

Artigo

Processo De Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado (ESIPT): Aplicações em Sondas Fluorescentes

Rocha, E. P.; Ramalho, T. C.*

Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (2), 466-482. Data de publicação na Web: 27 de março de 2016<http://rvq.sbq.org.br>**Intramolecular Proton Transfer in the Excited State (ESIPT) Process: Applications in Fluorescent Probes**

Abstract: Currently the opportune diagnosis of cancer has shown a great importance, mainly by decreasing the mortality rate. Among the techniques employed to achieve the diagnosis, spectroscopy has been highlighted for presenting safe and highly accurate diagnoses. The Fluorescence Spectroscopy has become very important in cancer diagnosis, being employed in breast, oral cavity and esophagus cancer testing. The technique employs fluorophore which in many cases have groups capable of carrying out the intramolecular proton transfer in the excited state (ESIPT). These compounds may be used for various molecular targets such as cations, anions and proteins detection, besides the diagnosis of diseases. Spectroscopic probes have an important role in the development of more accurate diagnosing diseases methods, which may influence the treatment and avoid the risks of further surgery and patient death.

Keywords: Excited state; spectroscopic probe; proton transfer; ESIPT.

Resumo

Nos dias atuais o diagnóstico do câncer vem apresentando uma relevante importância, principalmente por diminuir a taxa de mortalidade. Dentre as técnicas empregadas para realização do diagnóstico, a espectroscopia vem se destacando por apresentar diagnósticos seguros e com grande acurácia. Neste contexto, a espectroscopia de fluorescência vem se tornando bastante importante nos diagnósticos de câncer de mama, cavidade oral e esôfago. A técnica emprega fluoróforo que em muitos casos apresentam grupos capazes de realizar a transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT). Esses compostos podem ser empregados para diversos alvos moleculares, como detecção de cátions, ânions e proteínas, além do diagnóstico de doenças. As sondas espectroscópicas apresentam um importante papel no desenvolvimento de métodos mais acurados de diagnóstico de doenças, o qual pode influenciar diretamente no tratamento e evitar os riscos de novas cirurgias e a morte do paciente.

Palavras-chave: Estado excitado; sonda espectroscópica; transferência do próton; ESIPT.

* Universidade Federal de Lavras, Laboratório de Química Computacional, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras-MG, Brasil. Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Departamento de Educação, Av. Dr. José Sebastião da Paixão, Lindo Vale, CEP 36880000, Rio Pomba-MG, Brasil.

✉ eduardo.rocha@ifsudestemg.edu.br; teo@dqi.ufla.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20160034](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160034)

Processo De Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado (ESIPT): Aplicações em Sondas Fluorescentes

Eduardo P. da Rocha,^{a,b} Teodorico C. Ramalho^{a,*}

^a Universidade Federal de Lavras, Laboratório de Química Computacional, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras-MG, Brasil.

^b Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Departamento de Educação, Av. Dr. José Sebastião da Paixão, Lindo Vale, CEP 36880000, Rio Pomba-MG, Brasil.

* eduardo.rocha@ifsudestemg.edu.br; teo@dqi.ufla.br

Recebido em 27 de março de 2016. Aceito para publicação em 27 de março de 2016

1. Introdução

2. O Processo de transferência protônica intramolecular no estado excitado

3. Aplicações em Sondas

3.1. Sondas fluorescentes para cátions e metais

3.2. Sondas fluorescentes formadas por proteínas

3.3. Sondas para ânions

3.4. Sondas empregadas no diagnóstico de doenças

4. Considerações Finais

1. Introdução

Na atualidade, o câncer é uma das doenças que mais vitimam no mundo.¹ Um dos motivos é a dificuldade de diagnóstico no pré e pós-operatório.² Quando o diagnóstico no pós-operatório é feito de forma acurada, diminui a necessidade de uma nova cirurgia, que hoje é de 50% dos casos de câncer de mama com margem positiva e 10% dos casos com margem negativa.² Atualmente, um dos grandes desafios do diagnóstico de imagem é desenvolver um sistema capaz de localizar espécies em diferentes ambientes com alta resolução para detectar focos de câncer nas margens cirúrgicas para uso clínico.²

Dentre as técnicas de diagnóstico empregadas no tratamento do câncer estão os exames de Tomografia, Ressonância Magnética por Imagem e endoscopias ultrassônicas, porém, em muitos casos o diagnóstico não traz a acurácia pretendida para a doença e muitos pacientes são vitimados pela falta de um diagnóstico preciso.⁵ Muitos esforços têm sido empregados para detectar tumores utilizando a espectroscopia molecular.^{3,4} Por exemplo, a espectroscopia molecular de infravermelho e Raman,³ que medem as vibrações moleculares das amostras e são empregadas para diagnóstico de arteriosclerose no sangue, displasia e vários tipos de câncer,⁴ como os tumores na tireoide, nas células cervicais, na pele, na

mucosa oral, no cólon, na mama, nas células de linfomas, e no câncer de cérebro.³ A Espectroscopia de Refletância Difusa tem sido usada no diagnóstico do progresso de doenças, como câncer de colón, esôfago, cervical e bexiga.^{2,4} A Espectroscopia de Fluorescência, que mede a emissão de fluóforos endógenos encontrados em tecido, foi relatada para o diagnóstico de displasia no colo uterino, câncer no esôfago e na cavidade oral, e por ser eficiente para estudos em tempo real de células vivas e doenças.^{5,4,6} Além dos diagnósticos citados, esse tipo de espectroscopia molecular apresenta informações complementares sobre a composição do tecido, informações sobre a organização, movimento e superfície de membranas celulares e suas combinações, contribuindo com informações úteis sobre a doença e seu diagnóstico.⁴

Nesse contexto, vem crescendo o interesse por sondas fluorescentes. Essas sondas são altamente sensíveis, de fácil operação e permitem a análise por imagem em sistemas vivos.⁷ Nos últimos anos, o interesse pelos compostos que apresentam o processo de transferência protônica

intramolecular no estado excitado (ESIPT) vem aumentando, devido aos prospectos de aplicação no desenvolvimento de novas sondas fluorescentes, visando métodos analíticos com aplicação nos campos da biofísica, medicina e no controle ambiental.⁸

2. O Processo de transferência protônica intramolecular no estado excitado

O processo ESIPT foi primeiramente observado por Weller em 1956, em estudos com o salicilato de metila (Figura 1).^{9,10,8} O processo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT) pode ser iniciado por um pulso de luz, e posteriormente ser explorado como um sistema de transferência dinâmico.¹¹ As moléculas que apresentam o processo ESIPT apresentam no estado fundamental uma ligação de hidrogênio intramolecular entre um grupo hidroxila (OH) ou amino (NH) com uma carbonila ou ao nitrogênio do grupo piridil,^{8,12} em uma distância menor que 2 Å.¹³

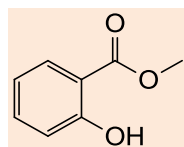
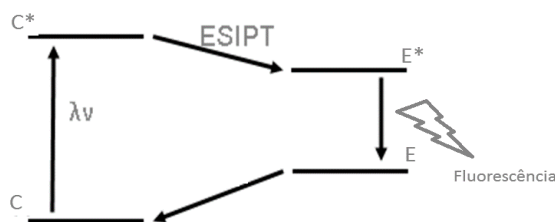


Figura 1. Estrutura química do Salicilato de Metila

No estado fundamental, a estrutura mais estável é a forma enol ou amino quando esse composto passa para o estado excitado por absorção de um fóton de luz, ele pode promover a troca para seu tautômero mais estável no estado excitado que é a forma ceto.^{14,15} Esse processo adiabático acontece em pico-segundos e resulta na formação de produtos tautoméricos fotoativos que emitem radiação em comprimento de onda maior que no estado fundamental.^{8,16} O estado ceto excitado produz o processo ESIPT pela diferença na geometria estrutural e

configuração eletrônica em comparação com a espécie original (estado fundamental). Esse fato, gera um grande deslocamento de Stoke,¹⁷ da ordem de 8 a 10 mil cm^{-1} .^{12,15} Depois, o produto ESIPT retorna ao seu estado fundamental pela emissão fluorescente ou pela perda da radiação (conversão interna),¹² que posteriormente é revertido ao tautômero, no estado fundamental, mais estável.⁸ No espectro de absorção, a forma enol é observada e a forma ceto no espectro de fluorescência, o que caracteriza o processo ESIPT.⁸



Esquema 1. Diagrama de transição do estado fundamental (C) para o estado excitado (C*) e a conversão para a forma tautomérica (E*) via processo ESIPT emitindo fluorescência quando decai para o estado fundamental (E)

Existem muitas dúvidas sobre o final do processo, e seu retorno ao estado fundamental (GS), na verdade, alguns pesquisadores na literatura relatam que o processo é irreversível. Porém, nos últimos anos, propostas reversíveis do processo vêm sendo estudadas.⁸

Moléculas que apresentam o processo ESIPT tem muitas aplicações, como corantes laser,^{18,14,19} foto estabilizadores UV,^{18,20,19} sondas de proteínas e membranas,^{18,20} LEDs orgânicos,¹⁸ diodos emissores de luz,^{20,16} sondas para diversos ambientes biológicos e solvatação dinâmica,¹⁴ sensores de íons e metais,¹⁴ materiais luminescentes,¹² entre outras aplicações.

A razão ultra-rápida do ESIPT, com um grande deslocamento de Stoke,²¹ entre a

banda de absorção e emissão do tautômero (pico a pico), fornece uma ampla janela de cor complementar para o processo de emissão e reabsorção.²² Emissões brancas foram observados por Park e co-autores. Sun e co-autores, observaram emissão branca dopando dois polímeros sólidos com moléculas que apresentam o processo ESIPT.²² A alta intensidade da emissão fluorescente e o grande deslocamento de Stoke devido ao fenômeno ESIPT são muito sensíveis, dependendo muito do ambiente local do composto, porém, em alguns compostos, como os da família das 2-(2'-hidroxifenil)-benzimidazol, (Figura 2), conseguem regular estruturalmente essa propriedade fotofísica, excedendo a influência do ambiente.²¹

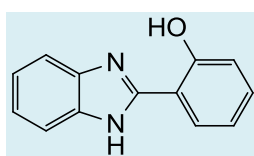


Figura 2. Estrutura química da 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol

Na literatura, tem sido apresentado diferentes etapas de reação para o processo ESIPT, isso devido as características ácido-base das moléculas.²³ Quando ocorre a excitação eletrônica da molécula suas características ácido e base dos sítios próximos aumenta, envolvendo assim, a troca rápida do próton na superfície do estado excitado.²¹ Muitos compostos apresentam alteração no seu pKa quando excitados, podendo sofrer a desprotonação

na presença de espécies básicas, como o solvente.^{18,24} A influência do solvente é significativa no processo ESIPT, de modo que, solventes polares diminuem o solvatocromismo das moléculas podendo até reduzir o efeito de emissão fluorescente. Solventes polares, podem concorrer diretamente pelo próton, promovendo o processo de transferência do próton no estado excitado (ESPT), nesse processo, moléculas de solvente como a água, podem

concorrer pelo próton, e nesse caso, impedir a transferência intramolecular.²⁴ Nesses solventes polares, a solvatação pode prejudicar o processo devido a inúmeras ligações de hidrogênio entre o soluto e o solvente.²⁵ Porém, solventes apolares favorecem a transferência, e alguns aumentam as características de fluorescência e a intensidade da emissão, que em alguns casos, se devem a estabilização dos produtos tautômeros.²⁴

Alcoóis aromáticos apresentam acidez quando excitados para o primeiro estado

excitado (S_1). Como exemplo, o grupo hidroxila do 2-naftol, (Figura 3), aumenta sua acidez aproximadamente em 7 ordens de grandeza na forma excitada ($\log(K^*/K) \approx 2,8$) quando comparado ao estado fundamental ($\log(K^*/K) \approx 9,5$).²⁴ O aumento da acidez na excitação do 1-naftol é tão pronunciada que ele muda o pKa de 9,4 (estado fundamental) para 0,4 (no estado excitado). Fenóis excitados usam a desprotonação adiabática em picosegundos em água via processo ESPT para emitir fluorescência na forma de fenolato no estado excitado.²⁴

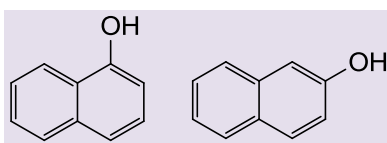


Figura 3. Estrutura química do 1-naftol e do 2-naftol

Recentemente, um conceito intrigante foi reportado por Dunietz e colaboradores na relação entre os graus de conjugação π e a ocorrência do processo ESIPT.^{26,14} Nessa aproximação teórica, os autores reconstruíram virtualmente um conjunto de derivações com números diferentes e posições do anel aromático em análogos de

dímeros da 7-azaindol, (Figura 4), e calcularam a relação entre a energia e a estrutura dessas espécies tautoméricas no estado excitado. Como um resultado, observou que os graus de conjugação π nas espécies tautoméricas, no estado excitado, influenciam o processo.^{26,14}

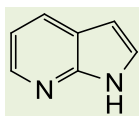


Figura 4. Estrutura química do composto 7-azaindol

Observaram que a conjugação π prolonga a deslocalização, melhorando a distribuição do excesso de carga no centro da reação e tende a baixar a energia relativa das espécies tautoméricas no estado excitado. Resultando, assim, numa grande força termodinâmica dirigida no sentido da transferência do próton.²⁶ Experimentalmente, Chung e co-autores, procuraram provar esse conceito com o estudo de vários 7-azaindol derivados da tereína. E mostraram que esses fenômenos são importantes para o processo ESIPT.²⁶

A substituição em compostos que apresentam o processo ESIPT pode influenciar a emissão. Doadores de elétrons, em que os elétrons podem ser considerados ressonantes para o oxigênio da carbonila pela excitação, criam um grande momento de dipolo para o estado excitado na forma enol em relação ao tautômero no estado excitado e sua forma no estado fundamental. Essa substituição, então, causada por grupos doadores, pode promover um aumento da transferência do próton.²⁷

Compostos que apresentam o processo

ESIPT empregados como sondas fluorescentes apresentam características positivas como a não dependência da concentração, a variação da luz de excitação,⁹ a ligação receptor-analito deve ser seletiva e muito sensível, além de gerar um sinal analítico grande.²⁸ Podendo ser empregados em diferentes ambiente e para diferentes alvos moleculares de interesse biológico, razão essa, que faz com que esses compostos sejam importantes dentro da espectroscopia de fluorescência para o diagnóstico de doenças.

3. Aplicações em Sondas

3.1. Sondas fluorescentes para cátions e metais

As Dihidroxi-antraquinonas (DHAQ), Figura 5, são um grupo de compostos interessantes do ponto de vista fotoquímico e fotofísico.²⁹ Corantes DHAQ apresentam um grupo carbonila e uma hidroxila vizinho que podem ser empregados para ancorar na superfície de semi-condutores.²⁹

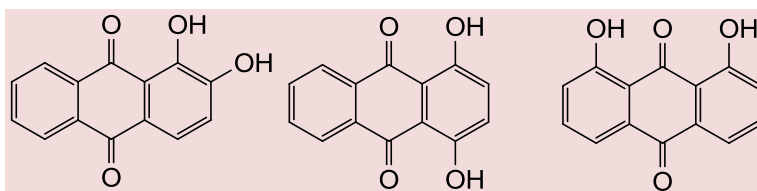


Figura 5. Estrutura química da Alizarina, Quinizarina e Crisazina

A alizarina, a partir da segunda metade do século 19 revolucionou a indústria têxtil, apresentando afinidade por metais do bloco p e d, formando complexos com cores fortes, que são usados na quantificação dos mesmos. Sua interação com o cálcio foi importante para estudos de crescimento dos ossos e osteoporose, expressão gênica e a engenharia de tecidos. Sendo empregada, também, na detecção de boro e fluoreto.²⁹ A Quinizarina forma complexos fluorescentes com lítio, boro, alumínio e pode ser utilizado para a detecção desses elementos por espectroscopia de fluorescência. A Crisazina foi empregada na detecção de cálcio, cobre, platina, chumbo, cádmio, zinco, níquel, manganês, ferro e cobalto.²⁹

Quimiossensores fluorescentes artificiais para íons de metais de transição tem sido alvo de um grande número de pesquisas nos últimos anos, principalmente, para o zinco,

que é o segundo metal de transição mais abundante dentro do organismo humano.³⁰ Ele é significativo em vários processos biológicos, como metabolismo celular, expressão genética, reparação do DNA, apoptose celular, neuro-transmissão, regulação de proteínas, reorganização e regulação da desordem neurológica em doenças como as de Parkinson, Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e epilepsia.^{30,28} Entre os diferentes caminhos para a produção de sondas fluorescentes para a detecção do zinco, o mais promissor é a utilização de compostos que apresentam o processo ESIPT.²⁸ Os derivados de 2-(benzotiazol-2-il)fenol estão envolvidos na formação de sondas fluorescentes de zinco. O hidroxinaftaleno baseado em sensores de benzotiazol, também, tem recebido atenção para a determinação desse metal por espectroscopia de fluorescência.¹³

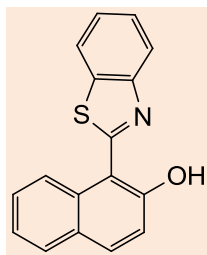


Figura 6. Estrutura química da sonda derivado do 2-naftol com benzotiazol para análise de Zn(II)

3.2. Sondas fluorescentes formadas por proteínas.

Aminoácidos não naturais são importantes para investigar peptídeos e proteínas, podendo servir como sondas locais para monitoramento seletivo de propriedades e funções proteicas.³¹ Os

aminoácidos fluorescentes são atrativos por serem altamente sensíveis a métodos de fluorescência. Desde que os aminoácidos fluorescentes, como o triptofano, (Figura 7), apresentaram propriedades fluorescentes ruins, muitas pesquisas têm como objetivo desenvolver aminoácidos com melhores propriedades fluorescentes.³¹

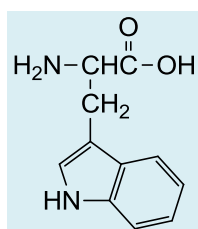


Figura 7. Estrutura química do Triptofano

Interações biomoleculares decrescem com a polaridade e com a presença de água em sítios lábeis, que podem ser monitorados por aminoácidos fluorescentes. Um exemplo, foram os aminoácidos baseados no Prodan, Figura 8, que foram utilizados para monitorar

interações do peptídeo S com a ribonuclease S e receptores de δ -opiíides como antagonistas, bem como para estimar a constante dielétrica local do domínio B1 da proteína G do estafilococo.³¹

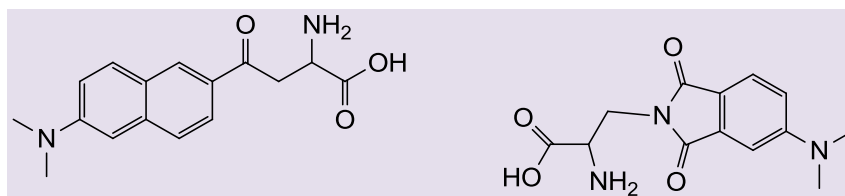


Figura 8. Estrutura química da Prodan e da 4-dimetilamiononaftilimida (4-DMAP)

Os aminoácidos baseados no 4-dimetilamionoftalimida (4-DMAP) fluorescente foram aplicados para ligar a peptídeos na tentativa de investigar domínios de ligação

de sulfeto (SH₂) fosfotirosínico e interações peptídeo-calmodulina.³¹

Estudos de aminoácidos fluorescentes ainda são limitados a poucos exemplos e focados apenas em interações proteína-proteína, enquanto que estudos de interações peptídeos-oligonucleotídeos são mais raros. Strizhake e colaboradores estudaram derivados da 3-hidroxicromona, que apresentam o processo ESIPT, para avaliar a detecção dos nucleocapsídeos do vírus HIV. Estes dados mostram relativa interação da sonda com as proteínas e nucleosídeos presentes na estrutura.³¹

As albuminas são importantes proteínas presentes no sistema circulatório, contribuindo para a manutenção da pressão osmótica.^{32,33} As albuminas transportam muitos compostos, como ácidos graxos, sais biliares, hormônios, metais e fármacos.³³ Podem, também, transportar proteínas

geradas por tumores que entram na corrente sanguínea.³²

A natureza da ligação entre sondas fluorescentes e a albumina tem sido investigada na tentativa de avaliar os problemas ocasionados nos estudos de estrutura molecular de proteínas pelo uso de surfactantes, que dobram/desdobram/redobram as estruturas das proteínas.³³ Alguns estudos mostram a aplicação da sonda p-N,N-dimetilamino-orto-hidroxibenzaldeído (PDOHBA), Figura 9, que apresenta o processo ESIPT, nos estudos de estrutura de proteínas pela interação com a albumina.³³ Nesse caso, a sonda foi empregada para avaliar mudanças conformacionais da proteína, carreando-a com o triptofano intrínseco da albumina.³³

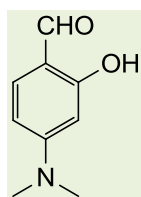


Figura 9. Estrutura química da PDOHBA

A molécula exibiu bandas de fluorescência tanto em ambiente polar como em ambiente apolar. Observaram, também, que a molécula se liga dentro da cavidade interna da albumina, diminuindo seu contato com a água, aumentando as emissões do estado excitado.³³ Caracterizaram a sonda como promissora para o estudo de propriedades estruturais de proteínas com o auxílio da albumina, como carreadora. Dentro dos estudos de proteínas geradas por células tumorais, a albumina pode ser empregada como alvo, uma vez que carrega essas proteínas no meio sanguíneo, para peptídeos biomarcadores que identificam essas proteínas dentro da cavidade da albumina.³²

Sondas fluorescentes baseados em proteínas podem ser utilizadas para detecção de complexos bioativos (interação com metais Zn e Ca, por exemplo, na estrutura de

proteínas) e para investigar estruturas sub-celulares específicas.³⁴ Outro exemplo de sondas empregando proteínas, são as Proteínas Verde Fluorescente (GFP), elas têm recebido intensa atenção devido a suas aplicações em biologia molecular e bioquímica.^{35,11,16} Essas GFP apresentam reações do tipo ESPT no qual a ligação de hidrogênio envolve a molécula de água e certos aminoácidos. A solvatação por moléculas de água podem influenciar o processo de ESPT devido às inúmeras ligações de hidrogênio entre o soluto e o solvente.²⁵ As GFP que apresentam o cromóforo (Z)-4-(4-hidroxibenzilideno)-1,2-dimetil-1H-imidazol-5(4H)-ona (HBDI) apresentam vantagens.³⁵ O HBDI é composto por um anel de 7 membros formado por uma ligação de hidrogênio, evidenciado pela presença de uma distância de 2,61 Å e um ângulo diedro de 175°, que apresenta o

processo ESIPT.³⁵ A formação dessa ligação de hidrogênio favorece a deslocalização dos elétrons π e diminui o “gap” de energia entre

os estados $S_0 \rightarrow S_1$. A transição entre os tautômeros provocado pelo processo ESIPT, então, gera a forma Zwitteriônica.³⁵

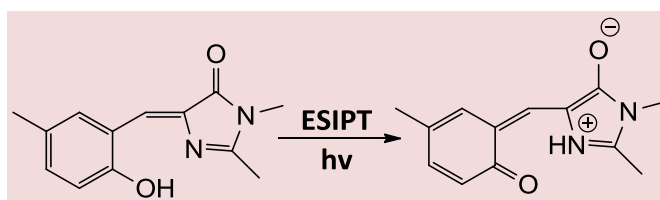


Figura 10. Representação do processo de transferência protônica intramolecular para a HBDI representando os tautômeros enol e ceto

Duas estruturas têm sido sugeridas na literatura, uma utilizando o grupo *meta*-HBDI, que apresenta o processo ESIPT em solventes polares, e a *orto*-HBDI que apresenta o mesmo processo em solventes apolares, como o ciclohexano, em torno de 605 nm. Podendo a estrutura *orto* ser empregada também em filmes sólidos originando o processo ESIPT e emitindo fluorescência na faixa de 595 nm.³⁵ Do ponto de vista químico, modificações na estrutura da HBDI tem apresentado emissão de cor que pode ser atribuído ao efeito do substituinte, uma vez que grupos retiradores de elétrons aumentaram a força da ligação OH diminuindo o processo ESIPT, e grupos doadores, diminuíram a força da ligação OH aumentando as emissões do processo.³⁵

3.3. Sondas para ânions

As sondas para fluoreto (F^-) são as mais reportadas, apesar de possuírem algumas limitações na determinação e na formação de bioimagem.⁷ Os sensores para fluoreto tem relativa importância, por causa de ser um fator crucial na cárie e na osteoporose.^{6,36} Uma variedade de sondas espectroscópicas para fluoreto têm sido desenvolvidas e três métodos analíticos são empregados para detectar o flúor: 1) a utilização de

quimiossensores derivados de organoboro, que promovem a formação da ligação B – F, apropriados para o monitoramento de fluoreto em água potável ou de agentes químicos que contenham flúor, como o Sarin, (Figura 11). 2) A utilização de derivados desilil-éter, no qual ocorre a formação da ligação Si – F com a quebra da ligação Si - O, no qual o sensor necessita de uma quantidade 1400 vezes maior de fluoreto para apresentar sinal; 3) A utilização de moléculas que apresentam o processo ESIPT, no qual empregam grupos amida ou ligantes com OH.^{5,37}

Dentre as sondas empregadas para fluoreto temos os derivados dos tetrazóis, que são compostos heterocíclicos de 5 membros que apresentam atividade biológica e farmacológica, e a Coumarina.^{5,38} A sonda baseada em tetrazol (Figura 12) captura o íon fluoreto através de ligação com o anel imidazol (N-H) quebrando a ligação intramolecular, promovendo assim a transferência de carga entre o 1H-tetrazol e o 2H-tetrazol auxiliado pelo processo ESIPT, estabilizando as estruturas ressonantes, e como consequência o ânion formado pelo anel tetrazol.⁵ Na sonda, pode ocorrer a mudança de cor com a presença do fluoreto de amarelo para incolor, o que pode auxiliar a detecção até a olho nu, permitindo uma determinação da presença de flúor.⁵

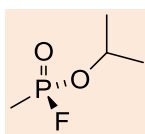


Figura 11. Estrutura química do gás Sarin

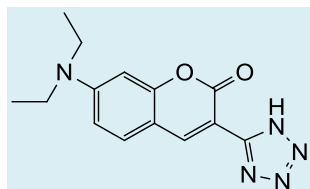


Figura 12. Estrutura química do Tetrazol empregado como sonda fluorescente para Fluoreto

O *design* de sensores fluorescentes em solução aquosa tem obtido apenas limitado sucesso.^{6,39} Um promissor corante

fluorescente é um derivado da 3-hidroxi-flavona, que exhibe o processo ESIPT em combinação com Zr-EDTA.⁶

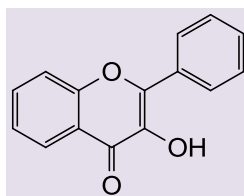


Figura 13. Estrutura química da 3-hidroxi-flavona

Especial atenção é dada nos últimos anos aos ânions fosfatos, pois estes íons são essenciais para os processos biológicos.^{28,40} Em particular, nucleotídeos di e trifosfato como ADP, ATP, GDP e GTP que são componentes estruturais do DNA e RNA.²⁸ Sensores capazes de reconhecer individualmente cada um desses compostos são importantes para o processo de comunicação químico e biológico. O grupo de Kim e co-autores reportou, recentemente, um complexo composto por dois átomos de zinco, que foi empregado para sondas fluorescentes de pirofosfato (PPI). Esse grupo demonstrou que complexos de zinco tem a capacidade de se ligar a grupos fosfato na seguinte ordem: ADP<ATP<PPI.^{28,41} O complexo foi empregado para avaliar o comportamento de polimerização da Tubulina, que usa a energia do GTP para sofrer a polimerização.^{28,42} O complexo de Zn

mostrou interação com o PPI e íons de Cu(II) mostrando propriedades fluorescentes. A ligação com grupos como o ATP e GTP mostra que o complexo de Zn se forma por uma ligação forte com o grupo pirofosfato.^{28,43} Na ligação com o ADP, observou-se que diferentes ânions não afetam a fluorescência e cátions Cu²⁺ e Fe²⁺ afetam negativamente a fluorescência, porém o mercúrio parece não interferir no processo.^{28,44} Como conclusão, o grupo apontou o complexo como uma sonda promissora no estudo de doenças degenerativas e para detecção de organofosforados.^{28,45}

3.4. Sondas empregadas no diagnóstico de doenças

As Alcalinefosfatases (ALP) são enzimas importantes que catalisam a hidrólise de

trans-fosforilação de uma variedade de compostos fosfato. Estas enzimas são encontradas em diferentes tipos de tecidos (intestino, osso, placenta, fígado, e rim) de todos os organismos vivos.^{46,47} Essas enzimas são empregadas como biomarcadores de diferentes doenças, como as relacionadas aos ossos (osteoporose, doença de Paget e osteomalacia) e ao fígado (câncer, hepatite e icterícia obstrutiva).^{46,37} A avaliação da

atividade da ALP é de fundamental importância para o diagnóstico preciso da doença ou para determinação dos alvos terapêuticos. Devido à sua rápida implementação, sensibilidade, sondas fluorescentes como a fluoresceína e Cumarina, (Figura 14), são empregadas para avaliar a atividade da ALP em fluidos biológicos.^{46,38}

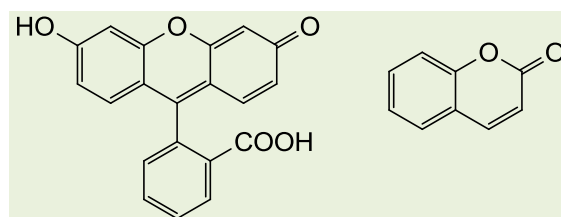


Figura 14. Estrutura química da Fluoresceína e Cumarina

Essas duas sondas são empregadas devido a sua alta sensibilidade, porém, elas são excretadas da célula reduzindo a aplicação endógena.^{46,36} Compostos derivados da 2-(2-hidroxifenil)-4-feniltiazol estão sendo investigados para tentar resolver os problemas de solubilidade enfrentados pelas sondas fluoresceína e cumarina, na tentativa de avaliar o diagnóstico endógeno das ALP's, com resultados promissores.^{46,48} A conversão

do composto (1) em (2), (Figura 15), após a reação com a ALP promove uma forte emissão fluorescentes, característica do processo ESIPT, em água e 2,0% de etanol. Quando ocorre a formação do composto (2), observa-se um forte batocromismo de 319 nm para 339 nm, resultando na formação desse composto ao longo de 10 min de reação, promovendo uma emissão azul intensa.^{46,49}

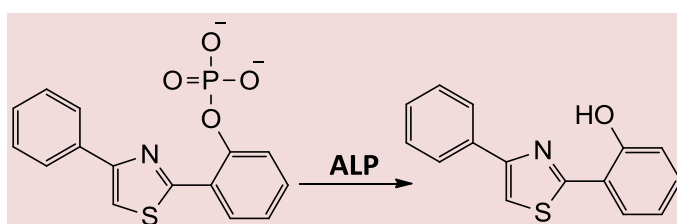


Figura 15. Representação da ação da ALP sobre a sonda (1) que apresenta uma fluorescência azul sendo transformada em (2) que apresenta uma fluorescência verde forte

A emissão de fluorescência em 525 nm é observada em diferentes concentrações de ALP em menos de 1 min. Possibilitando o monitoramento da atividade enzimática em tempo real pelas medidas fluorescentes.^{28,50}

A 3-hidroxiavona (Figura 9), a mais abundante estrutura da classe dos flavonoides naturais, é outra classe de

compostos que vem apresentando relativa importância no estudo de doenças humanas.^{27,51} Essa classe de compostos, tem seu interesse por serem compostos bioativos no combate a diversos radicais livres mediados por doenças como a arteriosclerose, câncer, alergias, problemas cardíacos, inflamações e AIDS.^{51,52} A 3-hidroxiavona pode ser

empregada como uma sonda fluorescente para explorar sítios ligantes em vários alvos biorrelevantes, como proteínas, membranas miméticas, como lipossomos e micelas.^{28,53} Pahari e co-autores empregaram a 3-hidroxi-flavona no estudo de interações com a cavidade de ciclodextrinas para aplicações farmacológicas, mostrando grande sucesso na inserção da mesma. Porém, relataram que estudos mais aprofundados de sua aplicação como fármaco, ainda, se fazem necessário.^{51,54} A substituição na posição 4 da 3-hidroxi-flavona por grupos dialquil amina, promove mudanças no processo ESIPT, uma vez que o grupo é um doador de elétrons por ressonância para o oxigênio da carbonila por

excitação, aumentando o momento de dipolo para o estado excitado (N*) relativo ao tautômero excitado (T*), quando comparado ao seu estado normal (N) e tautômero (T) no estado fundamental.^{27,54} Observou-se que N* é estabilizado por solventes polares e que o solvente aumenta a barreira energética de transferência.^{27,55} Para tentar diminuir essa barreira é utilizado a substituição com os grupos amino na tentativa de aumentar a força de transferência do próton quando submetidos a solventes polares.²⁷

A Doxorubicina (DOX) apresenta aplicações biológicas como fármaco e características fotofísicas na transferência de próton e elétrons.^{23,56}

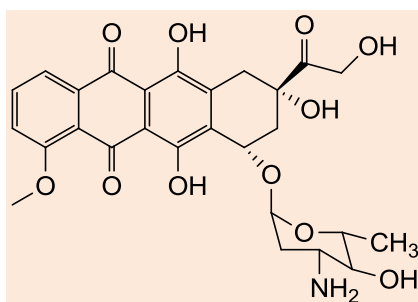


Figura 16. Estrutura química da Doxorubicina

A DOX é membro das antraciclina dos grupos dos antibióticos, conhecida pela sua ação quimioterápica, sendo tetracíclica, contendo 3 anéis planares e um anel antraquinona aromático com uma hidroxila, e um anel não aromático composto por um grupo aminoglicosídico.^{23,57} Devido a presença de diferentes grupos funcionais, ela pode se apresentar protonada dependendo do pH do meio. As propriedades fotofísicas da DOX apresentam variação com o pH do meio, exibindo fluorescência em 593 nm em solução aquosa e 577 nm em etanol. Essa diferença remete ao deslocamento atribuído a mudanças estruturais adotados em diferentes solventes, mais apolar (protonado) e polar (desprotonado), sugerindo que o solvatocromismo na DOX é determinado pelo ambiente local, mudando a polaridade do composto.^{23,58} Seu interesse vem se

reforçando, uma vez que pesquisas demonstram sua ação contra linhagens de células tumorais altamente resistentes “in vitro”.^{23,59} A DOX atua sobre a Topoisomerase II, além de impedir a geração de radicais livres dentro da célula. A DOX apresenta características fluorescentes intrínsecas podendo ser usada para sondas e empregado em várias técnicas de imagem. Alguns estudos têm focado na utilização da DOX no monitoramento da ligação com DNA, outros para o monitoramento de culturas de células por fluorescência.^{23,60}

A classe de compostos derivados dos 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazol, como o 2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxazol, 2-(2'-hydroxyphenyl)benzthiazol e 2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazol (ver figura 2), apresentam fluorescência devido ao processo ESIPT, possuindo seus derivados uma ampla

aplicação, como laser, materiais poliméricos e estabilizantes, sendo reportados por muitos grupos de pesquisa.^{13,21,61,62,63,64,65} Um dos derivados, o composto 2,1,3-benzothiazol (BTD) e seus derivados, apresentam detecção seletiva da dupla fita de DNA (dsDNA) em células vivas, sendo uma candidata a utilização em estudos de imagem, uma vez que podem atravessar a membrana de células e se ligar seletivamente e

eficientemente ao dsDNA. Outro exemplo, são os derivados aminobenzazoles sintetizados a partir dos 2-(2'-hidroxifenil)benzazoles e orto-anilinas. Esses compostos apresentam emissão fluorescente verde e potencial para aplicação biológica e médica, sendo aplicados para determinação de proteínas em meio aquoso, como a albumina (BSA).⁶³

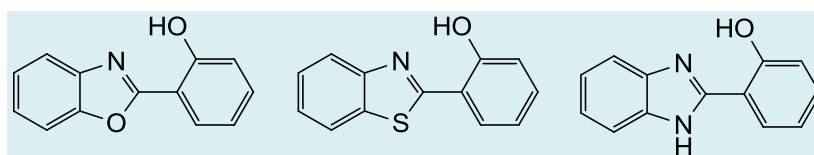


Figura 17. Estrutura química da 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol, 2-(2'-hidroxifenil)benzothiazol e 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol, respectivamente

4. Considerações Finais

Os estudos de sondas fluorescentes aplicados a diferentes sistemas passam por estudos teóricos e experimentais, assim, como pelo entendimento dos seus mecanismos de ação e de aplicabilidade. Sendo necessários, ainda, estudos cada vez mais abrangentes para aplicação dessas sondas em organismos vivos. A utilização de sondas fluorescentes em diferentes ambientes surge como uma promissora área para a detecção de compostos de interesse ambiental, medicinal e bioquímico. O desenvolvimento de pesquisas para entender melhor o processo ES IPT, o qual pode ser uma poderosa ferramenta para aplicações clínicas, como o diagnóstico de tumores e problemas neurodegenerativos. Desta forma, novas pesquisas para aperfeiçoar a técnica de espectroscopia de fluorescência e a aplicação dessas sondas, se fazem necessárias para que se produzam mecanismos de diagnóstico mais eficientes, que possam reduzir a mortalidade.

Agradecimentos

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, a Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Química, ao IF Sudeste MG pelo apoio na realização do programa de Doutorado e as agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Referências Bibliográficas

- Chaudhuri, S.; Pahari, B.; Sengupta, P. K. Ground and excited state proton transfer and antioxidant activity of 7-hydroflavone in model membranes: Absorption and fluorescence spectroscopic studies. *Biophysical Chemistry* **2009**, *139*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lue, N.; Kang, J. W.; Yu, C. C.; Barman, I.; Dingari, N. C.; Feld, M. S.; Dasari, R. R.; Fitzmaurice, M. Portable optical fiber probe-based spectroscopic scanner for rapid cancer diagnosis: A New tool for intraoperative margin assessment. *PLoS One* **2012**, *7*, e30887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Beleites, C.; Steiner, G.; Sowa, M. G.; Baumgartner, R.; Sobottka, S.; Schackert, G.; Salzer, R. Classification of Human gliomas by

- infrared imaging spectroscopy and chemometric image processing. *Vibrational Spectroscopy* **2005**, *38*, 143. [CrossRef]
- ⁴ Sepanovic, O. R.; Volynskaya, Z.; Kong, C. R.; Galindo, L. H.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. A multimodal spectroscopy system for real-time disease diagnosis. *Review Scientific Instruments* **2009**, *80*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵ Li, J. Y.; Zhou, X. Q.; Zhou, Y.; Fang, Y.; Yao C. A highly specific tetrazole-based chemosensor for fluoride ion: a new sensing functional group based on intramolecular proton transfer. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2013**, *102*, 66. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Wang, F.; Wu, J.; Zhuang, X.; Zhang, W.; Liu, W.; Wang, P.; Wu, S. A highly selective fluorescent sensor for fluoride in aqueous solution based on the inhibition of excited-state intramolecular proton transfer. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, *146*, 260. [CrossRef]
- ⁷ Zhu, B.; Kan, H.; Liu, J.; Liu, H.; Wei, Q.; Du, B. A highly selective ratiometric visual and red-emitting fluorescent dual-channel probe for imaging fluoride anions in living cells. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *52*, 298. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Doroshenko, A. O.; Matsakov, A. Y.; Nevskii, O. V.; Grygorovych, O. V. Excited state intramolecular proton transfer reaction revisited: S₁ state or general reversibility? *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2012**, *250*, 40. [CrossRef]
- ⁹ Paul, B. K.; Samanta, A.; Guchhait, N. Modulation of Excited-State Intramolecular Proton Transfer Reaction of 1-hydroxy-2-naphthaldehyde in Different Supramolecular Assemblies. *Langmuir* **2010**, *26*, 3214. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Basarić, N.; Cindro, N.; Hou, Y.; Žabčić, I.; Mlinarić-Majerski, K.; Wan, P. Competing photodehydration and excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) in adamantyl derivatives of 2-phenylphenols. *Canadian Journal of Chemistry* **2011**, *89*, 221. [CrossRef]
- ¹¹ Lee, J.; Kim, C. H.; Joo, T. Active role of proton in excited state intramolecular proton transfer reaction. *Journal of Physical Chemistry A* **2013**, *117*, 1400. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Enchev, V.; Markova, N.; Stoyanova, M.; Petrov, P.; Rogozherov, M.; Kuchukova, N.; Timtcheva, I.; Monev, V.; Angelova, S.; Spassova, M. Excited state proton transfer in 3,6-bis(4,5-dihydroxyoxazo-2-yl)benzene-1,2-diol. *Chemical Physics Letters* **2013**, *563*, 43. [CrossRef]
- ¹³ Goswami, S.; Das, A. K.; Aich, K.; Manna, A. Competitive intra- and inter-molecular proton transfer in hydroxy-naphthyl benzothiazole: selective ratiometric sensing of acetate. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54*, 4215. [CrossRef]
- ¹⁴ Deperasińska, I.; Gryko, D. T.; Karpiuk, E.; Kozankiewicz, B.; Makarewicz, A.; Piechowska, J. 12-Hydroxy-1-azaperylene - Limiting Case of the ESIPT System: Enol-Keto Tautomerization in S₀ and S₁ States. *Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116*, 2109. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Nibbering, E. T. J.; Fidler, H.; Pines, E. Ultrafast Chemistry: Using time-resolved vibrational spectroscopy for interrogation of structural dynamics. *Annual Reviews of Physical Chemistry* **2005**, *56*, 337. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Tang, K.-C.; Chen, C.-L.; Chuang, H.-H.; Chen, J.-L.; Chen, Y.-J.; Lin, Y.-C.; Shen, J.-Y.; Hu, W.-P.; Chou, P.-T. A Genuine intramolecular proton relay system undergoing excited-state double proton transfer reaction. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2011**, *2*, 3063. [CrossRef]
- ¹⁷ Mahajan, A.; Aulakh, R. K.; Bedi, R. K.; Kumar, S.; Kumar, S.; Aswal, D. K. Synthesis and characterization of excited state intramolecular proton transfer based 2-hydroxylaryl imidazole fluorescent materials. *Synthetic Metals* **2012**, *162*, 58. [CrossRef]
- ¹⁸ Brenlla, A.; Rodríguez-Prieto, F.; Mosquera, M.; Ríos, M. A.; Ríos Rodríguez, M. C. Solvent-Modulated Ground-State Rotamerism and Tautomerism and Excited-State Proton-Transfer Processes in o-Hydroxynaphthylbenzimidazoles. *Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 56. [CrossRef]
- ¹⁹ Yang, G. Q.; Li, S.; Wang, S.; Li, Y. Emissive

properties and aggregation-induced emission enhancement of excited-state intramolecular proton-transfer compounds. *Comptes Rendus Chimie* **2011**, *14*, 789. [[CrossRef](#)]

²⁰ Daengngern, R.; Kerdpol, K.; Kungwan, N.; Hannongbua, S.; Barbatti, M. Dynamics simulations of excited-state triple proton transfer in 7-azaindole complexes with water, water-methanol and methanol. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2013**, *266*, 28. [[CrossRef](#)]

²¹ Patil, V. S.; Padalkar, V. S.; Phatangare, K. R.; Gupta, V. D.; Umape, P. G.; Sekar, N. Synthesis of new ESIPT-Fluorescein: Photophysics of pH sensitivity and fluorescence. *Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116*, 536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²² Tang, K. C.; Chang, M. J.; Lin, T. Y.; Pan, H. A.; Fang, T. C.; Chen, K. Y.; Hung, W. Y.; Hsu, Y. H.; Chou, P. T. Fine Tuning the Energetics of Excited-State intramolecular Proton transfer (ESIPT): White light generation in a single ESIPT system. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 17738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²³ Rana, D. K.; Dhar, S.; Sarkar, A.; Bhattacharya, S. C. Dual intramolecular hydrogen bond as a switch for inducing ground and excited-state intramolecular double proton transfer in doxorubicin: an excitation wavelength dependence study. *Journal of Physical Chemistry A* **2011**, *115*, 9169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁴ Lukeman, M.; Burns, M.-D.; Wan, P. Excited state intramolecular proton transfer in 1-hydroxypyrene. *Canadian Journal of Chemistry* **2011**, *89*, 433. [[CrossRef](#)]

²⁵ Lin, T. Y.; Tang, K. C.; Yang, S. H.; Shen, J. Y.; Cheng, Y. M.; Pan, H. A.; Chi, Y.; Chou, P. T. The empirical Correlation between Hydrogen Bonding Strength and Excited-State intramolecular Proton Transfer in 2-Pyridyl Pyrazoles. *The Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116*, 4438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁶ Chung, M. W.; Lin, T. Y.; Hsieh, C. C.; Tang, K. C.; Fu, H.; Chou, P. T.; Yang, S. H.; Chi, Y. Excited-State Intramolecular Proton Transfer (ESIPT) fine Tuned by Quinoline-Pyrazole Isomerism: π -Conjugation Effect on ESIPT. *Journal of Physical Chemistry A* **2010**, *114*, 7886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁷ Lin, C. C.; Chen, C. L.; Chung, M. W.; Chen, Y. J.; Chou, P. T. Effects of Multibrnching on 3-Hydroxyflavone-Based chromophores and the excited-state intramolecular proton transfer dynamics. *Journal of Physical Chemistry A* **2010**, *114*, 10412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁸ Kim, K.; Ha, Y.; Kaufman, L.; Churchill, D. G. Labile Zinc-Assisted Biological Phosphate Chemosensing and Related Molecular Logic Gating Interpretations. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51*, 928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁹ Mech, J.; Grela, M. A.; Szaciłowski, K. Ground and excited state properties of alizarin and its isomers. *Dyes and Pigments* **2014**, *103*, 202. [[CrossRef](#)]

³⁰ Helal, A.; Kim, H. S. Carbazole incorporated ratiometric chemosensor for Zn^{2+} . *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2013**, *105*, 273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

³¹ Strizhak, A. V.; Postupalenko, V. Y.; Shvadchak, V. V.; Morellet, N.; Guittet, E.; Pivovarenko, V. G.; Klymchenko, A. S.; Mély, Y. Two-Color fluorescent L-amino acid mimic of tryptophan for probing peptide-nucleic acid complexes. *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 2434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

³² Kazmierczak, S. C.; Gurachevsky, A.; Matthes, G.; Muravsky, V. Electron Spin Resonance Spectroscopy of Serum Albumin: A Novel New Test for Cancer Diagnosis and Monitoring. *Clinical Chemistry* **2006**, *52*, 2129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

³³ Samanta, A.; Paul, B. K.; Guchhait, N. Spectroscopic probe for exploring probe-protein interaction: a mapping of native, unfolding and refolding of protein bovine serum albumin by extrinsic fluorescence probe. *Biophysical Chemistry* **2011**, *156*, 128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

³⁴ Srikun, D.; Albers, A. E.; Nam, C. I.; Iavarone, A. T.; Chang, C. J. Organelle-targetable fluorescent probes for imaging hydrogen peroxide in living cells via SNAP-Tag protein labeling. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 4455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

³⁵ Garcia, E.; Andrews, C.; Hua, J.; Kim H. L.; Sukumaran, D. K.; Szyperski, T.; Odunsi, K. Diagnosis of Early Stage Ovarian Cancer by 1H

- NMR metabonomics of Serum Explored by use of a Microflow NMR probe. *Journal of Proteome Research* **2011**, *10*, 1765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁶ Saroj, M. K.; Sharma, N.; Rastogi, R. C. Photophysical study of some 3-benzoylmethyleneindol-2-ones and estimation of ground and excited states dipole moments from solvatochromic methods using solvent polarity parameters. *Journal of Molecular Structure* **2012**, *1012*, 73. [[CrossRef](#)]
- ³⁷ Sekikawa, T.; Schalk, O.; Wu, G.; Boguslavskiy, A. E.; Stolow, A. Initial Processes of proton transfer in salicylideneaniline studied by time resolved photoelectron Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A* **2013**, *117*, 2971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Shen, X. F.; Wang, F.; Xu, S.; Qian, Y.; Liu, Y.; Yuan, H.; Zhao, Q.; Feng, S.; Guo, X.; Xu, J.; Yang, J. Is cardiolipin the target of local anesthetic cardiotoxicity? *Brazilian Journal of Anesthesiology* **2010**, *60*, 445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹ Zhao, X. D.; Sun, C. J.; Yao, Q. Q.; Li, W. B. Synthesis of 3-hydroxyflavone fluorescent probes and study of their fluorescence properties. *Chinese Chemical Letters* **2010**, *21*, 529. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁰ Yu, C.; Gestl, E.; Eckert, K.; Allara, D.; Irudayaraj, J. Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy. *Cancer Detection Prevention* **2006**, *30*, 515. [[CrossRef](#)]
- ⁴¹ Valchanov, G.; Ivanova, A.; Tadjer, A.; Chercka, D.; Baumgarten, M. Tuning the optical absorption of potential blue emitters. *Organic Electronics* **2013**, *14*, 2727. [[CrossRef](#)]
- ⁴² Wang, J.; Chu, Q.; Liu, X.; Wesdemiotis, C.; Pang, Y. Large fluorescence response by alcohol from a bis(benzoxazole)-Zinc(II) complex: The role of excited state intramolecular proton transfer. *Journal of Physical Chemistry B* **2013**, *117*, 4127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³ Tomin, V. I.; Jaworski, R. ESIPT may proceed in 3HF at excitation in S₂ state. *Journal of Molecular Structure* **2012**, *1030*, 104. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁴ Zhang, W.; Yang, T.; Jiao, K. Ultrasensitive indicator-free and enhanced self-signal nanohybrid DNA sensing platform based on electrochemically grown poly-xanthurenic acid/Fe₂O₃. *Biosensors Bioelectronics* **2012**, *31*, 182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁵ Stolow, A. Femtosecond time-resolved photoelectron spectroscopy of polyatomic molecules. *Annual Reviews of Physical Chemistry* **2003**, *54*, 89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁶ Park, J.; Helal, A.; Kim, H. S.; Kim, Y. Fluorogenic assay of alkaline phosphatase activity based on the modulation of excited-state intramolecular proton transfer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 5541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Steiner, G.; Shaw, A.; Choo-Smith, L. P.; Abuid M. H.; Schackert, G.; Sobottka, S.; Steller, W.; Salzer, R.; Mantsch, H. H. Distinguishing and grading human gliomas by IR spectroscopy. *Biopolymers* **2003**, *72*, 464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ Rosspeintner, A.; Lang, B.; Vauthey, E. Ultrafast Photochemistry in Liquids. *Annual Reviews of Physical Chemistry* **2013**, *64*, 247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Ju, C. C.; Yin, H. J.; Yuan, C. L.; Wang, K. Z. A fluorescent probe for both pH and Zn²⁺ based on 2-(1-phenyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)phenol. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2011**, *79*, 1876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Jayabharathi, J.; Thanikachalam, V.; Kalaiarasi, V.; Jayamoorthy, K. Intramolecular excited charge transfer, radiative and radiationless charge recombination processes in donor-acceptor imidazole derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2014**, *275*, 114. [[CrossRef](#)]
- ⁵¹ Pahari, B.; Chakraborty, S.; Sengupta, P. K. Encapsulation of 3-hydroxyflavone in γ -cyclodextrin nanocavities: Excited state proton transfer fluorescence and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure* **2011**, *1006*, 483. [[CrossRef](#)]
- ⁵² Banerjee, S.; Pabbathi, A.; Sekhar, M. C.; Samanta, A. Dual Fluorescence of Ellipticine: Excited State Proton Transfer from Solvent versus Solvent mediated intramolecular

- Proton Transfer. *Journal of Physical Chemistry A* **2011**, *115*, 9217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ Chuang, W. T.; Hsieh, C. C.; Lai, C. H.; Lai, C. H.; Shih, C. W.; Chen, K. Y.; Hung, W. Y.; Hsu, Y. H.; Chou, P. T. Excited-State Intramolecular Proton transfer molecules bearing o-hydroxy analogues of Green Fluorescent Protein Chromophore. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 8189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ Chandra, M.; Scheiman, J.; Heidt, D.; Simeone, D.; McKenna, B.; Mycek, M. A. Probing pancreatic disease using tissue optical spectroscopy. *Journal Biomedical Optics* **2007**, *12*, 060501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁵ Goldberg, J. M.; Batjargal, S.; Petersson, E. J. Thioamides as fluorescence Quenching probes: Minimalist Chromophores to Monitor Protein Dynamics. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 14718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ Chen, W.-H.; Pang, Y. Excited-state intramolecular proton transfer in 2-(2',6'-dihydroxyphenyl)benzoxazole: effect of dual hydrogen bonding on the optical properties. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 1914. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁷ Erez, Y.; Presiado, I.; Gepshtein, R.; Huppert, D. Excited-State intermolecular Proton transfer of Firefly Luciferin IV. Temperature and pH Dependence. *Journal of Physical Chemistry A* **2011**, *115*, 1617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁸ Hsieh, C. C.; Jiang, C. M.; Chou, P. T. Recent Experimental advances on Excited-State intramolecular Proton Coupled Electron Transfer Reaction. *Accounts of Chemical Research* **2010**, *43*, 1364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁹ Erez, Y.; Simkovitch, R.; Shomer, S.; Gepshtein, R.; Huppert, D. Effect of Acid on the Ultraviolet-Visible Absorption and Emission Properties of Curumin. *Journal of Physical Chemistry A* **2014**, *118*, 872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁰ Fang, T.-C.; Tsai, H.-Y.; Luo, M.-H.; Chang, C.-W.; Chen, K.-Y. Excited-State charge coupled proton transfer reaction via the dipolar functionality of salicylideneaniline. *Chinese Chemical Letters* **2013**, *24*, 145. [[CrossRef](#)]
- ⁶¹ Oliveira, F. F. D.; Santos, D. C.; Lapis, A. A.; Corrêa, J. R.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; Moreira, P. F. Jr.; de Oliveira, V. C.; Quina, F. H.; Neto B. A. On the use of 2,1,3-benzothiadiazole derivatives as selective live cell fluorescence imaging probes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 6001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶² Coelho, F. L.; Rodembusch, F. S.; Campo, L. F. Synthesis, characterization and photophysics of new photoactive ESIPT lipophilic dyes. Partition experiments with different composed liposomes. *Dyes and Pigments* **2014**, *110*, 134. [[CrossRef](#)]
- ⁶³ Holler, M. G.; Campo, L. F.; Brandelli, A.; Stefania, V. Synthesis and spectroscopic characterization of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazole isothiocyanates as new fluorescent probes for proteins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2002**, *149*, 217. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁴ Dick, P. F.; Faleiro, N. V. S.; Campo, L. F.; Scroferneker, M. L.; Corbellini, V. A.; Rodembusch, F. S.; Stefani, V. Amphiphilic ESIPT benzoxazole derivatives as prospective fluorescent membrane probes. *Tetrahedron Letters* **2014**, *55*, 3024. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁵ Grando, S. R.; Pessoa, C. M.; Gallas, M. R.; Costa, T. M.; Rodembusch, F. S.; Benvenuti, E. V. Modulation of the ESIPT Emission of Benzothiazole Type Dye Incorporated in Silica-Based Hybrid Materials. *Langmuir* **2009**, *25*, 13219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]