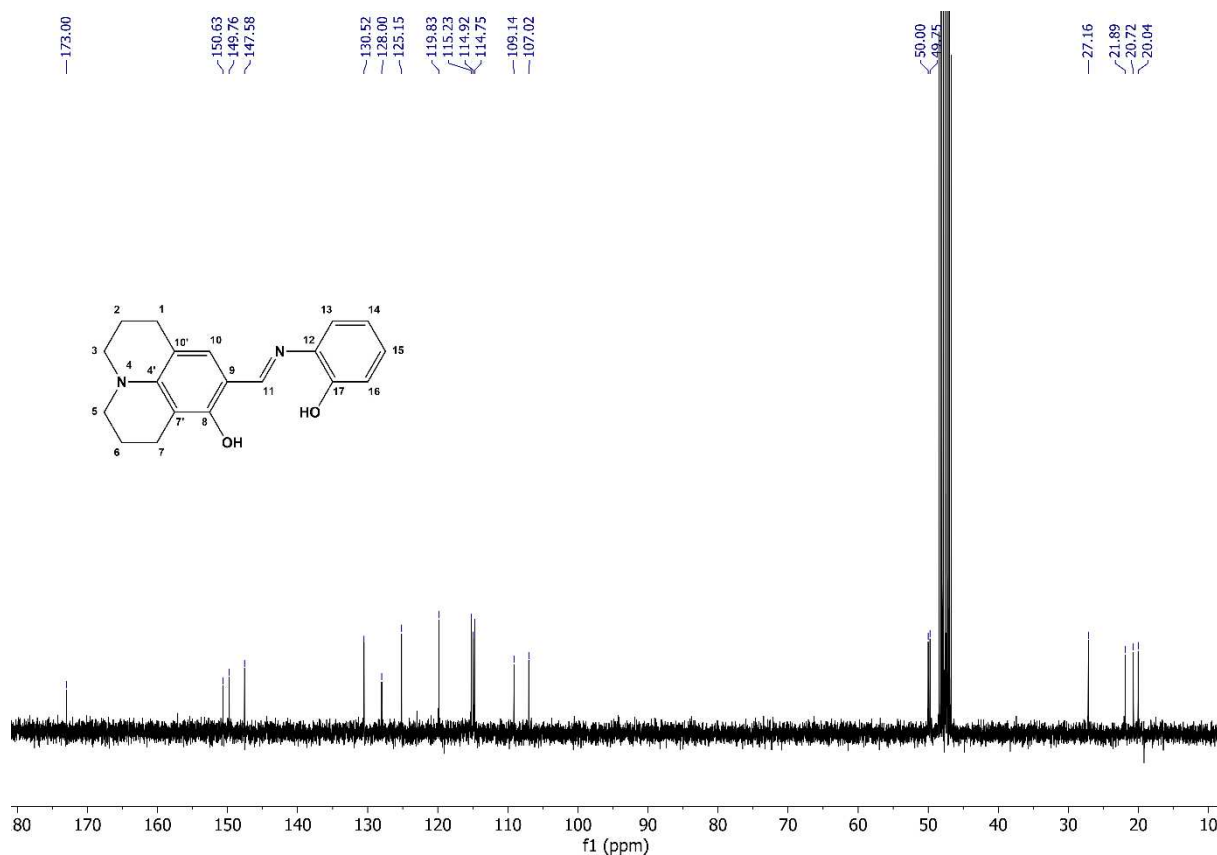
No espectro de RMN de ^1H (**Figura 40**) foi observado um simpleto em δ 8,19, integrado para um hidrogênio, que foi atribuído à hidroxila ligada ao carbono C17. Na região de hidrogênios aromáticos os sinais em δ 7,44 – 7,36, 7,05 – 6,93 e 6,94 – 6,82 observados como multipletos e integrados para um, dois e dois hidrogênios, respectivamente, foram atribuídos aos hidrogênios (H13), (H16, H14) e (H15 e H10). O sinal em δ 6,70 observado como um simpleto e com integração para um hidrogênio foi atribuído ao H11. Na região de hidrogênios alifáticos, em δ 3,33 – 3,20 foi observado um multipletto com integração para quatro hidrogênios, que foi atribuído aos hidrogênios H3a, H3b, H5a e H5b. Os sinais em δ 2,62 e 1,96 – 1,82 foram atribuídos como um triplete ($J = 6,4$ Hz) e um quinteto ($J = 6,5$ Hz) com integração para quatro hidrogênios cada que foram atribuídos aos hidrogênios (H7a, H7b, H1a e H1b) e (H2a, H2b, H6a e H6b), respectivamente. Um sinal em δ 0,00 observado como simpleto e integrado para um hidrogênio foi atribuído à hidroxila ligada ao C8. Tal deslocamento se deve ao fato de que a janela espectral na aquisição do espectro foi pequena e o sinal rebateu para o início do espectro.

Figura 40 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, Metanol- d_4 , $\delta_{\text{CH}_3\text{OH}}$ 4,87) de **IJO**.



O espectro de RMN de ^{13}C apresentou um total de dezenove sinais (**Figura 41**). Os sinais dos carbonos alifáticos foram observados em δ 20,04, 20,72, 21,89, 27,16, 49,75 e 50,00 e foram atribuídos dos carbonos C2, C6, C1, C7, C5 e C3, respectivamente. Na região de carbonos aromáticos os deslocamentos químicos em δ 107,02, 109,14, 114,75, 114,92, 115,23, 119,83, 125,15, 128,00, 130,52, 147,58, 149,76, 150,63 e 173,00 foram atribuídos aos carbonos C9, C10', C7', C16, C13, C14, C15, C10, C17, C4', C12, C8, e C11, respectivamente.

Figura 41 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, Metanol- d_4 , $\delta_{\text{CH}_3\text{OH}}$ 49,00) de **IJO**.



3.5. Ensaio de complexação com metais

Iminas, benzimidazóis e benzotiazóis são frequentemente reportados na literatura pela sua capacidade de complexar metais em meio aquoso ou não-aquoso, podendo atuar como sensores químicos na detecção de alguns metais.

Tendo isso em vista, foram selecionadas 4 moléculas (**Figura 42**) que foram sintetizadas neste trabalho para um ensaio qualitativo de complexação com íons metálicos.

Os ensaios foram conduzidos para os seguintes íons metálicos: Cu(II), Ca(II), Mn(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II), Co(II), Fe(II), Fe(III), Cr(III), Ni(II), Ba(II), Al(III), Pb(II). Foram utilizadas soluções de íons metálicos na concentração de $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, as soluções com os ligantes na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e os ensaios foram conduzidos em meio neutro, básico e ácido. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 3**, para meio neutro e para meio básico. O sinal positivo (+) na tabela indica que houve complexação com o metal, quando foi observada mudança na coloração da solução, e o sinal negativo (-) indica que não houve complexação com o metal, quando não foi observada mudança na coloração da solução. Em

meio ácido não foi observada complexação com nenhum metal, para nenhuma das 4 moléculas avaliadas nos ensaios.

Figura 42 – Moléculas testadas quanto a sua capacidade de complexação com metais.

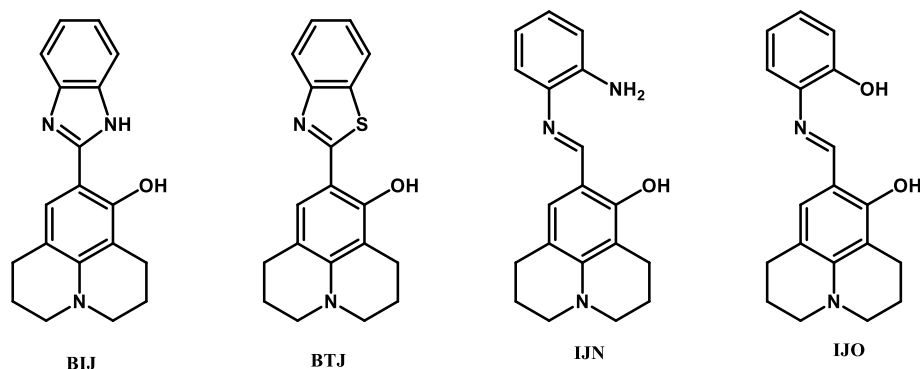


Tabela 3 – Ensaio de complexação com diferentes metais em meio neutro e meio básico.

	Meio neutro													
	Cu ²⁺	Ca ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺	Co ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Ba ²⁺	Al ³⁺	Pb ²⁺
BIJ	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BTJ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IJN	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
IJO	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

	Meio básico													
	Cu ²⁺	Ca ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺	Co ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Ba ²⁺	Al ³⁺	Pb ²⁺
BIJ	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BTJ	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
IJN	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IJO	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Em meio básico, observou-se que a molécula **IJN** foi seletiva na complexação de Cu(II). Tendo em vista os resultados obtidos, decidiu-se avaliar diferentes parâmetros – concentração ótima de NaOH e ligante, cinética reacional, razão estequiométrica metal/ligante, seletividade, recuperação e precisão – para a molécula **IJN**, utilizando, para isso, a câmera de um smartphone para aquisição dos dados RGB das reações colorimétricas.

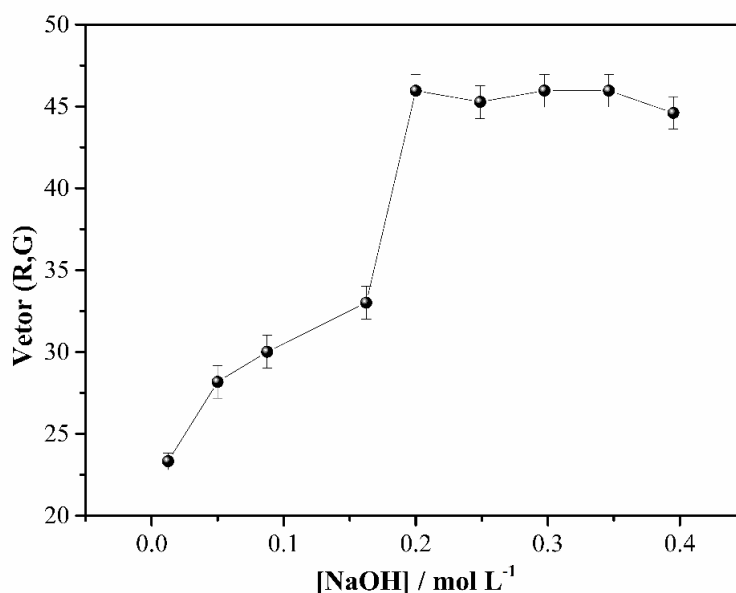
3.6. Otimização das condições reacionais e procedimentos operacionais

No processo de otimização dos parâmetros operacionais observou-se que todas as dimensões de área de seleção de imagem apresentaram mesmo sinal analítico, com CV < 1%.

Sendo assim foi escolhida a dimensão 40×40 (comprimento \times altura) como padrão, indicando que a distribuição de luz estava homogênea por todo módulo reacional.

A reação entre Cu(II) e **IJN** (ligante) foi otimizada com intuito de se obter resposta analítica adequada para se fazer a determinação de cobre em amostras de cachaças. Sendo assim, a proposta inicial foi investigar qual pH ótimo para reação descrita. Dessa forma, 200 μL de diferentes concentrações de Cu(II) variando de 2 a 1 mg L^{-1} foram dispostos em uma placa de porcelana, sendo em seguida, adicionado 100 μL de soluções tampão em diferentes pH 4, 6, 7, 8, 9 e 10, e por fim, 100 μL do ligante **IJN** em concentração de $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Percebeu-se a partir destes estudos que, apenas em pH básico 8, 9 e 10, foi formado um gradiente colorimétrico a partir da variação da concentração do metal, sendo este gradiente mais perceptível em pH 10. Entretanto, após medida dos valores RGB, observou-se uma baixa sensibilidade analítica, e decidiu-se optar pela adição direta de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} , substituindo as soluções tampão. Dessa forma notou-se uma melhora significativa da sensibilidade analítica. Não obstante, constatou-se variações significativas nos canais R e G e uma estabilização do valores dos canais B, e portanto, como houve variação em dois canais conjuntamente, optou-se por fazer uma vetorização destes canais, como resposta analítica. Sendo assim, testou-se várias concentrações de hidróxido de sódio, buscando identificar a resposta analítica máxima (maiores valores para Vetor (R,G)) (**Figura 43**).

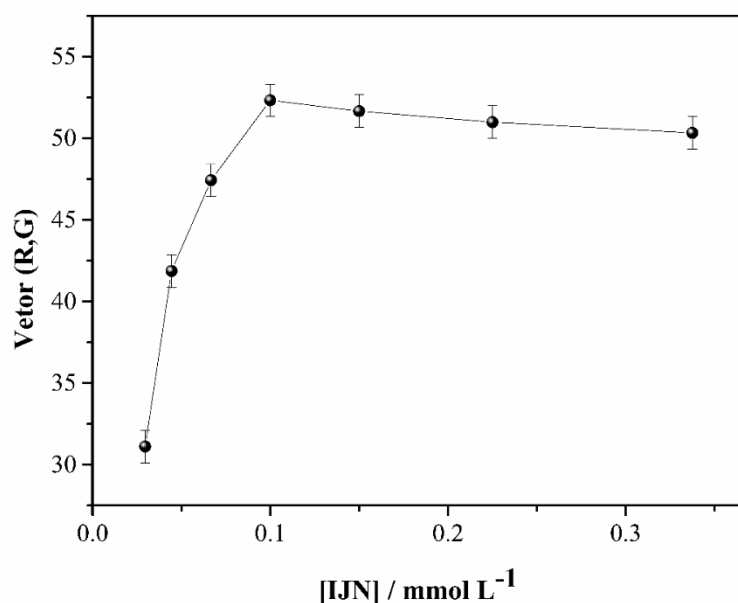
Figura 43 – Variação da concentração de hidróxido de sódio em função da resposta analítica (vetor R,G).



Como pode ser observado, a concentração ótima de NaOH foi de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, e após esse valor, houve uma estabilização da resposta e, portanto, essa concentração foi empregada em estudos posteriores.

Após a otimização da concentração ótima de NaOH, buscou-se identificar a concentração ótima do ligante **IJN**. Como pode ser observado na **Figura 44**, a concentração ótima do ligante é $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e, portanto, foi empregada em estudos posteriores.

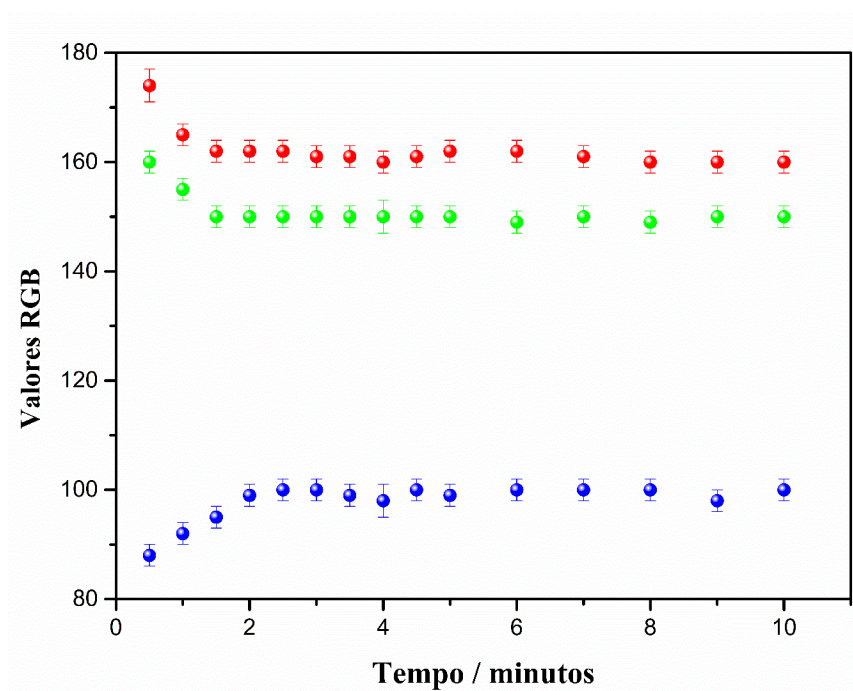
Figura 44 – Variação da concentração de **IJN** em função da resposta analítica (vetor R,G).



Após otimização da concentração ideal de NaOH e de **IJN**, foi estudada a cinética reacional, procurando obter resultados que pudessem indicar uma alta resposta analítica por um período longo de tempo, e como pode ser observado na **Figura 45**, os canais R e G mantêm-se estáveis a partir de 1,5 minutos decorridos do início da reação, indicando que a formação do complexo é extremamente rápida, e que, além disso, mantém estável por um longo período. Em relação ao aumento do canal Blue com o passar do tempo, pode ser explicado porque a **IJN** apresenta coloração amarelada e, portanto, no início da reação, tem-se o equilíbrio de complexação deslocado no sentido da **IJN** livre e, portanto, observa-se um valor baixo para o canal Blue, que é complementar à cor amarela. Entretanto, à medida que a reação se processa, o canal Blue aumenta, indicando que a concentração da **IJN** livre está diminuindo em função da formação do complexo esverdeado do **IJN** com o Cu(II). Por outro lado, os canais R e G, apresentam valores menores porque a reação se processa e, com a formação do composto (esverdeado), o canal Red, que apresenta cor complementar ao verde, tem seus valores

diminuídos. O canal Green apresenta seus valores diminuídos porque a decomposição do espectro visível em canais é ampla e, por isso, também consegue responder à mistura de cores (esverdeada do complexo e amarelada do ligante).

Figura 45 – Estudo da cinética reacional do complexo Cu(II)/I₂N.



3.7. Determinação da razão estequiométrica Cu(II)/I₂N

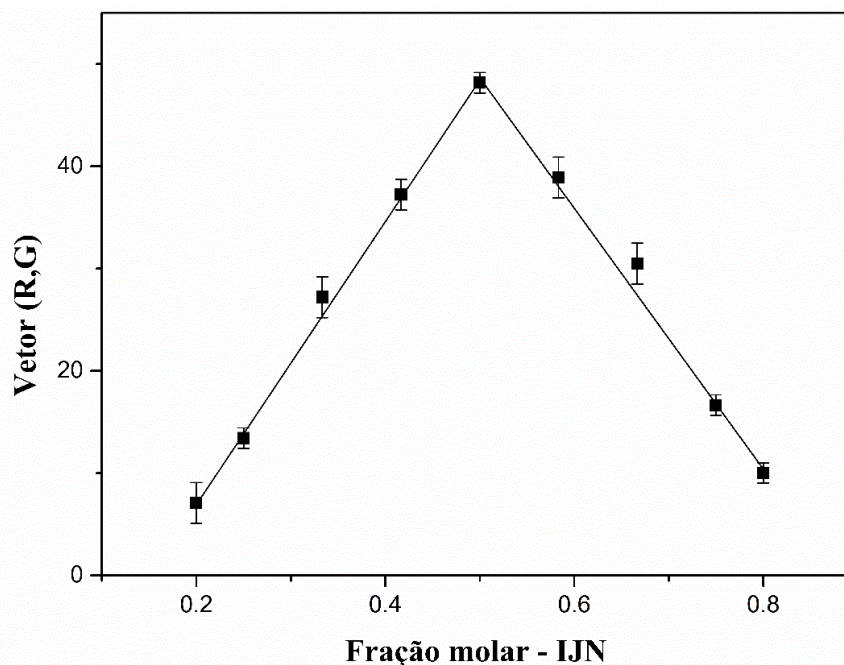
O método de Job (JOB, 1928), também conhecido como método de variação contínua, é uma das técnicas mais utilizadas para determinar a razão estequiométrica, devido à sua simplicidade e rapidez (RENNY *et al.*, 2013). Assim, este método foi utilizado para obter a relação estequiométrica do complexo Cu(II)/I₂N.

Neste estudo, duas soluções de 4 mmol de Cu(II) e I₂N foram preparadas e avaliadas em diferentes razões metal/ligantes. A curva de Job foi construída plotando os resultados obtidos do sinal analítico (Vetor R,G) em relação à concentração de equilíbrio de Cu(II)_α/I₂N_β contra a fração molar de I₂N. O valor α/β foi obtido a partir da abcissa do ponto máximo da curva de Job.

A **Figura 46** ilustra o diagrama de Job para a reação Cu(II)_α/I₂N_β. O maior sinal analítico foi quando a fração molar do ligante foi equivalente a 0,5. Quando o valor da fração molar do ligante livre é usado no cálculo usando a equação $X_{I_2N} = n / (n + 1)$, a quantidade de

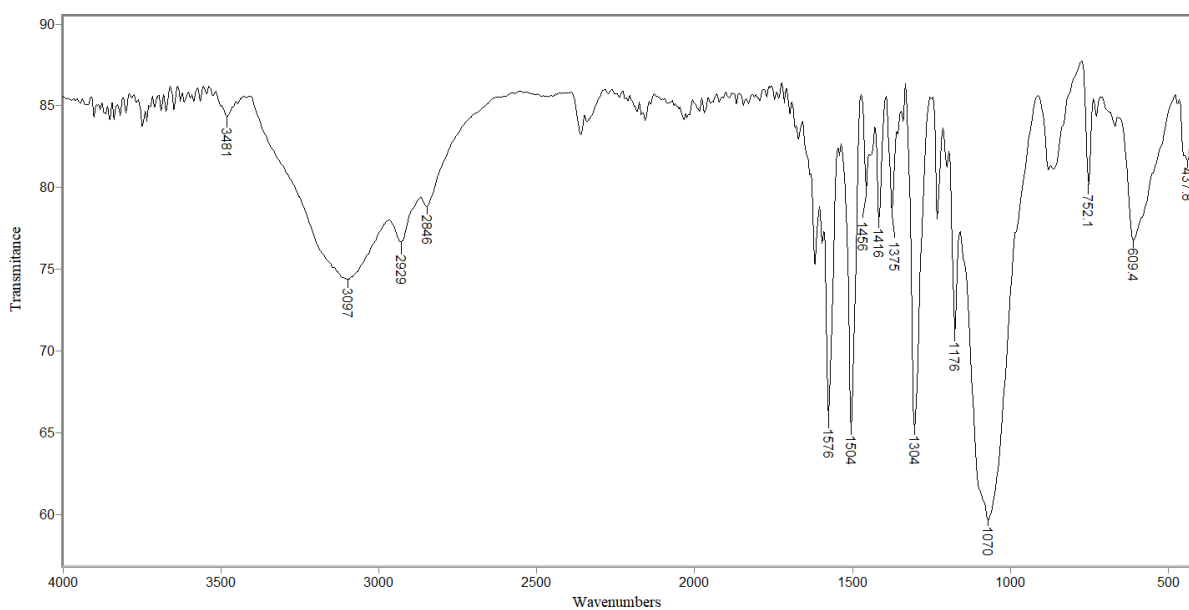
números de mols (n) igual a 1 é encontrada. Desta forma, pode-se concluir pelo método de Job que a razão estequiométrica da reação Cu(II)/IJN é de 1:1.

Figura 46 – Método de Job para determinar a estequiometria do complexo Cu(II)/IJN.



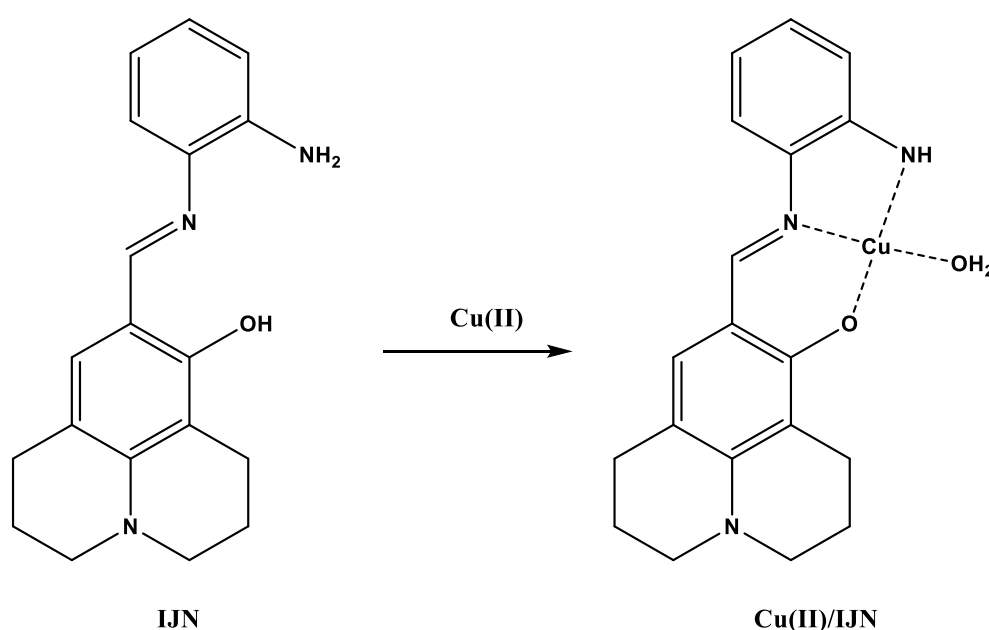
Analisando os espectros no IV (**Figura 47**) e comparando com os dados espectrais de IJN (**Figura 34**, página 45), foi possível propor a estrutura para o complexo Cu(II)/IJN.

Figura 47 – Espectro no infravermelho do complexo Cu(II)/IJN.



A formação do complexo pode ser especulada a partir de alterações dos deslocamentos das bandas dos espectros no infravermelho do complexo em relação ao ligante livre. Analisando o espectro do complexo (**Figura 47**), observa-se o desaparecimento da banda em 3369 cm^{-1} , que foi atribuída ao estiramento da ligação N-H, característico de aminas secundárias aromáticas, e também o deslocamento e alargamento da banda de estiramento da ligação C-O em 1070 cm^{-1} , o que indica que o oxigênio da hidroxila e o nitrogênio da amina fazem coordenação com o íon metálico. No espectro do complexo há também o aparecimento de banda característica de estiramento de ligação O-H, o que indica que pode haver uma molécula de água coordenada ao íon metálico. Tendo em vista que o Cu^{2+} pode possuir número de coordenação 4 ou 6 e, com os dados analisados a partir dos espectros no infravermelho do ligante livre e do complexo, foi proposta uma estrutura para o complexo (**Figura 48**).

Figura 48 – Estrutura proposta do complexo 1:1 de IJN e Cu(II).



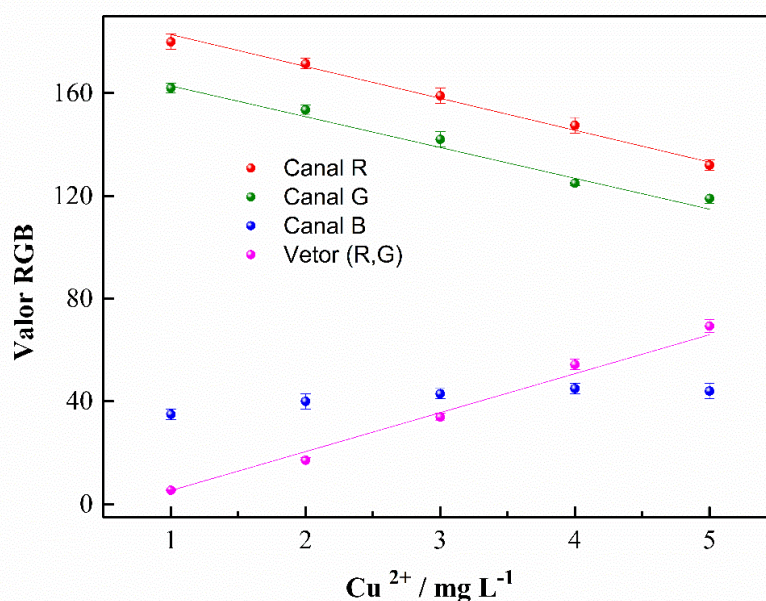
3.8. Validação analítica – determinação de Cu(II) em amostras de cachaça

De acordo com a Instrução Normativa nº 13 de 29 de junho de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a cachaça é definida como uma bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% v/v a 20 °C, obtida através de destilação simples do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar (MAPA, 2005).

A cachaça artesanal geralmente é produzida em alambiques de cobre, o que confere melhor qualidade ao produto quando comparado aos alambiques confeccionados com outros materiais, contudo, pode haver contaminação do produto final. O excesso de cobre no organismo pode ser tóxico devido à afinidade do cobre com grupos S-H de muitas proteínas e enzimas, causando doenças como epilepsia, melanoma, bem como a perda do paladar (AZEVEDO *et al.*, 2003). A legislação brasileira permite uma quantidade máxima de 5 mg L^{-1} de cachaça, portanto, é de grande importância monitorar o teor de cobre para garantir a qualidade deste produto tão consumido em nosso país (MAPA, 2005).

A linearidade do método desenvolvido foi verificada pela análise da curva analítica usando os métodos dos mínimos quadrados. Como pode ser observado na **Figura 49**, os canais R e G e também o Vetor (R,G) responderam linearmente para a faixa estudada (1 a 5 mg L^{-1} de Cu^{2+}).

Figura 49 – Curvas analíticas para determinação de Cu(II) em cachaça empregando os canais RGB e o vetor (R,G).



Na **Tabela 4** estão sumarizados os parâmetros analíticos para as curvas obtidas pelas três respostas analíticas. Como podemos constatar houve uma melhora significativa na sensibilidade analítica quando foi empregado o Vetor (R,G) como resposta analítica, além de uma melhora também perceptível em termos do coeficiente de determinação (R^2), e, portanto, todas as determinações das concentrações de Cu(II) nas amostras de bebidas foram empregando o Vetor (R,G) como resposta analítica.

Tabela 4 – Parâmetros analíticos das curvas obtidas para determinação de Cu(II) empregando os canais R, G e também o Vetor (R,G).

Canais/Vetor	Equação	R ²
R	$y = 195 \pm 2,15 - 12,42x \pm 0,62$	0,990
G	$y = 174 \pm 4,00 - 12,00x \pm 1,10$	0,987
Vetor (R,G)	$y = -9,89 \pm 1,12 + 15,17x \pm 0,90$	0,992

O limite de detecção foi estimado com base em novas recomendações, conforme descrito por Currie (1999) (CURRIE, 1999). Foi utilizado o tipo 2 (falso negativo), aceitando a "hipótese nula" (analito ausente), sendo assim, foram realizadas 10 leituras ($n = 10$) do branco analítico (sem a presença do metal), e empregando a seguinte fórmula: $LD = 2t(v, 95\%) (v / v + 1) \times S_0$, na qual: v = graus de liberdade; t = Student's-t; S_0 (desvio padrão do branco). Dessa forma, o limite de detecção foi de $0,26 \text{ mg L}^{-1}$ e o limite de quantificação (LQ) definido como 3,04 vezes o limite de detecção foi de $0,79 \text{ mg L}^{-1}$. O estudo de seletividade também foi realizado empregando as concentrações de Cu(II) a 3 mg L^{-1} . Sendo assim, restaram dois níveis de interferência, na proporção Cu(II)/interferente 1:1 e também 1:10. Os resultados estão sumarizados na **Tabela 5**.

Neste estudo foi observado que alguns metais podem ser interferentes para análise de Cu(II) em cachaça. Na proporção de 1:1 de Cu(II)/interferente, vale ressaltar que nenhum dos metais apresentou, neste caso, uma interferência superior à $\pm 10\%$. Entretanto, na proporção de 1:10 de Cu(II)/interferente, a maioria dos metais apresentou interferência significativa na determinação de Cu(II). Alguns metais em meio alcalino formam hidróxi-complexos, como o Fe(II) que forma o complexo $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, de cor amarelada característica. Dessa forma, com excesso do interferente, após a adição do NaOH na etapa que antecede a adição do ligante, já havia um pronunciamento excessivo da cor da solução, provocada pela formação desse hidróxi-complexo.

Outros metais, por sua vez, diminuiram a resposta de modo significativo, ou seja, apresentaram interferência negativa, atenuando o sinal do Vetor (R,G) em relação ao padrão de Cu(II). Esses metais foram: Ca(II), Zn(II), Ni(II) Cr(III), Cd(II) e Ba(II). Essa possível interferência pode ser explicada por dois motivos. A primeira possibilidade é a formação de complexos do ligante com os metais citados na região do UV, o que aumentaria a formação desses complexos e diminuiria a concentração de ligante disponível para complexar com o Cu(II), diminuindo a resposta analítica e explicando a interferência negativa. Outra

possibilidade, é o impedimento espacial que esses metais podem fazer quando estão em altas concentrações em relação ao Cu(II). Nessa perspectiva, estes metais muito eletropositivos poderiam se aproximar dos centros eletronegativos nos quais se formam a complexação, e, por todos terem raio atômico maior que o Cu(II), poderiam dificultar a ligação Cu(II)-I₂N.

Tabela 5 – Estudo de seletividade para determinação de Cu(II) em amostras de cachaças ($n=10$).

Interferente	Razão Cu ²⁺ : Interferente	Erro relativo (%)
Fe(II)	1:1	14,10
	1:10	29,60
Ca(II)	1:1	+1,48
	1:10	-19,75
Fe(III)	1:1	+2,80
	1:10	+5,80
Zn(II)	1:1	+2,35
	1:10	+15,76
Al(III)	1;1	+0,79
	1:10	-1,19
Ni(II)	1:1	-8,90
	1:10	-18,75
Pb(II)	1:1	+5,40
	1:10	-6,77
Cr(III)	1:1	-9,50
	1:10	-29,25
Cd(II)	1:1	-8,33
	1:10	-12,36
Ba(II)	1:1	0,016
	1:10	-15,87

Entretanto, em nenhum estudo anteriormente reportado, as concentrações de algum desses interferentes estudados foram iguais ou superiores à concentração de Cu(II) em cachaça, indicando que, de fato, o cobre é o metal majoritário na bebida e que o método pode ser

considerado seletivo para determinação de Cu(II) em amostras de cachaças (PESSOA *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2005).

Sendo assim, estudos de recuperação foram realizados para avaliação de possíveis efeitos de matriz na determinação de Cu(II) empregando o ligante **IJN** e os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 6**. Foram adicionados dois níveis de padrão de Cu(II): 1 e 3 mg L⁻¹ nas amostras de cachaças avaliadas e os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 6 – Estudo de recuperação realizados para determinação de Cu(II) em amostras comerciais de cachaças.

Amostra	Adicionado ^a	Recuperado ^a	Recuperação (%)
S1	1	1,1 ± 0,04	110,00
	3	2,8 ± 0,03	93,33
S2	1	0,9 ± 0,04	90,00
	3	2,99 ± 0,07	99,67
S3	1	0,84 ± 0,05	84,00
	3	2,59 ± 0,07	86,33
S4	1	1,12 ± 0,04	112,00
	3	3,15 ± 0,08	105,00
S5	1	0,96 ± 0,02	96,00
	3	3,00 ± 0,10	100,00
S6	1	0,97 ± 0,02	97,00
	3	3,16 ± 0,09	105,33
S7	1	1,05 ± 0,04	105,00
	3	3,02 ± 0,03	100,67
S8	1	0,89 ± 0,05	89,00
	3	3,25 ± 0,10	108,33

^a Concentração expressa em mg L⁻¹; Média ± desvio padrão.

Como pode ser observado na tabela acima, os percentuais de recuperação variaram entre 84 a 112 %, com recuperação média de 98,85%, indicando que não existem efeitos de matrizes significativos para determinação de Cu(II) em cachaça empregando a reação com **IJN**.

Para calcular a precisão do método, foram feitas análises de 10 soluções de Cu(II) com concentração de 3 mg L⁻¹ empregando as condições otimizadas e obteve-se um coeficiente de variação percentual (CV%) de 4,5 % ($n = 10$), indicando a alta precisão do método.

Por fim, as concentrações das amostras foram testadas empregando a Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) como método de referência e o método proposto. Os resultados obtidos por ambos métodos estão representados na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Resultados obtidos para determinação de Cu(II) em amostras de cachaça empregando o método proposto e o método de referência.

Amostras	Método Proposto (mg L⁻¹)	Método de Referência (mg L⁻¹)	Erro Relativo (%)
S1	3,32 ± 0,4	3,6 ± 0,2	-8,44
S2	3,42 ± 0,4	3,35 ± 0,2	2,05
S3	0,31 ± 0,2	0,26 ± 0,1	16,13
S4	0,33 ± 0,2	0,35 ± 0,1	-6,06
S5	0,26 ± 0,3	0,29 ± 0,1	-11,53
S6	< LD	0,24 ± 0,1	-
S7	< LD	0,10 ± 0,1	-
S8	< LD	0,15 ± 0,1	-

Média ± desvio padrão.

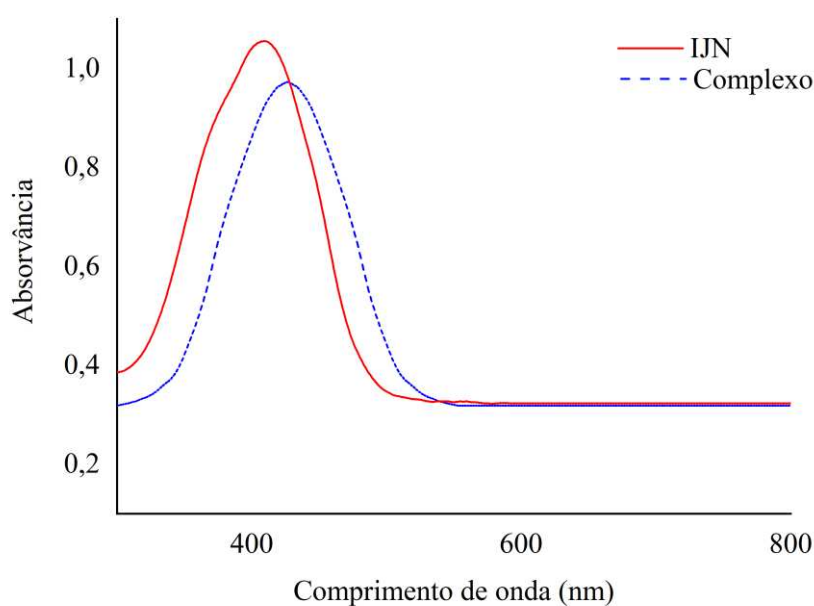
Como pode ser observado, os erros relativos referentes às concentrações obtidas pelo método proposto e o método de referência variaram entre -11,53 e 16,13 %, valores que podem ser considerados aceitáveis, considerando a portabilidade do método proposto. Também foi constatado que as amostras de cachaças analisadas estão com o teor de cobre abaixo de 5 mg L⁻¹, teor máximo permitido pela legislação brasileira. Além disso, o método proposto apresenta baixo consumo de reagentes (apenas 400 µL por análise) e apresenta custo irrisório se comparado com o método oficial, além de apresentar alta portabilidade, sendo útil para aplicação *in situ*, no qual o próprio produtor pode controlar os níveis de Cu(II) das cachaças produzidas. O método apresenta menores custos em relação à manutenção e dispensa uso de gases, que são inconvenientes frequentes para laboratórios que apresentam um Espectrofotômetro de Absorção Atômica (EAA). Um ponto a ser observado no presente método é a menor precisão das medidas, como pode ser observado no desvio padrão superior aos

obtidos pelos resultados do EAA. Além disso, o método proposto possui um limite de detecção menor que o método oficial, o que pode ser evidenciado pela concentração de Cu(II) não detectada para as amostras S6, S7 e S8.

Com o propósito de comparar os resultados alcançados através do método proposto e pelo EAA, foi empregado o teste t pareado, a 95% de confiabilidade. Este, por sua vez, indicou que o valor de $t_{\text{calculado}}$ foi menor perante o de $t_{\text{crítico}}$, ($0,61 < 2,77$), e, portanto, é passível de afirmação que não existem distinções estatisticamente significativas na determinação de Cu(II) em cachaça empregando os dois métodos quantitativos.

Sendo assim, neste trabalho foi proposto o emprego de um ligante inédito para determinação de Cu(II) em cachaças. O ligante **IJN** complexa de forma seletiva com o Cu(II) e forma um complexo verde, com absorção máxima em 427 nm (**Figura 50**).

Figura 50 – Espectros de absorção no UV-Visível de **IJN** e do complexo Cu(II)/**IJN**.



O complexo foi caracterizado empregando Espectroscopia no Infravermelho e por meio do método de Job determinou-se a estequiometria do complexo metal/ligante como sendo de 1:1. Após otimização das condições de complexação, o método foi aplicado para amostras reais de cachaças e os erros relativos que foram encontrados para os valores obtidos pelo método proposto e o método de referência – Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) – variaram entre -11,53 a 16,13 %. Além disso, não foram constatados efeitos de matrizes significativos.

4. Conclusão

Neste trabalho foram sintetizados oito derivados julolidínicos com potenciais de serem utilizados como sensores químicos em diversas análises. Quatro destas moléculas são inéditas e quatro têm sua síntese reportada na literatura, porém, neste trabalho, foram desenvolvidas novas metodologias, onde se obtiveram melhores rendimentos e com métodos ambientalmente amigáveis. As moléculas **BIJ**, **BTJ**, **BIJ-H**, **BTJ-H**, **BIJ-F1**, **BTJ-F1**, **IJN** e **IJO** foram obtidas com rendimentos de 81, 86, 59, 65, 81, 72, 83 e 87%, respectivamente.

Foram avaliados quatro derivados da julolidina, **BIJ**, **BTJ**, **IJN** e **IJO**, na tentativa de verificar o potencial das mesmas com relação a complexação de metais. A molécula **IJN** apresentou seletividade na complexação com Cu(II) em meio básico. Assim, foram realizados alguns estudos analíticos e foi elaborada uma metodologia para a determinação do teor de Cu(II) em cachaça. A metodologia desenvolvida apresenta vantagens tais como: baixo consumo de reagentes/amostras (400 μ L), boa exatidão e precisão (CV = 4.5%), possibilidade de aplicação *in situ*, além de usar equipamentos de baixo custo e um smartphone, um dispositivo amplamente disseminado pelo mundo. Sendo assim, o método proposto é uma alternativa viável para que produtores de cachaça possam fazer o controle do teor de Cu(II) em amostras de cachaças ou até mesmo para laboratórios de análise que possuem recursos financeiros limitados.

5. Perspectivas

Perspectivas deste trabalho:

- A avaliação da eficiência das moléculas sintetizadas **BTJ-H**, **BIJ-H**, **BTJ-F1** e **BIJ-F1** como sondas fluorogênicas latentes para detecção de fosfatase e de espécies reativas de oxigênio (ERO);
- O desenvolvimento de novas possíveis sondas para detecção de novos analitos a partir das moléculas **BIJ** e **BTJ**;
- O desenvolvimento de uma metodologia para acessar a benzoxazoljulolidina, haja vista que, nas tentativas anteriores, o único produto obtido foi a imino-julolidina **IJO**;
- O desenvolvimento de uma metodologia para acessar os produtos **BTJ-F2** e **BTI-F2**, pois a metodologia proposta neste trabalho não foi eficaz e, com isso, não foi possível obter os produtos;
- Avaliar a capacidade das moléculas sintetizadas como sensores fluorescentes na complexação com metais, visto o potencial da molécula **IJN** para a complexação com Cu(II).

6. Parte Experimental

6.1. Metodologia geral

Os reagentes e solventes utilizados foram produtos analiticamente puros e/ou indicados pelos fabricantes para uso em síntese orgânica. Quando necessário, os reagentes e/ou solventes foram purificados de acordo com a metodologia apropriada (ARMAREGO, 2017).

Todas as reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo utilizadas placas de alumínio Sigma-Aldrich cobertas com sílica-gel 60 GF₂₅₄ como fase estacionária. As moléculas sintetizadas foram purificadas através de colunas cromatográficas tendo como fase estacionária sílica-gel (70-230 mesh).

Os espectros no infravermelho foram adquiridos em espectrofotômetro FTIR Varian 660 equipado com GladiATR pertencente ao Núcleo de Análises Químicas de Amostras Ambientais e Agroindustriais (NAQAA), do Departamento de Química – UFV. Os valores foram expressos em números de onda (cm⁻¹) e registrados no intervalo de 4000-400 cm⁻¹.

Os espectros no UV-Visível foram adquiridos em espectrofotômetro Thermo Scientific modelo Evolution Array pertencente ao Núcleo de Análises Químicas de Amostras Ambientais e Agroindustriais (NAQAA), do Departamento de Química – UFV.

Os espectros de massas foram obtidos em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) SHIMADZU modelo QP2010 Ultra pertencente ao Núcleo de Análises Químicas de Amostras Ambientais e Agroindustriais (NAQAA), do Departamento de Química – UFV.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H – 300 MHz) e de carbono (RMN de ¹³C – 75 MHz) foram obtidos em espectrômetro Varian Mercury 300 MHz pertencente ao Núcleo de Análises Químicas de Amostras Ambientais e Agroindustriais (NAQAA), do Departamento de Química – UFV.

Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm, tomando como padrões de referência interna os sinais dos solventes deuterados (clorofórmio – δ_{CHCl_3} 7,26 ppm ¹H e 77,16 ppm ¹³C, acetona – δ_{acetona} 2,05 ppm ¹H e 29,84 ppm ¹³C, metanol – $\delta_{\text{CH}_3\text{OH}}$ 4,87 ppm ¹H e 40,00 ppm ¹³C). Os sinais foram caracterizados como simpleto (s), sinal largo (sl), duplete (d), tripleto (t), multiplete (m) e duplo duplo duplete (ddd).

6.2. Síntese da benzimidazoljulolidina (BIJ)

A um tubo selado de 15 mL (Ace Pressure Tube #15 - Ace Glass Inc.) foram adicionados 0,5 mmol da 9-formil-8-hidroxijulolidina, 1,0 mmol da *o*-fenilenodiamina, 1,0 mmol de

bissulfito de sódio e 5 mL de etanol. A mistura foi mantida sob agitação durante 24h, a 120 °C. Após este período, o solvente foi removido através de evaporador rotatório e, posteriormente, foi realizada a extração líquido-líquido com diclorometano (3 x 10 mL). As frações orgânicas foram reunidas e sulfato de sódio anidro foi adicionado para a remoção de água residual. Em seguida, a solução foi filtrada para a remoção do sólido, sendo o solvente removido através de evaporador rotatório. O material obtido foi purificado através de coluna cromatográfica utilizando sílica-gel (70-230 mesh) como fase estacionária e como fase móvel uma mistura de hexano, diclorometano e acetato de etila na proporção de 6:2:1 (v/v).

6.3. Síntese da benzotiazoljulolidina (BTJ)

A um balão de fundo redondo de uma via de 25 mL foram adicionados 0,5 mmol da 9-formil-8-hidroxiulolidina, 1,0 mmol da 2-aminobenzenotiol, 7,5 mmol de HCl 37% (m/m), 3,0 mmol de peróxido de hidrogênio 30% (m/v) e 5 mL de etanol. A mistura foi mantida sob agitação durante 24h, em temperatura ambiente. Após este período, a solução foi neutralizada para pH = 7 utilizando uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório e foi realizada uma extração líquido-líquido com diclorometano (3 x 10 mL). As frações orgânicas foram reunidas e sulfato de sódio anidro foi adicionado para a remoção de água residual. Em seguida, a solução foi filtrada para a remoção do sólido e o solvente foi removido em evaporador rotatório. O material obtido foi purificado através de coluna cromatográfica utilizando sílica-gel (70-230 mesh) como fase estacionária e uma mistura de hexano e acetato de etila na proporção de 8:2 (v/v) como fase móvel.

6.4. Síntese da sonda fluorogênica latente para detecção de fosfatase (BIJ-F2)

A um balão de fundo redondo de uma via de 25 mL foram adicionados 0,5 mmol da BIJ e 1,0 mmol de hidreto de sódio. O balão foi fechado com um septo de borracha e foi realizada atmosfera de nitrogênio com o auxílio de um balão de látex e uma agulha. Em seguida, com o auxílio de uma seringa e agulha, foram adicionados 5 mL de tetrahydrofurano anidro e 0,75 mmol de clorofosfato de dietila. A mistura foi mantida sob agitação durante 15h, em temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 10 mL de uma solução de cloreto de amônio a 10% (m/v), a fim de neutralizar o hidreto de sódio em excesso. O solvente foi removido em evaporador rotatório e, posteriormente, foi realizada uma extração líquido-líquido empregando 10 mL de água e diclorometano (3 x 10 mL). As frações orgânicas foram reunidas e sulfato de sódio anidro foi adicionado para a remoção de água residual. Em seguida, a solução

foi filtrada para a remoção do sólido e o solvente foi removido em evaporador rotatório. O material obtido foi purificado através de coluna cromatográfica utilizando sílica-gel (70-230 mesh) como fase estacionária e uma mistura de hexano e acetato de etila na proporção de 1:3 como fase móvel, sendo obtido como produto a benzimidazoljulolidina **BIJ-F1**.

Para obter o produto final (**BIJ-F2**), a um balão de fundo redondo de uma via de 25 mL foram adicionados 0,5 mmol de **BIJ-F1** e 5 mL de diclorometano anidro. O balão foi fechado com um septo de borracha e foi realizada atmosfera de nitrogênio com o auxílio de um balão de látex e uma agulha. Em seguida, com o auxílio de uma seringa e agulha, foi adicionado 5,0 mmol de bromotrimetilsilano, gota a gota. A mistura foi mantida sob agitação durante 24h, à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 3 mL de metanol e a mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos. O precipitado formado foi filtrado e lavado com metanol e em seguida foi seco à vácuo.

6.5. Síntese da sonda fluorogênica latente para detecção de fosfatase (BTJ-F2)

A um balão de fundo redondo de uma via de 25 mL foram adicionados 0,5 mmol da **BTJ** e 1,0 mmol de hidreto de sódio. O balão foi fechado com um septo de borracha e foi realizada atmosfera de nitrogênio com o auxílio de um balão de látex e uma agulha. Em seguida, com o auxílio de uma seringa e agulha, foram adicionados 5 mL de tetrahydrofurano anidro e 0,75 mmol de clorofosfato de dietila. A mistura foi mantida sob agitação durante 15h, à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 10 mL de uma solução de cloreto de amônio a 10% (m/v), a fim de neutralizar o hidreto de sódio em excesso. O solvente foi removido em evaporador rotatório e foi realizada uma extração líquido-líquido empregado 10 mL de água e diclorometano (3 x 10 mL). As frações orgânicas foram reunidas e sulfato de sódio anidro foi adicionado para a remoção de água residual, em seguida a solução foi filtrada para a remoção do sólido e o solvente foi removido em evaporador rotatório. O material obtido foi purificado através de coluna cromatográfica utilizando sílica-gel (70-230 mesh) como fase estacionária e como fase móvel metanol, sendo obtido como produto a benzotiazoljulolidina **BTJ-F1**.

Para obter o produto final (**BTJ-F2**), a um balão de fundo redondo de uma via de 25 mL foram adicionados 0,5 mmol de **BTJ-F1** e 5 mL de diclorometano anidro. O balão foi fechado com um septo de borracha e foi feita atmosfera de nitrogênio com o auxílio de um balão de látex e uma agulha. Em seguida, com o auxílio de uma seringa e agulha, foi adicionado 5,0 mmol de bromotrimetilsilano, gota a gota. A mistura foi mantida sob agitação durante 24h, à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 3 mL de metanol, e a mistura foi

mantida sob agitação por 30 minutos. O precipitado formado foi filtrado e lavado com metanol e em seguida foi seco à vácuo.

6.6. Procedimento geral para a síntese das sondas fluorogênicas latentes para detecção de ERO (BIJ-H e BTJ-H)

A um balão de fundo redondo de uma via de 25 mL foram adicionados 0,5 mmol da benzimidazoljulolidina ou da benzotiazoljulolidina, 2,0 mmol de cloreto de dimetilcarbamoíla, 1,0 mmol de K_2CO_3 e 10 mL de acetona. Um condensador foi acoplado ao balão e a mistura foi mantida sob refluxo por 16h. Após este período, o solvente foi removido em evaporador rotatório e foi realizada uma extração líquido-líquido com 10 mL de água destilada e diclorometano (3 x 10 mL). As frações orgânicas foram reunidas, sulfato de sódio anidro foi adicionado para a remoção de água residual e, em seguida, a solução foi filtrada para a remoção do sólido e o solvente foi removido em evaporador rotatório. O material obtido foi purificado através de coluna cromatográfica utilizando sílica-gel (70-230 mesh) como fase estacionária e como fase móvel uma mistura de diclorometano e acetato de etila na proporção de 2:0,5.

6.7. Procedimento geral para a síntese das imino-julolidinas IJN e IJO

A um balão de fundo redondo de uma via de 25 mL foram adicionados 0,5 mmol da 9-formil-8-hidroxiulolidina, 1,0 mmol da amina aromática e 5 mL de etanol. Um condensador foi acoplado ao balão e a mistura foi mantida sob agitação durante 5h em temperatura de refluxo, sob atmosfera de nitrogênio. Após este período, o solvente foi removido em rotaevaporador e os produtos foram purificados por recristalização em etanol.

6.8. Soluções e amostras

As soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade $> 18,0 M\Omega$) obtida no sistema Millipore Milli-Q e todos os reagentes químicos eram de grau analítico. A solução estoque de Cu^{2+} $40,00 mg L^{-1}$ ($0,68 mmol L^{-1}$) foi preparada pela dissolução de 0,0170 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $> 98\%$, Sigma Aldrich em 100 mL de água ultrapura e, a seguir, armazenada em temperatura ambiente. A solução de NaOH $1 mol L^{-1}$ foi preparada dissolvendo 4 gramas do reagente (99%, Sigma Aldrich) em 100 ml de água ultrapura.

6.9. Aparato para aquisição dos dados RGB

Para a determinação de Cu(II) em amostras de cachaças, o procedimento foi realizado de acordo com o protocolo descrito em publicações anteriores (FRANCO *et al.*, 2021; PESSOA *et al.*, 2017). Em resumo, as reações colorimétricas para determinação do cobre em cachaças foram realizadas diretamente em placas de porcelana contendo seis recipientes e, em seguida, cada alíquota de reação foi transferida para o módulo de reação, que foi então colocado no aparato construído para aquisição das imagens. Micropipetas foram usadas para transferir volumes apropriados de reagentes ou amostras para placas de porcelana.

Como pode ser observado na **Figura 51**, a própria caixa do celular foi usada para aquisição das imagens. Essa escolha foi feita no sentido de tornar a análise mais simples, portátil e barata possível, para que o próprio produtor consiga fazer análise *in situ* dos níveis de Cu(II) em seu alambique, de modo seguro e fácil.

Figura 51 – Aparato desenvolvido para determinação de Cu(II) em amostras de cachaça.



No presente trabalho, uma câmera de smartphone Xiaomi Redmi Note 8, versão Android 9.0 com resolução de 48,0 megapixels foi empregada para obtenção dos dados RGB provenientes da reação colorimétrica. Entretanto, como já foi anteriormente reportado, a qualidade da câmera não interfere na sensibilidade e qualidade dos dados obtidos (BENEDETTI, L. P. D. S. *et al.*, 2015).

Os parâmetros da câmera foram fixados no aplicativo desenvolvido, de forma a evitar configurações automáticas do celular. O modo de foco foi definido, considerando que a distância entre a lente da câmera e o módulo de reação que contém uma amostra é menor que cinco centímetros.

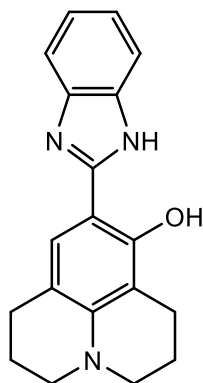
6.10. Otimização dos parâmetros operacionais

Todos os parâmetros necessários para tornar o procedimento proposto exato e preciso foram otimizados. Em um primeiro momento, três níveis da área de seleção retangular utilizada para obtenção dos dados foram estudadas: (20 × 20, 30 × 30 e 40 × 40). As dimensões são dadas em pixels (comprimento × altura) e foram escolhidas as regiões que apresentam o menor coeficiente de variação, evitando regiões com brilho e sombra.

No que tange a esse último aspecto, é importante ressaltar que excessos de sombra e brilho podem prejudicar severamente os valores RGB obtidos, e portanto, foram evitados (FRANCO *et al.*, 2017). Os valores RGB foram obtidos em tempo real por meio do uso de aplicativo gratuito Color Grab (LOOMATIX, 2017). Esse procedimento tem como vantagem tornar a coleta de dados mais rápida, eliminando as etapas de captura de fotos, transferência dos arquivos e subsequentes análises por um software externo, problemas perceptíveis em trabalhos anteriores (FRANCO *et al.*, 2017; RAVAZZI *et al.*, 2018).

Além disso, o próprio *flash* do smartphone foi utilizado como fonte de iluminação controlada e estável para o sistema, dispensando LEDs e outros recursos empregados em trabalhos anteriores (BENEDETTI *et al.*, 2015; BENEDETTI *et al.*, 2015). Os valores RGB podem ser usados de modo independente, como na maioria dos trabalhos publicados que empregam decomposição de imagens utilizando um modelo de cor algébrico (DOS SANTOS *et al.*, 2019; FRANCO *et al.*, 2021; SARANCHINA *et al.*, 2021). Entretanto, trabalhos recentes têm demonstrado que os valores RGB trabalhados conjuntamente proporcionam respostas mais satisfatórias, uma vez que um canal somente pode não representar integralmente um modelo proposto de validação, podendo ter dois ou até mesmo três canais que respondem conjuntamente em um modelo (RESQUE; DOS SANTOS; SUAREZ, 2019). Sendo assim, os valores RGB obtidos pelo aplicativo foram testados individualmente, bem como em conjunto para verificar em qual condição a curva analítica apresentava-se o mais sensível possível. Para trabalhar com método de vetorização dos canais, emprega-se a fórmula: $\text{Vetor (V)} = (\Delta R^2 + \Delta G^2 + \Delta B^2)^{1/2}$, onde o ΔRGB é a diferença do sinal do padrão ou amostra em relação ao branco analítico.

7. Dados espectroscópicos



BIJ

9-(1H-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-8-ol (**BIJ**)

Rendimento: 81%

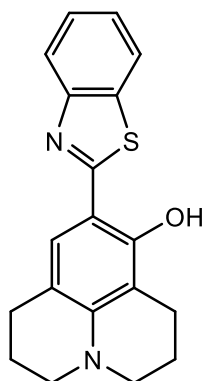
Massa molar: 305,38 g mol⁻¹

IV (cm⁻¹) ν_{\max} : 2947, 2833, 1628, 1505, 1450, 1377, 740, 688.

CG-EM *m/z* (abundância em %): 305 (57, M⁺), 290 (33), 276 (10), 138 (5), 44 (100).

RMN de ¹H (300 MHz; Acetona-*d*₆ δ_{acetona} 2,05), δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 13,08 (s, 1H, OH); 11,61 (s, 1H, NH); 7,73-7,53 (m, 1H, H13); 7,52-7,38 (m, 1H, H16); 7,32 (sl, 1H, H10); 7,25-7,13 (m, 2H, H14 e H15); 3,25-3,14 (m, 4H, H3a, H3b, H5a, H5b); 2,77-2,65 (m, 4H, H7a, H7b, H1a, H1b); 2,01-1,86 (m, 4H, H2a, H2b, H6a, H6b).

RMN de ¹³C (75 MHz; Acetona-*d*₆ δ_{acetona} 29,84), δ (atribuição): 21,65 (C7); 22,11 (C2); 22,95 (C6); 28,07 (C1); 50,12 (C3); 50,55 (C5); 101,08 (C9); 108,16 (C10^o); 111,22 (C7^o); 113,50 (C13); 118,02 (C16); 122,71 (C15); 122,93 (C10); 123,78 (C14); 134,16 (C17); 142,93 (C4^o); 146,53 (C12); 154,72 (C8); 156,56 (C11).

**BTJ**

9-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-8-ol (**BTJ**)

Rendimento: 86%

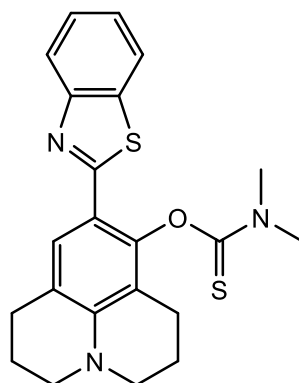
Massa molar: 322,43 g mol⁻¹

IV (cm⁻¹) ν_{\max} : 2920, 2827, 1625, 1580, 1491, 1428, 783, 746.

CG-EM *m/z* (abundância em %): 322 (100, M⁺), 307 (31), 207 (7), 147 (17).

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 7,26), δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 12,70 (s, 1H, OH); 7,81 (ddd, 1H, *J* = 4,0, 1,3, 0,6 Hz, H13); 7,79 (ddd, 1H, *J* = 3,9, 1,3, 0,7 Hz, H16); 7,40 (ddd, 1H, *J* = 8,2, 7,3, 1,3 Hz, H14); 7,27 (ddd, 1H, *J* = 8,0, 7,3, 1,2 Hz, H15); 7,08 (s, 1H, H10); 3,30-3,13 (m, 4H, H3a, H3b, H5a, H5b); 2,80 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz, H7a, H7b); 2,74 (t, 2H, *J* = 6,1 Hz, H1a, H1b); 2,18-1,89 (m, 4H, H2a, H2b, H6a, H6b).

RMN de ¹³C (75 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 77,16), δ (atribuição): 20,81 (C7); 21,34 (C2); 22,17 (C6); 27,45 (C1); 49,80 (C3); 50,19 (C5); 105,39 (C9); 106,97 (C10'); 113,53 (C7'); 120,96 (C13); 121,28 (C16); 124,08 (C15); 126,08 (C10); 126,28 (C14); 132,11 (C17); 146,50 (C4'); 152,44 (C12); 154,97 (C8); 170,11 (C11).

**BTJ-H**

O-(9-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-8-yl)
dimethylcarbamothioate (**BTJ-H**)

Rendimento: 65%

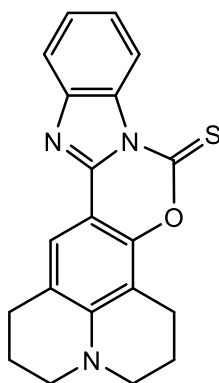
Massa molar: 409,57 g mol⁻¹

IV (cm⁻¹) ν_{max} : 2930, 2837, 1603, 1530, 1425, 1393, 1122, 760, 729.

CG-EM *m/z* (abundância em %): 409 (9, M⁺), 337 (35), 305 (69), 88 (100).

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 7,26), δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 7,93 (ddd, 1H, *J* = 8,1, 1,2, 0,6 Hz, H13); 7,81 (ddd, 1H, *J* = 7,9, 1,3, 0,7 Hz, H16); 7,81 (sl, 1H, H10); 7,40 (ddd, 1H, *J* = 8,1, 7,2, 1,3 Hz, H14); 7,27 (ddd, 1H, *J* = 8,0, 7,2, 1,2 Hz, H15); 3,53 (s, 3H, H19a, H19b, H19c); 3,51 (s, 3H, H20a, H20b, H20c); 3,31-3,14 (m, 4H, H3a, H3b, H5a, H5b); 2,99-2,79 (m, 4H, H7a, H7b, H1a, H1b); 2,69-2,48 (m, 4H, H2a, H2b, H6a, H6b).

RMN de ¹³C (75 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 77,16), δ (atribuição): 20,88 (C7); 21,53 (C2); 21,79 (C6); 27,44 (C1); 39,09 (C19); 43,50 (C20); 49,29 (C5); 49,81 (C3); 113,94 (C9); 119,07 (C10'); 121,02 (C7'); 122,12 (C16); 123,86 (C13); 125,68 (C14); 127,54 (C15); 134,92 (C10); 145,66 (C17); 148,33 (C4'); 153,12 (C12); 164,06 (C8); 186,00 (C18).

**BIJ-H**

2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,9*H*-benzo[4',5']imidazo[1',2':3,4][1,3]oxazino[6,5-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinoline-9-thione (**BIJ-H**)

Rendimento: 59%

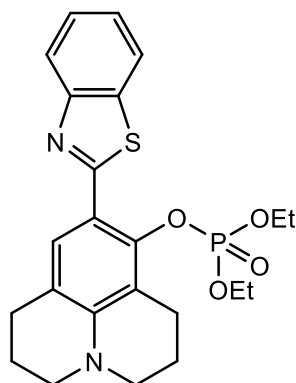
Massa molar: 347,44 g mol⁻¹

IV (cm⁻¹) ν_{\max} : 2920, 2851, 1747, 1630, 1440, 1375, 1208, 767, 752.

CG-EM *m/z* (abundância em %): 347 (100, M⁺), 331 (73), 314 (30), 286 (17).

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 7,26), δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 9,04 (ddd, 1H, *J* = 8,2, 1,3, 0,6 Hz, H13); 7,75 (ddd, 1H, *J* = 7,9, 1,3, 0,7 Hz, H16); 7,72 (s, 1H, H10); 7,49 (ddd, 1H, *J* = 8,0, 7,4, 1,3 Hz, H14); 7,38 (ddd, 1H, *J* = 8,6, 7,4, 1,3 Hz, H15); 3,29 (t, 4H, *J* = 5,7 Hz, H3a, H3b, H5a, H5b); 2,98 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz, H7a, H7b); 2,82 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, H1a, H1b); 2,08-1,89 (m, 4H, H2a, H2b, H6a, H6b).

RMN de ¹³C (75 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 77,16), δ (atribuição): 20,25 (C7); 20,61 (C2); 21,13 (C6); 27,57 (C1); 49,52 (C3); 49,95 (C5); 99,29 (C9); 105,40 (C10'); 114,51 (C7'); 116,52 (C13); 118,81 (C16); 120,71 (C15); 121,73 (C10); 123,55 (C14); 126,75 (C17); 131,66 (C4'); 145,22 (C12); 146,77 (C8); 149,60 (C11); 174,95 (C18).

**BTJ-F1**

9-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-8-yl diethyl phosphate (**BTJ-F1**)

Rendimento: 72%

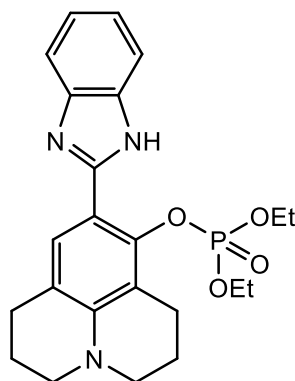
Massa molar: 458,51 g mol⁻¹

IV (cm⁻¹) ν_{\max} : 2928, 2943, 1672, 1605, 1430, 1328, 1146, 758.

CG-EM *m/z* (abundância em %): 458 (27, M⁺), 331 (100), 322 (46), 207 (3).

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 7,26), δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 7,98 (ddd, 1H, *J* = 8,1, 1,2, 0,6 Hz, H13); 7,85 (ddd, 1H, *J* = 7,9, 1,3, 0,7 Hz, H16); 7,47-7,36 (m, 2H, H14 e H10); 7,33-7,26 (m, 1H, H15); 4,25-3,82 (m, 4H, H18a, H18b, H20a e H20b); 3,22 (t, 4H, *J* = 5,7 Hz, H3a, H3b, H5a e H5b); 2,96 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, H7a, H7b); 2,76 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, H1a, H1b); 2,02-1,85 (m, 4H, H2a, H2b, H6a, H6b); 1,23 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, H19a, H19b e H19c); 1,10 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, H21a, H21b e H21c).

RMN de ¹³C (75 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 77,16), δ (atribuição): 16,01 (C19); 16,10 (C21); 21,21 (C2); 21,61 (C6); 22,65 (C1); 27,52 (C7); 49,57 (C5); 49,96 (C3); 64,64 (C18); 64,72 (C20); 113,60 (C9); 114,17 (C10'); 118,47 (C7); 121,33 (C16); 122,37 (C13); 124,16 (C14); 125,75 (C15); 128,59 (C10); 135,73 (C17); 144,67 (C4'); 145,63 (C12); 153,24 (C8); 165,89 (C11).

**BIJ-F1**

9-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-8-yl diethyl phosphate (**BIJ-F1**)

Rendimento: 81%

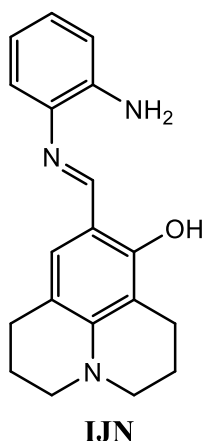
Massa molar: 441,47 g mol⁻¹

IV (cm⁻¹) ν_{\max} : 2926, 2853, 1610, 1506, 1446, 1376, 903, 744.

CG-EM m/z (abundância em %): 441 (36, M⁺), 314 (79), 305 (59), 44 (100).

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 7,26), δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 7,74 (s, 1H, NH); 7,63-7,57 (sl, 1H, H13); 7,48-7,42 (sl, 1H, H16); 7,24-7,15 (m, 3H, H14, H15 e H10); 4,19-4,01 (m, 4H, H18a, H18b, H20a e H20b); 3,20 (t, 4H, $J = 5,7$ Hz, H3a, H3b, H5a e H5b); 2,85 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, H7a, H7b); 2,73 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz, H1a, H1b); 1,98-1,85 (m, 4H, H2a, H2b, H6a, H6b); 1,23 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, H19a, H19b e H19c); 1,22 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, H21a, H21b e H21c).

RMN de ¹³C (75 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 77,16), δ (atribuição): 15,85 (C19); 15,94 (C21); 21,05 (C2); 21,45 (C6); 22,49 (C1); 27,36 (C7); 49,41 (C5); 49,80 (C3); 64,48 (C18); 64,56 (C20); 113,40 (C9); 114,06 (C10'); 118,33 (C7); 121,17 (C16); 122,21 (C13); 124,00 (C14); 125,59 (C15); 128,43 (C10); 135,57 (C17); 144,51 (C4'); 145,47 (C12); 153,08 (C8); 165,73 (C11).



(*E*)-9-(((2-aminophenyl)imino)methyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-8-ol (**IjN**)

Rendimento: 83%

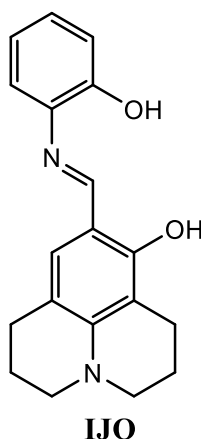
Massa molar: 307,40 g mol⁻¹

IV (cm⁻¹) ν_{\max} : 2931, 2837, 3369, 1635, 1516, 1429, 1303, 749.

CG-EM m/z (abundância em %): 307 (76, M⁺), 306 (100), 188 (30), 119 (27).

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 7,26), δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 11,81 (s, 1H, OH); 8,34 (s, 1H, H11); 7,07-6,94 (m, 2H, H13 e H16); 6,88-6,69 (m, 3H, H10, H14 e H15); 3,97 (sl, 2H, NH₂); 3,33-3,19 (m, 4H, H3a, H3b, H5a e H5b); 2,80-2,62 (m, 4H, H7a, H7b, H1a e H1b); 2,04-1,85 (m, 4H, H2a, H2b, H6a e H6b).

RMN de ¹³C (75 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 77,16), δ (atribuição): 20,28 (C7); 21,08 (C2); 21,98 (C6); 27,22 (C1); 49,76 (C3); 50,13 (C5); 106,36 (C9); 108,79 (C10'); 112,95 (C7'); 115,41 (C13); 118,08 (C16); 118,75 (C15); 126,35 (C10); 129,84 (C14); 136,49 (C17); 140,44 (C4'); 146,68 (C12); 158,19 (C8); 160,96 (C11).



(*E*)-9-(((2-hydroxyphenyl)imino)methyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-8-ol (**IJO**)

Rendimento: 87%

Massa molar: 308,38 g mol⁻¹

IV (cm⁻¹) ν_{max} : 2930, 2837, 1603, 1530, 1425, 1393, 1122, 760, 729.

CG-EM m/z (abundância em %): 308 (100, M⁺), 307 (40), 200 (38).

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 7,26), δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 12,70 (s, 1H, OH); 7,81 (ddd, 1H, $J = 4,0, 1,3, 0,6$ Hz, H13); 7,79 (ddd, 1H, $J = 3,9, 1,3, 0,7$ Hz, H16); 7,40 (ddd, 1H, $J = 8,2, 7,3, 1,3$ Hz, H14); 7,27 (ddd, 1H, $J = 8,0, 7,3, 1,2$ Hz, H15); 7,08 (s, 1H, H10); 3,30-3,13 (m, 4H, H3a, H3b, H5a, H5b); 2,80 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, H7a, H7b); 2,74 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz, H1a, H1b); 2,18-1,89 (m, 4H, H2a, H2b, H6a, H6b).

RMN de ¹³C (75 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 77,16), δ (atribuição): 20,81 (C7); 21,34 (C2); 22,17 (C6); 27,45 (C1); 49,80 (C3); 50,19 (C5); 105,39 (C9); 106,97 (C10'); 113,53 (C7'); 120,96 (C13); 121,28 (C16); 124,08 (C15); 126,08 (C10); 126,28 (C14); 132,11 (C17); 146,50 (C4'); 152,44 (C12); 154,97 (C8); 170,11 (C11).

8. Referências bibliográficas

ARAÚJO, D. P. **Síntese e atividades anti-ureolítica e antiproliferativa de benzimidazóis e benzotiazóis**. 2015. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2015.

ARMAREGO, W. L. F. **Purification of Laboratory Chemicals**. 8th. ed. Oxford: Elsevier, 2017.

AZEVEDO, S. M. *et al.* Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana-de-açúcar produzidas em Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, p. 618-624, 2003.

BACHHAV, H. M.; BHAGAT, S. B.; TELVEKAR, V. N. Efficient protocol for the synthesis of quinoxaline, benzoxazole and benzimidazole derivatives using glycerol as green solvent. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 43, p. 5697–5701, 2011.

BENEDETTI, L. P. D. S. *et al.* A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. **Anal. Methods**, v. 7, n. 10, p. 4138–4144, 2015.

BENEDETTI, L. P. DOS S. *et al.* A digital image analysis method for quantification of sulfite in beverages. **Anal. Methods**, v. 7, n. 18, p. 7568–7573, 2015.

CACIANO DE SENA, R. *et al.* A Simple Method Based on the Application of a CCD Camera as a Sensor to Detect Low Concentrations of Barium Sulfate in Suspension. **Sensors**, v. 11, n. 1, p. 864–875, 2011.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 105–126, 1999.

DAMASCENO, D. *et al.* Análise multivariada de imagens na química: Um experimento para determinação do pH de águas potáveis. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 836–841, 2015.

DOS SANTOS, V. B. *et al.* Low cost in situ digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruits. **Food Chemistry**, v. 285, p. 340–346, 2019.

DVOŘÁKOVÁ, H. *et al.* Partially O-Alkylated Thiocalix[4]arenes: Synthesis, Molecular and Crystal Structures, Conformational Behavior. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 19, p. 7157–7166, 2007.

FRANCO, M. O. K. *et al.* A novel digital image method for determination of reducing sugars in aged and non-aged cachaças employing a smartphone. **Food Chemistry**, v. 338, p. 127800, 2021.

FRANCO, M. O. K. *et al.* Smartphone Application for Methanol Determination in Sugar Cane Spirits Employing Digital Image-Based Method. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 6, p. 2102–2109, 2017.

GANESAN, J. S. *et al.* Execution of julolidine based derivative as bifunctional chemosensor for Zn²⁺ and Cu²⁺ ions: Applications in bio-imaging and molecular logic gate. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 219, p. 33–43, 2019.

GLASS, D. B.; WEISSBERGER, A. **Organic Syntheses**. Vol. III ed. New York: Wiley Ed, 1955.

GONÇALVES, C. D. C. S.; MARSAIOLI, A. J. MONITORING ENZYMATIC ACTIVITIES WITH FLUOROGENIC PROBES. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 1028–1036, 2014.

GUO, H. Y.; LI, J. C.; SHANG, Y. LE. A simple and efficient synthesis of 2-substituted benzothiazoles catalyzed by H₂O₂/HCl. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, n. 12, p. 1408–1410, 2009.

HU, Q. *et al.* A fluorescent probe for alkaline phosphatase via excited state intramolecular proton transfer. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 220, p. 720–726, 2015.

JI, Y.; DAI, F.; ZHOU, B. Developing a julolidine-fluorescein-based hybrid as a highly sensitive fluorescent probe for sensing and bioimaging cysteine in living cells. **Talanta**, v. 197, p. 631–637, 2019.

JOB, P. Formation and Stability of Inorganic Complexes in Solution. **Ann. Chim.**, n. 9, p. 113–203, 1928.

KHOSRAVI, K.; KAZEMI, S. Synthesis of 2-arylbenzimidazoles and 2-arylbenzothiazoles in both room temperature and microwave condition catalyzed by hexamethylenetetramine-bromine complex. **Chinese Chemical Letters**, v. 23, n. 1, p. 61–64, 2012.

KIM, H. J.; HEO, C. H.; KIM, H. M. Benzimidazole-based ratiometric two-photon fluorescent probes for acidic pH in live cells and tissues. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 47, p. 17969–17977, 2013.

KIM, T. IL *et al.* A highly selective fluorescent ESIPT probe for the dual specificity phosphatase MKP-6. **Chemical Communications**, v. 2, n. 39, p. 5895–5897, 2009.

LIAO, Y. X. *et al.* A highly sensitive and selective “turn-on” fluorescent probe for hypochlorous acid monitoring. **RSC Advances**, v. 5, n. 24, p. 18275–18278, 2015.

LIU, F. *et al.* Synthesis of julolidine-containing nonlinear optical chromophores: Achieving excellent electro-optic activity by optimizing the bridges and acceptors. **Dyes and Pigments**, v. 134, p. 358–367, 2016.

LOOMATIX. *Color Grab.* . Haifa, Israel: [s.n.], 2017

LOPEZ-MOLINERO, A. *et al.* Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 2, p. 380–385, 1, 2010.

MARTINI, G. *et al.* Julolidine fluorescent molecular rotors as vapour sensing probes in polystyrene films. **Dyes and Pigments**, v. 113, p. 47–54, 2015.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade de Qualidade para Aguardente e Cana e para Cachaça. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 142, n. 124, p. 3, 30 de junho de 2005.

NOH, J. Y. *et al.* Solvent-dependent selective fluorescence assay of aluminum and gallium ions using julolidine-based probe. **Dyes and Pigments**, v. 99, n. 3, p. 1016–1021, 2013.

PACIORNIK, S. *et al.* Scanner image analysis in the quantification of mercury using spot-tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 156–161, 2006.

PESSOA, K. D. *et al.* A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 310–316, 2017.

PINKUS, G. Ueber die Einwirkung von Trimethylenchlorbromid auf einige aromatische Amine und Amide. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 25, n. 2, p. 2798–2806, 1892.

PINTO, F. G. *et al.* Determinação de Cobre e Zinco em cachaça por espectrometria de absorção atômica com chama usando calibração por ajuste de matriz. **Revista Analytica**, v. 17, p. 48–50, 2005.

RAVAZZI, C. G. *et al.* Smartphone application for captopril determination in dosage forms and synthetic urine employing digital imaging. **Talanta**, v. 189, p. 339–344, 2018.

RENNY, J. S. *et al.* Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 46, p. 11998–12013, 2013.

RESQUE, I. S.; DOS SANTOS, V. B.; SUAREZ, W. T. An environmentally friendly analytical approach based on spot test and digital image to evaluate the conformity of bleaching

products. **Chemical Papers**, v. 73, n. 7, p. 1659–1668, 2019.

SANTOSH, P. C.; PANDEYA, S. N.; PATHAK, A. K. ChemInform Abstract: Benzimidazole: A Versatile Chemical Entity. **ChemInform**, v. 43, n. 14, p. no-no, 3, 2012.

SARANCHINA, N. V. *et al.* Smartphone-based colorimetric determination of fluoride anions using polymethacrylate optode. **Talanta**, v. 226, p. 122103, maio 2021.

SCHULZ-FINCKE, A.-C. *et al.* Design of an Activity-Based Probe for Human Neutrophil Elastase: Implementation of the Lossen Rearrangement To Induce Förster Resonance Energy Transfers. **Biochemistry**, v. 57, n. 5, p. 742–752, 2018.

SHREYKAR, M. R.; SEKAR, N. NLOphoric donor-rigidified ESIPT dyes – Synthesis, pH study, solvatochromism and DFT insights. **Journal of Luminescence**, v. 192, p. 343–358, 2017.

TILLEY, R. J. D. **Colour and the Optical Properties of Materials**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. **Molecular Fluorescence. Principles and Applications**. 2nd. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2012.

VAREJÃO, J. O. S.; VAREJÃO, E. V. V.; FERNANDES, S. A. Synthesis and Derivatization of Julolidine: A Powerful Heterocyclic Structure. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2019, n. 27, p. 4273–4310, 2019.

VEJDĚLEK, Z.; PROTIVA, M. Potential antidepressants and tranquillizers: Synthesis of some 9-(aminoalkoxy)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo[*ij*] quinolizines and 1-(substituted amino)-3-(1-naphthoxy)-2-propanols. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 55, n. 5, p. 1290–1296, 1990.

VELÍK, J. *et al.* Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. **Research in Veterinary Science**, v. 76, n. 2, p. 95–108, 2004.

WANG, K. *et al.* A ratiometric benzothiazole-based fluorescence probe for selectively recognizing HClO and its practical applications. **Chinese Chemical Letters**, v. 31, n. 11, p. 2955–2959, 2020.

WU, G. *et al.* Julolidine dyes with different acceptors and thiophene-conjugation bridge: Design, synthesis and their application in dye-sensitized solar cells. **Synthetic Metals**, v. 180, p. 9–15, 2013.

XU, L. *et al.* A water-soluble fluorescent probe for the sensitive detection of endogenous alkaline phosphatase in living cells. **Dyes and Pigments**, v. 159, n. April, p. 584–589, 2018.

YAM, K. L.; PAPADAKIS, S. E. A simple digital imaging method for measuring and

analyzing color of food surfaces. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 1, p. 137–142, 2004.

YANGYANG, Y. *et al.* A ratiometric fluorescent probe for alkaline phosphatase with high sensitivity. **Chinese Chemical Letters**, 2019.

YUN, J. Y. *et al.* A novel benzimidazole-based fluorescence probe for detecting zinc ion in aqueous solution and zebrafish. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 92, n. 5, p. 961–966, 2019.

ZHANG, Y.-B. *et al.* Matrine-Type Alkaloids from the Roots of *Sophora flavescens* and Their Antiviral Activities against the Hepatitis B Virus. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 10, p. 2259–2265, 2018.