

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

THAIS KROETZ

**AMINAS FLUORESCENTES DE CADEIA LONGA:  
SÍNTESE, ESTUDO FOTOFÍSICO E OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS FOTOATIVOS  
DE FOSFATIDILCOLINA**

Prof. Dr. Fabiano Severo Rodembusch  
Orientador

Porto Alegre, Novembro de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

THAIS KROETZ

**AMINAS FLUORESCENTES DE CADEIA LONGA:  
SÍNTESE, ESTUDO FOTOFÍSICO E OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS FOTOATIVOS  
DE FOSFATIDILCOLINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Fabiano Severo Rodembusch  
Orientador

Porto Alegre, Novembro de 2017

A presente dissertação foi realizada inteiramente pela autora, no período entre agosto/2015 e agosto/2017, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Fabiano Severo Rodembusch, exceto algumas análises feitas em colaboração, as quais serão citadas durante o texto e nos agradecimentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me abençoar, me acompanhar na minha trajetória e me dar forças para superar as dificuldades diárias.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fabiano Rodembusch, pelos ensinamentos e conselhos, pela paciência, pelas horas dedicadas ao meu aprendizado, os quais foram de extrema importância para minha formação como pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Alexandre Gonçalves Dal-Bó pelas instruções, e, principalmente pelas análises realizadas, que contribuíram com o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Fotoquímica Orgânica Aplicada, por toda ajuda que me deram ao longo destes dois anos, pelo conhecimento compartilhado e pela amizade.

À minha família pelo apoio dispensado, principalmente aos meus pais pela compreensão e pelo auxílio sempre que necessário.

Ao meu noivo pelo incentivo e apoio em minhas decisões, pelo companheirismo e por partilhar comigo momentos bons e ruins.

## CONGRESSOS

### **7th International Colloids Conference, 2017, Sitges - Spain**

Kroetz, T.; Santos, M. C.; Giacomelli, F. C.; Frizon, T. E. A.; Lima, V. R.; Rodembusch, F. S.; Dal-Bó, A. G. *ESIPT photoactive carbohydrate-based vesicles. Photophysical, spectroscopic and physico-chemical characterization.* Apresentação de pôster.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 LIPOSSOMAS.....	4
2.1.1 Classificação dos Lipossomas.....	8
2.1.2 Métodos de Preparação.....	9
2.2 SONDAS FLUORESCENTES.....	10
2.3 HETEROCICLOS FLUORESCENTES BENZAZÓLICOS.....	14
2.3.1 Mecanismo de ESIPT e Deslocamento de Stokes.....	16
2.4 FOTOFÍSICA.....	19
2.4.1 Absorção da radiação na região do UV-Vis.....	19
2.4.2 Emissão de Fluorescência.....	20
2.4.3 Rendimento Quântico de Fluorescência.....	21
2.5 ASSOCIAÇÃO COM BSA.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA.....	25
4.1.1 Compostos <b>27-30</b> .....	25
4.1.2 Iminas <b>34-39</b> .....	27
4.1.3 Aminas Fluorescentes <b>40-45</b> .....	39
4.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	42
4.3 ESTUDO FOTOFÍSICO.....	50
4.3.1 Compostos <b>40-45</b> .....	50
4.3.2 Estudo fotofísico dos Lipossomas PC e Lipossomas C <sub>22</sub> PC.....	58
4.4 ESTUDO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DAS AMINAS <b>40-45</b> .....	62
4.5 ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS LIPOSSOMAS COM LECTINA WGA.....	76
4.6 ESTUDO DA INTERAÇÃO DAS AMINAS <b>40-45</b> COM BSA.....	80

5. CONCLUSÕES.....	87
6. EXPERIMENTAL.....	89
6.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
6.2 SÍNTESE DOS PRECURSORES BENZAZÓLICOS.....	90
6.2.1 Síntese dos precursores <b>27</b> e <b>28</b> .....	91
6.2.2 Síntese dos precursores formilados <b>29</b> e <b>30</b> .....	91
6.3 SÍNTESE DAS IMINAS <b>34-39</b> .....	92
6.3.1 Procedimento I – Síntese das iminas <b>34</b> e <b>37</b> .....	92
6.3.2 Procedimento II – Síntese das iminas <b>35, 36, 38</b> e <b>39</b> .....	93
6.4 ESTUDO DA HIDRÓLISE DAS IMINAS <b>34-39</b> .....	94
6.5 SÍNTESE DAS AMINAS <b>40-45</b> .....	95
6.6 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA .....	97
6.7 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS C <sub>22</sub> PC.....	98
6.7.1 Síntese do anfifílico glicosilado C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc.....	98
6.7.2 Preparação dos Lipossomas C <sub>22</sub> PC .....	99
6.8 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	100
6.8.1 Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS).....	100
6.8.2 Espalhamento de Luz Dinâmico ( <i>Dynamic Light Scattering –DLS</i> ).....	100
6.9 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DAS AMINAS <b>40-45</b> NOS LIPOSSOMAS PC E C <sub>22</sub> PC.....	101
6.10 TESTE DE INTERAÇÃO DOS LIPOSSOMAS C <sub>22</sub> PC COM LECTINA WGA.....	102
6.11 ESTUDO DA INTERAÇÃO COM BSA.....	102
7. REFERÊNCIAS.....	103

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Corantes lipofílicos baseados na estrutura do benzoxazol, com potencial aplicação como sondas fluorescentes de membranas. ....	3
<b>Figura 2.</b> Representação de um lipossoma dividido ao meio, evidenciando sua estruturação interna. ....	4
<b>Figura 3.</b> Efeito da forma molecular na estrutura de agregados anfifílicos. ....	5
<b>Figura 4.</b> Estruturas moleculares da 1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (DPPC) e do 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-[fosfo- <i>rac</i> -(1-glicerol)] (DOPG). ....	6
<b>Figura 5.</b> Estrutura do lipossoma: (a) lipossoma convencional; (b) lipossomas estericamente estabilizados ( <i>stealth</i> ); (c) lipossoma sítio-específico; (d) lipossoma contendo compostos fluorescentes e fosfolipídios carregados positivamente ou negativamente. ....	8
<b>Figura 6.</b> Estrutura da bicamada lipídica composta por fosfolipídios e colesterol (acima) e classificação de lipossomas (abaixo): lipossomas multilamelares (MLV), lipossomas multivesiculares (MVL) e lipossomas unilamelares (ULV) representados como lipossomas unilamelares grandes (LUV) e lipossomas unilamelares pequenos (SUV). ....	9
<b>Figura 7.</b> Sondas fluorescentes derivadas da Fluoresceína. (A) 5-Dodecanoilaminofluoresceína; (B) Fluoresceína acoplada ao hexapeptídeo formil-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys, (C) <i>Calcium Green-1</i> e (D) <i>Fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside</i> (FDG). ....	12
<b>Figura 8.</b> Exemplos de sondas fluorescentes descritas na literatura. Derivado de cumarina (8); derivado de rodamina (9); derivado de fluoresceína (10); derivado de cianina (11). ....	13
<b>Figura 9.</b> Corantes orgânicos lipofílicos. DPH (12), Nile Red (13), Laurdan (14), Prodan (15). ....	14
<b>Figura 10.</b> Sondas de membrana análogas a ácidos graxos e fosfolipídios. Ácido graxo marcado com NBD (16) e fosfolipídio marcado com pireno (17). ....	14
<b>Figura 11.</b> Estrutura química de heterociclos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol, onde X=O (benzoxazol), S (benzotiazol) ou NH (benzimidazol). ....	15
<b>Figura 12.</b> Exemplos de derivados de heterociclos benzazólicos reportados na literatura indicando as respectivas aplicações. ....	15
<b>Figura 13.</b> Exemplos de derivados de heterociclos benzazólicos reportados na literatura que apresentam aplicações farmacológicas. ....	16

<b>Figura 14.</b> Representação do processo de ESIPT para heterociclos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol, onde X=O, S ou NH. ....	17
<b>Figura 15.</b> Representação do Deslocamento de Stokes ( $\Delta\lambda_{ST}$ ) para emissão normal, da forma enol (esquerda), e, emissão por ESIPT da forma ceto (direita). ....	17
<b>Figura 16.</b> Formas tautoméricas enol-cis ( $E_I$ ), enol-trans ( $E_{III}$ ), enol-cis solvatado ( $E_{II}$ ), enol-trans aberto ( $E_{IV}$ ), com X= O, S ou NH. ....	18
<b>Figura 17.</b> Possíveis transições eletrônicas em compostos orgânicos. ....	19
<b>Figura 18.</b> Diagrama de Jablonski. ....	21
<b>Figura 19.</b> Estrutura da BSA com representação dos respectivos subdomínios (acima), e, comparação entre as estruturas da BSA e HSA indicando a localização dos resíduos de triptofano. ....	23
<b>Figura 20.</b> Mistura de regioisômeros obtida a partir da formilação de precursores 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis pela reação de Duff. ....	25
<b>Figura 21.</b> Metodologia sintética de obtenção dos derivados benzazólicos <b>27-28</b> . ....	25
<b>Figura 22.</b> Metodologia sintética de obtenção dos derivados benzazólicos formilados <b>29-30</b> . ....	26
<b>Figura 23.</b> Metodologia sintética de obtenção das iminas <b>34-39</b> . ....	27
<b>Figura 24.</b> Proposta mecanística genérica para obtenção das iminas <b>34-39</b> . ....	28
<b>Figura 25.</b> Espectro de RMN de $^1H$ (300 MHz) da imina <b>38</b> , em $CDCl_3$ , com ampliação da região aromática. ....	30
<b>Figura 26.</b> Espectro de FTIR da imina <b>38</b> em KBr.....	31
<b>Figura 27.</b> Mecanismo genérico de hidrólise de iminas. ....	33
<b>Figura 28.</b> Espectro de absorção na região do UV-Vis da imina <b>34</b> com acompanhamento de sua hidrólise catalisada por solução aquosa de AcOH (0,1 M) (esquerda). Valores inicial e final da hidrólise onde as setas indicam a variação que ocorre de 0 a 15 min (direita). ....	34
<b>Figura 29.</b> Espectro de absorção na região do UV-Vis da imina <b>35</b> com acompanhamento de sua hidrólise catalisada por solução aquosa de AcOH (0,1 M) (esquerda). Valores inicial e final da hidrólise onde as setas indicam a variação que ocorre de 0 a 15 min (direita). ....	35

<b>Figura 30.</b> Espectro de absorção na região do UV-Vis da imina <b>36</b> com acompanhamento de sua hidrólise catalisada por solução aquosa de AcOH (0,1 M) (esquerda). Valores inicial e final da hidrólise onde as setas indicam a variação que ocorre de 0 a 15 min (direita). .....	35
<b>Figura 31.</b> Espectro de absorção na região do UV-Vis da imina <b>37</b> com acompanhamento de sua hidrólise catalisada por solução aquosa de AcOH (0,1 M) (esquerda). Valores inicial e final da hidrólise onde as setas indicam a variação que ocorre de 0 a 44 min (direita). .....	36
<b>Figura 32.</b> Espectro de absorção na região do UV-Vis da imina <b>38</b> com acompanhamento de sua hidrólise catalisada por solução aquosa de AcOH (0,1 M) (esquerda). Valores inicial e final da hidrólise onde as setas indicam a variação que ocorre de 0 a 45 min (direita). .....	36
<b>Figura 33.</b> Espectro de absorção na região do UV-Vis da imina <b>39</b> com acompanhamento de sua hidrólise catalisada por solução aquosa de AcOH (0,1 M) (esquerda). Valores inicial e final da hidrólise onde as setas indicam a variação que ocorre de 0 a 45 min (direita). .....	37
<b>Figura 34.</b> Gráfico da Concentração da imina <b>38</b> em função do tempo da reação de hidrólise (esquerda) e gráfico do logaritmo natural (ln) da concentração do corante em relação ao tempo (direita) ( $R^2 = 0,998$ ). .....	38
<b>Figura 35.</b> Gráfico da Concentração da imina <b>39</b> em função do tempo da reação de hidrólise (esquerda) e gráfico do logaritmo natural (ln) da concentração do corante em relação ao tempo (direita) ( $R^2 = 0,999$ ). .....	38
<b>Figura 36.</b> Metodologia sintética de obtenção das aminas <b>40-45</b> . .....	39
<b>Figura 37.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) da amina <b>44</b> , em $\text{CDCl}_3$ , com ampliação da região aromática. ....	40
<b>Figura 38.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (APT) (100 MHz) da amina <b>44</b> , em $\text{CDCl}_3$ . ....	41
<b>Figura 39.</b> Espectro de FTIR da amina secundária <b>44</b> em ATR. ....	42
<b>Figura 40.</b> Estruturas moleculares da 1,2-diastearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfolina (DSPC), L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina (LPC) e 1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfato (DPPA). ....	43
<b>Figura 41.</b> Diagrama esquemático da formação de lipossomas de fosfatidilcolina pelo método de evaporação em fase reversa. ....	44
<b>Figura 42.</b> Diagrama esquemático da síntese do glicoconjugado $\text{C}_{22}\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$ . ....	46

<b>Figura 43.</b> Representação da distribuição de íons em torno de uma partícula esférica negativamente carregada dispersa em líquido ionizado. ....	47
<b>Figura 44.</b> Função de correlação $C(q,t)$ adquirida no ângulo de espalhamento $\theta=90^\circ$ , para uma solução de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ da vesícula mista de $C_{22}\text{PC}$ na ausência de amina a $25^\circ\text{C}$ , em solução tampão fosfato salino PBS, 10mM, pH 7,2. A Figura inserida mostra a respectiva distribuição de $R_H$ , em volume total. ....	49
<b>Figura 45.</b> Distribuição do tempo de relaxação $A(t)$ obtida das funções de correlação temporal adquirida no ângulo de espalhamento $\theta=90^\circ$ , para soluções de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ das vesículas mistas de $C_{22}\text{PC}$ na ausência de amina ( $\bullet$ ) e na presença da amina 40 ( $\circ$ ) à $25^\circ\text{C}$ , em solução tampão fosfato salino PBS, 10mM, pH 7,2. ....	49
<b>Figura 46.</b> Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) normalizados da molécula <b>40</b> ( $\sim 10^{-5} \text{ M}$ ). ( $\lambda_{\text{exc}}=328 \text{ nm}$ para etanol e acetonitrila, $\lambda_{\text{exc}}=332 \text{ nm}$ para tolueno e $\lambda_{\text{exc}}=318 \text{ nm}$ para tampão PBS, pH 7,2). ....	50
<b>Figura 47.</b> Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) normalizados da molécula <b>41</b> ( $\sim 10^{-5} \text{ M}$ ). ( $\lambda_{\text{exc}}=327 \text{ nm}$ para etanol, $\lambda_{\text{exc}}=332 \text{ nm}$ para tolueno, $\lambda_{\text{exc}}=328 \text{ nm}$ para acetonitrila e $\lambda_{\text{exc}}=350 \text{ nm}$ para tampão PBS, pH 7,2). ....	51
<b>Figura 48.</b> Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) normalizados da molécula <b>42</b> ( $\sim 10^{-5} \text{ M}$ ). ( $\lambda_{\text{exc}}=327 \text{ nm}$ para etanol e acetonitrila, $\lambda_{\text{exc}}=332 \text{ nm}$ para tolueno e $\lambda_{\text{exc}}=350 \text{ nm}$ para tampão PBS, pH 7,2). ....	51
<b>Figura 49.</b> Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) normalizados da molécula <b>43</b> ( $\sim 10^{-5} \text{ M}$ ). ( $\lambda_{\text{exc}}=342 \text{ nm}$ para etanol, $\lambda_{\text{exc}}=348 \text{ nm}$ para tolueno, $\lambda_{\text{exc}}=343 \text{ nm}$ para acetonitrila e $\lambda_{\text{exc}}=332 \text{ nm}$ para tampão PBS, pH 7,2). ....	52
<b>Figura 50.</b> Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) normalizados da molécula <b>44</b> ( $\sim 10^{-5} \text{ M}$ ). ( $\lambda_{\text{exc}}=341 \text{ nm}$ para etanol, $\lambda_{\text{exc}}=347 \text{ nm}$ para tolueno, $\lambda_{\text{exc}}=342 \text{ nm}$ para acetonitrila e $\lambda_{\text{exc}}=367 \text{ nm}$ para tampão PBS, pH 7,2). ....	52
<b>Figura 51.</b> Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) normalizados da molécula <b>45</b> ( $\sim 10^{-5} \text{ M}$ ). ( $\lambda_{\text{exc}}=342 \text{ nm}$ para etanol e acetonitrila, $\lambda_{\text{exc}}=348 \text{ nm}$ para tolueno e $\lambda_{\text{exc}}=365 \text{ nm}$ para tampão PBS, pH 7,2). ....	53
<b>Figura 52.</b> Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e espectros normalizados de emissão de fluorescência (direita) das moléculas <b>40</b> ( $\sim 10^{-5} \text{ M}$ ) e <b>43</b> ( $\sim 10^{-5} \text{ M}$ ) em etanol e acetonitrila. ....	56

<b>Figura 53.</b> Comparação entre os espectros de absorção (acima) e emissão de fluorescência (abaixo) das moléculas <b>43-45</b> ( $\sim 10^{-5}$ M) nos solventes acetonitrila e tampão PBS. ....	57
<b>Figura 54.</b> Espectros de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência de <b>40</b> ( $\sim 10^{-5}$ M) em lipossomas PC e C <sub>22</sub> PC e PBS. (Slits 5.0nm/5.0nm, $\lambda_{exc}=318$ nm para PBS e $\lambda_{exc}=325$ nm para lipossoma). ....	59
<b>Figura 55.</b> Espectros de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência de <b>41</b> ( $\sim 10^{-5}$ M) em lipossomas PC e C <sub>22</sub> PC e PBS. (Slits 5.0nm/5.0nm, $\lambda_{exc}=350$ nm para PBS e $\lambda_{exc}=325$ nm para lipossoma). ....	59
<b>Figura 56.</b> Espectros de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência de <b>42</b> ( $\sim 10^{-5}$ M) em lipossomas PC e C <sub>22</sub> PC e PBS. (Slits 5.0nm/5.0nm, $\lambda_{exc}=350$ nm para PBS e $\lambda_{exc}=326$ nm para lipossoma). ....	60
<b>Figura 57.</b> Espectros de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência de <b>43</b> ( $\sim 10^{-5}$ M) em lipossomas PC e C <sub>22</sub> PC e PBS. (Slits 5.0nm/5.0nm, $\lambda_{exc}=332$ nm para PBS e $\lambda_{exc}=341$ nm para lipossoma). ....	60
<b>Figura 58.</b> Espectros de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência de <b>44</b> ( $\sim 10^{-5}$ M) em lipossomas PC e C <sub>22</sub> PC e PBS. (Slits 5.0nm/5.0nm, $\lambda_{exc}=367$ nm para PBS e $\lambda_{exc}=341$ nm para lipossoma). ....	61
<b>Figura 59.</b> Espectros de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência de <b>45</b> ( $\sim 10^{-5}$ M) em lipossomas PC e C <sub>22</sub> PC e PBS. (Slits 5.0nm/5.0nm, $\lambda_{exc}=365$ nm para PBS e $\lambda_{exc}=341$ nm para lipossoma). ....	61
<b>Figura 60.</b> Espectros de absorção na região do UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) do corante <b>40</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em lipossomas PC (acima) e C <sub>22</sub> PC (abaixo) na presença do respectivo fosfolipídio ( $5,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ M). Branco (ausência de lipossoma). (Slits 5.0nm/5.0nm, $\lambda_{exc}=318$ nm). ....	64
<b>Figura 61.</b> Espectros de absorção na região do UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) do corante <b>41</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em lipossomas PC (acima) e C <sub>22</sub> PC (abaixo) na presença do respectivo fosfolipídio ( $2,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ M). Branco (ausência de lipossoma). (Slits 5.0nm/5.0nm, $\lambda_{exc}=325$ nm). ....	65

<b>Figura 62.</b> Espectros de emissão de fluorescência do corante <b>42</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em lipossomas PC (esquerda) e C <sub>22</sub> PC (direita) na presença do respectivo fosfolipídio ( $2,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ M). Branco (ausência de lipossoma). (Slits 5.0nm/5.0nm, $\lambda_{exc}=325$ nm). .....	66
<b>Figura 63.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência do corante <b>40</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em função da concentração dos lipossomas PC e C <sub>22</sub> PC ( $5,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ M) (esquerda) e gráfico de 1/F versus 1/[PC] (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência. (PC: $R^2=0,993$ e C <sub>22</sub> PC: $R^2=0,996$ ). .....	67
<b>Figura 64.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência do corante <b>41</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em função da concentração dos lipossomas PC e C <sub>22</sub> PC ( $2,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ M) (esquerda) e gráfico de 1/F versus 1/[PC] (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência. (PC: $R^2=0,981$ e C <sub>22</sub> PC: $R^2=0,983$ ). .....	67
<b>Figura 65.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência do corante <b>42</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em função da concentração dos lipossomas PC e C <sub>22</sub> PC ( $2,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ M) (esquerda) e gráfico de 1/F versus 1/[PC] (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência. (PC: $R^2=0,9793$ e C <sub>22</sub> PC: $R^2=0,983$ ). .....	68
<b>Figura 66.</b> Espectros de absorção na região do UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) do corante <b>43</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em lipossomas PC (acima) e C <sub>22</sub> PC (abaixo) na presença do respectivo fosfolipídio ( $5,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ M). Branco (ausência de lipossoma). (Slits 5.0nm/5.0nm, $\lambda_{exc}=334$ nm). .....	70
<b>Figura 67.</b> Espectros de absorção na região do UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) do corante <b>44</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em lipossomas PC (acima) e C <sub>22</sub> PC (abaixo) na presença do respectivo fosfolipídio ( $2,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ M). Branco (ausência de lipossoma). (Slits 5.0nm/5.0nm, $\lambda_{exc}=340$ nm). .....	71
<b>Figura 68.</b> Espectros de emissão de fluorescência do corante <b>45</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em lipossomas PC (esquerda) e C <sub>22</sub> PC (direita) na presença do respectivo fosfolipídio ( $2,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ M). Branco (ausência de lipossoma). (Slits 5.0nm/5.0nm, $\lambda_{exc}=350$ nm). .....	72
<b>Figura 69.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência do corante <b>43</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em função da concentração do lipossoma PC ( $5,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ M) (esquerda), onde $\lambda_1$ =emissão normal e $\lambda_2$ =emissão ESIPT e gráfico de 1/F versus 1/[PC] (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência ( $R^2=0,987$ ). .....	73

<b>Figura 70.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência do corante <b>43</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em função da concentração do lipossoma $C_{22}PC$ ( $5,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ M) (esquerda), onde $\lambda_1$ =emissão normal e $\lambda_2$ =emissão ESIPT e gráfico de $1/F$ versus $1/[PC]$ (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência ( $R^2=0,990$ ). .....	73
<b>Figura 71.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência do corante <b>44</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em função da concentração dos lipossomas PC e $C_{22}PC$ ( $2,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ M) (esquerda) e gráfico de $1/F$ versus $1/[PC]$ (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência. (PC: $R^2=0,973$ e $C_{22}PC$ : $R^2=0,992$ ). .....	74
<b>Figura 72.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência do corante <b>45</b> ( $5,0 \times 10^{-5}$ M) em função da concentração dos lipossomas PC e $C_{22}PC$ ( $2,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ M) (esquerda) e gráfico de $1/F$ versus $1/[PC]$ (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência. (PC: $R^2=0,982$ e $C_{22}PC$ : $R^2=0,987$ ). .....	74
<b>Figura 73.</b> Valores de coeficiente de partição ( $K_p$ ) das moléculas <b>40-45</b> em relação com o número de carbonos da cadeia alifática. ....	76
<b>Figura 74.</b> Diminuição da banda de fluorescência da lectina WGA (350 nm) com crescente adição do lipossoma $C_{22}PC$ contendo a amina <b>40</b> (10-100 $\mu$ L). Indicado pela seta preta. ....	78
<b>Figura 75.</b> Comparação na banda de emissão do lipossoma $C_{22}PC$ contendo a amina <b>40</b> , com e sem adição de 20 $\mu$ L da lectina WGA. ....	79
<b>Figura 76.</b> Espectro de emissão de fluorescência da lectina WGA em presença de diferentes alíquotas do lipossoma $C_{22}PC$ . ....	79
<b>Figura 77.</b> Espectros de absorção de UV-Vis (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) de BSA (11 $\mu$ M - 1mL) na presença de diferentes concentrações de <b>40</b> (2-20 $\mu$ M). Supressão de fluorescência: 42%. ....	80
<b>Figura 78.</b> Espectros de absorção de UV-Vis (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) de BSA (11 $\mu$ M - 1mL) na presença de diferentes concentrações de <b>41</b> (2-20 $\mu$ M). Supressão de fluorescência: 50%. ....	81
<b>Figura 79.</b> Espectros de absorção de UV-Vis (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) de BSA (11 $\mu$ M - 1mL) na presença de diferentes concentrações de <b>42</b> (2-20 $\mu$ M). Supressão de fluorescência: 41%. ....	81
<b>Figura 80.</b> Espectros de absorção de UV-Vis (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) de BSA (11 $\mu$ M - 1mL) na presença de diferentes concentrações de <b>43</b> (2-20 $\mu$ M). Supressão de fluorescência: 48%. ....	82

<b>Figura 81.</b> Espectros de absorção de UV-Vis (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) de BSA (11 $\mu\text{M}$ - 1mL) na presença de diferentes concentrações de <b>44</b> (2-20 $\mu\text{M}$ ). Supressão de fluorescência: 53%. .....	82
<b>Figura 82.</b> Espectros de absorção de UV-Vis (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) de BSA (11 $\mu\text{M}$ - 1mL) na presença de diferentes concentrações de <b>45</b> (2-20 $\mu\text{M}$ ). Supressão de fluorescência: 41%. .....	83
<b>Figura 83.</b> Curvas de Stern-Volmer aplicadas ao máximo de emissão da BSA em 342 nm na presença dos corantes <b>40-45</b> . .....	84
<b>Figura 84.</b> Curvas de $\log [S] \times \log (F_0-F/F)$ utilizadas para o cálculo da constante de ligação ( $K_A$ ) e número de sítios de ligação das moléculas <b>40-45</b> com a BSA. ....	86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Propriedades físico-químicas das aminas primárias <b>31-33</b> . .....	32
<b>Tabela 2.</b> Concentração ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e os comprimentos de onda do máximo de absorção ( $\lambda_{\text{abs}}$ ) (nm), antes e após a hidrólise, das iminas <b>34-39</b> . .....	34
<b>Tabela 3.</b> Composição e concentração dos lipossomas de fosfatidilcolina. ....	45
<b>Tabela 4.</b> Composição e concentração dos lipossomas de fosfatidilcolina contendo o anfifílico glicoconjugado $\text{C}_{22}\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$ . ....	45
<b>Tabela 5.</b> Valores de Potencial Zeta (PZ) dos lipossomas $\text{C}_{22}\text{PC}$ na ausência e presença das aminas e PC na ausência das aminas, logo após preparação e após 30 dias em temperatura de $25^{\circ}\text{C}$ . ....	48
<b>Tabela 6.</b> Resultados do estudo fotofísico para as aminas <b>40-45</b> , onde $\lambda_{\text{abs}}$ e $\lambda_{\text{em}}$ são os comprimentos de onda de absorção e emissão, respectivamente, apresentados em nm, $\Delta\lambda_{\text{ST}}$ é o deslocamento de Stokes (em nm), $\epsilon$ é o coeficiente de absorvidade molar (em $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) e $\Phi_{\text{f}}$ é o rendimento quântico de emissão de fluorescência. ....	55
<b>Tabela 7.</b> Resultados do estudo fotofísico para os lipossomas na presença das aminas <b>40-45</b> , onde $\lambda_{\text{abs}}$ e $\lambda_{\text{em}}$ são os comprimentos de onda de absorção e emissão, respectivamente, apresentados em nm, $\Delta\lambda_{\text{ST}}$ é o deslocamento de Stokes (nm) e $\Phi_{\text{f}}$ é o rendimento quântico de emissão de fluorescência. ....	62
<b>Tabela 8.</b> Valores relativos ao coeficiente de partição (Kp) calculado para as moléculas <b>40-42</b> . ....	69
<b>Tabela 9.</b> Valores relativos ao coeficiente de partição (Kp) calculado para as moléculas <b>43-45</b> . ....	75
<b>Tabela 10.</b> Resíduos de aminoácidos envolvidos nas regiões de interação da WGA. Aminoácidos apresentados em itálico indicam seu envolvimento em ligações de hidrogênio. ....	77
<b>Tabela 11.</b> Porcentagem de supressão da banda de emissão da BSA (277 nm) pela interação com os corantes <b>40-45</b> . ....	83
<b>Tabela 12.</b> Resultados obtidos a partir da equação de Stern-Volmer, à $25^{\circ}\text{C}$ . ....	84
<b>Tabela 13.</b> Constante de ligação com BSA e número de sítios de ligação para as aminas <b>40-45</b> , à $25^{\circ}\text{C}$ .....	85

## ABREVIATURAS

A – Absorbância

$A_0$  – Absorbância do padrão

APF – Ácido polifosfórico

APT – Attached Proton Test

ATF – Ácido trifluoroacético

$A_X$  – Absorbância da amostra

b – Caminho óptico

BSA – Albumina Sérica Bovina

C – Confômero ceto

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

$C_{22}PC$  – Lipossoma composto por fosfatidilcolina e o glicoconjugado N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminil-PEG<sub>900</sub>-docosanato

$C_{22}PEG_{900}GlcNAc$  - Glicoconjugado N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminil-PEG<sub>900</sub>-docosanato

d – Dupleto

DCC – Diciclohexilcarbodiimida

DLS – Espalhamento de luz dinâmico

DOPG – 1,2-Dioleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)]

DPH – 1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno

DPPA – 1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfato

DPPC – 1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DSPC – 1,2-Diastearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

$\Delta\lambda_{ST}$  – Deslocamento de Stokes

$E_I$  - Confômero enol-cis

$E_{II}$  – Confômero enol-cis solvatado

$E_{III}$  – Confômero enol-trans

$E_{IV}$  – Confômero enol-trans aberto

ESI-MS – Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray

ESIPT – Transferência protônica intramolecular no estado excitado

F – Intensidade de Fluorescência

$F_{m\acute{a}x}$  – Máxima intensidade de emissão resultante da incorporação total do corante

$F_X$  – Área da curva de emissão de fluorescência da amostra para rendimento quântico

$F_0$  – Área da curva de emissão de fluorescência do padrão para rendimento quântico

$F_0$  – Intensidade de fluorescência da solução de BSA pura  
FTIR – Espectroscopia de absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier  
 $\Phi_F$  – Rendimento quântico de fluorescência  
 $\Phi_{FX}$  – Rendimento quântico de fluorescência da amostra  
 $\Phi_{F0}$  – Rendimento quântico de fluorescência do padrão  
GUV – Lipossomas unilamelares gigantes  
HMTA – Hexametilenotetramina  
HOMO – Orbital molecular de mais alta energia ocupado  
HRMS – Espectrometria de massas de alta resolução  
HSA – Albumina Sérica Humana  
J – Constante de acoplamento  
k – Constante cinética de hidrólise  
 $K_A$  – Constante de ligação  
 $K_p$  – Coeficiente de partição  
 $K_q$  – Constante bimolecular de supressão  
 $K_{SV}$  – Constante de supressão de Stern-Volmer  
LOV – Lipossomas oligolamelares  
LPC – L- $\alpha$ -Lisofosfatidilcolina  
LUMO – Orbital molecular de mais baixa energia desocupado  
LUV – Lipossomas unilamelares grandes  
 $\lambda_{abs}$  – Comprimento de onda do máximo de absorção  
 $\lambda_{em}$  – Comprimento de onda do máximo de emissão  
 $\lambda_{exc}$  – Comprimento de onda de excitação  
m – Multiplete  
MLV – Lipossomas multilamelares  
MVL – Lipossomas multivesiculares  
n – Número de sítios de ligação  
n – Orbital não-ligante  
 $n_0$  – Índice de refração do solvente do padrão  
NBD – Nitrobenzoxadiazol  
 $n_x$  – Índice de refração do solvente da amostra  
PC – Fosfatidilcolina  
PBS – Tampão fosfato salino

PEG – Polietilenoglicol  
ppm – Parte por milhão  
PZ – Potencial Zeta  
 $\pi$  – Orbital molecular pi ligante  
 $\pi^*$  – Orbital molecular pi anti-ligante  
[S] – Concentração do supressor  
quint – Quintuplete  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
s – Singleto  
S – Estado singlete  
 $\sigma$  – Orbital molecular sigma ligante  
sext – Sextuplete  
SUV – Lipossomas unilamelares pequenos  
t – Tripleto  
 $t_{1/2}$  – Tempo de meia vida  
T – Estado triplete  
TMS – Tetrametilsilano  
 $\tau_0$  – Tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor  
ULV – Lipossomas unilamelares  
UV-Vis – Ultravioleta-Visível  
WGA – Lectina aglutinina de germe de trigo

## RESUMO

Neste trabalho foram sintetizadas seis novas aminas lipofílicas fluorescentes contendo cadeias alquílicas de diferentes tamanhos, derivadas de compostos heterocíclicos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazólicos. Suas estruturas foram confirmadas através das técnicas de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono, bem como Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho e Espectrometria de Massas de Alta Resolução. As moléculas sintetizadas foram incorporadas em lipossomas compostos por fosfatidilcolina (PC) da lecitina de soja e lipossomas de PC contendo o anfifílico glicoconjugado ( $C_{22}PEG_{900}GlcNAc$ ), em proporção de 1:1. Ambos foram obtidos pelo método de evaporação em fase reversa. A caracterização destes se deu por experimentos de potencial zeta (PZ) e espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os lipossomas apresentaram altos valores de potencial zeta, mesmo após um período de 30 dias mantidos à temperatura ambiente, sugerindo que estes sistemas apresentam estabilidade coloidal contra processos de agregação. Análises feitas por DLS indicaram que os lipossomas apresentam um diâmetro de 100 nm, tanto na ausência como na presença das moléculas sintetizadas.

Foi realizado o estudo fotofísico das aminas em solventes orgânicos e em solução de tampão fosfato salino (pH 7,2), através de medidas de absorção na região do UV-Vis e emissão de fluorescência. Além disso, através de estudo fotofísico, foi avaliada a inserção das aminas nos lipossomas. O coeficiente de partição das moléculas nos lipossomas foi determinado e os altos valores apresentados indicam alta lipofilicidade das mesmas, além disso, através destas medidas foi verificado que estas tendem à saturação com o aumento da cadeia alifática indicando maior afinidade pelo ambiente hidrofóbico do sistema estudado. Foi avaliada a interação dos lipossomas de PC contendo o anfifílico glicoconjugado ( $C_{22}PEG_{900}GlcNAc$ ) com a lectina WGA, tanto na ausência como na presença das aminas. Testes de interação das aminas com albumina sérica bovina indicaram alta interação através de um mecanismo de supressão de fluorescência estático.

## ABSTRACT

In this work six new benzazolic based fluorescent lipophilic amines presenting alkyl chains of different sizes were synthesized. Their structures were confirmed by classical spectroscopic techniques, as well as, High Resolution Mass Spectrometry. The photophysical study of the amines was carried out in organic solvents and in phosphate buffered saline solution (pH 7.2), by absorption measurements in the UV–Vis region and fluorescence emission. These compounds present absorption in the UV–region and emission in the visible region of the spectra. The synthesized molecules were incorporated into liposomes composed of phosphatidylcholine (PC) from soy lecithin and PC liposomes containing the amphiphilic glycoconjugate (C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc), in a ratio of 1:1 (w/w). Both were obtained by the reverse phase evaporation method. The liposomes were characterized by zeta potential (PZ) and dynamic light scattering (DLS). The liposomes presented high values of zeta potential suggesting that these systems present colloidal stability against aggregation processes. DLS data indicated that the liposomes have a diameter of 100 nm. In addition, the insertion of the amines into the liposomes was evaluated by fluorescence emission spectroscopy. The coefficient of partition of the molecules in the liposomes was also determined. The high values indicated high lipophilicity of the synthesized compounds. The interaction of liposomes PC containing the glycoconjugate C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc with WGA, both in the absence and presence of the amines, was evaluated. Overall, the synthesized compounds showed potential application staining liposomes and as optical sensor for BSA in solution through a static fluorescence suppression mechanism.

## 1. INTRODUÇÃO

Membranas plasmáticas são sistemas dinâmicos e heterogêneos complexos,<sup>1</sup> compostos por uma grande variedade de constituintes, dentre os quais, destacam-se lipídios, carboidratos e proteínas.<sup>2</sup> Estes últimos, são responsáveis por fornecer propriedades funcionais diferentes a cada tipo de membrana, destacando-se o reconhecimento, proteção, sinalização e mobilidade celular, além da disponibilização de sítios de ligação.<sup>1</sup> Fosfolipídios são os componentes principais da bicamada lipídica que é considerada a estrutura básica das membranas.<sup>3</sup> Esta, é responsável por proporcionar uma barreira seletiva que delimita o contorno celular e, conseqüentemente permite a separação entre componentes extracelulares e intracelulares.<sup>4</sup>

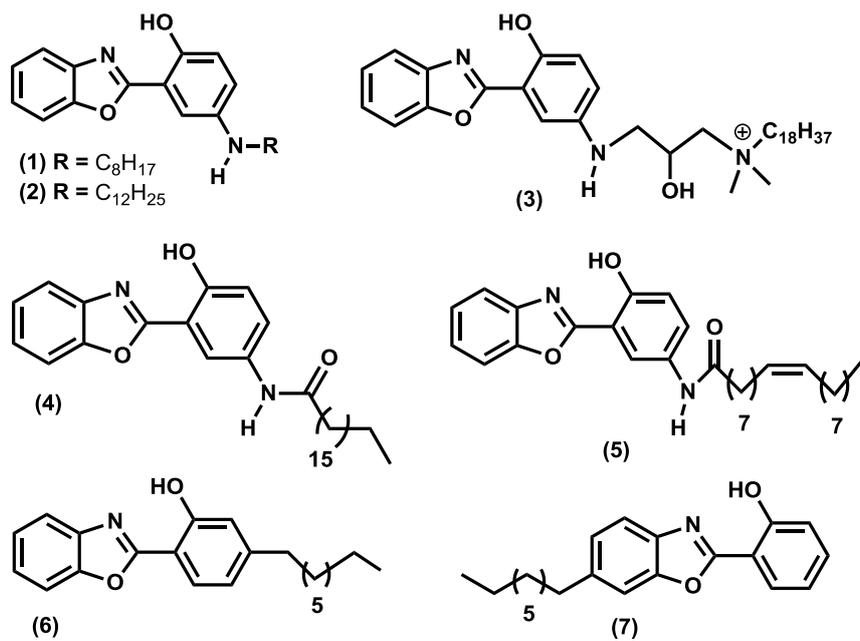
Espectroscopia de fluorescência desempenha um papel importante na compreensão da fisiologia celular devido à sua alta sensibilidade<sup>5</sup> e versatilidade.<sup>6</sup> Assim, pode ser utilizada como um meio para monitorar parâmetros como a organização, heterogeneidade, variabilidade estrutural e dinâmica de membranas lipídicas.<sup>7</sup> As informações obtidas por meio desta técnica resultam de medidas em que sondas fluorescentes são incorporadas ao sistema de estudo. Sondas fluorescentes têm se tornado ferramentas úteis na caracterização das propriedades físicas das membranas, em estudos de processos intracelulares e metabolismo lipídico.<sup>8</sup> Dentre outras vantagens, possuem rápida detecção e boa reprodutibilidade, mesmo quando utilizadas pequenas concentrações do corante.<sup>9</sup> A interação específica que ocorre entre a sonda com uma biomolécula induz alterações nas propriedades fotoquímicas, como, por exemplo, alteração na intensidade de fluorescência ou um deslocamento da banda do espectro, ampliando as possibilidades de utilização destes compostos em processos celulares.<sup>10,11</sup> Dependendo da propriedade a ser estudada, diferentes sondas de membrana podem ser utilizadas.<sup>7</sup> Algumas podem apresentar o marcador fluorescente ligado covalentemente em posições específicas<sup>6</sup> de lipídios naturais (fosfolipídios, colesterol).<sup>12</sup> Desta forma, oferecem a vantagem de se monitorar a dinâmica e organização<sup>7</sup> das membranas sem que ocorra perturbação da integridade celular (ex. NBD-PC – nitrobenzoxadiazol).<sup>13</sup> Por outro lado, corantes orgânicos lipofílicos de natureza não-lipídica,<sup>14</sup> quando inseridos na membrana, podem ser usados para caracterização das propriedades biofísicas,<sup>8</sup> destacando-se a detecção de alterações no microambiente como pH, polaridade, viscosidade ou temperatura.<sup>7</sup>

Muitas vezes, a investigação direta de características funcionais e estruturais das membranas biológicas em células vivas pode ser complexa.<sup>3</sup> O uso de sistemas modelos que mimetizam com precisão características específicas de uma membrana, como no caso de

lipossomas, serve como uma plataforma alternativa permitindo o estudo sob condições definidas e controladas<sup>2</sup> de forma simples e versátil.<sup>15</sup> Estas estruturas são vesículas esféricas concêntricas formadas por bicamadas lipídicas que isolam compartimentos aquosos internos do meio externo e apresentam similaridade intrínseca à membranas biológicas. Outra aplicação notável é sua utilização como veículos carreadores de fármacos. A incorporação de sondas fluorescentes em lipossomas permite monitorar a interação entre esses sistemas e as respectivas células em estudo.

Compostos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis apresentam emissão de fluorescência com grande deslocamento de Stokes devido a um mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado (ESIPT),<sup>16-18</sup> o que confere características importantes a estas moléculas como alta fotoestabilidade<sup>19</sup> e diminuição da auto-absorção.<sup>20-22</sup> As propriedades apresentadas por estes compostos permitem aplicações como sensores de pH,<sup>23</sup> sensores para cátions e ânions,<sup>24,25</sup> marcação de proteínas,<sup>26</sup> materiais para óptica não-linear,<sup>27</sup> matrizes poliméricas fluorescentes<sup>28</sup> e sondas fluorescentes.<sup>29-31</sup> Além disso, alguns destes derivados podem apresentar características espectroscópicas desejáveis para seu uso como sondas fluorescentes em atividades biológicas, como sondas de DNA, proteínas e lipídios.<sup>31</sup> Devido às propriedades apresentadas por este tipo de molécula, tem-se reportado ao longo dos últimos anos alguns derivados lipofílicos de compostos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis (Figura 1), que podem ser utilizados como potenciais sondas fluorescentes de membranas.<sup>29-31</sup>

Assim, este trabalho apresenta a síntese de novos derivados benzazólicos contendo cadeia alquílica de diferentes tamanhos, além da incorporação destas em lipossomas de fosfatidilcolina (PC) e lipossomas de PC contendo o anfifílico glicoconjugado C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNac para estudo da potencial aplicação destas moléculas como sondas de sistemas lipídicos. Além disso, para estudo de uma potencial aplicação dos corantes sintetizados como sondas de proteínas, foi feita a investigação da interação dos mesmos com a albumina sérica bovina (BSA), a qual foi escolhida como modelo por ser uma proteína globular<sup>32,33</sup> muito utilizada em aplicações biológicas, devido seu baixo custo,<sup>34</sup> alta estabilidade<sup>35</sup> e similaridade estrutural com a albumina sérica humana (HSA).<sup>36</sup>

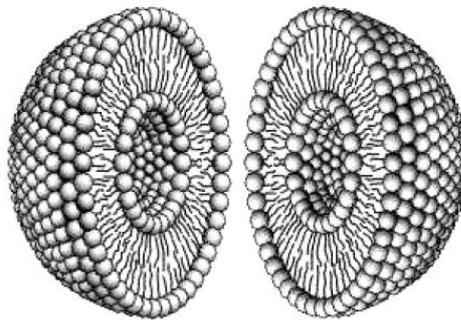


**Figura 1.** Corantes lipofílicos baseados na estrutura do benzoxazol, com potencial aplicação como sondas fluorescentes de membranas.<sup>29-31</sup>

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LIPOSSOMAS

Lipossomas são estruturas em forma de vesículas esféricas, que isolam um ou mais compartimentos aquosos internos do meio externo, com diâmetros compreendidos entre alguns nanômetros e alguns micrômetros, que apresentam similaridade intrínseca com membranas biológicas (Figura 2). São constituídos basicamente de fosfolipídios naturais ou sintéticos. Além disso, podem incluir outros componentes, tais como o colesterol, que lhes confere maior estabilidade.<sup>37,38</sup>



**Figura 2.** Representação de um lipossoma dividido ao meio, evidenciando sua estruturação interna. (Fonte: Mertins *et al.*<sup>39</sup>)

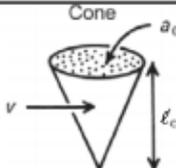
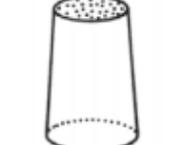
Fosfolipídios são moléculas anfifílicas, possuem uma extremidade polar ou hidrofílica e duas longas cadeias apolares constituídas de ácidos graxos. Quando entram em contato com o meio aquoso, tendem a formar estruturas auto-associadas em formato de bicamadas lipídicas, de maneira a evitar o efeito hidrofóbico. Nesta configuração, grupos polares permanecem em contato com a interface aquosa e grupos apolares interagem entre si, obedecendo ao estado de menor energia termodinâmica.<sup>39,40</sup>

As estruturas mais comuns formadas por moléculas anfifílicas são micelas e bicamadas lipídicas, sendo a simetria da auto-associação (*lipid self-assembly*) dependente da concentração e formato das moléculas anfifílicas (Figura 3). Isto pode ser expresso pelo parâmetro de empacotamento crítico (*Critical Packing Parameter – CPP*) (Equação 1):

$$p = \frac{v}{a_0 l_c} \quad (1)$$

onde  $v$  é o volume da cauda hidrofóbica,  $a_0$  representa a área de superfície da região polar e  $l_c$  é o comprimento da cauda hidrofóbica estendida. A agregação das moléculas anfifílicas pode ser presumida de acordo com o valor de  $p$ . Quando a área da região polar é suficientemente grande em relação à apolar o parâmetro de empacotamento crítico se encontra entre  $0 < p \leq 1/3$ , sendo assim, há maior probabilidade de formação de estruturas como micelas esféricas.

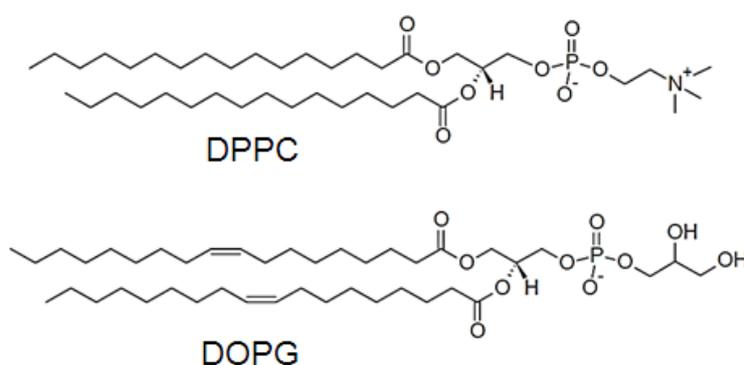
Fosfolipídios que possuem duas caudas hidrofóbicas e grande área da região polar, apresentam  $1/2 < p \leq 1$ , e, preferencialmente irão formar estruturas em forma de bicamadas flexíveis, as quais se associam formando vesículas (Figura 3).<sup>41</sup>

Molécula Anfifílica	CPP $v/a_0 \ell_c$	Forma	Estruturas formadas
Lipídios de cadeia única (surfactantes) que apresentam grande área da região polar	$< 1/3$		micelas esféricas
Lipídios de cadeia única que apresentam pequena área da região polar	$1/3-1/2$		micelas cilíndricas
Lipídios de cadeia dupla que apresentam grande área da região polar. Ex.: Fosfatidilcolina	$1/2-1$		bicamadas flexíveis, vesículas
Lipídios de cadeia dupla que apresentam pequena área da região polar. Lipídios aniônicos, com cadeias saturadas Ex.: Fosfatidiletanolamina	$\sim 1$		bicamadas planares
Lipídios de cadeia dupla que apresentam pequena área da região polar. Lipídios não-aniônicos, com cadeia insaturada. Ex. fosfatidiletanolamina insaturada	$> 1$		micelas inversas

**Figura 3.** Efeito da forma molecular na estrutura de agregados anfifílicos. (Adaptado de Israelachvili, J. N. *et al.*<sup>41</sup>)

Fosfolipídios podem ser classificados de acordo com a carga. As cabeças polares podem ser carregadas negativamente (fosfolipídios aniônicos), positivamente (fosfolipídios catiônicos) ou podem apresentar balanço de cargas nulo (zwitteriônicos), podendo ainda apresentar variações no número de átomos de carbono da cauda hidrofóbica e presença de

insaturações.<sup>6</sup> Os principais fosfolipídios das membranas biológicas são os fosfoglicerídeos, os quais possuem em sua estrutura duas moléculas de ácido graxo esterificadas ao primeiro e ao segundo grupo hidroxila do glicerol. O terceiro se encontra ligado a um grupo fosfato, que pode ser esterificado com colina (para formação da fosfatidilcolina), serina (para formação da fosfatidilserina) ou etanolamina (para formação da fosfatidiletanolamina). Dentre estes, a fosfatidilcolina (PC) é o fosfolipídio natural mais empregado na formação de lipossomas mimetizadores de membranas biológicas. Pode ser extraída da soja (lecitina de soja) ou da gema do ovo. Fosfolipídios sintéticos também podem ser empregados para tal fim, como exemplos tem-se a dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) e o dioleoil fosfatidilglicerol (DOPG) (Figura 4).<sup>38-41</sup>



**Figura 4.** Estruturas moleculares da 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC) e do 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (DOPG).

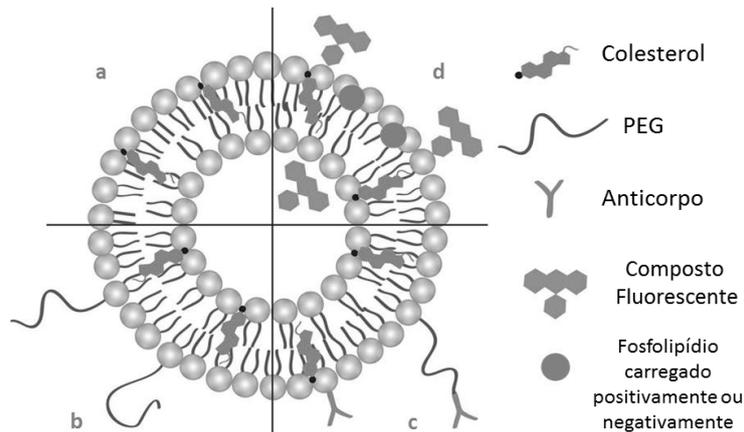
As pesquisas em torno dos lipossomas iniciaram após a publicação do trabalho de Alec Bangham e colaboradores,<sup>42</sup> que consistiu na primeira descrição de sistemas vesiculares de fosfolipídios. Seguindo os primeiros estudos na caracterização biofísica de lipossomas multilamelares e unilamelares, investigadores começaram a utilizá-los como modelos para compreensão da estrutura e função de membranas biológicas. A utilização destes como veículos carreadores de fármacos surgiu na década de 70 após estudos feitos por Gregory Gregoriadis, o qual estabeleceu que lipossomas possuem a capacidade de incorporar fármacos.<sup>43-45</sup>

Desde sua descoberta, os lipossomas têm sido amplamente utilizados no campo científico, tecnológico e industrial. Devido à sua composição, são altamente biocompatíveis, biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade. Podem oferecer ampla variedade estrutural, considerando tamanho, composição e fluidez da bicamada e carga superficial. Possuem habilidade de transportar uma vasta gama de substâncias, sendo os compostos hidrofílicos

encapsulados dentro do núcleo aquoso, enquanto que compostos hidrofóbicos são inseridos na bicamada lipídica.<sup>37,46</sup>

Considerando seu emprego como carreador de fármacos, muitas vezes são realizadas alterações em sua estrutura com o intuito de possibilitar maior aplicação terapêutica (Figura 5).<sup>47</sup> Lipossomas formados por fosfolipídios naturais ou sintéticos, contendo ou não colesterol, são denominados de lipossomas convencionais, no entanto, quando administrados *in vivo*, apresentam curto tempo de circulação na corrente sanguínea, pois são reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear.<sup>47,48</sup> Lipossomas revestidos com polímeros inertes e biocompatíveis, tais como o polietilenoglicol (PEG), são conhecidos como lipossomas estericamente estabilizados ou *stealth*. A camada hidrofílica superficial destes polímeros aumenta o tempo de meia-vida de circulação sanguínea dos lipossomas prevenindo o reconhecimento e a captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear.<sup>47,48</sup> A funcionalização dos lipossomas com ligantes específicos permite ampliar a especificidade de interações dos lipossomas com células-alvo e tecidos de interesse<sup>49</sup> com concomitante aumento da quantidade de fármaco liberado. Neste contexto, foram desenvolvidos lipossomas direcionados ou sítio-específicos, os quais possuem ligantes acoplados na superfície externa conferindo maior seletividade para distribuição do fármaco no sítio desejado.<sup>47,48</sup> Como exemplo de ligantes que podem ser empregados tem-se anticorpos, glicopeptídeos, polissacarídeos, proteínas virais, lectinas e glicolipídeos.<sup>49</sup> Estes, por sua vez, podem se encontrar conjugados ao PEG ou diretamente na bicamada lipídica.<sup>50</sup>

A incorporação de compostos fluorescentes em lipossomas também se mostra útil no que se refere ao estudo de membranas biológicas. Uma das funções apresentada pelos marcadores é, após a inserção, permitir imagem de fluorescência das membranas celulares e processos de tráfego de membrana.<sup>51</sup> Fosfolipídios carregados negativamente ou positivamente podem ser adicionados na formação de lipossomas com o intuito de auxiliar na estabilização e diminuir aglomeração.<sup>50</sup>



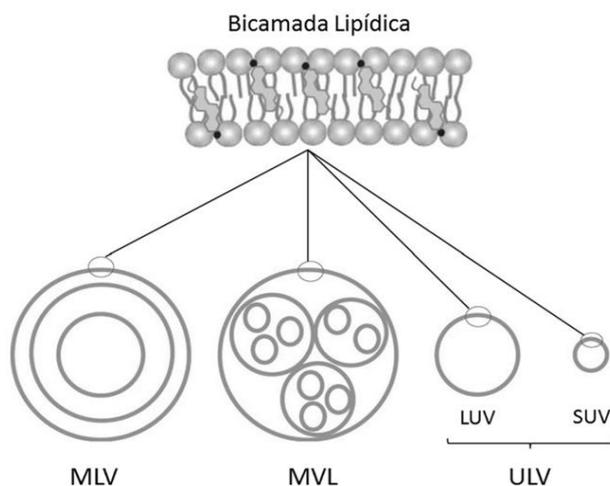
**Figura 5.** Estrutura do lipossoma: (a) lipossoma convencional; (b) lipossomas estericamente estabilizados (*stealth*); (c) lipossoma sítio-específico; (d) lipossoma contendo compostos fluorescentes e fosfolípidios carregados positivamente ou negativamente. (Fonte: Monteiro *et al.*<sup>50</sup>)

A estabilidade de lipossomas pode ser afetada por processos químicos, físicos e biológicos que podem ocasionar agregação, fusão e ruptura da membrana, levando à formação de estruturas heterogêneas e/ou à perda do conteúdo encapsulado. As alterações químicas compreendem reações de hidrólise do éster e de oxidação das cadeias insaturadas dos fosfolípidios. A hidrólise é afetada pela temperatura e pH do meio, sendo assim, a conservação dos lipossomas em pH em torno de 6,5 torna-se necessária.<sup>38,47</sup> Além disso, o emprego de fosfolípidios de pureza elevada e utilização de substâncias anti-oxidantes reduzem significativamente os processos de oxidação. Muitas vezes a liofilização da formulação final com a ajuda de um crioprotetor permite que sejam conservados por longos períodos.<sup>47</sup> As estruturas secas são suspensas novamente em solução no momento em que serão utilizadas, evitando assim, a degradação em solução.<sup>48</sup> As alterações físicas que podem ocorrer são a agregação e fusão das vesículas provenientes de interações de Van der Waals, além do extravasamento do conteúdo encapsulado. A repulsão eletrostática criada pela utilização de fosfolípidios com carga, na preparação dos lipossomas, reduz estes efeitos.<sup>47</sup> A presença de polímeros como PEG na superfície de lipossomas fornece uma barreira estérica que previne a agregação, sendo assim, são estáveis em relação ao tamanho e material incorporado.<sup>48</sup>

### 2.1.1 Classificação dos lipossomas

A classificação morfológica dos lipossomas pode se dar através do número de bicamadas lipídicas presentes na vesícula, ou pelo seu tamanho. Lipossomas multilamelares

(MLV- *multilamellar vesicles*) são constituídos por várias bicamadas esféricas concêntricas formadas a partir da dispersão de fosfolipídios em água ou tampão, sem que ocorra qualquer outro processamento. Seu diâmetro geralmente varia de 400 nm e 3,5  $\mu\text{m}$ .<sup>38,52</sup> Em lipossomas unilamelares, a vesícula possui somente uma bicamada lipídica em torno da solução aquosa.<sup>46</sup> Compreendem os lipossomas unilamelares grandes (LUV - *large unilamellar vesicle*) com diâmetros entre 100 nm e 1  $\mu\text{m}$ , lipossomas unilamelares pequenos (SUV – *small unilamellar vesicle*) com diâmetros entre 20 e 50 nm e lipossomas unilamelares gigantes (GUV – *giant unilamellar vesicle*) que apresentam diâmetro superior a 1  $\mu\text{m}$ . Dentre estes, LUVs são os sistemas mais comumente utilizados como modelos mimetizadores da membrana plasmática.<sup>52</sup> Além destes, também existem os lipossomas oligolamelares (LOV) e multivesiculares (MVL).



**Figura 6.** Estrutura da bicamada lipídica composta por fosfolipídios e colesterol (acima) e classificação de lipossomas (abaixo): lipossomas multilamelares (MLV), lipossomas multivesiculares (MVL) e lipossomas unilamelares (ULV) representados como lipossomas unilamelares grandes (LUV) e lipossomas unilamelares pequenos (SUV). (Fonte: Monteiro *et al.*<sup>50</sup>)

### 2.1.2 Métodos de preparação

Os diferentes tipos de lipossomas que podem ser formados, com relação ao número de bicamadas lipídicas, tamanho, estrutura e capacidade de encapsulamento, dependem do método de preparação escolhido, o qual deve ser feito de forma criteriosa.<sup>48</sup>

A maioria dos métodos inclui a dissolução dos lipídios em solvente orgânico, seguido da evaporação do mesmo com consequente formação de um filme lipídico. Através da adição

de água ou solução tampão ocorre a hidratação deste último. A formação da dispersão de lipossomas multilamelares (MLV) ocorre somente após agitação magnética vigorosa, pois para a produção de lipossomas é necessário que energia seja dissipada no sistema.<sup>47</sup> Substâncias hidrofílicas podem ser encapsuladas após incorporação na solução aquosa, contudo, compostos lipofílicos devem ser adicionados na primeira etapa, em que ocorre a dissolução dos lipídios no solvente orgânico.<sup>47</sup> Este método de preparação, denominada de hidratação do filme lipídico, é simples e rápido, contudo, há formação de vesículas heterogêneas as quais apresentam diferentes tamanhos e números de bicamadas lipídicas, além disso, os lipossomas obtidos apresentam baixa taxa de encapsulamento.<sup>48</sup>

A obtenção de vesículas unilamelares (SUV ou LUV), as quais são homogêneas e apresentam tamanho definido, ocorre através de processos adicionais após a formação do lipossoma multilamelar (MLV), que podem ser processos mecânicos, eletrostáticos ou químicos. Os mais frequentes são os processos mecânicos, sendo os principais a extrusão através de membranas de policarbonato com diferentes porosidades e a sonicação.<sup>38,47</sup> Esta última, por sua vez, é utilizada quando se pretende obter lipossomas de tamanho reduzido (SUV). Caracteriza-se por gerar uma elevada transferência de energia para a suspensão lipídica que é originada por banho de ultrassom. A extrusão permite a obtenção de vesículas unilamelares grandes (LUV) e baseia-se em diversas passagens da dispersão de MLV através de filtros de membranas de policarbonato ou celulose, que possuem o diâmetro do poro bem definido. O diâmetro final das vesículas depende do tamanho de poro das membranas e das características do próprio lipídio.<sup>38</sup>

Outro método bastante empregado para a obtenção de lipossomas unilamelares grandes (LUV) é a evaporação em fase reversa, proposta por Szoka e Papahadjopoulos em 1978.<sup>48</sup> Os fosfolipídios são dissolvidos em um solvente orgânico, geralmente o clorofórmio, com posterior adição de solução tampão/água. Há formação de uma emulsão após o sistema ser submetido à sonicação, onde são formadas micelas reversas com núcleo aquoso. A evaporação do solvente, sob vácuo, concentra as micelas formando um gel. Com a adição de solução tampão, seguida de alta agitação, ocorre a formação dos lipossomas unilamelares LUV. Este método permite uma alta eficiência de encapsulação se comparado com o método da hidratação do filme lipídico.<sup>48</sup>

## **2.2 SONDAS FLUORESCENTES**

Compostos fluorescentes que apresentam qualquer alteração nas suas propriedades fotofísicas quando em contato com outra estrutura (ex. molécula, íon, organela), seja na

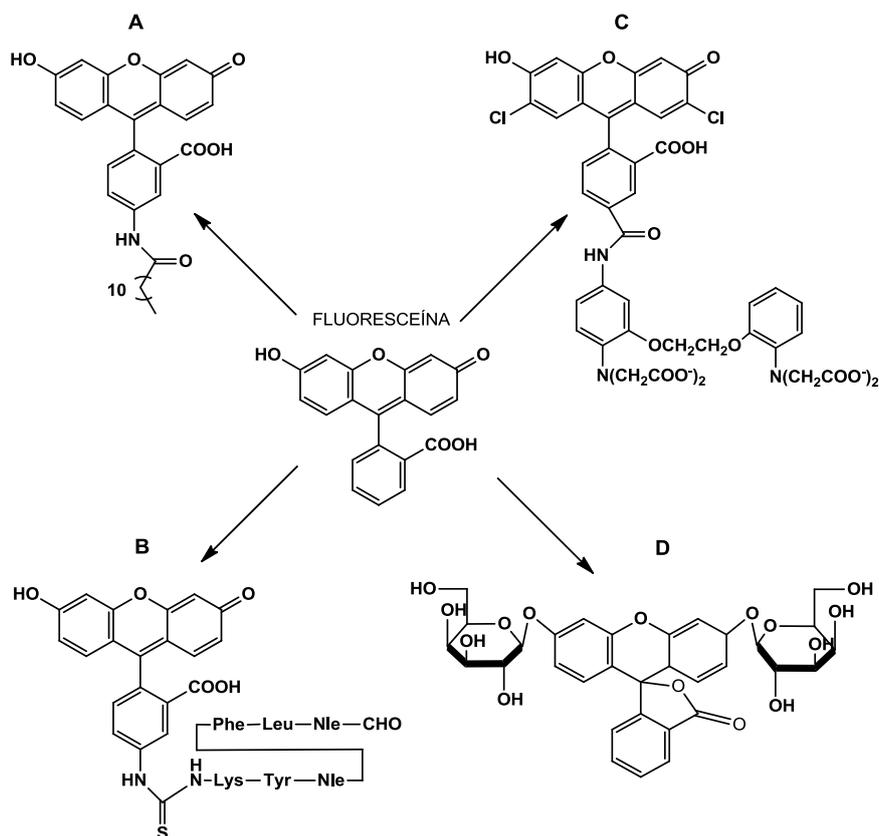
intensidade de fluorescência, comprimento de onda de emissão ou formato da banda, são considerados sondas de fluorescência e podem ser utilizados para detecção e quantificação de processos celulares.<sup>53</sup> Neste contexto, a utilização de moléculas fluorescentes, as quais são responsáveis por gerar informações como a localização de uma região em uma amostra biológica, através de respostas espectroscópicas que são ocasionadas por uma interação específica, é de extrema importância em estudos no campo da medicina, biologia celular e molecular, bioquímica, química e outras ciências interdisciplinares.<sup>11,54</sup>

Técnicas de fluorescência são técnicas espectroscópicas que apresentam alta sensibilidade, sendo assim, a partir da utilização de uma sonda fluorescente, há possibilidade de visualizar os processos mesmo em baixas concentrações do fluoróforo, o que permite que a marcação de moléculas não-fluorescentes ou pouco fluorescentes, como aminoácidos, peptídios, proteínas, DNA e outras biomoléculas, ocorra de forma efetiva.<sup>31,54,55</sup>

Embora alguns componentes biológicos apresentem fluorescência intrínseca, como por exemplo, proteínas que contêm os aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina, NADH, flavinas e porfirinas, e possam ser detectados por espectroscopia de fluorescência, sendo assim, bons indicadores em processos celulares, tais sondas intrínsecas geralmente são raras. Além disso, pesquisadores descobriram que a interação específica de moléculas biológicas usando anticorpos marcados com corantes fluorescentes forneceu especificidade molecular que não poderia ser obtida por outro método de observação visual. Isto fez com que fosse desenvolvida uma ampla gama de fluoróforos que podem ser utilizados para a marcação de fluorescência de moléculas biológicas ou como sensores capazes de relatar mudanças em seu ambiente.<sup>11,55</sup>

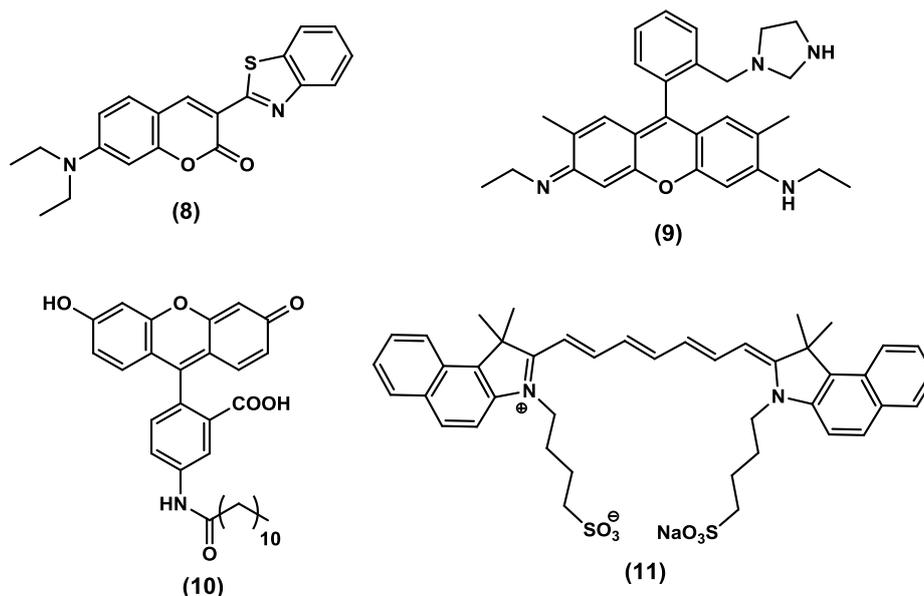
A seguir, são listados alguns critérios que devem ser seguidos no desenvolvimento de sondas fluorescentes aplicadas em sistemas vivos: (i) deve ser introduzida de forma que seja mantida a integridade estrutural e fisiológica da célula; (ii) deve interagir seletivamente com o alvo, sendo ele um íon, molécula, organela ou outra estrutura. (iii) a fluorescência da sonda deve ser suficiente para permitir a detecção do alvo sem interferência da emissão intrínseca do meio e (iv) a interação com o alvo deve ser detectada pela visualização da emissão de fluorescência na região do visível ou por uma resposta espectroscópica, como por exemplo, uma alteração na intensidade de fluorescência ou um deslocamento da banda do espectro de absorção. (v) deve possuir coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) e rendimento quântico ( $\Phi$ ) elevados, o que garante a utilização do corante em baixas concentrações e previne a toxicidade na célula.<sup>11,56,57</sup>

No desenvolvimento de sondas fluorescentes, é importante considerar sua estrutura molecular como sendo composta por dois componentes: um fluoróforo e grupos funcionais altamente seletivos que reconheçam e apresentem interação com o alvo biológico. Este conceito está representado na Figura 7, em que a estrutura da fluoresceína é sinteticamente modificada para que seja utilizada como sonda fluorescente em ambientes biológicos diferentes, respeitando os critérios previamente apresentados.<sup>11,56</sup>



**Figura 7.** Sondas fluorescentes derivadas da Fluoresceína. (A) 5-Dodecanoilaminofluoresceína, (B) Fluoresceína acoplada ao hexapeptídeo formil-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys, (C) *Calcium Green-1* e (D) *Fluorescein Di- $\beta$ -D-Galactopyranoside* (FDG). (Fonte: Johnson *et al.*<sup>11</sup>).

Derivados de cumarina, fluoresceína, rodamina e cianinas são alguns exemplos de marcadores fluorescentes frequentemente descritos na literatura (Figura 8).<sup>11,58</sup>



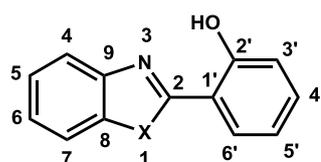
**Figura 8.** Exemplos de sondas fluorescentes descritas na literatura. Derivado de cumarina (**8**); derivado de rodamina (**9**); derivado de fluoresceína (**10**); derivado de cianina (**11**).

Uma importante área de aplicação de sondas fluorescentes se encontra em estudos que envolvem a estrutura e dinâmica de membranas celulares e de modelos biomembranares, como lipossomas.<sup>8,12</sup> Sondas de membrana incluem corantes orgânicos lipofílicos que não apresentam necessariamente semelhança estrutural com biomoléculas naturais. Estes, dependendo de sua estrutura, podem ser incorporados no núcleo hidrofóbico, na interface aquosa das membranas ou também podem ser usados em modelos biomiméticos de membranas celulares, como os lipossomas. Como exemplos, destacam-se as sondas 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (**12**) e seus derivados, Nile red (**13**), Laurdan (**14**) e Prodan (**15**) (Figura 9).<sup>12</sup> Além disso, sondas de membrana podem ser marcadores fluorescentes incorporados em análogos de cinco classes de lipídios de ocorrência natural: fosfolipídios, esfingolipídios, ácidos graxos, triacilgliceróis e esteroides. Desta forma, a sonda é monitorada sem que ocorra perturbação da integridade celular. Como exemplos, destacam-se ácidos graxos marcados com NBD (nitrobenzoxadiazol) (**16**) e fosfolipídios marcados com pireno (**17**) (Figura 10).<sup>12</sup>

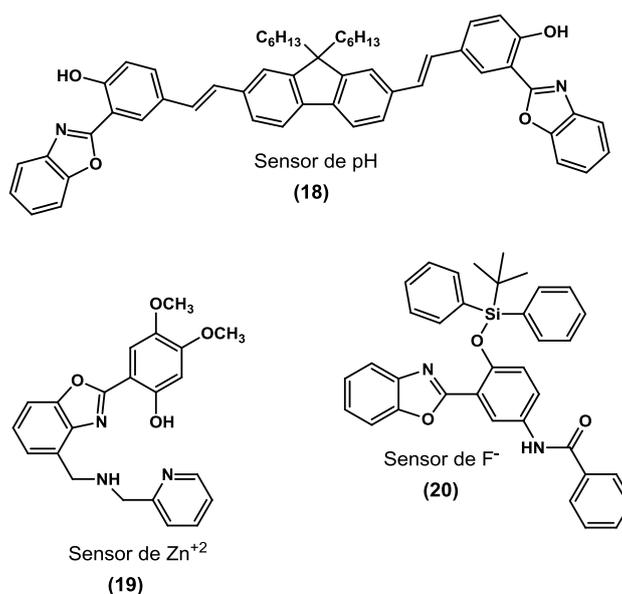


introdução de um grupo 2-hidroxifenil na posição 2 do anel azólico proporciona a formação dos compostos 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis (Figura 11).<sup>57</sup> Os heterociclos 2-(2'-hidroxifenil)benzazólicos tem sido amplamente estudados em razão de suas importantes propriedades fotofísicas, que incluem fotoestabilidade térmica<sup>19</sup> e intensa emissão de fluorescência. Estes apresentam grande deslocamento de Stokes devido a um mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado (ESIPT), também conhecido como fototautomerismo.<sup>16-18</sup> Esta característica faz com que esta classe de compostos se torne atrativa tanto do ponto de vista sintético quanto tecnológico<sup>59</sup> e apresente aplicação como sensores de pH,<sup>23</sup> sensores de cátions<sup>24</sup> e ânions,<sup>25</sup> sondas fluorescentes,<sup>29-31</sup> marcadores de proteínas,<sup>26</sup> materiais poliméricos fluorescentes,<sup>28</sup> entre outros (Figura 12).

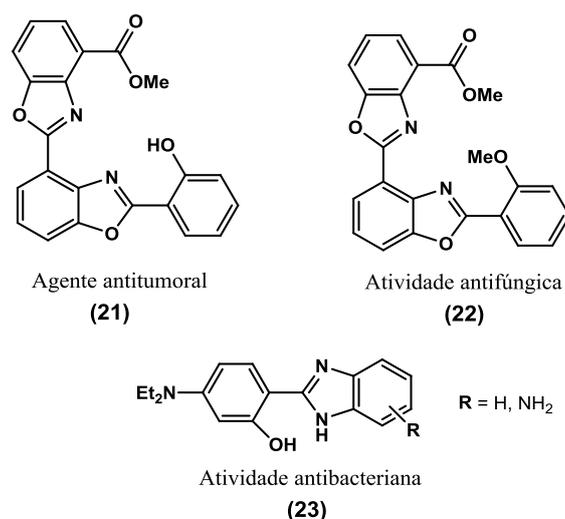
Derivados dos heterociclos 2-(2'-hidroxifenil)benzazólicos também demonstram importantes atividades farmacológicas e podem ser encontrados em compostos biologicamente ativos como agentes antibacterianos, antifúngicos, anti-inflamatórios, agentes antitumorais, antivirais, entre outros (Figura 13).<sup>60</sup>



**Figura 11.** Estrutura química de heterociclos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol, onde X=O (benzoxazol), S (benzotiazol) ou NH (benzimidazol).



**Figura 12.** Exemplos de derivados de heterociclos benzazólicos reportados na literatura indicando as respectivas aplicações.<sup>23-25</sup>



**Figura 13.** Exemplos de derivados de heterociclos benzazólicos reportados na literatura que apresentam aplicações farmacológicas.<sup>60</sup>

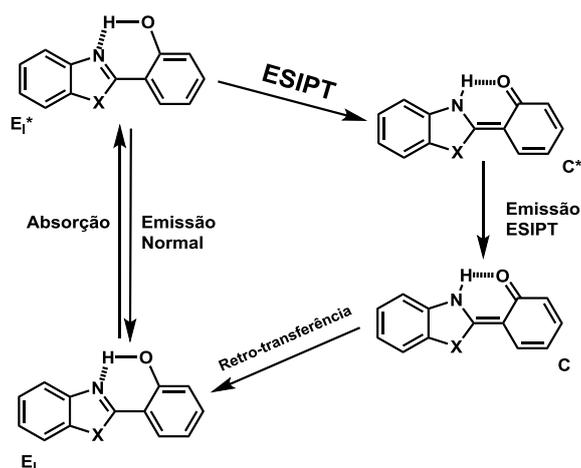
### 2.3.1 Mecanismo de ESIPT e Deslocamento de Stokes

A transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT) é um processo que tem sido amplamente investigado nas últimas décadas devido a sua importância química, biológica e bioquímica.<sup>59</sup> Este pode ser observado em moléculas que apresentam diferentes estruturas e, como exemplo, tem-se os compostos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazólicos, os quais possuem um grupo doador de prótons (hidroxila fenólica) e um grupo aceptor de prótons (átomo de nitrogênio azólico) vizinhos, associados por ligação de hidrogênio intramolecular.<sup>61</sup> No estado excitado, ocorre uma redistribuição eletrônica onde o grupo doador torna-se mais ácido e o grupo aceptor mais básico, permitindo assim, que ocorra uma transferência protônica através da ligação de hidrogênio intramolecular do grupo doador para o grupo aceptor.<sup>59</sup>

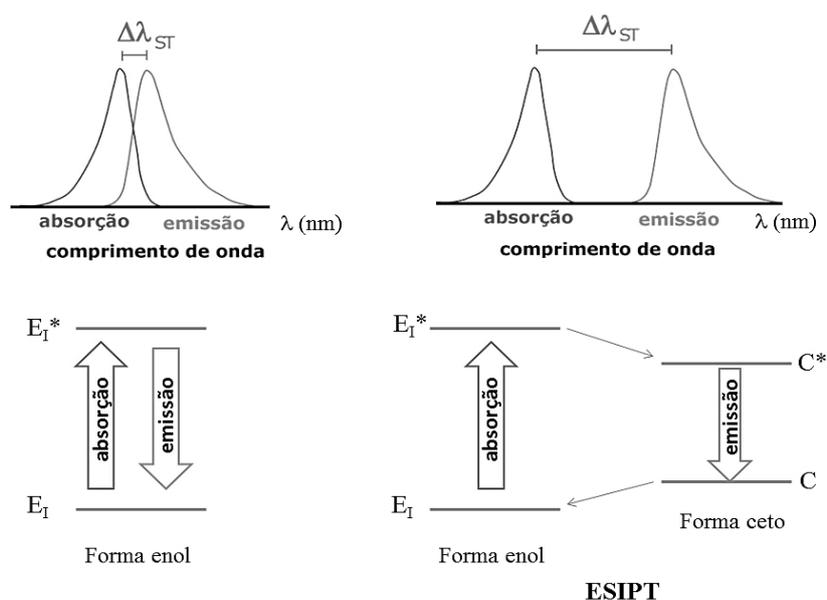
Este processo pode ser simplificado baseado em um modelo de quatro níveis. (Figura 14). Após a absorção da radiação, o confômero enol-cis ( $E_I$ ), que se encontra no estado fundamental, vai para um nível de maior energia levando ao enol-cis excitado ( $E_I^*$ ). Neste instante, a mudança na distribuição eletrônica, responsável pelo aumento, tanto da acidez da hidroxila, quanto da basicidade do nitrogênio azólico, favorece a transferência protônica intramolecular extremamente rápida gerando o correspondente tautômero ceto ( $C^*$ ). Esta configuração é mais estável sendo atingido um estado de menor energia eletrônica. Em seguida, o tautômero ceto na forma excitada ( $C^*$ ) decai para o estado fundamental formando o tautômero ceto no estado fundamental ( $C$ ). Como este processo ocorre com perda de energia

conformacional, a emissão é deslocada para maiores comprimentos de onda, resultando em grande deslocamento de Stokes. Por fim, o confômero enol-cis ( $E_I$ ) é regenerado sem que ocorra qualquer alteração química.<sup>57,59</sup>

Uma das propriedades fotofísicas mais marcantes em compostos que apresentam ESIPT é o grande deslocamento de Stokes, o qual é definido como a diferença entre os comprimentos de onda dos máximos de absorção e emissão da molécula (Figura 15).<sup>20,62</sup> Esta característica é importante por causa da diminuição da auto-absorção e, por consequência, melhora nas medidas de fluorescência.



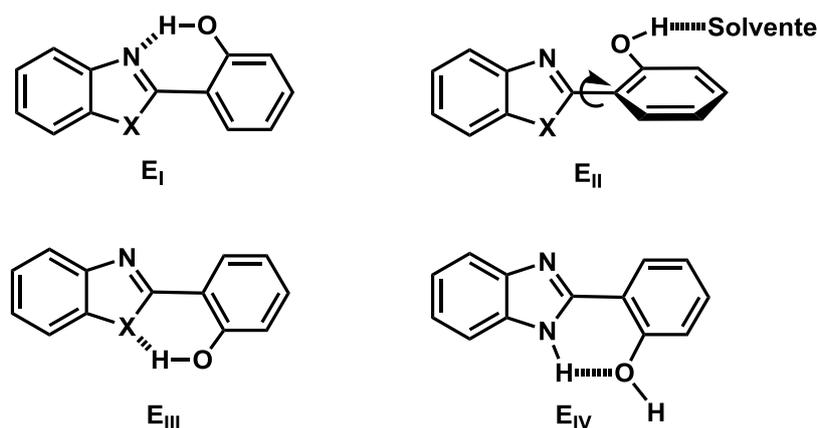
**Figura 14.** Representação do processo de ESIPT para heterociclos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol, onde  $X=O, S$  ou  $NH$ .



**Figura 15.** Representação do Deslocamento de Stokes ( $\Delta\lambda_{ST}$ ) para emissão normal, da forma enol (esquerda) e emissão por ESIPT, da forma cetona (direita). (Adaptado de Nunes *et al.*<sup>61</sup>)

O processo de ESIPT pode depender da conformação da molécula, do pH do meio e da natureza do solvente, principalmente com respeito à capacidade de formar ligação de hidrogênio. Dependendo das condições empregadas, algumas moléculas podem exibir dupla emissão de fluorescência, sendo uma em menor comprimento de onda devido à emissão que ocorre sem a transferência protônica, também denominada emissão normal, e outra proveniente do mecanismo de ESIPT com grande deslocamento de Stokes (Figura 15).<sup>57</sup>

Compostos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis podem apresentar diferentes confômeros no estado fundamental (I-IV) (Figura 16), os quais podem se encontrar mais ou menos estabilizados dependendo do solvente empregado, destes, somente o enol-cis ( $E_I$ ), é responsável pela emissão ESIPT. Um dos fatores que pode dificultar este processo é a formação de ligação de hidrogênio intermolecular entre os compostos e as moléculas de solvente. Em solventes próticos e/ou polares, como por exemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MeOH) e água, há ruptura da ligação de hidrogênio intramolecular e o confômero enol-cis solvatado ( $E_{II}$ ) é o mais estabilizado pelas ligações de hidrogênio intermoleculares com as moléculas de solvente, e, como consequência, há inibição do processo ESIPT e favorecimento da emissão normal. Por outro lado, em solventes apróticos ou apolares, o confômero  $E_I$  é o mais estabilizado devido a formação da ligação intramolecular, responsável pela formação do tautômero ceto no estado excitado que dá origem ao processo de ESIPT. Os confômeros enol-trans ( $E_{III}$ ) quando  $X = O, S$  e enol-trans aberto ( $E_{IV}$ ) quando  $X = NH$ , também podem existir.<sup>57,59,61,62</sup>

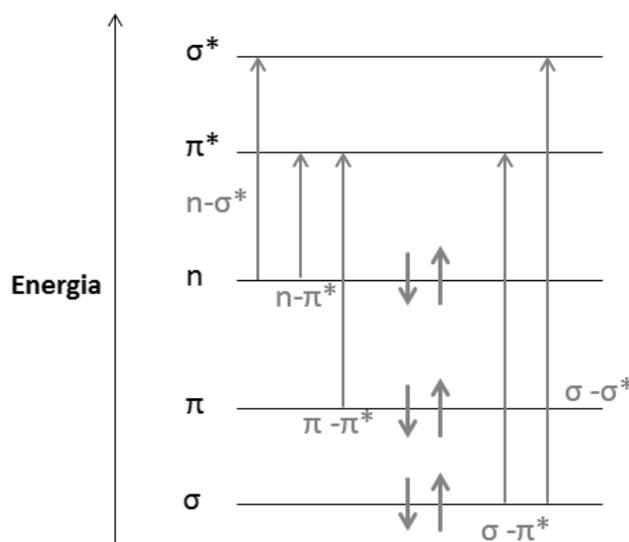


**Figura 16.** Formas tautoméricas enol-cis ( $E_I$ ), enol-trans ( $E_{III}$ ), enol-cis solvatado ( $E_{II}$ ), enol-trans aberto ( $E_{IV}$ ), com  $X = O, S$  ou  $NH$ .

## 2.4 FOTOFÍSICA

### 2.4.1 Absorção da radiação na região do UV-Visível

Uma transição eletrônica consiste na promoção de um elétron, que ocorre pela absorção de um fóton na região do ultravioleta ou visível, de um orbital ligante no estado fundamental à um orbital vazio antiligante. Em geral, a transição mais provável é aquela que ocorre do orbital ocupado de maior energia (HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital*) para o orbital desocupado de menor energia (LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*).<sup>63</sup> Diferentes transições eletrônicas podem ocorrer entre os orbitais  $\sigma$ ,  $\pi$  e  $n$  (Figura 17). Dentre estas transições, aquelas que apresentam maior interesse para a fotoquímica molecular orgânica são  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$ .<sup>64</sup> As transições do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  possuem uma absorção intensa na região do ultravioleta até a região do visível, e apresentam elevado coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ). Absorções do tipo  $n \rightarrow \pi^*$ , por sua vez, são características de cromóforos contendo heteroátomos que possuem pares de elétrons não-ligantes, sendo estas de baixa intensidade e apresentam baixo coeficiente de absorção molar. Geralmente a região de absorção para estas transições se encontra situada na região do visível, sendo assim, ocorrem em maiores comprimentos de onda, onde são necessárias baixa quantidade de energia para a sua promoção eletrônica.<sup>65,66</sup>



**Figura 17.** Possíveis transições eletrônicas em compostos orgânicos.

A probabilidade de uma absorção ocorrer é indicada pela constante de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) que é característica para cada molécula. A absorbância ( $A$ ) e  $\epsilon$  estão relacionadas pela Lei de Lambert-Beer (Equação 2):

$$A = \epsilon bc \quad (2)$$

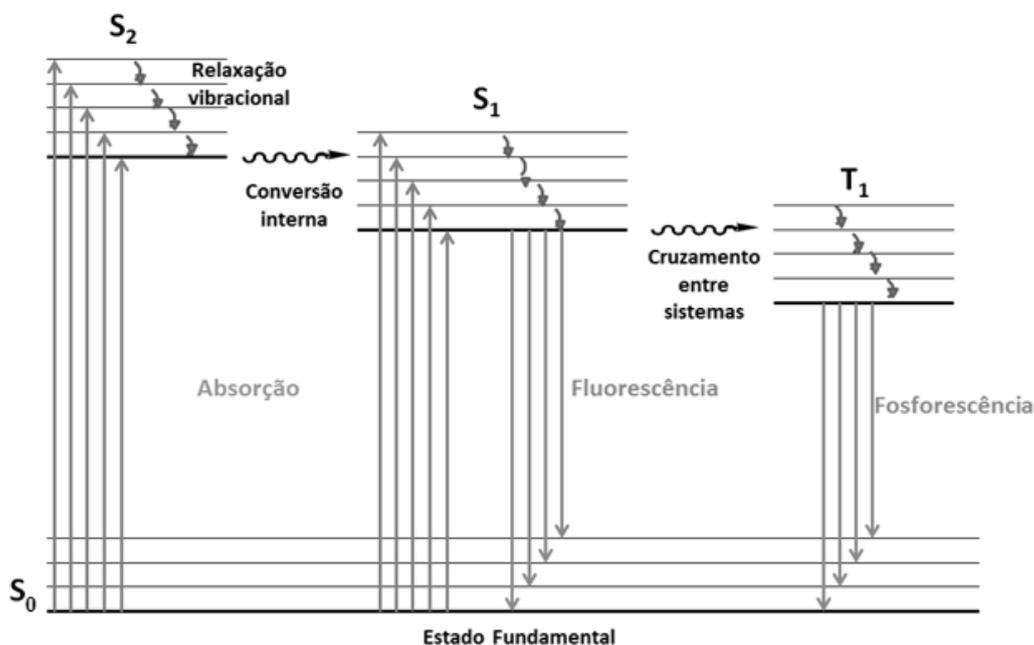
De acordo com a Equação 2, a absorvância é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente, onde  $b$  é o caminho óptico do meio absorvente.<sup>67</sup> Para valores em que a absorvância molar é maior que  $10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , considera-se que a absorção é de alta intensidade. Absorções de baixa intensidade possuem valor de  $\epsilon$  abaixo de  $10^2 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

A posição (efeito hipsocrômico ou batocrômico) e/ou a intensidade (efeito hipercrômico ou hipocrômico) da banda de um espectro de absorção pode ser afetada por vários fatores, entre eles podem ser destacados o aumento ou diminuição da conjugação eletrônica e utilização de diferentes solventes. Efeito batocrômico, também conhecido como deslocamento para o vermelho, é um deslocamento para energias mais baixas. Efeito hipsocrômico, também conhecido como deslocamento para o azul, é um deslocamento para energias mais altas. No efeito hipercrômico, ocorre um aumento na intensidade da absorção, enquanto que, no efeito hipocrômico, ocorre uma diminuição na intensidade da absorção.

#### **2.4.2 Emissão de Fluorescência**

A luminescência compreende vários tipos de fenômenos ópticos originados por processos biológicos, químicos e físicos. Os mais difundidos referem-se à bioluminescência, quimiluminescência e fotoluminescência, sendo esta última representada pelos processos de fluorescência e fosforescência.<sup>63</sup> Métodos baseados em fluorescência são aqueles nos quais a substância ao absorver um fóton de energia, proveniente da luz ultravioleta ou visível, é promovida de um estado de menor energia (estado fundamental) para um estado eletrônico de maior energia (estado excitado). Após absorção da energia e promoção ao estado excitado, a molécula pode retornar ao estado fundamental através de processos radiativos (fluorescência e fosforescência) ou não-radiativos (relaxação vibracional, conversão interna e cruzamento entre sistemas) e/ou fotoquímicos. Os processos que ocorrem entre a absorção e emissão de luz são ilustrados pelo diagrama de Jablonski (Figura 18). O excesso de energia é perdido rapidamente por processos não-radiativos até o mais baixo nível de energia do estado excitado. Deste nível, a molécula pode retornar para o estado fundamental pela emissão da energia na forma de fluorescência.<sup>68</sup> Este processo de desativação da energia é uma transição permitida por spin, pois envolve estados de mesma multiplicidade de spin, ocorrendo do primeiro estado excitado singlete para o estado fundamental ( $S_1 \rightarrow S_0$ ). A velocidade da emissão de fluorescência é de aproximadamente  $10^{-9}$  segundos, sendo um processo muito rápido. Moléculas no primeiro estado excitado  $S_1$  também podem ser submetidas a um cruzamento entre sistemas (transição não-radiativa) entre estados de diferentes multiplicidades ( $S_1 \rightarrow T_1$ ), sendo assim, uma transição proibida por spin. Emissão do primeiro

estado excitado triplete para o estado fundamental singlete ( $T_1 \rightarrow S_0$ ) é denominada de fosforescência e é um processo mais lento que a fluorescência ( $10^{-3}$ - $10^2$  s).



**Figura 18.** Diagrama de Jablonski.

### 2.4.3 Rendimento quântico de fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) é a fração de moléculas do estado excitado que retornam ao estado fundamental com emissão de fluorescência. Em outras palavras, é a razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos.<sup>63</sup> O rendimento quântico de fluorescência pode ser determinado de forma absoluta, sendo obtido diretamente em uma única medida utilizando esfera integradora, ou através de métodos ópticos relativos à um padrão com  $\Phi_F$  previamente conhecido. Este último é o mais empregado para a determinação do rendimento quântico de fluorescência e pode ser calculado pela equação (3):

$$\Phi_{FX} = \Phi_{F0} \left( \frac{F_X}{F_0} \right) \left( \frac{A_0}{A_X} \right) \left( \frac{n_X^2}{n_0^2} \right), \quad (3)$$

em que  $\Phi_{FX}$  é o rendimento quântico da amostra,  $\Phi_{F0}$  é o rendimento quântico do padrão,  $F_X$  e  $F_0$  são as áreas das curvas de emissão de fluorescência da amostra e do padrão, respectivamente;  $A_0$  e  $A_X$  são as absorbâncias do padrão e da amostra, respectivamente;  $n_X$  e  $n_0$  são os índices de refração dos solventes da amostra e do padrão, respectivamente. O

comprimento de onda do máximo de absorção do padrão deve ser próximo ao comprimento de onda do máximo de absorção da amostra. Os valores de rendimento quântico obtidos se encontram entre 0 e 1, sendo que este último representa que todos os fótons absorvidos foram emitidos por fluorescência.<sup>69,70</sup>

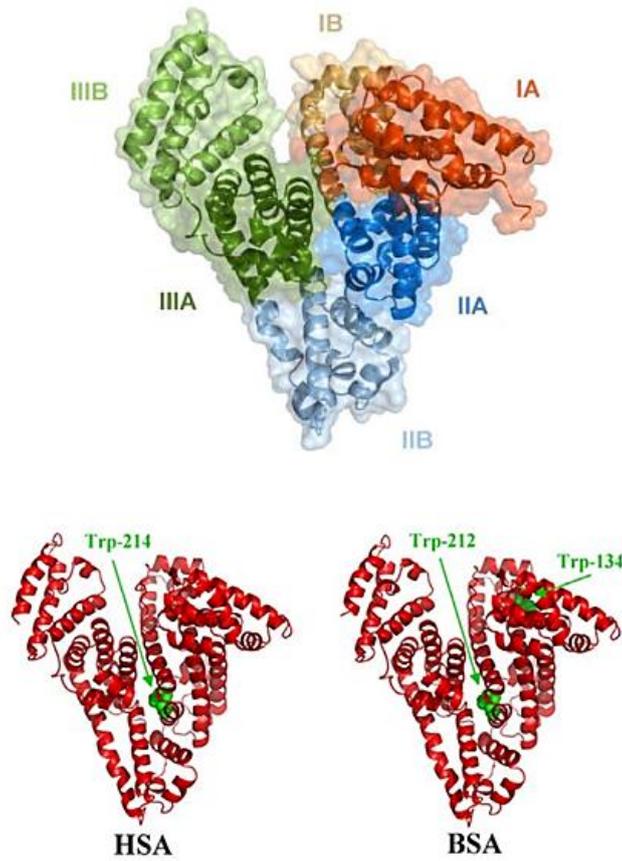
## 2.5 ASSOCIAÇÃO COM BSA

Albuminas séricas são as proteínas mais abundantes do plasma sanguíneo<sup>71</sup> e correspondem a 60% do total de proteínas globulares.<sup>72</sup> São responsáveis por diversas funções fisiológicas, dentre as quais destacam-se o transporte de substâncias endógenas e exógenas, incluindo ácidos graxos, metais, aminoácidos e fármacos.<sup>34,72-74</sup> A albumina sérica bovina (BSA) é a proteína mais estudada e tem sido amplamente utilizada como modelo em estudos de interação proteína-ligante,<sup>36</sup> devido seu baixo custo,<sup>34</sup> baixa toxicidade, alta estabilidade<sup>74</sup> e solubilidade<sup>35</sup> e, principalmente, pela similaridade com a albumina sérica humana (HSA),<sup>34</sup> apresentado uma porcentagem de sequências idênticas de aminoácidos de 76%.<sup>74</sup> Sua massa molecular é de 66,5 kDa.<sup>75</sup>

A BSA é composta por uma cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos e três domínios denominados de I, II e III, sendo que cada um deles, é dividido em outros dois subdomínios (A e B).<sup>32,36</sup> Possui 17 pontes dissulfeto, que conferem estabilidade à proteína.<sup>72</sup> Estudos indicam que os principais sítios de associação encontram-se localizados nas cavidades hidrofóbicas dos subdomínios IIA e IIIA.<sup>71</sup> A estrutura da BSA possui dois resíduos de triptofano (Trp), estando Trp-134 no primeiro domínio, localizado na superfície da molécula, e Trp-212 no subdomínio IIA, localizado na região hidrofóbica da proteína.<sup>76</sup> Além destes, a BSA possui 20 resíduos de tirosina (Tyr) e 27 de fenilalanina (Phe).<sup>32</sup> Embora haja várias similaridades entre BSA e HSA em suas composições, HSA possui somente um resíduo de triptofano Trp-214, enquanto BSA possui dois (Figura 19).<sup>77</sup>

Através da supressão da fluorescência intrínseca proveniente dos resíduos de triptofano da BSA, pode-se determinar a interação entre a proteína e as moléculas de interesse. Geralmente os mecanismos de supressão são classificados como dinâmicos ou estáticos. Os processos de supressão estática são induzidos por formação de um complexo entre a BSA e o corante no estado fundamental. A supressão dinâmica é causada pela colisão entre a BSA e o corante. Em ambos os casos, energia é transferida da proteína para o composto resultando em supressão da sua fluorescência. Estes dois mecanismos podem ser distinguidos por vários métodos, entre eles, a dependência da constante de supressão pela temperatura. No mecanismo estático, a estabilidade do complexo é diminuída com o aumento

da temperatura e, conseqüentemente, há diminuição dos valores da constante de supressão. No mecanismo dinâmico, o aumento da temperatura induz a um aumento das colisões entre a molécula e a proteína, e, a partir disso, observa-se um aumento da constante de supressão.<sup>78</sup>



**Figura 19.** Estrutura da BSA com representação dos respectivos subdomínios (acima), e, comparação entre as estruturas da BSA e HSA indicando a localização dos resíduos de triptofano.

### 3. OBJETIVOS

Síntese de seis novas aminas lipofílicas fluorescentes derivadas de compostos benzazólicos, além de sua caracterização fotofísica através de medidas de absorção na região do UV-Vis e emissão de fluorescência em solução.

Aplicação dos compostos sintetizados como marcadores de lipossomas de fosfatidilcolina (PC) e lipossomas de PC contendo o glicoconjugado C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc (*N*-acetil- $\beta$ -D-glucosaminil-PEG<sub>900</sub>-docosanato).

Determinação do coeficiente de partição dos corantes sintetizados nos lipossomas de PC e de PC + C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc via espectroscopia de emissão de fluorescência.

Estudo da interação entre os lipossomas de PC contendo o glicoconjugado anfifílico C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc, na ausência e presença dos corantes, com a lectina aglutinina de germe de trigo (WGA) via espectroscopia de emissão de fluorescência.

Teste da capacidade de aplicação das aminas sintetizadas como sondas fluorescentes para a Albumina Sérica Bovina (BSA).

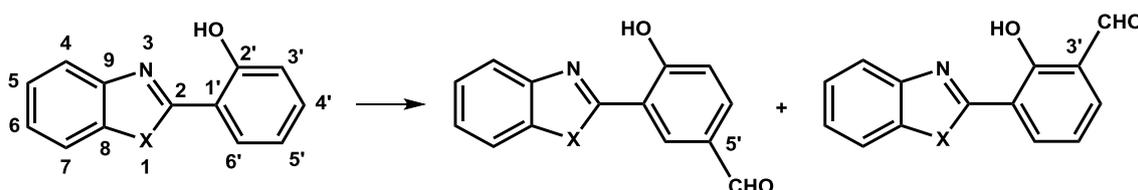
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA

#### 4.1.1 Compostos 27-30

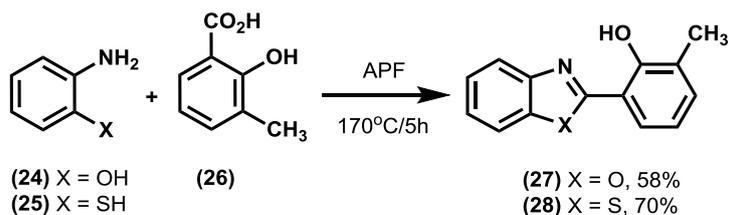
Compostos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis tem sido amplamente utilizados como blocos construtores de novas moléculas fluorescentes.<sup>22</sup> A funcionalização destes compostos através da introdução de um grupamento formil, pela reação de Duff, resulta na formação de dois regioisômeros. Isso ocorre devido a competição entre as posições 3' e 5' do anel fenólico, resultando em dificuldade na separação destes dois produtos (Figura 20).<sup>79</sup>

Para contornar este problema, trabalhos anteriormente realizados neste laboratório tiveram como proposta a síntese dos precursores heterocíclicos 2-(2'-hidroxi-3'-metilfenil)benzazóis os quais possuem um grupamento metila na posição 3' do anel aromático tendo como consequência um aumento no rendimento da reação.<sup>22</sup>



**Figura 20.** Mistura de regioisômeros obtida a partir da formilação de precursores 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis pela reação de Duff.

Os compostos 2-(2'-hidroxi-3'-metilfenil)benzoxazol (**27**) e 2-(2'-hidroxi-3'-metilfenil)benzotiazol (**28**) foram obtidos seguindo uma metodologia previamente descrita.<sup>22</sup> Nesta reação ocorre a condensação do ácido 3-metil-salicílico (**26**) com aminas aromáticas substituídas na posição orto (**24-25**) em ácido polifosfórico (APF) que atua como solvente e catalisador ácido da reação. Os rendimentos obtidos para esta reação foram satisfatórios e encontram-se de acordo com os apresentados na literatura.<sup>22</sup> O esquema geral de obtenção dos compostos **27** e **28** é apresentado na Figura 21.



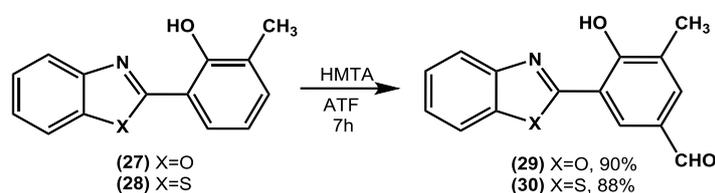
**Figura 21.** Metodologia sintética de obtenção dos derivados benzazólicos **27-28**.

As estruturas dos precursores benzazólicos foram confirmadas pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ). Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de absorção na região do infravermelho dos precursores **27** e **28** encontram-se em anexo (Figuras A1-A4) e as atribuições confirmam a obtenção dos produtos desejados.

A formilação de compostos heterocíclicos possibilita a síntese de uma vasta gama de compostos multifuncionais. Diferentes métodos clássicos podem ser usados na preparação de precursores formilados, entre eles destacam-se reações de Vilsmeier-Haack, Reimer-Tiemann, Gattermann, formilação de Rieche e de Duff.<sup>80</sup>

Dentre os métodos acima destacados, muitas vezes, é preferível a utilização da formilação de Duff devido ao baixo custo, estabilidade e baixa toxicidade dos reagentes utilizados.<sup>22</sup> A metodologia consiste na reação de anéis aromáticos que contenham um grupo doador de elétrons (amina ou hidroxila), com a hexametilenotetramina (HMTA) em meio ácido, sendo estes preferencialmente o ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), ácido polifosfórico (APF) ou ácido trifluoroacético (ATF). A substituição em *orto* geralmente é observada, porém, para o caso dos precursores **27-28** a formilação ocorre necessariamente na posição *para* em relação à hidroxila fenólica devido à presença da metila na posição 3'.

A formação dos compostos **29** e **30** ocorre através da síntese de Duff em que os precursores **27-28** reagem com a hexametilenotetramina (HMTA) em ácido trifluoroacético (ATF), com aquecimento sob refluxo por 7 horas (Figura 22). Para que ocorra hidrólise do intermediário formado durante a reação, água é adicionada ao sistema, sendo a mistura reacional refluxada por mais uma hora. Nesta etapa há formação de um precipitado, o qual é isolado por filtração, lavado com água para remoção do excesso de HMTA e seco à temperatura ambiente. Os rendimentos obtidos para a reação de Duff, após purificação por cromatografia em coluna utilizando diclorometano como eluente, foram satisfatórios (~90%).



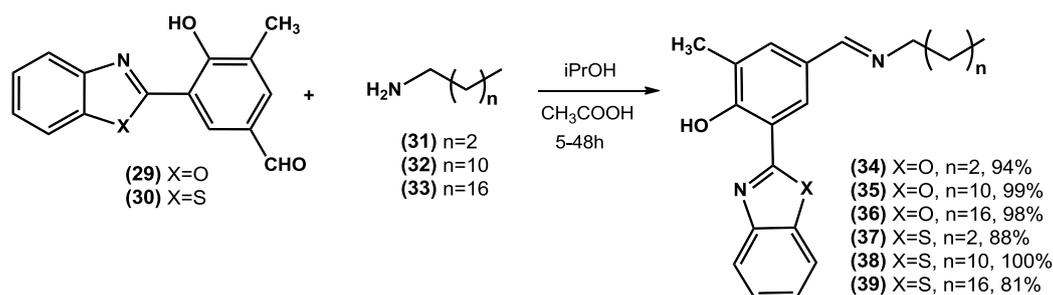
**Figura 22.** Metodologia sintética de obtenção dos derivados benzazólicos formilados **29-30**.

As estruturas dos precursores benzazólicos formilados foram confirmadas pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de absorção na região do

infravermelho dos precursores **29** e **30** encontram-se em anexo (Figuras A5-A8) e as atribuições confirmam a obtenção dos compostos desejados.

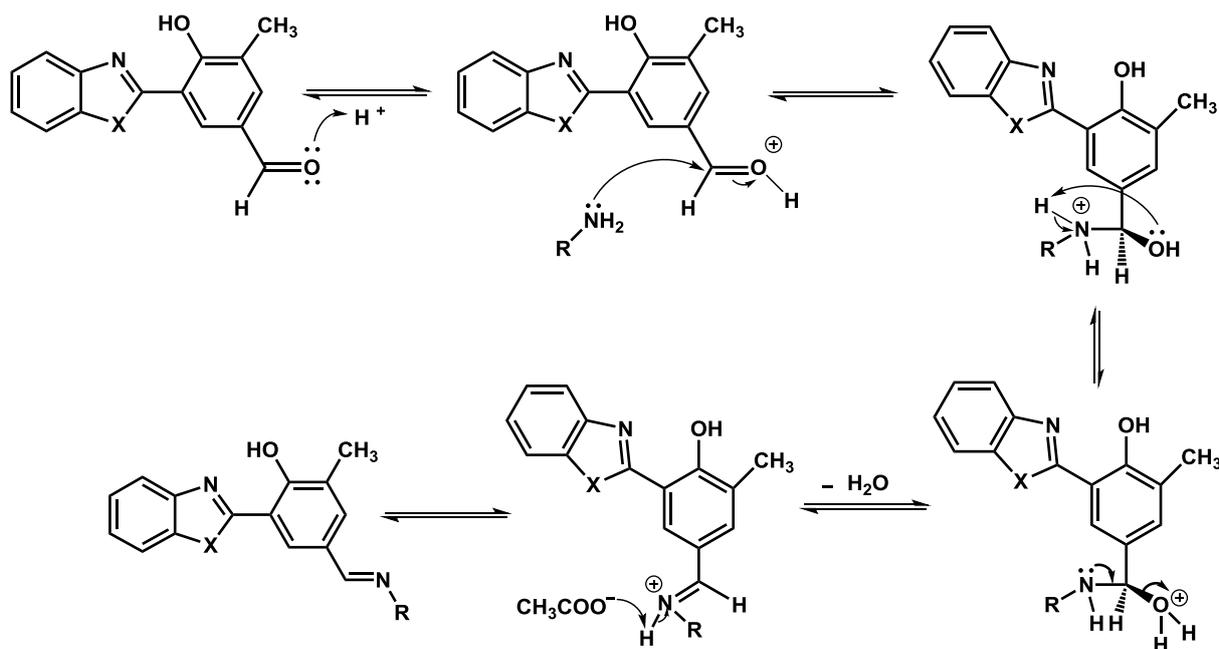
#### 4.1.2 Iminas 34-39

Com o intuito de obter iminas fotoativas com características lipofílicas procedeu-se a reação entre os compostos benzazólicos formilados **29** e **30** com as aminas alifáticas **31-33** contendo cadeias alquílicas em sua estrutura de 4, 12 e 18 átomos de carbono (Figura 23).



**Figura 23.** Metodologia sintética de obtenção das iminas **34-39**.

O método mais comum de preparação de iminas consiste na reação de um aldeído ou cetona com uma amina primária e eliminação de uma molécula de água.<sup>81</sup> A reação acontece em equilíbrio e normalmente requer catálise ácida ocorrendo de forma mais rápida entre pH 4-6. A primeira etapa do mecanismo corresponde à protonação do oxigênio da carbonila com posterior ataque nucleofílico da respectiva amina. Após este ataque há formação de um intermediário tetraédrico. Durante toda a reação há necessidade de controle do pH. Para a primeira etapa, no caso do pH estar abaixo de 4, a amina primária é protonada e ocorre diminuição da sua nucleofilicidade. A segunda etapa do mecanismo consiste na protonação da hidroxila e perda de uma molécula de água resultando na formação de um cátion imínico, o qual é desprotonado para que ocorra a formação da imina (Figura 24).<sup>82-84</sup>

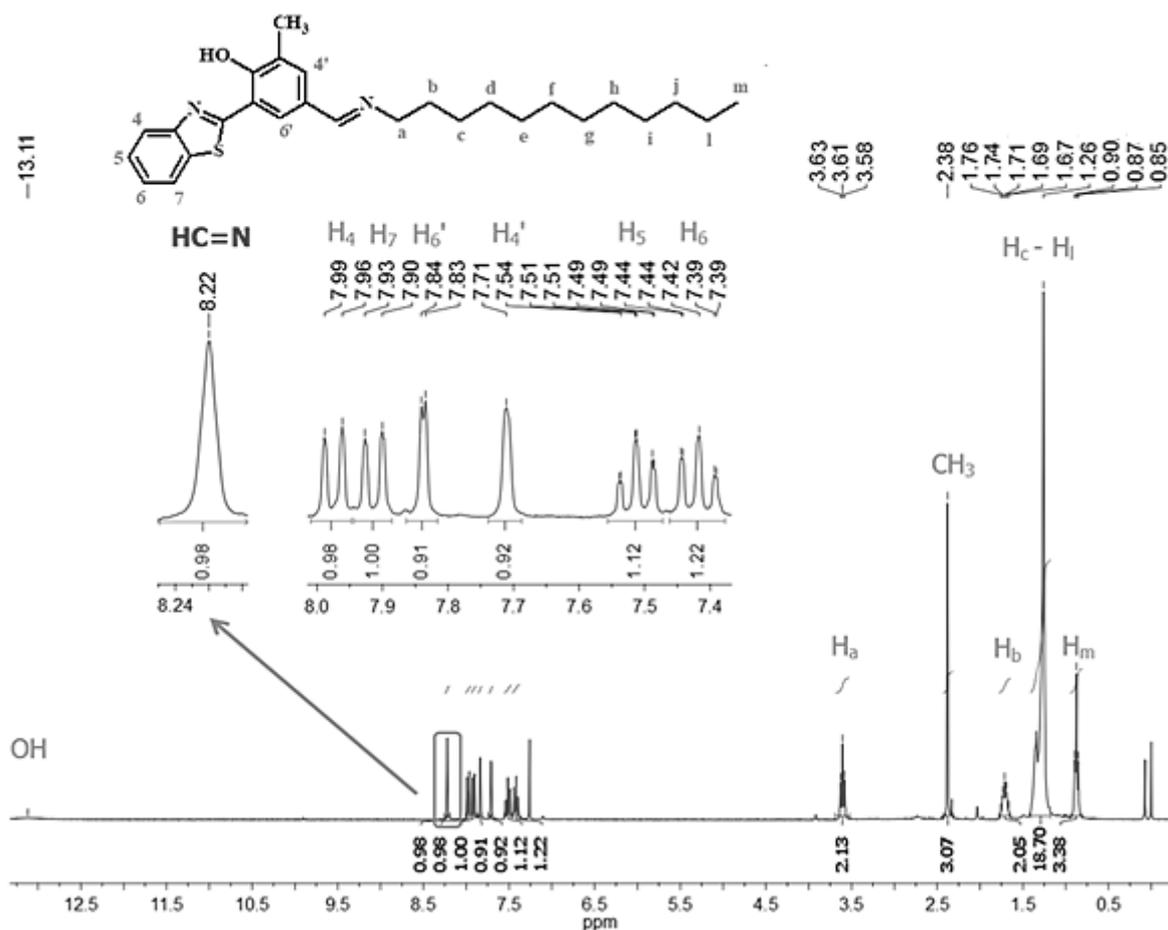


**Figura 24.** Proposta mecanística genérica para obtenção das iminas **34-39**.

A formação das iminas **34-39** foi realizada através da reação dos compostos benzazólicos formilados **29-30** com as aminas alifáticas **31-33**. Isopropanol foi utilizado como solvente contendo 50  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial, o qual atua como catalisador. Para a otimização das condições reacionais foram empregadas variações com relação à proporção dos reagentes e tempo de reação. Inicialmente, foi feito um teste utilizando sistema em refluxo. Porém, neste caso, não foram obtidos os produtos desejados, pois, as iminas ao serem formadas foram convertidas novamente nos respectivos materiais de partida. Isto ocorreu a partir da hidrólise ocasionada pela água formada durante a reação. Sendo assim, a remoção desta é importante para que seja garantida a conversão dos reagentes em produtos, visto que a reação ocorre em equilíbrio. Para este fim, muitas vezes são utilizados aparatos como Dean-Stark, para refluxo com remoção da água formada, ou agentes secantes como sulfato de sódio anidro ou peneira molecular. Porém, na falta do primeiro e pela dificuldade de se isolar o produto após a utilização dos últimos, procedeu-se a síntese de maneira diferente. Foi utilizado um sistema aberto, contendo os reagentes, sob agitação e aquecimento. O solvente foi adicionado em pequenas porções e de maneira contínua. À medida que evaporava, o equilíbrio da reação era deslocado preferencialmente para a formação dos produtos. Isso ocorre, pois, a formação de um azeótropo isopropanol-água facilita o processo de remoção da água formada no meio reacional.

Para a formação das iminas contendo 12 e 18 átomos de carbono na cadeia alifática (**35**, **36**, **38** e **39**), foram testadas duas reações com relação à quantidade dos reagentes empregados. Na primeira, foi utilizado um excesso da amina alifática em relação ao aldeído (proporção 2:1 respectivamente), porém, após a reação foi observada uma mistura entre a imina e o excesso da amina que permaneceu sem reagir. No segundo teste, foram utilizadas quantidades equimolares dos dois reagentes, sendo assim, todos os precursores foram consumidos e, como resultado, foi obtida somente a imina desejada. O tempo reacional é outro fator de extrema importância. As reações realizadas com tempo inferior a três horas, ainda apresentavam a presença dos reagentes de partida. Determinou-se que o tempo ideal para a formação da imina é de aproximadamente 5 horas. Após este período, houve aumento da temperatura até aproximadamente 110-120°C, para garantir o deslocamento do equilíbrio reacional a favor da formação dos produtos, que ocorre a partir da evaporação do solvente, da água formada no meio reacional e de resquícios de ácido acético. O solvente foi evaporado até *secura* e, cessado o aquecimento, foi observada a formação de um líquido viscoso. Após atingir temperatura ambiente, é formado um sólido correspondente à imina desejada. Um inconveniente apresentado na formação das iminas foi a dificuldade de detecção do fim da reação, pois foi verificado que as iminas formadas se degradaram em sílica, o que tornou inutilizável o uso de cromatografia em camada delgada. As iminas **35**, **36**, **38** e **39** foram obtidas com bons rendimentos (~90%) e através de RMN de <sup>1</sup>H verifica-se que todo material de partida foi convertido nos produtos desejados. Além disso, foi constatado que não foi necessária purificação adicional do bruto reacional. A comprovação de pureza e a caracterização foi feita por métodos espectroscópicos usuais (FTIR e RMN de <sup>1</sup>H).

A Figura 25 apresenta o espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **38**, em clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>), com ampliação da região aromática e as atribuições dos hidrogênios da molécula.

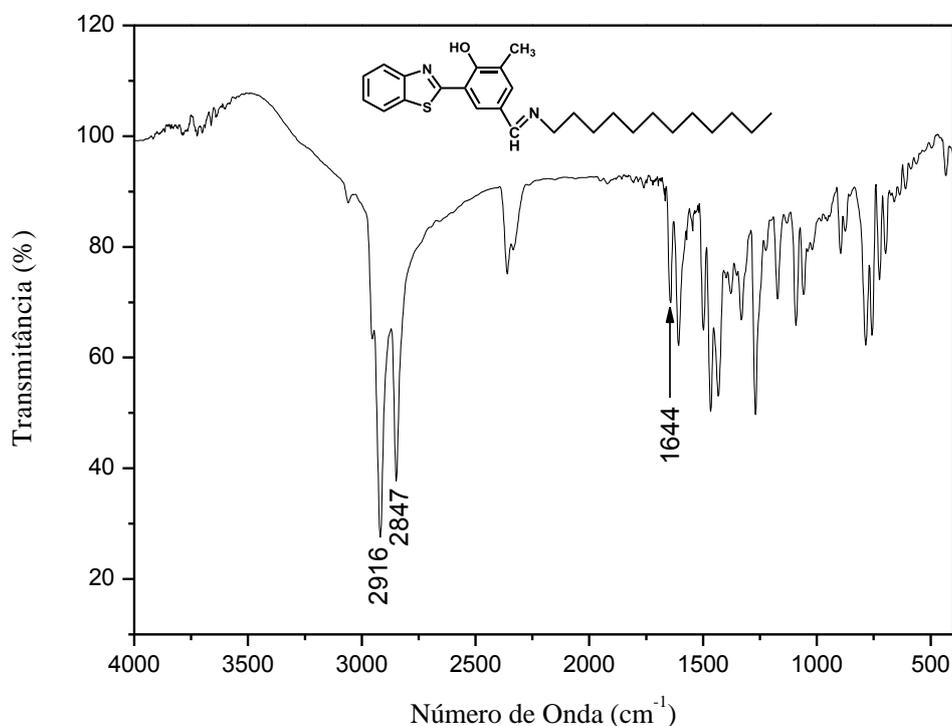


**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) da imina **38**, em  $\text{CDCl}_3$ , com ampliação da região aromática.

A presença do hidrogênio imínico é comprovada pelo aparecimento de um singlete em 8,22 ppm. Além disso, a ausência do singlete em 9,90 ppm, correspondente ao hidrogênio do aldeído, indica que todo precursor **30** foi convertido na imina **38**. Os 6 hidrogênios da região aromática se encontram entre 7,99-7,39 ppm. Na região alifática, os dois hidrogênios do carbono vizinho à imina ( $\text{H}_a$ ) se encontram na forma de um tripleto em 3,61 ppm ( $J=7,2$  Hz). Os dois hidrogênios  $\text{H}_b$  aparecem em 1,71 ppm na forma de um quintuplo ( $J=7,2$  Hz) devido ao acoplamento com os dois hidrogênios  $\text{H}_a$  e os dois hidrogênios  $\text{H}_c$ . Os hidrogênios  $\text{H}_c$ - $\text{H}_l$  se sobrepõem em 1,26 ppm na forma de um multiplo. Os três hidrogênios correspondentes ao  $\text{CH}_3$  da cadeia alifática ( $\text{H}_m$ ), se encontram em 0,87 ppm sob forma de um tripleto, pelo acoplamento com os dois hidrogênios  $\text{H}_l$  ( $J=6,9$  Hz).

A Figura 26 apresenta o espectro de infravermelho da molécula **38**, sendo a formação da imina evidenciada pelo aparecimento de uma banda de intensidade média em  $1644\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento  $\text{C}=\text{N}$  da imina. A presença de duas bandas muito intensas

correspondentes ao estiramento assimétrico e simétrico de C-H alifático em 2916 e 2847  $\text{cm}^{-1}$  também comprovam a formação do produto **38**. O desaparecimento da banda em 1690  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento C=O do aldeído confirmam que o mesmo foi totalmente consumido na reação.



**Figura 26.** Espectro de FTIR da imina **38** em KBr.

Ao proceder a síntese das iminas **34** e **37** utilizando as mesmas condições reacionais empregadas para a obtenção das iminas **35**, **36**, **38** e **39** verificou-se que a butilamina (**31**) foi perdida por evaporação antes que a reação pudesse ter sido concluída. Esse fato foi confirmado pelas técnicas de FTIR e RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras A9 e A10). Devido ao fato das iminas sintetizadas se degradarem em sílica, não foi possível a utilização de cromatografia em camada delgada (CCD), para comprovação do final da reação. Na Tabela 1 encontram-se algumas propriedades físico-químicas referentes às amins alifáticas utilizadas como precursores para a síntese das iminas. Verifica-se que a butilamina (**31**) possui ponto de ebulição de 78°C. Como a reação de formação de iminas ocorre em equilíbrio e é facilitada com a perda de água do sistema, à medida que a água é retirada por evaporação, também é perdido o reagente de partida butilamina.

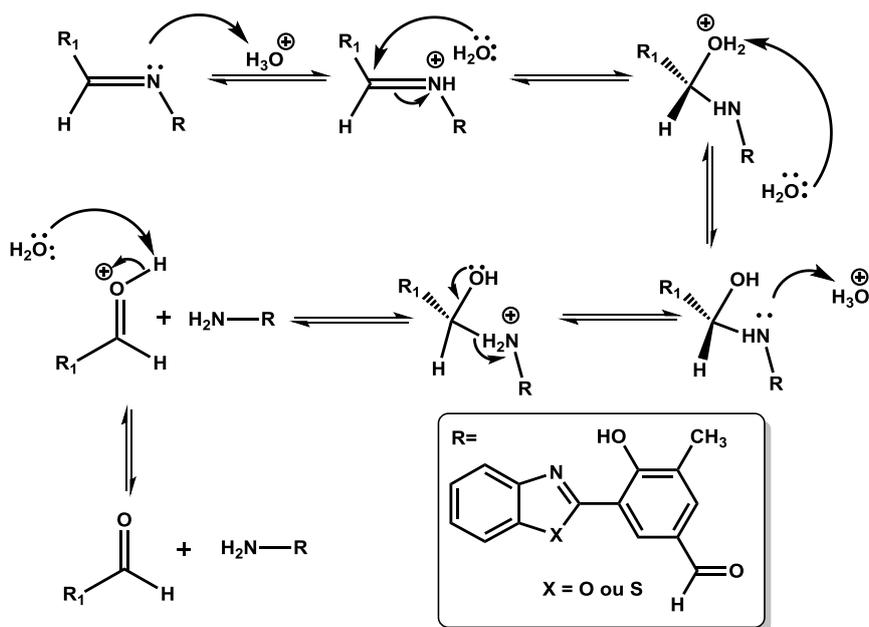
**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas das aminas primárias **31-33**.

<b>Amina</b>	<b>Massa Molar (g/mol)</b>	<b>Ponto de Fusão (°C)</b>	<b>Ponto de Ebulição (°C)</b>
Butilamina ( <b>31</b> )	73,14	- 49	78
Dodecilamina ( <b>32</b> )	185,35	27-29	247-249
Octadecilamina ( <b>33</b> )	269,51	50-52	232

Considerando os fatos apresentados anteriormente, foi necessária uma alteração no procedimento experimental. Foi utilizado um pequeno excesso da amina alifática em comparação com os compostos benzazólicos formilados, sendo a proporção de 2:1, respectivamente. Manteve-se a reação sob sistema fechado por 48 horas a 50°C e, após este período, o sistema reacional foi aberto, procedendo-se então a reação da mesma maneira que a utilizada na síntese das iminas **35**, **36**, **38** e **39**. A partir da caracterização pelas técnicas espectroscópicas de FTIR e RMN de  $^1\text{H}$ , verificou-se que praticamente todo material de partida foi convertido no produto desejado. Inicialmente foi feito um teste de purificação das iminas **34** e **37** através de recristalização com acetona. Porém, foi verificado através da mudança de coloração que parte do produto sofreu hidrólise neste solvente. O mesmo ocorreu para o teste de lavagem com acetato de etila e isopropanol. Justamente pelo fato das iminas se degradarem em sílica, não foi utilizada cromatografia em coluna como forma de purificação das mesmas. Devido à instabilidade das iminas sintetizadas não foi procedida a purificação das mesmas. As iminas **34** e **37** foram obtidas com bons rendimentos (~90%) e a caracterização foi feita por métodos espectroscópicos usuais (FTIR e RMN de  $^1\text{H}$ ).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , assim como os espectros de absorção na região do infravermelho das iminas **34-39** encontram-se em anexo (Figuras A11-A22) e as atribuições confirmam a obtenção dos compostos desejados.

Em soluções aquosas ácidas, as iminas podem ser hidrolisadas gerando seus respectivos precursores. Muitas vezes, são instáveis à ponto de sofrerem hidrólise, mesmo sem a necessidade de catálise ácida. O esquema abaixo mostra a reação de hidrólise da imina (Figura 27).<sup>82</sup>



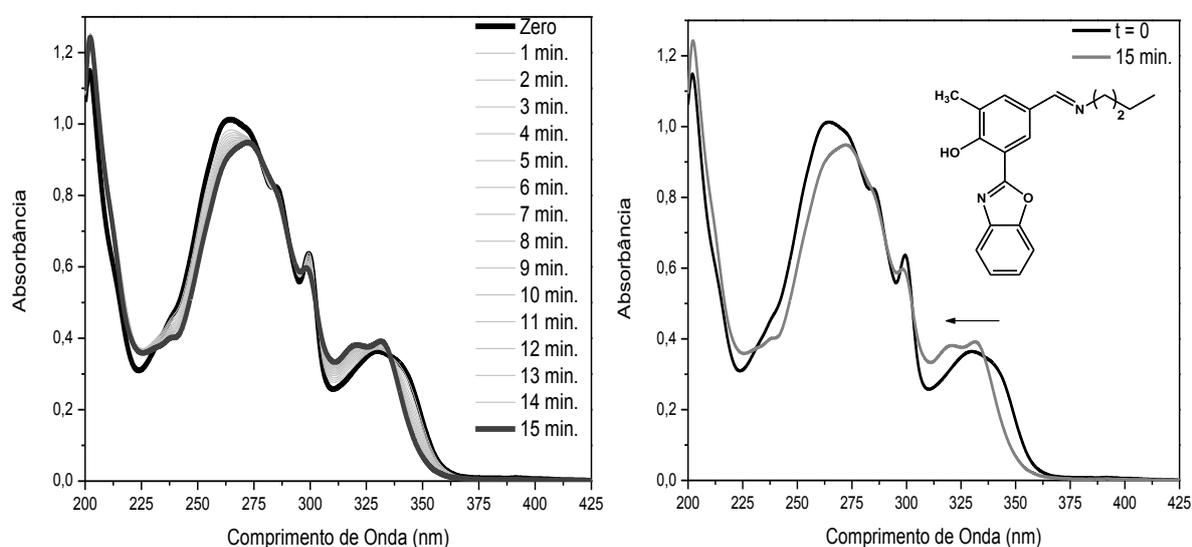
**Figura 27.** Mecanismo genérico de hidrólise de iminas.

Iminas originadas de precursores aromáticos são mais estáveis do que aquelas obtidas a partir de aldeídos e aminas alifáticas, devido ao efeito de conjugação.<sup>78</sup> Considerando o fato de que as iminas sintetizadas neste trabalho hidrolisaram quando em contato com sílica, decidiu-se avaliar a dinâmica da hidrólise das mesmas por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis. A hidrólise foi catalisada por solução aquosa de ácido acético ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em etanol absoluto. A solubilidade das iminas **34-39** é baixa em etanol, sendo assim, elas foram solubilizadas em uma solução-mãe de diclorometano e, em seguida, uma alíquota foi adicionada em 3 mL de etanol absoluto resultando em uma concentração final de aproximadamente  $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Em seguida, foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de ácido acético  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . As medidas foram feitas em intervalos de 60 s durante um período de 15 min para as iminas **34-36** e 45 min para as iminas **37-39**. Pela visualização dos espectros das iminas contendo o heteroátomo oxigênio (**34-36**) (Figuras 28-30), verifica-se que houve um deslocamento hipsocrômico (para o azul) da banda correspondente ao comprimento de onda máximo de absorção, indicado pelas setas. Pelos espectros das iminas contendo o heteroátomo enxofre (**37-39**) (Figuras 31-33), verifica-se que houve diminuição da banda localizada em 400 nm e deslocamento hipsocrômico (para o azul) da banda localizada em 352 nm. Para todas as análises, não houve uma alteração significativa no perfil dos espectros quando considerada a variação da cadeia alquílica. Além disso, pode-se destacar que a formação do íon imínio, que ocorre logo após adição da solução aquosa de ácido acético, faz com que haja aumento na conjugação da molécula, em comparação com o

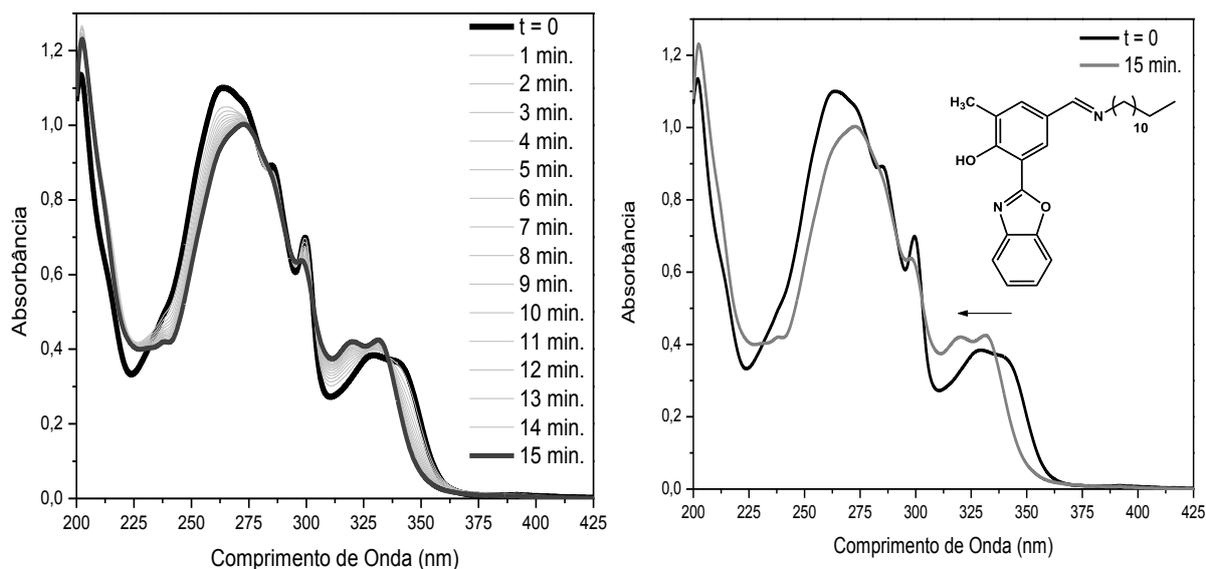
precursor aldeído, e, conseqüentemente, ocorre um deslocamento batocrômico da localização do comprimento de onda do máximo de absorção. As concentrações e os comprimentos de onda do máximo de absorção, antes e após a hidrólise, de cada imina são encontrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Concentração ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e os comprimentos de onda do máximo de absorção ( $\lambda_{\text{abs}}$ ) (nm), antes e após a hidrólise, das iminas 34-39.

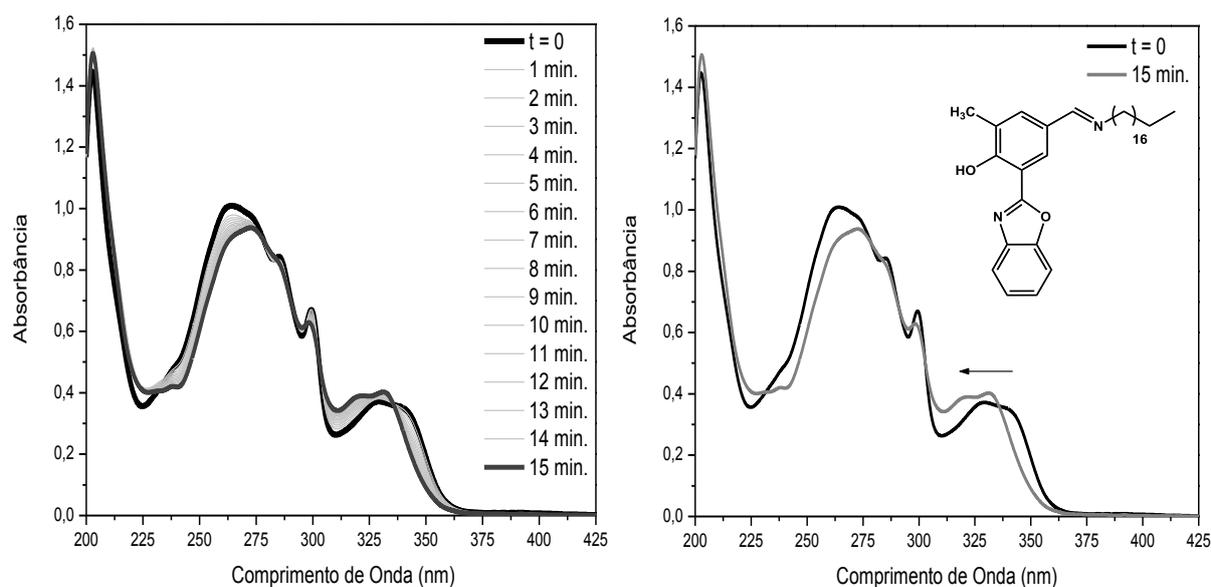
Molécula	Massa Molar ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	Concentração ( $\times 10^5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{abs}}$ antes da hidrólise (nm)	$\lambda_{\text{abs}}$ após a hidrólise (nm)
34	308	3,57	340	331
35	420	2,38	340	331
36	504	3,59	341	331
37	324	2,47	400, 349	340
38	436	5,05	400, 352	340
39	520	4,81	402, 351	340



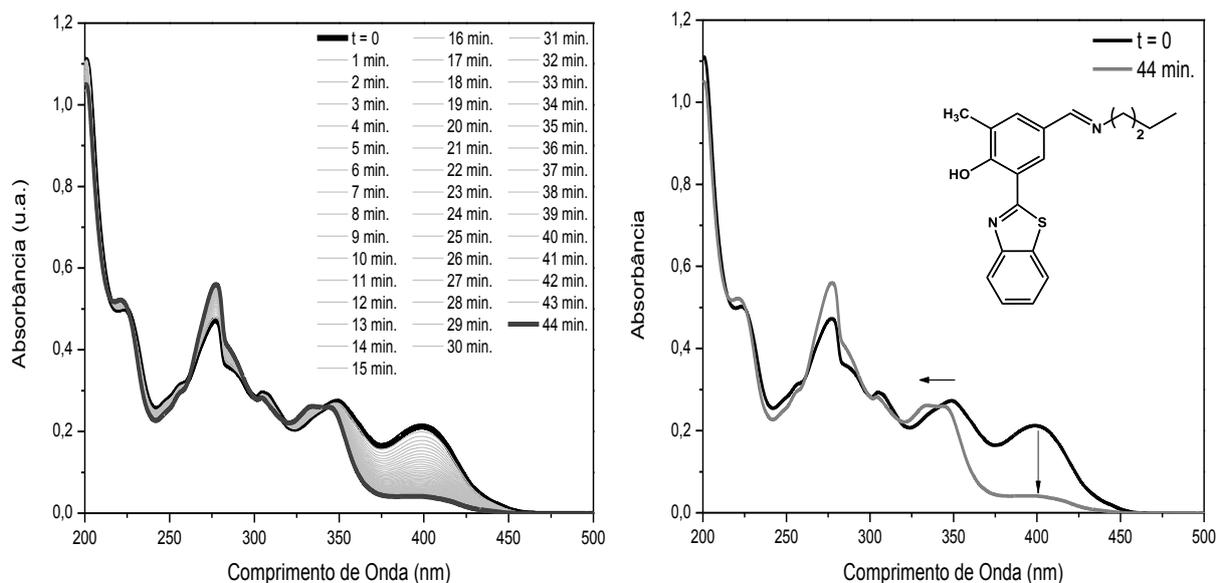
**Figura 28.** Espectro de absorção na região do UV-Vis da imina 34 com acompanhamento de sua hidrólise catalisada por solução aquosa de AcOH (0,1 M) (esquerda). Valores inicial e final da hidrólise onde as setas indicam a variação que ocorre de 0 a 15 min (direita).



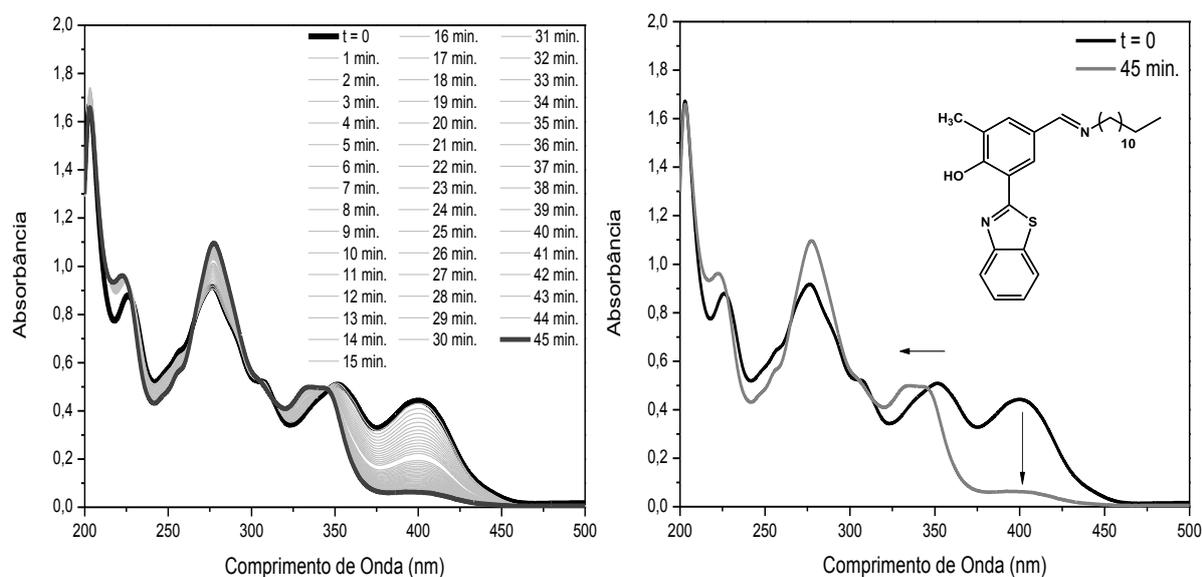
**Figura 29.** Espectro de absorção na região do UV-Vis da imina **35** com acompanhamento de sua hidrólise catalisada por solução aquosa de AcOH (0,1 M) (esquerda). Valores inicial e final da hidrólise onde as setas indicam a variação que ocorre de 0 a 15 min (direita).



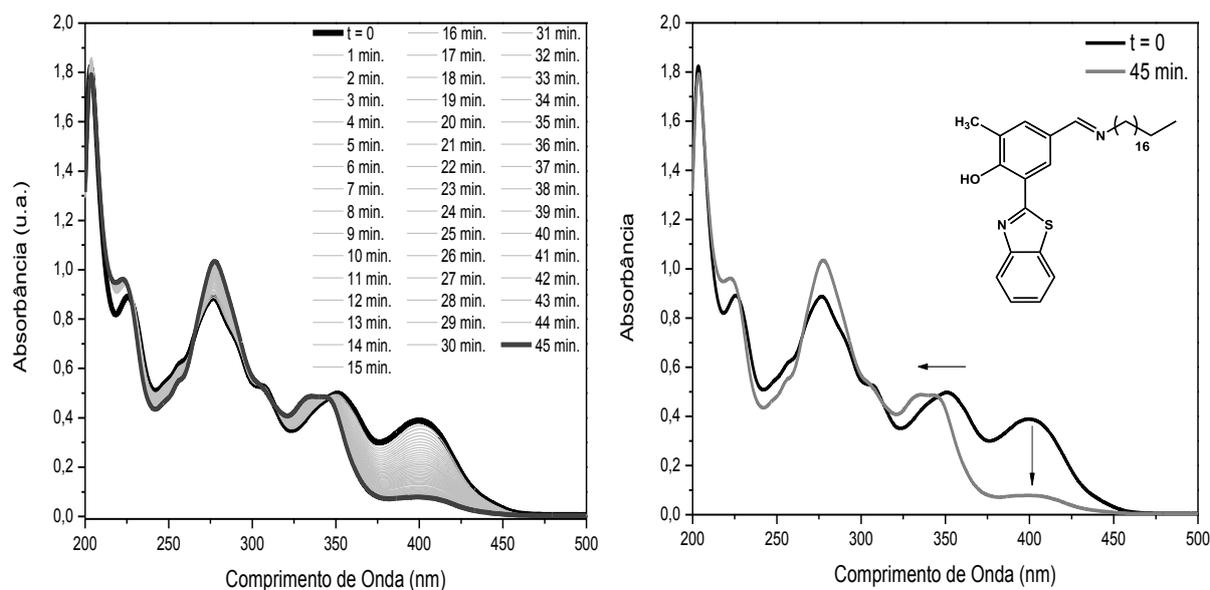
**Figura 30.** Espectro de absorção na região do UV-Vis da imina **36** com acompanhamento de sua hidrólise catalisada por solução aquosa de AcOH (0,1 M) (esquerda). Valores inicial e final da hidrólise onde as setas indicam a variação que ocorre de 0 a 15 min (direita).



**Figura 31.** Espectro de absorção na região do UV-Vis da imina **37** com acompanhamento de sua hidrólise catalisada por solução aquosa de AcOH (0,1 M) (esquerda). Valores inicial e final da hidrólise onde as setas indicam a variação que ocorre de 0 a 44 min (direita).



**Figura 32.** Espectro de absorção na região do UV-Vis da imina **38** com acompanhamento de sua hidrólise catalisada por solução aquosa de AcOH (0,1 M) (esquerda). Valores inicial e final da hidrólise onde as setas indicam a variação que ocorre de 0 a 45 min (direita).



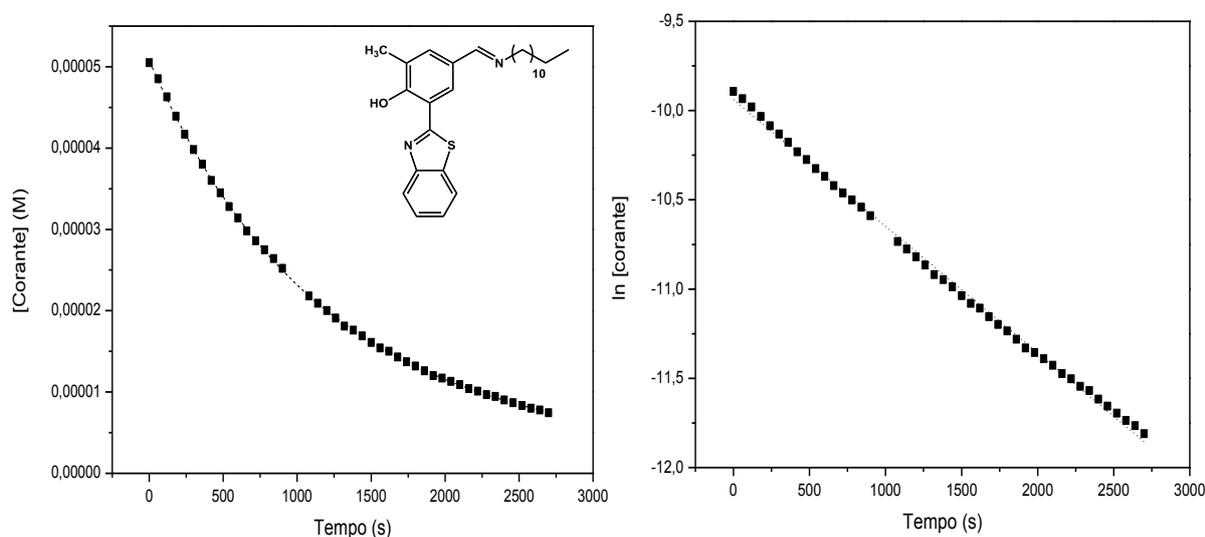
**Figura 33.** Espectro de absorção na região do UV-Vis da imina **39** com acompanhamento de sua hidrólise catalisada por solução aquosa de AcOH (0,1 M) (esquerda). Valores inicial e final da hidrólise onde as setas indicam a variação que ocorre de 0 a 45 min (direita).

Foi feito um estudo da cinética de hidrólise dos compostos **38** e **39**. Para isso, foram calculadas as concentrações, respectivas à imina estudada, a partir da medida da absorbância no comprimento de onda máximo de absorção (400 nm) a cada 60 s, durante 45 min (Figuras 32 e 33). Pelo gráfico da concentração em relação ao tempo, das moléculas estudadas, verifica-se que a concentração decresce de forma exponencial o que indica que se trata de uma reação de primeira ordem (Figuras 34 e 35). Para uma reação de primeira ordem, o gráfico do logaritmo natural da concentração do corante em função do tempo, gera uma reta em que a inclinação corresponde a  $-k$ .<sup>85</sup> A partir da equação da reta, foi possível a obtenção da constante cinética de hidrólise ( $k$ ) e, a partir desta, o cálculo do tempo de meia ( $t_{1/2}$ ), o qual é obtido pela equação (4).

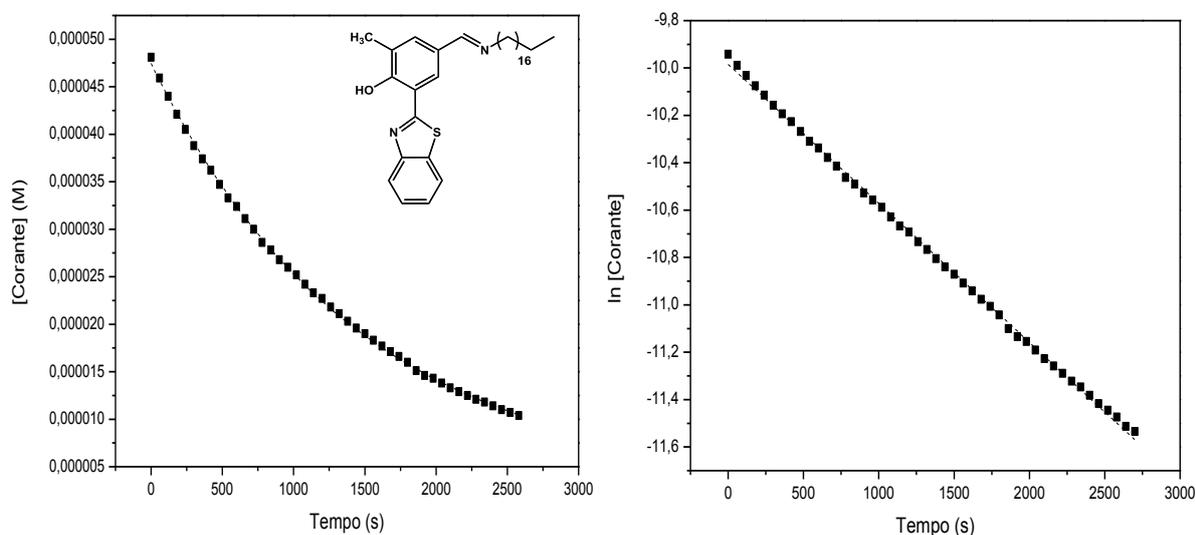
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k} \quad (4)$$

Desta forma, os dados cinéticos foram: constante cinética de hidrólise de  $0,000710 \text{ s}^{-1}$  e  $t_{1/2}=976 \text{ s}$  para a imina **38** e constante cinética de hidrólise de  $0,000587 \text{ s}^{-1}$  e  $t_{1/2}=1180 \text{ s}$  para a imina **39**. Estes resultados sugerem que, para as condições empregadas, o aumento da cadeia alifática, de 12 para 18 carbonos, aumenta a estabilidade da imina formada. Os resultados observados podem ser provavelmente relacionados com fatores de impedimento espacial provenientes do tamanho da cadeia alquílica, que dificultaria a hidrólise, além de uma

possível estruturação supramolecular proveniente das cadeias alquílicas de maior tamanho, levando a uma formação ou agregação do tipo micelar.



**Figura 34.** Gráfico da Concentração da imina **38** em função do tempo da reação de hidrólise (esquerda) e gráfico do logaritmo natural (ln) da concentração do corante em relação ao tempo (direita) ( $R^2 = 0,998$ ).



**Figura 35.** Gráfico da Concentração da imina **39** em função do tempo da reação de hidrólise (esquerda) e gráfico do logaritmo natural (ln) da concentração do corante em relação ao tempo (direita) ( $R^2 = 0,999$ ).

Tendo em vista os resultados de hidrólise observados, é conveniente destacar que as iminas estudadas neste trabalho são estáveis ao armazenamento em estado sólido, comprovado a partir de monitoramento via espectroscopia de absorção na região do IV. Além

disso, ressalta-se que após 1 ano, as iminas contendo 12 e 18 átomos de carbono na cadeia alquílica não apresentaram decomposição em estado sólido.

#### 4.1.3 Aminas Fluorescentes 40-45

Devido a observação de hidrólise nas iminas sintetizadas, e visando o estudo destes compostos como sondas fluorescentes em lipossomas, decidiu-se proceder a redução das mesmas gerando aminas, que são mais estáveis, principalmente em soluções aquosas ou soluções contendo traços de ácido.

A reação para formação das aminas secundárias **40-45** foi realizada através da redução das iminas **34-39** empregando-se o agente redutor borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) em proporção 1:2, respectivamente. Utilizou-se como solvente da reação, isopropanol seco através de peneira molecular, para evitar a hidrólise das iminas devido à presença de traços de água. A mistura reacional foi mantida sob agitação durante 2 horas à temperatura ambiente, sendo o final da reação determinado por CCD, utilizando acetato de etila como eluente. Os rendimentos obtidos após purificação por cromatografia em coluna, utilizando acetato de etila como eluente, foram satisfatórios (~70%) (Figura 36). A comprovação de pureza e a caracterização foi feita pelos métodos espectroscópicos FTIR, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (APT) e espectrometria de massas de alta resolução (HRMS).

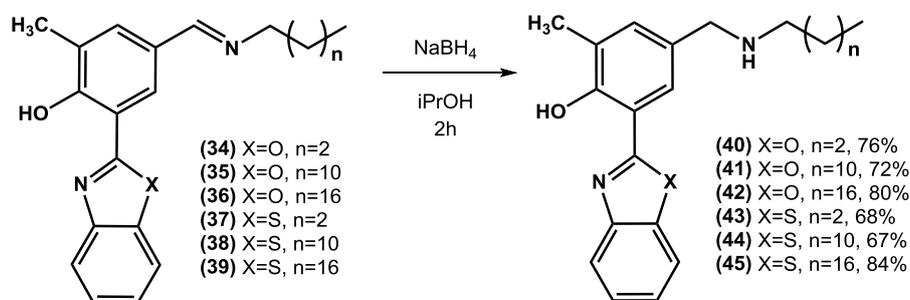
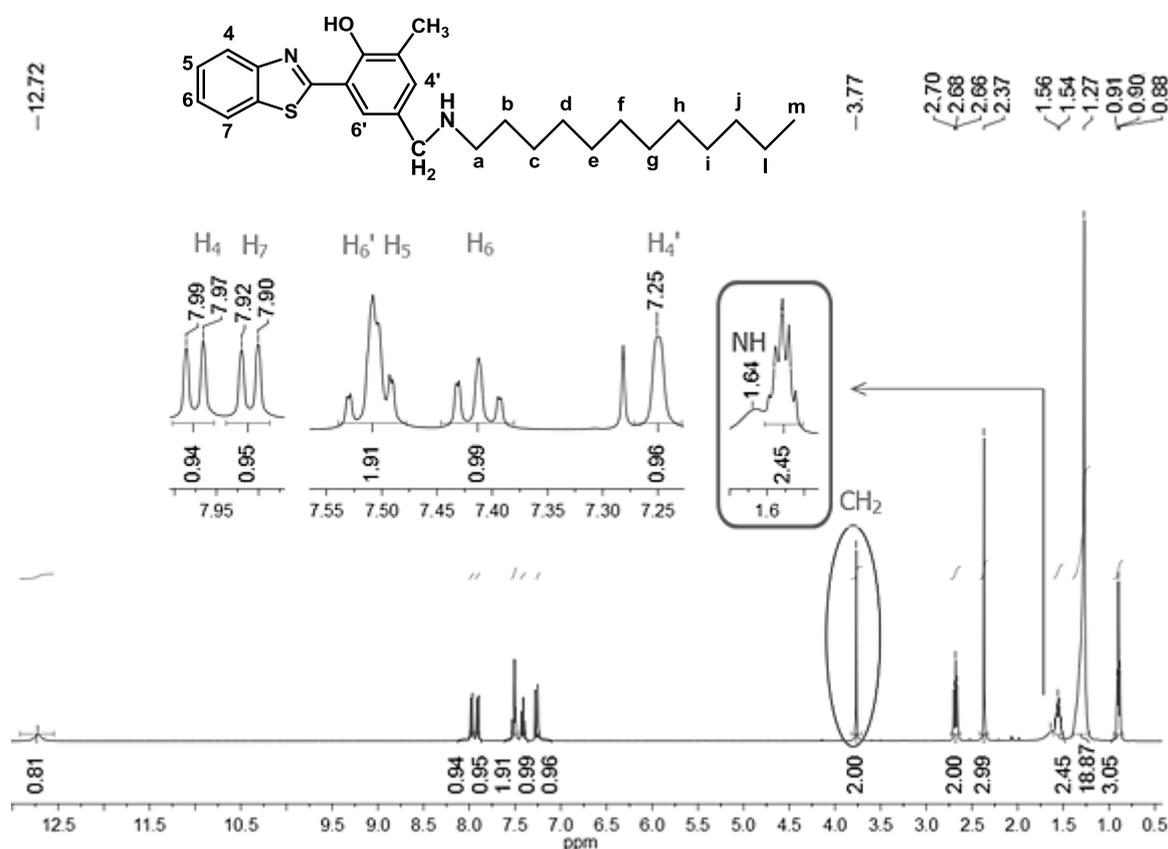


Figura 36. Metodologia sintética de obtenção das aminas **40-45**.

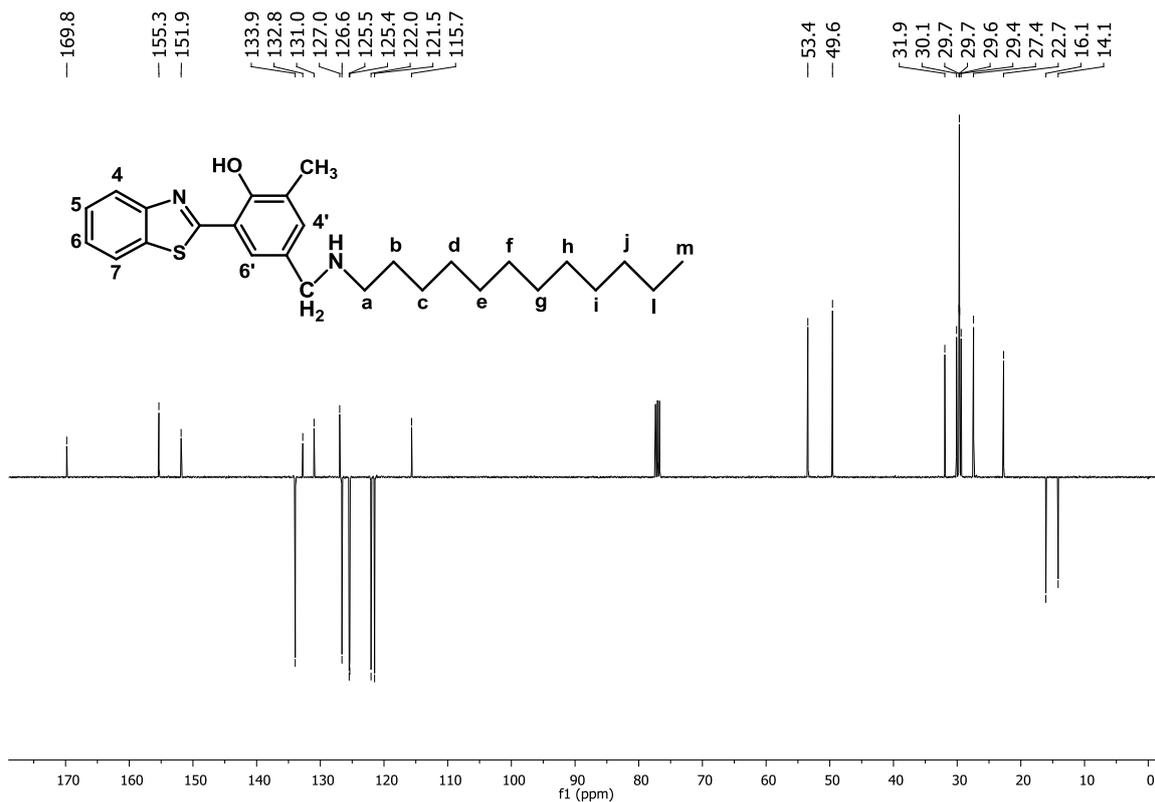
A Figura 37 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amina **44**, em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), com ampliação da região aromática e as atribuições dos hidrogênios da molécula. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e FTIR das aminas secundárias **40-45** encontram-se em anexo (Figuras A23-A40). A presença de um sinal alargado em 1,64 ppm correspondente ao hidrogênio da amina secundária e de um singlete em 3,77 ppm correspondente aos dois hidrogênios do carbono vizinho à amina, confirmam a obtenção do produto desejado. Além disso, a ausência do singlete em 8,22 ppm comprova que toda imina

foi reduzida para formar a respectiva amina secundária. Os 6 hidrogênios da região aromática se encontram entre 7,99-7,25 ppm. Os hidrogênios H<sub>4'</sub> e H<sub>6'</sub> encontram-se mais blindados, pois a amina, que é doadora de elétrons, aumenta a densidade eletrônica destes hidrogênios. Os demais hidrogênios da região alifática H<sub>a</sub>-H<sub>m</sub> apresentam a mesma característica observada na molécula **38**.



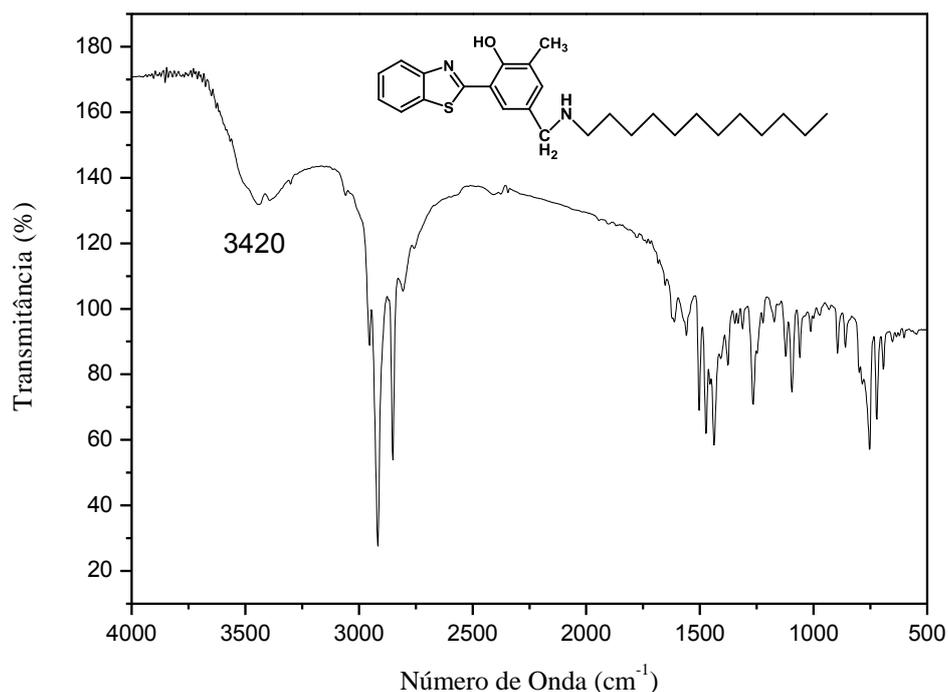
**Figura 37.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) da amina **44**, em CDCl<sub>3</sub>, com ampliação da região aromática.

Na análise através de RMN de <sup>13</sup>C (APT) (Figura 38), verifica-se que os 13 carbonos da região aromática se encontram entre 169,8 e 115,6 ppm. São observados 7 sinais correspondentes aos carbonos quaternários e 6 sinais que se referem aos carbonos C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub> e C<sub>4'</sub> e C<sub>6'</sub>. Os carbonos da região alifática (14 carbonos) se encontram entre 53,4-14,1 ppm. O carbono que aparece em 53,4 ppm corresponde ao CH<sub>2</sub>, vizinho ao N-H da amina. Da mesma forma, em 49,6 ppm, é observado o sinal referente ao carbono C<sub>a</sub>, também vizinho ao N-H. Entre 31,9-22,7 se encontram os carbonos C<sub>b</sub>-C<sub>1</sub>. A metila do anel aromático aparece em 14,14 ppm, enquanto que o CH<sub>3</sub> da cadeia alifática em 16,1 ppm.



**Figura 38.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APT) (100 MHz) da amina **44**, em  $\text{CDCl}_3$ .

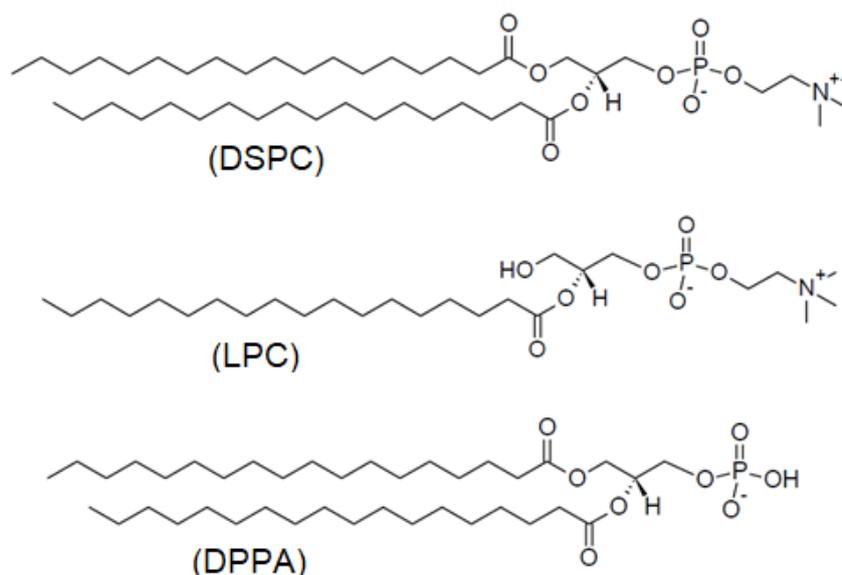
Pelo espectro de infravermelho da molécula **44** (Figura 39) a formação da amina é evidenciada pelo aparecimento de uma banda alargada em  $3420\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento N-H da amina secundária. Além disso, verifica-se o desaparecimento da banda referente ao estiramento C=N da imina em  $1644\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 39.** Espectro de FTIR da amina secundária **44** em ATR.

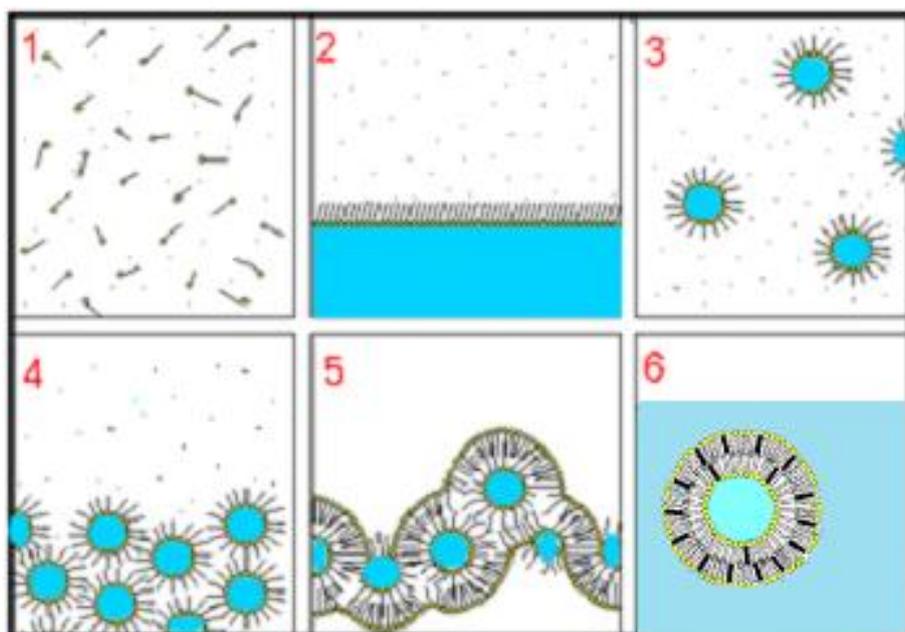
#### 4.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Com o intuito de se avaliar a eficiência dos corantes lipofílicos sintetizados **40-45** como sondas de membrana, procedeu-se a incorporação destas moléculas em lipossomas compostos por fosfatidilcolina (PC) da lecitina de soja, sendo esta, fornecida pela empresa Solae do Brasil S.A. Convém ressaltar que a fosfatidilcolina (PC) compreende uma mistura de fosfolipídios naturais constituídos por uma região hidrofóbica formada por duas longas cadeias de ácidos graxos, que podem conter uma ou mais insaturações. Estas são esterificadas ao primeiro e segundo grupo hidroxila do glicerol. O terceiro grupo do glicerol se encontra ligado a um grupo fosfato o qual, por sua vez, é esterificado com a colina, constituindo assim a extremidade polar da molécula. O composto apresenta aspecto pastoso, amarelado e higroscópico. O grau de pureza da fosfatidilcolina utilizada é de 95%, sendo os 5% restantes referentes à lisofosfatidilcolina (LPC) e ao ácido fosfátídico (DPPA) (Figura 40).<sup>39</sup> Uma estrutura característica está representada na Figura 40.<sup>39,41,86</sup>



**Figura 40.** Estruturas moleculares da 1,2-diastearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC), L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina (LPC) e 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfato (DPPA). (Adaptado de Mertins *et al.*<sup>39</sup>)

Os lipossomas foram obtidos pelo método de evaporação em fase reversa. Esta técnica é relativamente simples e, possui a vantagem de incorporação de fármacos, proteínas, ácidos nucleicos e outros reagentes bioquímicos.<sup>87</sup> A Figura 41 apresenta um diagrama esquemático simplificado para a formação de lipossomas por este método. A primeira etapa consiste na dissolução dos fosfolipídios de fosfatidilcolina em clorofórmio. Os corantes lipofílicos **40-45** foram adicionados nesta etapa, em que é formada a solução orgânica em clorofórmio. Em seguida, uma solução tampão fosfato salino (pH 7,2) foi adicionada para formação de duas fases imiscíveis. A partir disso, ocorre a deposição da fosfatidilcolina na interface clorofórmio/tampão, pois a extremidade polar da fosfatidilcolina é atraída pela fase aquosa. Esta suspensão foi sonicada em banho de ultrassom, resultando em uma emulsão onde a fosfatidilcolina se estrutura para formação de micelas reversas. Nesta etapa ocorre a incorporação das amins sintetizadas. A evaporação do clorofórmio em evaporador rotatório resulta na formação de um organogel. A adição de solução tampão PBS e agitação vigorosa em vortex causam um colapso da fase gel. Algumas micelas se desintegram e permitem a formação de bicamadas lipídicas em volta das micelas resultantes, fazendo com que vesículas em forma de lipossomas sejam formadas, o que é caracterizado por uma solução homogênea e leitosa. Por fim, estes foram submetidos à extrusão com filtros de membrana de nylon com poros 0,45  $\mu\text{m}$  para remoção de grandes agregados e obtenção de LUVs de tamanho uniforme.<sup>39,83</sup>



**Figura 41.** Diagrama esquemático da formação de lipossomas de fosfatidilcolina pelo método de evaporação em fase reversa. (Adaptado de Mertins *et al.*<sup>48</sup>)

Foram preparados dois tipos de lipossomas sendo um deles lipossomas de fosfatidilcolina (PC) de concentração  $6,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , na ausência (puros) e presença das amins (**40-45**), estando estas em uma concentração aproximada de  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A composição e concentração dos lipossomas de fosfatidilcolina, assim como a concentração dos corantes **40-45** incorporados, encontram-se na Tabela 3. Além disso, foram preparados lipossomas de PC contendo o anfifílico glicoconjugado  $\text{C}_{22}\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$  ( $\text{C}_{22}\text{PC}$ ) de concentração  $6,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ambos em uma proporção de 1:1 (m/m). Da mesma forma, foram preparados na ausência (puros) ou contendo os corantes lipofílicos **40-45** ( $0,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A composição e concentração dos lipossomas de  $\text{C}_{22}\text{PC}$ , assim como a concentração dos corantes **40-45** incorporados, encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 3.** Composição e concentração dos lipossomas de fosfatidilcolina.

<b>Amostra</b>	<b>Composição</b>	<b>[Lipossoma] (mg·mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>[Corante] no lipossoma (mg·mL<sup>-1</sup>)</b>
PC	Fosfatidilcolina	6,0	-
PC@40	Fosfatidilcolina + 40	6,0	0,43
PC@41	Fosfatidilcolina + 41	6,0	0,35
PC@42	Fosfatidilcolina + 42	6,0	0,35
PC@43	Fosfatidilcolina + 43	6,0	0,25
PC@44	Fosfatidilcolina + 44	6,0	0,35
PC@45	Fosfatidilcolina + 45	6,0	0,35

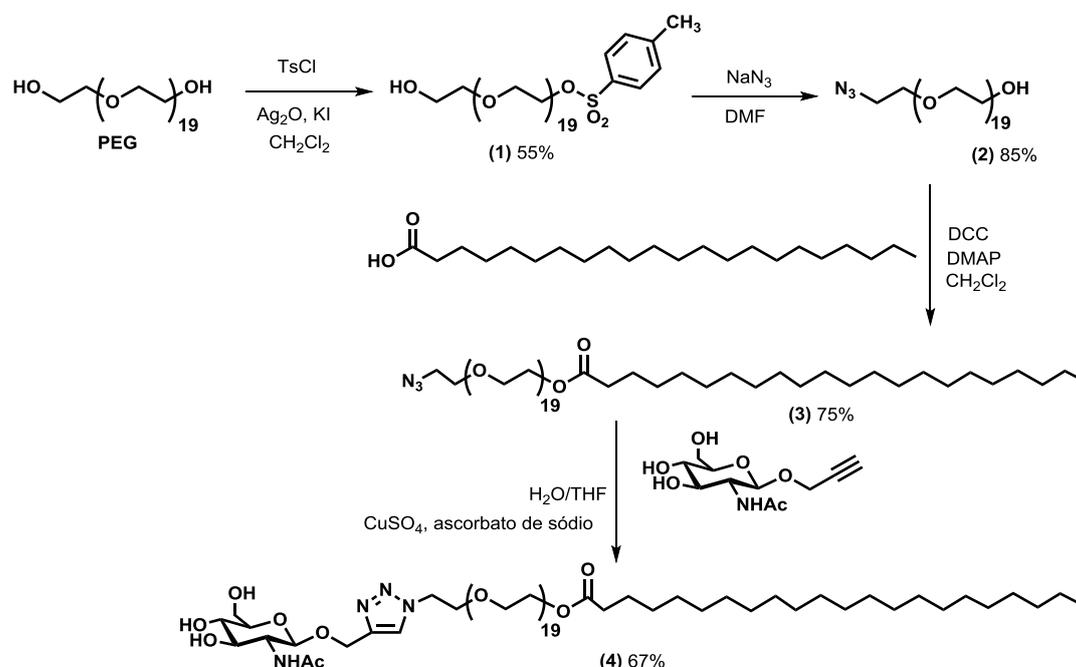
**Tabela 4.** Composição e concentração dos lipossomas de fosfatidilcolina contendo o anfifílico glicoconjugado C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc.

<b>Amostra</b>	<b>Composição</b>	<b>[Lipossoma] (mg·mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>[Corante] no lipossoma (mg·mL<sup>-1</sup>)</b>
C <sub>22</sub> PC	Fosfatidilcolina+C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc (1:1)	6,0	-
C <sub>22</sub> PC@40	Fosfatidilcolina+C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc+40	6,0	0,6
C <sub>22</sub> PC@41	Fosfatidilcolina+C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc+41	6,0	0,6
C <sub>22</sub> PC@42	Fosfatidilcolina+C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc+42	6,0	0,6
C <sub>22</sub> PC@43	Fosfatidilcolina+C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc+43	6,0	0,6
C <sub>22</sub> PC@44	Fosfatidilcolina+C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc+44	6,0	0,6
C <sub>22</sub> PC@45	Fosfatidilcolina+C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc+45	6,0	0,6

Anfifílicos glicosilados têm sido muito estudados devido à possibilidade de se auto-organizarem em diversas nanoestruturas e servirem como uma função bioativa, dando a estas estruturas diversas aplicações como o transporte de fármacos a sítios de reconhecimento específicos por receptores.<sup>88,89</sup> A funcionalização de lipossomas de fosfatidilcolina com o glicoconjugado C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc, foi proposta com o intuito de se possibilitar o aumento da especificidade destes sistemas para a interação proteína-carboidrato através de ligações com proteínas específicas denominadas lectinas. Estudos demonstraram que o lipossoma de C<sub>22</sub>PC foi efetivamente reconhecido nos sítios de ligação da aglutinina de germe de trigo (WGA).<sup>37,91</sup> Desta forma, tem-se que estes sistemas possuem potencial aplicação em estudos de interação

entre o carboidrato N-acetilglucosamina (GlcNAc) - o qual se encontra acoplado na superfície do lipossoma - com proteínas integrais de membrana, como no caso de lectinas do tipo C. Estas possuem especificidades para diferentes carboidratos, incluindo manose, fucose, N-acetilglucosamina e  $\beta$ -glicanos. Alguns destes receptores atuam na fagocitose de microrganismos, ao passo que outros têm funções de sinalização que induzem respostas protetoras das células do hospedeiro aos microrganismos.<sup>90</sup>

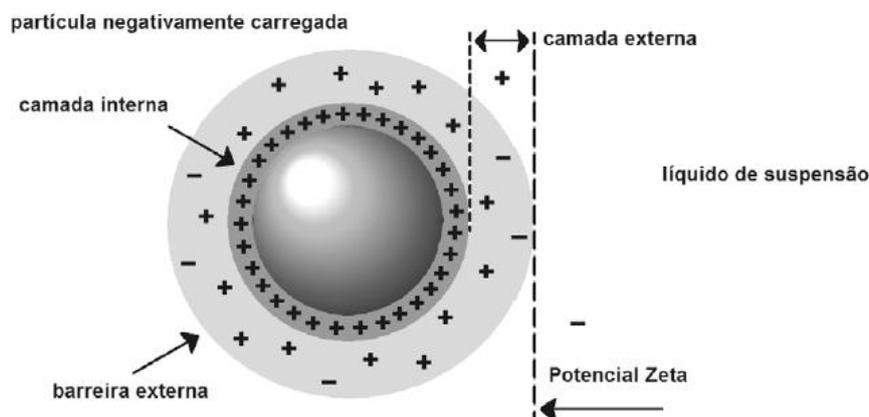
O anfifílico glicoconjugado C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc foi fornecido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Alexandre Gonçalves Dal-Bó (UNESC), sendo este obtido através de uma série de etapas, a partir de procedimentos já descritos na literatura (Figura 42).<sup>37,91</sup> Esta síntese, esquematizada na Figura 42, é iniciada com monotosilação do PEG<sub>900</sub> na presença de óxido de prata (Ag<sub>2</sub>O) e iodeto de potássio (KI), através de um método reportado por Bouzide et. al., que permite monotosilação de dióis simétricos<sup>92</sup>, o que fornece PEG sulfonado em bons rendimentos (55%). Em seguida ocorre a substituição do grupo tosila na presença de azida de sódio. A introdução do grupo docosanóico ocorre através de uma etapa de esterificação promovida por DCC (diciclohexilcarbodiimida). Por fim, ocorre a introdução de  $\beta$ -glicosídeos de N-acetilglucosamina na cabeça polar do surfactante por uma cicloadição Huisgen catalisada por cobre. Esta reação ocorreu em temperatura de 40°C em sistema catalítico de sulfato de cobre/ascorbato de sódio em uma mistura de água/THF para garantir uma boa solubilidade do conjugado anfifílico glicosilado.<sup>37,91</sup>



**Figura 42.** Diagrama esquemático da síntese do glicoconjugado C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc. (Adaptado de Micheletto *et al.*<sup>37</sup> e Dal-Bó *et al.*<sup>91</sup>)

No presente trabalho, os lipossomas foram caracterizados por: potencial zeta (PZ) e espalhamento de luz dinâmico (DLS). Estas análises foram realizadas pelo grupo de pesquisas do Professor Doutor Alexandre Gonçalves Dal-Bó – UNESC (Universidade do Extremo Sul Catarinense), Santa Catarina.

A análise do potencial zeta pode ser usada para prever e controlar a estabilidade dos sistemas coloidais.<sup>93</sup> Estes quando em suspensão aquosa apresentam comportamentos diferentes no que se refere a fenômenos de agregação. A presença de carga superficial nestes sistemas afeta a distribuição de íons que se encontram na interface entre a superfície da partícula e o meio de suspensão. Isto resulta em um acúmulo de íons de carga oposta à carga da superfície, na região que cerca a partícula. Estes íons, por sua vez, formam uma camada elétrica que reveste a partícula e é dividida em uma camada interna (íons fortemente ligados às partículas) e uma camada externa (íons difundem e estão fracamente ligados). A camada externa forma uma barreira de proteção em que a partícula e os íons apresentam relativa estabilidade iônica (Figura 43). Desta forma, potencial zeta é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada externa.<sup>39</sup>



**Figura 43.** Representação da distribuição de íons em torno de uma partícula esférica negativamente carregada dispersa em líquido ionizado. (Fonte: Mertins *et al.*<sup>39</sup>).

Os valores elevados de potencial zeta indicam vesículas estáveis em suspensão devido à repulsão entre partículas causadas pela carga superficial, ou seja, partículas que apresentem valores altamente positivos ( $\sim +30$  mV) ou altamente negativos ( $\sim -30$  mV), irão se repelir o que evita processos de agregação. Para o caso em que os valores de potencial zeta são muito baixos a ausência de carga superficial favorece interações entre as partículas, o que pode

promover processos de floculação ou agregação. O valor de 0 mV é considerado de maior instabilidade, e é chamado de ponto isoeletrico.<sup>39</sup>

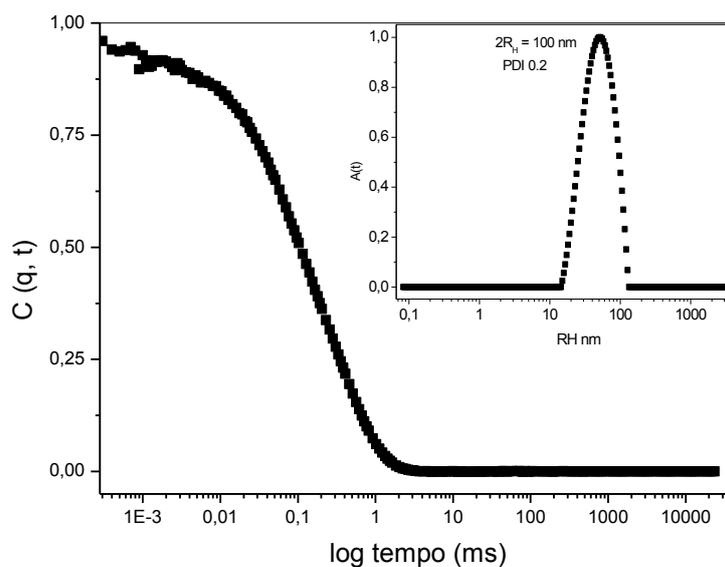
O potencial zeta negativo das vesículas de PC e C<sub>22</sub>PC é devido à presença de ácido fosfatídico a 5% e fosfato de fosfatidilinositol na sua composição, resultando em uma superfície carregada negativamente.<sup>94</sup> Além disso, a presença do anfifílico glicoconjugado na composição do lipossoma de C<sub>22</sub>PC proporciona um impedimento estérico que também evita os fenômenos de agregação. O potencial zeta negativo encontrado para C<sub>22</sub>PC na ausência (-19,0±0,8 mV, respectivamente) e na presença das aminas sugere uma estabilidade coloidal relativa contra processos de agregação. Além disso, a suspensão lipossômica foi submetida à análise de potencial zeta após permanecer durante 30 dias à temperatura ambiente e, os resultados mostraram pouca agregação, o que indica que o sistema se mostrou estável durante este período, conforme os resultados apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Valores de Potencial Zeta (PZ) dos lipossomas C<sub>22</sub>PC na ausência e presença das aminas e PC na ausência das aminas, logo após preparação e após 30 dias em temperatura de 25°C.

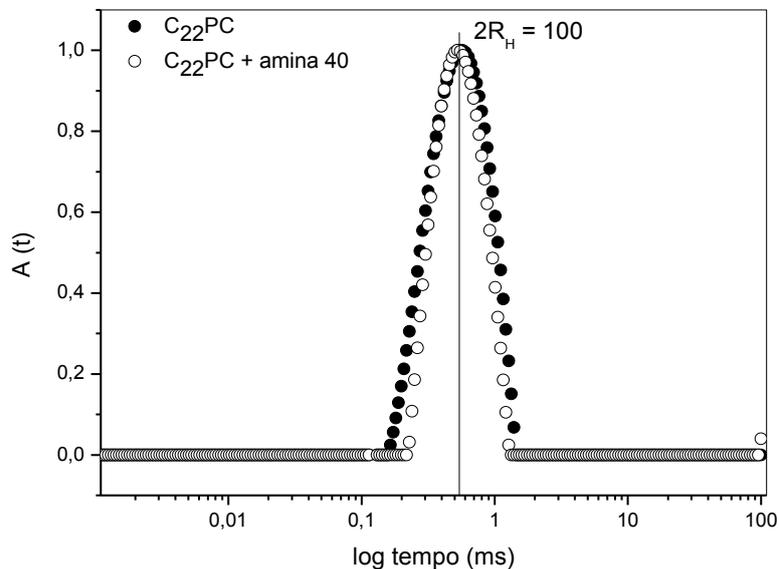
Amostra	[Lipossoma] (mg·mL <sup>-1</sup> )	[Corante]	PZ (mV)	PZ <sup>a</sup> (mV)
PC	6,0	-	-30,0±0,7	-25,0±0,2
C <sub>22</sub> PC			-19,0±0,8	-16,0±0,5
C <sub>22</sub> PC@40	6,0	0,6	-21,3±0,8	-20,9±0,6
C <sub>22</sub> PC@41			-37,0±0,6	-33,0±0,7
C <sub>22</sub> PC@42			-20,3±0,5	-15,3±0,3
C <sub>22</sub> PC@43			-24,0±0,4	-24,5±0,3
C <sub>22</sub> PC@44			-13,2±0,7	-
C <sub>22</sub> PC@45			-20,7±0,6	-21,2±0,3

<sup>a</sup>Valores de Potencial Zeta (PZ) das vesículas, na ausência e presença das aminas após 30 dias à 25°C.

Os lipossomas obtidos neste trabalho, por meio da auto-associação da mistura de fosfatidilcolina (PC) e do anfifílico glicoconjugado C<sub>22</sub>PEGGlcNAc na ausência e presença das aminas **40-45** apresentaram um diâmetro médio de 100 nm analisados por DLS, conforme as Figuras 44 e 45.



**Figura 44.** Função de correlação  $C(q,t)$  adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta=90^\circ$ , para uma solução de  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  da vesícula mista de  $C_{22}\text{PC}$  na ausência de amina a  $25^\circ\text{C}$ , em solução tampão fosfato salino PBS, 10mM, pH 7,2. A Figura inserida mostra a respectiva distribuição de  $R_H$ , em volume total.



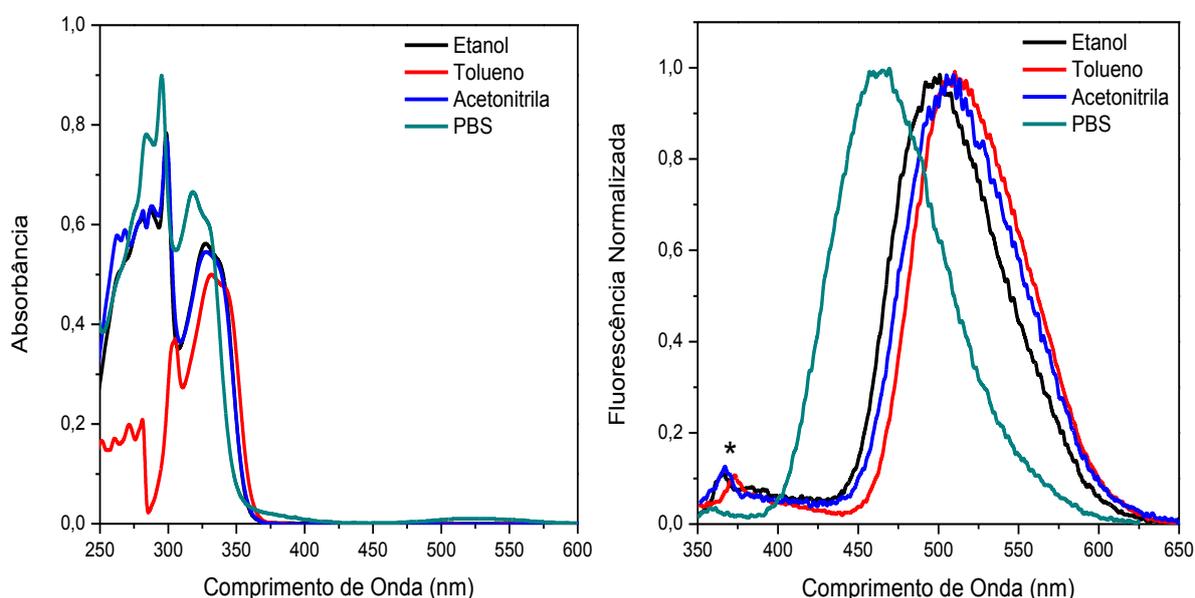
**Figura 45.** Distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$  obtida das funções de correlação temporal adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta=90^\circ$ , para soluções de  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  das vesículas mistas de  $C_{22}\text{PC}$  na ausência de amina ( $\bullet$ ) e na presença da amina 40 ( $\circ$ ) à  $25^\circ\text{C}$ , em solução tampão fosfato salino PBS, 10mM, pH 7,2.

## 4.3 ESTUDO FOTOFÍSICO

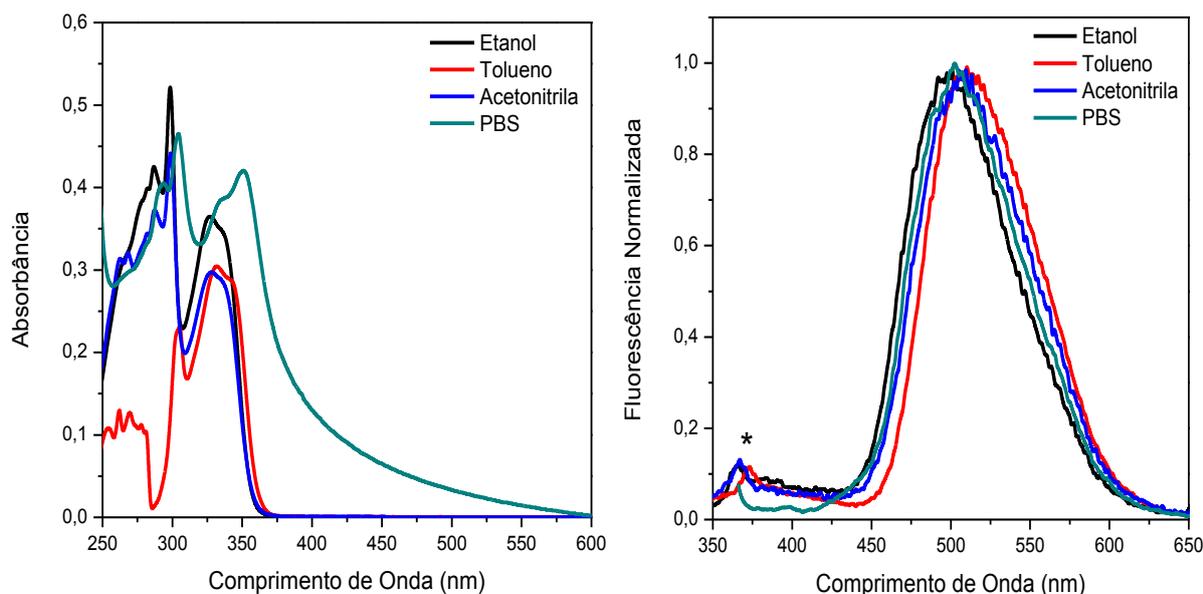
### 4.3.1 Compostos 40-45

Inicialmente, foi realizado o estudo fotofísico em solução, das aminas sintetizadas **40-45**, utilizando como solventes etanol ( $\epsilon=24,6$ ), tolueno ( $\epsilon=2,38$ ) e acetonitrila ( $\epsilon=37,5$ ), os quais apresentam diferentes constantes dielétricas ( $\epsilon$ ). Além disso, com o intuito de, posteriormente, se estudar a incorporação das moléculas sintetizadas nos lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC, também foi realizado o estudo fotofísico das aminas **40-45** em solução de tampão fosfato PBS.

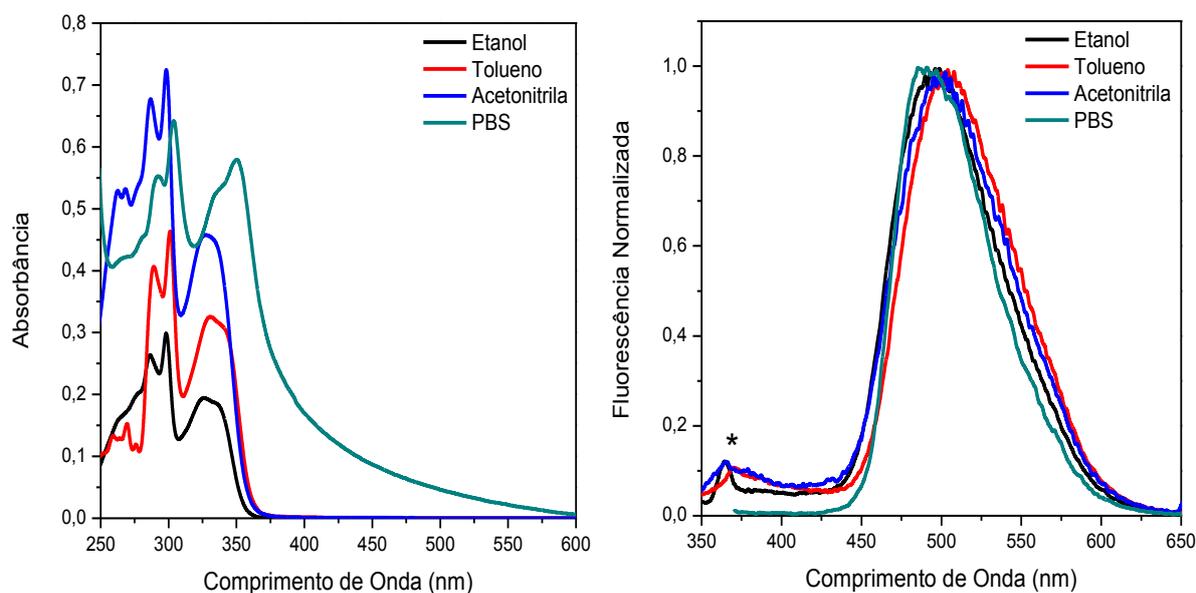
As Figuras 46-51 apresentam os espectros de absorção na região do UV-Vis e de emissão de fluorescência normalizados das moléculas **40-45**, os quais foram obtidos utilizando o comprimento de onda do máximo de absorção como comprimento de onda de excitação. Os estudos fotofísicos foram realizados à temperatura ambiente (25°C), em uma concentração de aproximadamente 10<sup>-5</sup> M. A Tabela 6 apresenta os resultados originados a partir deste estudo. Cabe ressaltar que nas Figuras 46, 47 e 49 para os espectros de absorção em tolueno, verifica-se uma queda drástica na intensidade da banda de absorção, localizada em aproximadamente 303 nm, o que pode estar relacionado com a troca de lâmpada do equipamento. Além disso, o asterisco é referente ao sinal Raman do solvente.



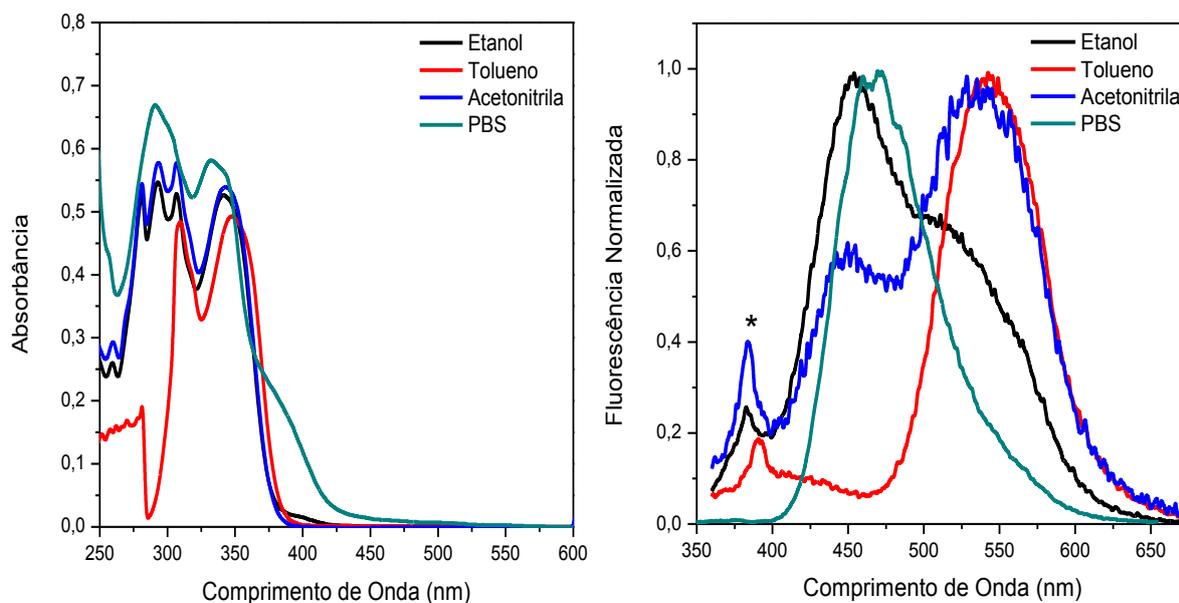
**Figura 46.** Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) normalizados da molécula **40** ( $\sim 10^{-5}$  M). ( $\lambda_{exc}=328$  nm para etanol e acetonitrila,  $\lambda_{exc}=332$  nm para tolueno e  $\lambda_{exc}=318$  nm para tampão PBS, pH 7,2).



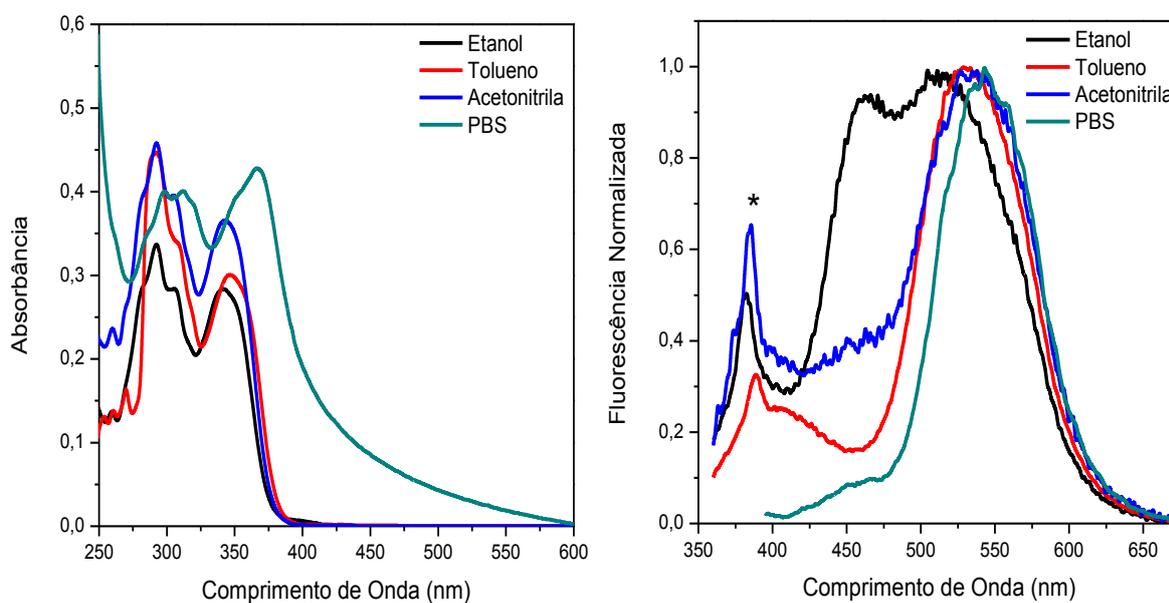
**Figura 47.** Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) normalizados da molécula **41** ( $\sim 10^{-5}$  M). ( $\lambda_{exc}=327$  nm para etanol,  $\lambda_{exc}=332$  nm para tolueno,  $\lambda_{exc}=328$  nm para acetonitrila e  $\lambda_{exc}=350$  nm para tampão PBS, pH 7,2).



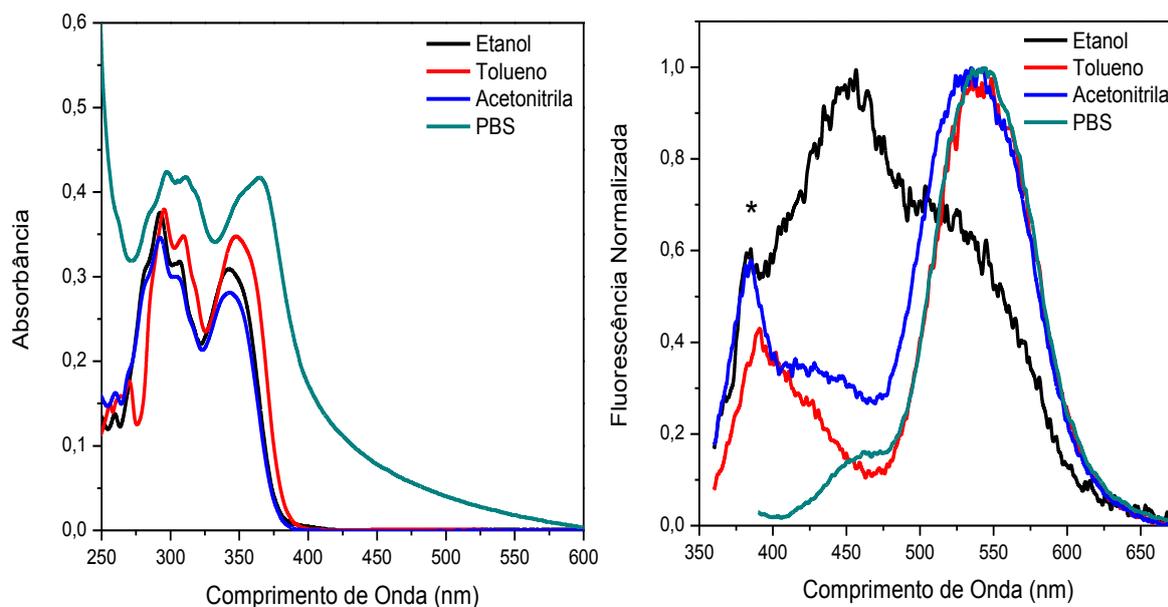
**Figura 48.** Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) normalizados da molécula **42** ( $\sim 10^{-5}$  M). ( $\lambda_{exc}=327$  nm para etanol e acetonitrila,  $\lambda_{exc}=332$  nm para tolueno e  $\lambda_{exc}=350$  nm para tampão PBS, pH 7,2).



**Figura 49.** Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) normalizados da molécula **43** ( $\sim 10^{-5}$  M). ( $\lambda_{exc}=342$  nm para etanol,  $\lambda_{exc}=348$  nm para tolueno,  $\lambda_{exc}=343$  nm para acetonitrila e  $\lambda_{exc}=332$  nm para tampão PBS, pH 7,2).



**Figura 50.** Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) normalizados da molécula **44** ( $\sim 10^{-5}$  M). ( $\lambda_{exc}=341$  nm para etanol,  $\lambda_{exc}=347$  nm para tolueno,  $\lambda_{exc}=342$  nm para acetonitrila e  $\lambda_{exc}=367$  nm para tampão PBS, pH 7,2).



**Figura 51.** Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) normalizados da molécula **45** ( $\sim 10^{-5}$  M). ( $\lambda_{exc}=342$  nm para etanol e acetonitrila,  $\lambda_{exc}=348$  nm para tolueno e  $\lambda_{exc}=365$  nm para tampão PBS, pH 7,2).

Para os derivados do benzoxazol (**40-42**), o comprimento de onda do máximo de absorção se encontra em torno de 332 nm para o solvente que apresenta a menor constante dielétrica (tolueno). Verifica-se uma variação muito pequena no  $\lambda_{abs}$  com o aumento da constante dielétrica do meio (diminuição de aproximadamente 5 nm) e praticamente nenhuma variação entre os solventes etanol e acetonitrila. O mesmo pode ser observado para os derivados do benzotiazol (**43-45**), onde o comprimento de onda do máximo de absorção se encontra em torno de 348 nm para o tolueno e aproximadamente 342 nm, para os solventes etanol e acetonitrila. Os valores dos coeficientes de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) para todas as absorções são característicos para transições eletrônicas do tipo  ${}^1\pi-\pi^*$ . Com base na localização dos máximos de absorção, observa-se que não houve uma variação solvatocrômica significativa nestes compostos no estado fundamental. Para a molécula **43** em solução de tampão PBS, verifica-se uma banda de menor intensidade em 377 nm, provavelmente devido à forma aniônica do composto **43**. Tanto para os derivados do benzoxazol quanto derivados do benzotiazol em PBS, é verificado que para as moléculas que possuem 4 carbonos na cadeia alifática (**40** e **43**), há um deslocamento hipsocrômico em relação aos demais solventes orgânicos (10-16 nm). No entanto, para moléculas que possuem 12 e 18 átomos de carbono na cadeia alifática, verifica-se um deslocamento batocrômico considerável em relação aos outros solventes orgânicos (17-26 nm). Além disso, pode ser

observado o fenômeno de espalhamento nos espectros de absorção destas aminas (**41**, **42**, **44** e **45**), o que pode ser indício de possíveis formações de estruturas supramoleculares (agregados) quando em solução de tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,2), favorecidas pela presença de cadeias alquílicas longas, que são altamente hidrofóbicas.

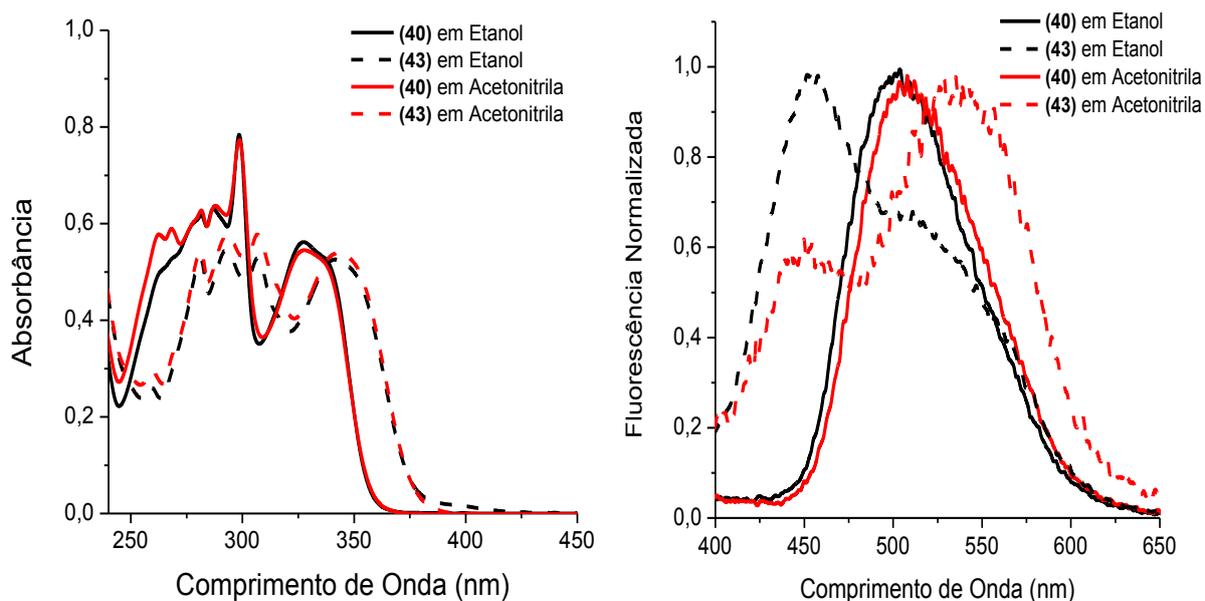
Com relação aos espectros de emissão de fluorescência, quando considerados os comprimentos de onda de emissão de fluorescência verifica-se que não existe uma tendência na variação do comprimento de onda com o aumento da constante dielétrica do solvente. Pode-se observar para as moléculas **40-42** em solventes orgânicos uma emissão majoritária, que junto com os valores obtidos pelo cálculo do Deslocamento de Stokes ( $\Delta\lambda_{ST}$ ), pode-se atribuir ao processo de ESIPT. No entanto, para as moléculas **43-45** são observadas duas bandas de emissão de fluorescência. Uma delas localizada em menor comprimento de onda (~400-460 nm), atribuída à emissão normal e a outra, a maiores comprimentos de onda (~510-545 nm), com grande deslocamento de Stokes, referente ao processo de ESIPT. Como este tipo de mecanismo é dependente da polaridade do meio, no caso de solventes próticos e polares, como o etanol, há maior probabilidade de ocorrerem ligações de hidrogênio intermoleculares entre as moléculas de solvente e a hidroxila fenólica, favorecendo a emissão normal. Da mesma forma que o observado nos espectros de absorção, verifica-se que para as moléculas **40** e **43** em solução de PBS há predominância da emissão normal, enquanto que para as moléculas que possuem 12 e 18 átomos de carbono na cadeia alifática (**41**, **42**, **44** e **45**), há predominação da emissão por ESIPT, com grande deslocamento de Stokes, o que corrobora com a suposição apresentada anteriormente de formação de agregados destas moléculas quando em solução de PBS.

A perda de energia no estado excitado pelo processo de ESIPT e por outros processos não-radiativos, pode explicar os baixos valores de rendimento quântico de fluorescência apresentados pelas moléculas nos solventes estudados. Entretanto, o grande deslocamento de Stokes presente nestas estruturas, minimiza a auto-absorção (efeito de filtro interno) e compensa os baixos valores de rendimento quântico observados.

**Tabela 6.** Resultados do estudo fotofísico para as aminas **40-45**, onde  $\lambda_{\text{abs}}$  e  $\lambda_{\text{em}}$  são os comprimentos de onda de absorção e emissão, respectivamente, apresentados em nm,  $\Delta\lambda_{\text{ST}}$  é o deslocamento de Stokes (em nm),  $\epsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar (em  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) e  $\Phi_f$  é o rendimento quântico de emissão de fluorescência.

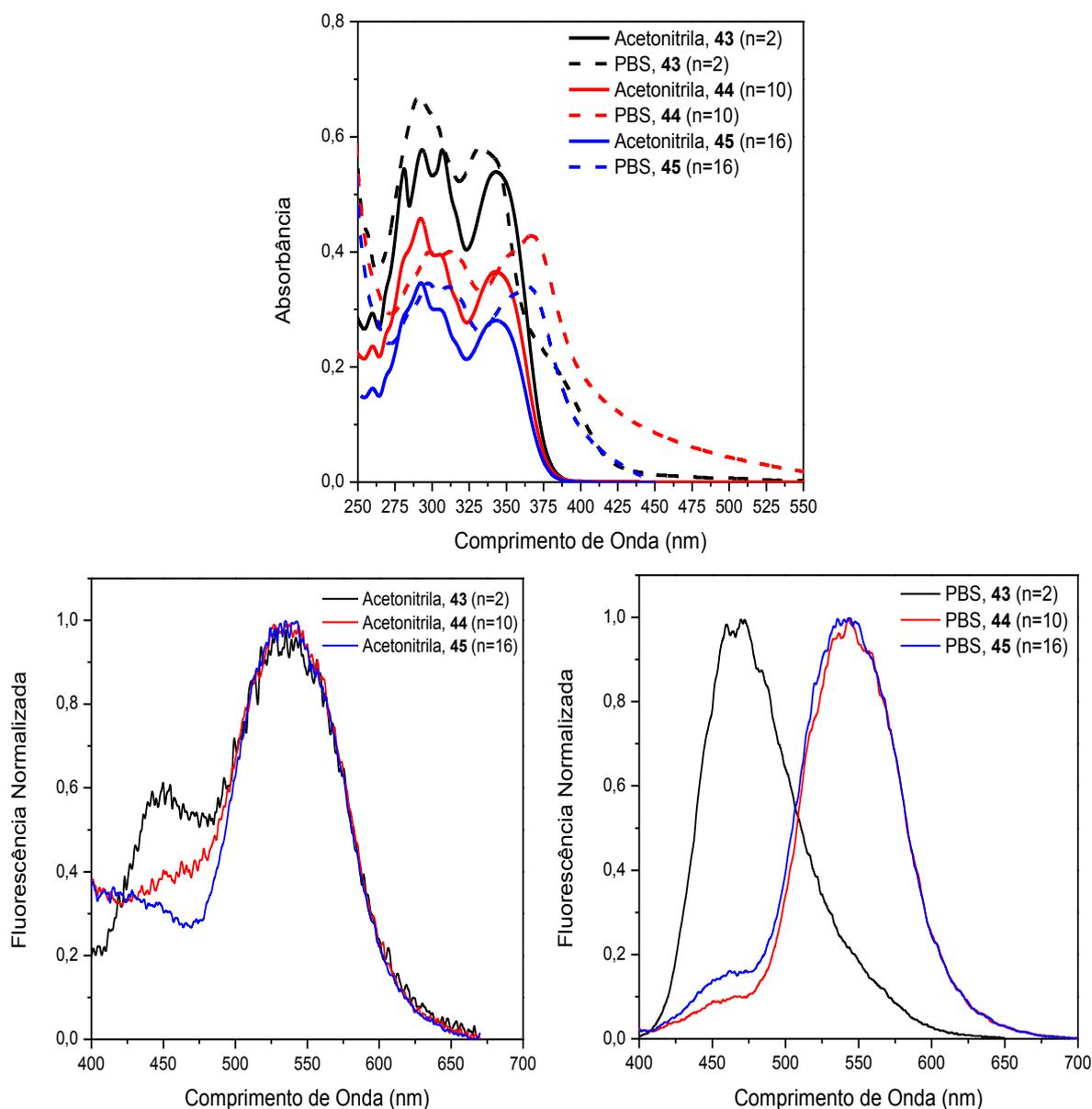
Corante	Solvente	$\lambda_{\text{abs}}$	$\lambda_{\text{em}}$	$\Delta\lambda_{\text{ST}}$	$\epsilon$	$\Phi_f$
<b>40</b>	Tolueno	332	510	178	11537	0,008
	Etanol	328	498	170	12982	0,009
	Acetonitrila	328	507	179	12625	0,013
	Tampão fosfato (PBS)	318	464	146	15344	0,069
<b>41</b>	Tolueno	332	510	178	13038	0,009
	Etanol	327	498	171	15485	0,015
	Acetonitrila	328	508	180	12658	0,017
	Tampão fosfato (PBS)	350	502	152	17806	0,094
<b>42</b>	Tolueno	332	504	172	11498	0,009
	Etanol	327	497	170	6864	0,011
	Acetonitrila	327	499	172	16063	0,022
	Tampão fosfato (PBS)	350	492	142	20278	0,144
<b>43</b>	Tolueno	348	412/544	64/196	11932	0,010
	Etanol	342	454/506	112/164	12802	0,027
	Acetonitrila	343	450/534	107/191	13140	0,019
	Tampão fosfato (PBS)	332/377	465	133/88	14082	0,087
<b>44</b>	Tolueno	347	404/530	57/183	9870	0,011
	Etanol	341	464/512	123/171	9285	0,017
	Acetonitrila	342	455/535	113/193	11980	0,016
	Tampão fosfato (PBS)	367	462/544	95/177	13961	0,099
<b>45</b>	Tolueno	348	403/540	55/192	14337	0,015
	Etanol	342	452/510	110/168	10120	0,020
	Acetonitrila	342	420/535	78/193	11406	0,017
	Tampão fosfato (PBS)	365	465/542	100/177	13655	0,148

A Figura 52 apresenta uma comparação entre as moléculas **40** e **43** através do espectro de absorção na região do UV-Vis e espectro normalizado de emissão de fluorescência.



**Figura 52.** Espectros de absorção no UV-Vis (esquerda) e espectros normalizados de emissão de fluorescência (direita) das moléculas **40** ( $\sim 10^{-5}$  M) e **43** ( $\sim 10^{-5}$  M) em etanol e acetonitrila.

Pela Figura 52, verifica-se que as aminas derivadas do benzotiazol (**43-45**), apresentam um deslocamento batocrômico (para o vermelho) em relação às aminas derivadas do benzoxazol (**40-42**). Isso pode ser explicado pela melhor deslocalização eletrônica permitida pelo átomo de enxofre quando comparado ao oxigênio.<sup>22</sup> Além disso, pelo espectro de emissão de fluorescência, verifica-se dupla emissão de fluorescência para a molécula **43**, tanto em etanol quanto em acetonitrila, referentes à emissão normal (450 nm acetonitrila e 454 nm etanol) e emissão por ESIPT (534 nm acetonitrila e 506 nm etanol), enquanto que a molécula **40** apresenta somente uma banda de emissão referente ao mecanismo de ESIPT, tanto para o etanol quanto para a acetonitrila. A Figura 53 apresenta uma comparação entre as moléculas **43-45**, em acetonitrila e em solução tampão fosfato salino (PBS), através do espectro de absorção na região do UV-Vis e espectro de emissão de fluorescência, com o intuito de se avaliar a influência do tamanho da cadeia alifática nos resultados do estudo fotofísico.



**Figura 53.** Comparação entre os espectros de absorção (acima) e emissão de fluorescência (abaixo) das moléculas **43-45** ( $\sim 10^{-5}$  M) nos solventes acetonitrila e tampão PBS.

Pelo espectro de absorção na região do UV-Vis para as moléculas **43-45** em acetonitrila, não é observada alteração no valor do comprimento de onda do máximo de absorção com o aumento do tamanho da cadeia alquílica. O mesmo é observado para os outros solventes orgânicos (Tabela 6). No entanto, para as mesmas aminas, quando em solução de PBS, ocorre um deslocamento batocrômico com o aumento da cadeia alifática de 4 para 12 e 18 carbonos ( $\sim 33$  nm). Pelo espectro de emissão de fluorescência em acetonitrila, verifica-se que não há alteração significativa na forma do espectro com o aumento do tamanho da cadeia, por outro lado, para as aminas **43-45** em PBS verifica-se que a amina **43**

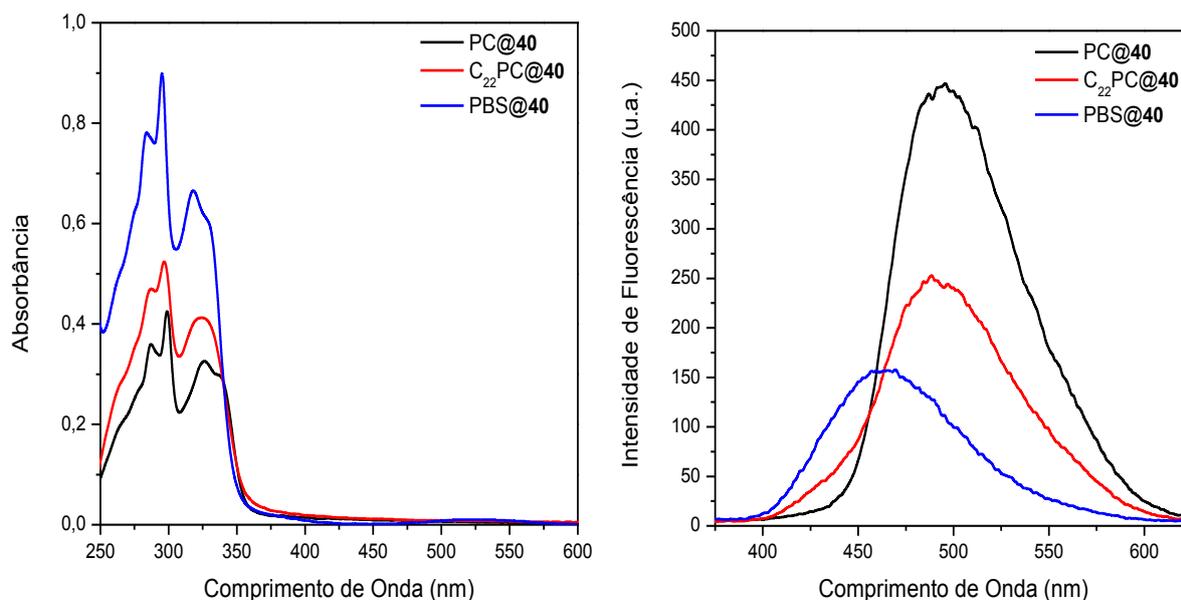
apresenta uma banda referente à emissão normal em 465 nm, enquanto que as aminas **44** e **45** apresentam dupla emissão de fluorescência, correspondente à emissão normal e emissão por ESIPT, sendo esta última a predominante.

#### **4.3.2 Estudo fotofísico dos Lipossomas PC e Lipossomas C<sub>22</sub>PC.**

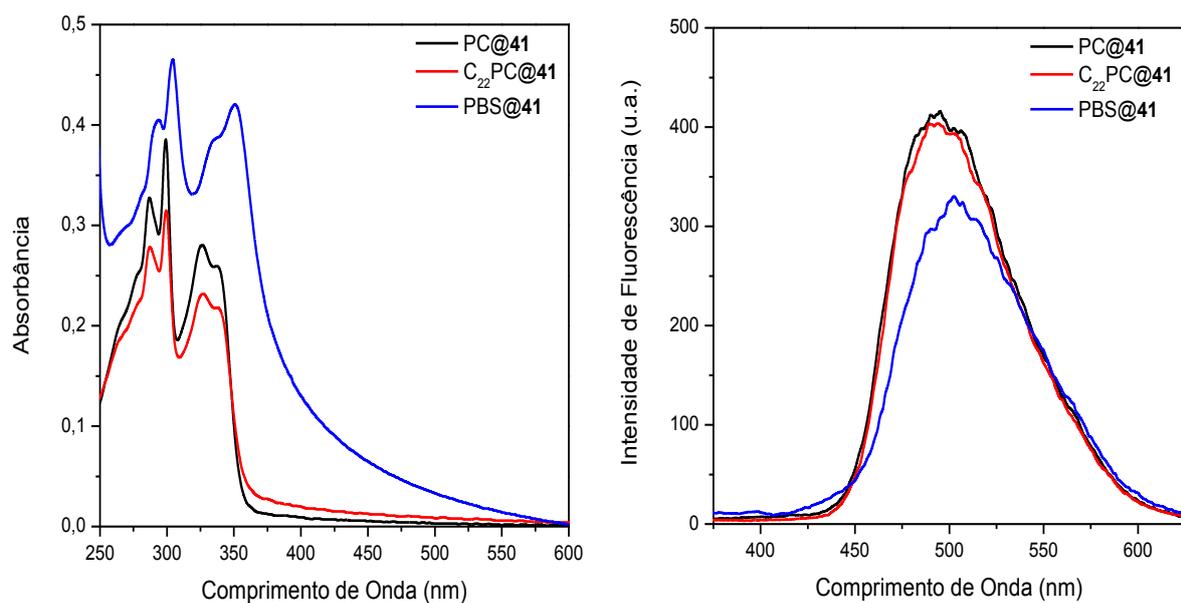
A inserção das moléculas sintetizadas nos lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC, foi avaliada através do estudo fotofísico dos lipossomas em solução de tampão fosfato salino (PBS). As Figuras 54-59 apresentam os espectros de absorção na região do UV-Vis e espectros de emissão de fluorescência dos lipossomas PC (6,0 mg·mL<sup>-1</sup>) contendo os corantes lipofílicos **40-45** (~0,3 mg·mL<sup>-1</sup>) e lipossomas C<sub>22</sub>PC (6,0 mg·mL<sup>-1</sup>) contendo os corantes **40-45** (0,6 mg·mL<sup>-1</sup>). Além disso, em nível de comparação, nas Figuras 54-59 também se encontram os espectros de absorção e emissão de fluorescência dos corantes **40-45** em solução tampão PBS.

Os estudos fotofísicos foram realizados à temperatura ambiente (25°C), em uma concentração de aproximadamente 10<sup>-5</sup> M. A Tabela 7 apresenta os resultados originados a partir deste estudo. Para as moléculas que possuem 4 carbonos na cadeia alifática (**40** e **43**) (Figuras 54 e 57), é verificado um deslocamento batocrômico nos espectros de absorção com a incorporação do corante no lipossoma. Além disso, é observado o desaparecimento da banda correspondente à espécie aniônica (~377 nm) do composto **43**. No espectro de emissão de fluorescência, o deslocamento batocrômico e o aumento significativo da intensidade de fluorescência podem ser explicados pela predominância da emissão resultante do mecanismo de ESIPT.

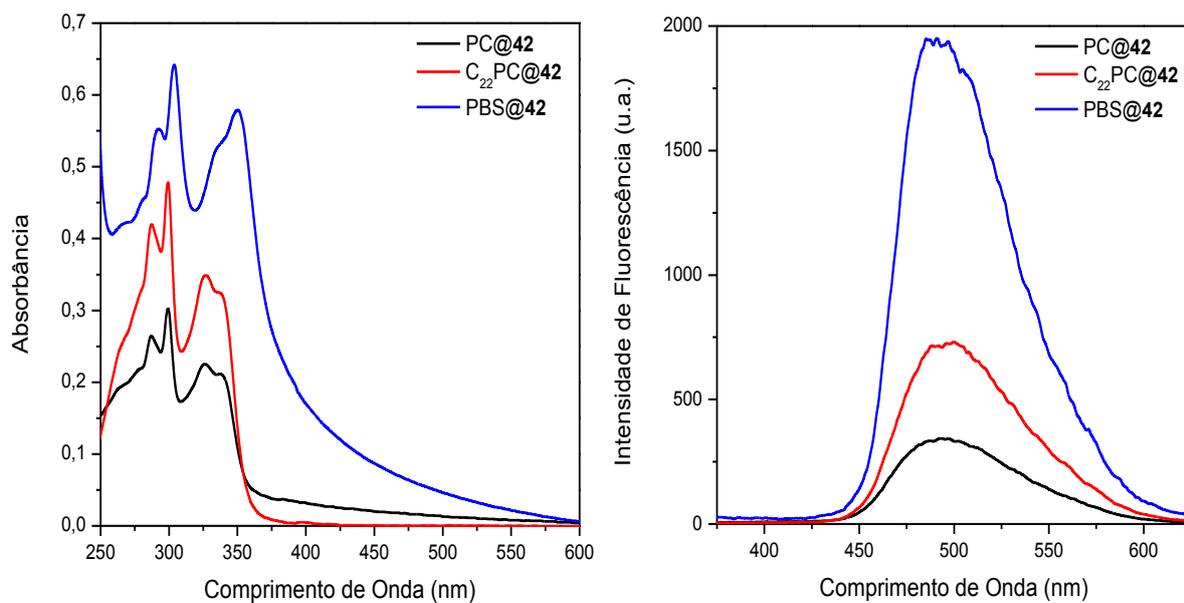
Para as moléculas que possuem 12 e 18 carbonos na cadeia alifática (**41**, **42**, **44** e **45**) (Figuras 55, 56, 58 e 59), a inserção no ambiente hidrofóbico do lipossoma é verificada através de um leve deslocamento hipsocrômico, tanto nos espectros de absorção, quanto nos espectros de emissão de fluorescência. Nestes casos, também há a predominância pela emissão resultante do mecanismo de ESIPT. O fato da emissão ESIPT ser majoritária, indica que estes compostos se encontram preferencialmente no ambiente hidrofóbico da bicamada lipídica, onde ligações de hidrogênio da hidroxila fenólica com a água, são minimizadas.



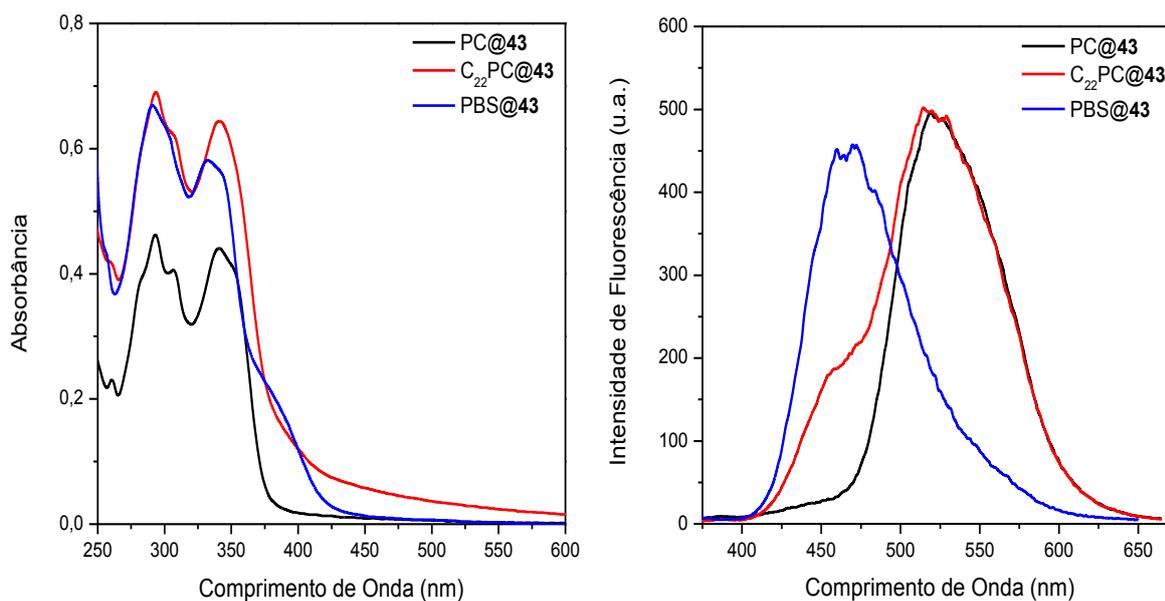
**Figura 54.** Espectros de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência de **40** ( $\sim 10^{-5}$  M) em lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC e PBS. (Slits 5.0nm/5.0nm,  $\lambda_{exc}=318$  nm para PBS e  $\lambda_{exc}=325$  nm para lipossoma).



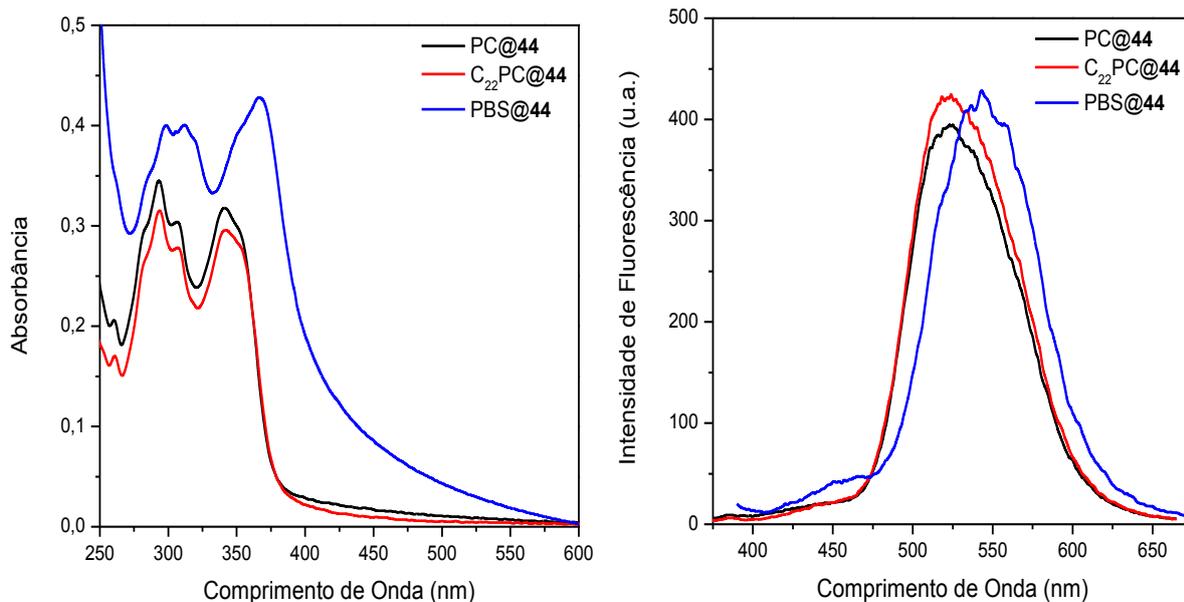
**Figura 55.** Espectros de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência de **41** ( $\sim 10^{-5}$  M) em lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC e PBS. (Slits 5.0nm/5.0nm,  $\lambda_{exc}=350$  nm para PBS e  $\lambda_{exc}=325$  nm para lipossoma).



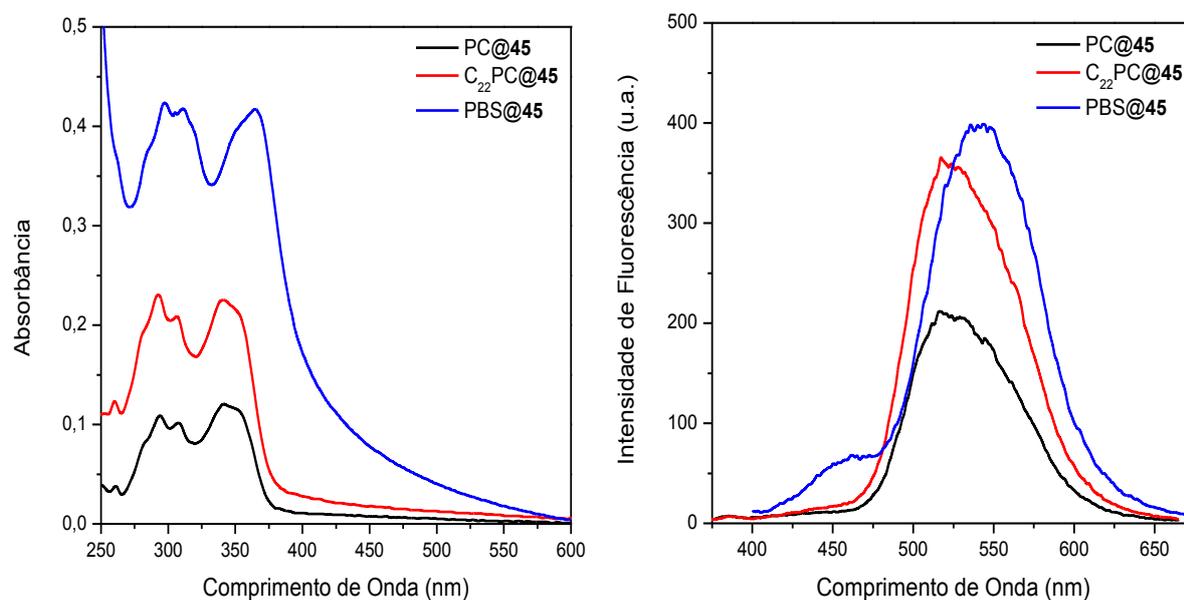
**Figura 56.** Espectros de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência de **42** ( $\sim 10^{-5}$  M) em lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC e PBS. (Slits 5.0nm/5.0nm,  $\lambda_{exc}=350$  nm para PBS e  $\lambda_{exc}=326$  nm para lipossoma).



**Figura 57.** Espectros de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência de **43** ( $\sim 10^{-5}$  M) em lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC e PBS. (Slits 5.0nm/5.0nm,  $\lambda_{exc}=332$  nm para PBS e  $\lambda_{exc}=341$  nm para lipossoma).



**Figura 58.** Espectros de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência de **44** ( $\sim 10^{-5}$  M) em lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC e PBS. (Slits 5.0nm/5.0nm,  $\lambda_{exc}=367$  nm para PBS e  $\lambda_{exc}=341$  nm para lipossoma).



**Figura 59.** Espectros de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência de **45** ( $\sim 10^{-5}$  M) em lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC e PBS. (Slits 5.0nm/5.0nm,  $\lambda_{exc}=365$  nm para PBS e  $\lambda_{exc}=341$  nm para lipossoma).

**Tabela 7.** Resultados do estudo fotofísico para os lipossomas na presença das aminas **40-45**, onde  $\lambda_{\text{abs}}$  e  $\lambda_{\text{em}}$  são os comprimentos de onda de absorção e emissão, respectivamente, apresentados em nm,  $\Delta\lambda_{\text{ST}}$  é o deslocamento de Stokes (nm) e  $\Phi_f$  é o rendimento quântico de emissão de fluorescência.

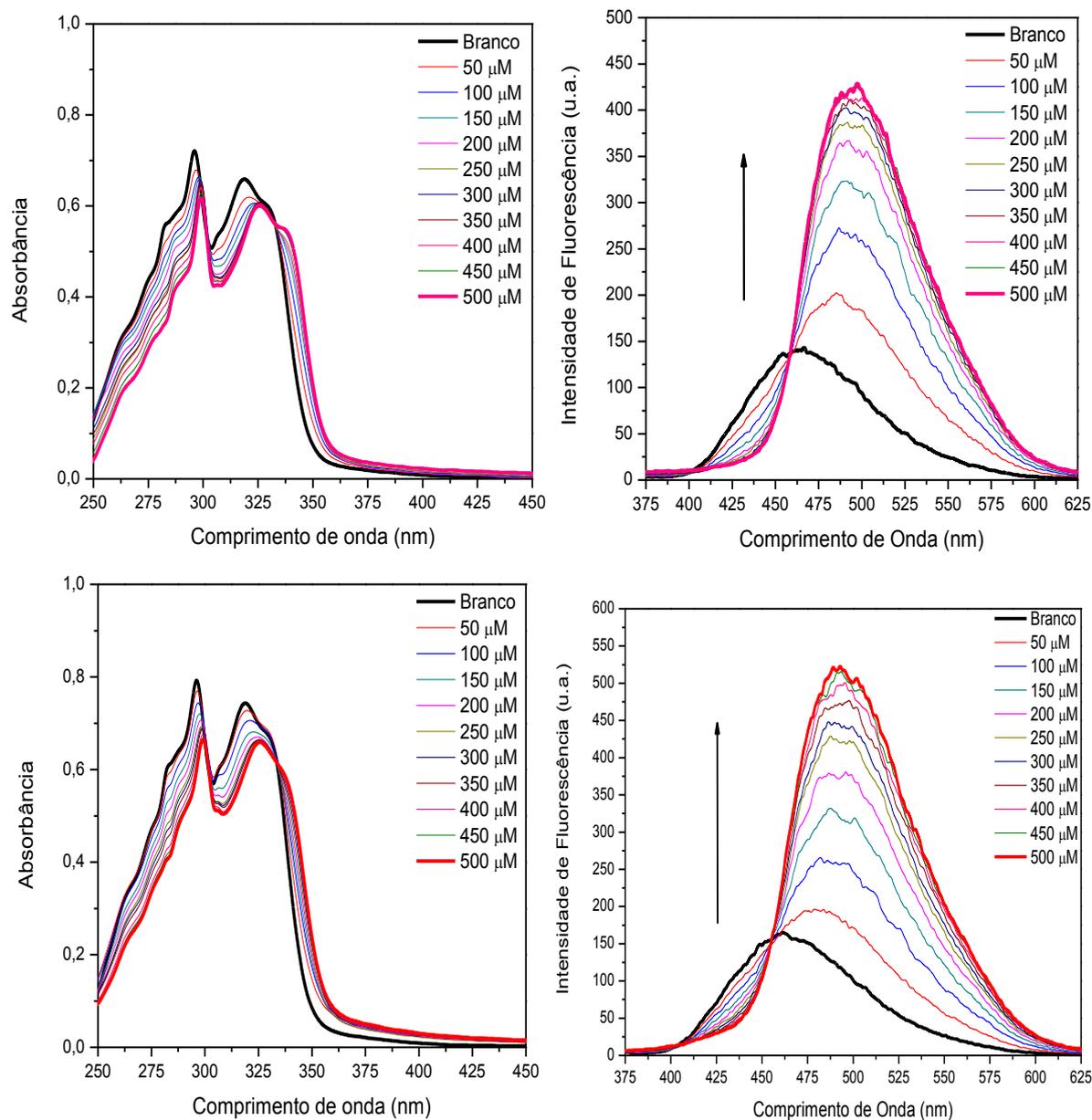
Corante	Sistema	$\lambda_{\text{abs}}$	$\lambda_{\text{em}}$	$\Delta\lambda_{\text{ST}}$	$\Phi_f$
<b>40</b>	Lipossoma PC	326	495	169	0,045
	Lipossoma C <sub>22</sub> PC	325	490	165	0,131
	Tampão fosfato (PBS)	318	464	146	0,069
<b>41</b>	Lipossoma PC	326	494	168	0,068
	Lipossoma C <sub>22</sub> PC	327	494	167	0,149
	Tampão fosfato (PBS)	350	502	152	0,094
<b>42</b>	Lipossoma PC	326	494	168	0,048
	Lipossoma C <sub>22</sub> PC	327	496	169	0,138
	Tampão fosfato (PBS)	350	492	142	0,144
<b>43</b>	Lipossoma PC	341	525	184	0,087
	Lipossoma C <sub>22</sub> PC	341	467/520	126/179	0,122
	Tampão fosfato (PBS)	332/377	465	133/88	0,087
<b>44</b>	Lipossoma PC	341	523	182	0,068
	Lipossoma C <sub>22</sub> PC	342	523	182	0,134
	Tampão fosfato (PBS)	367	462/544	95/177	0,099
<b>45</b>	Lipossoma PC	342	523	181	0,127
	Lipossoma C <sub>22</sub> PC	341	523	182	0,123
	Tampão fosfato (PBS)	365	465/542	100/177	0,148

#### 4.4 ESTUDO DO COEFICIENTE DE PERTIÇÃO DAS AMINAS 40-45

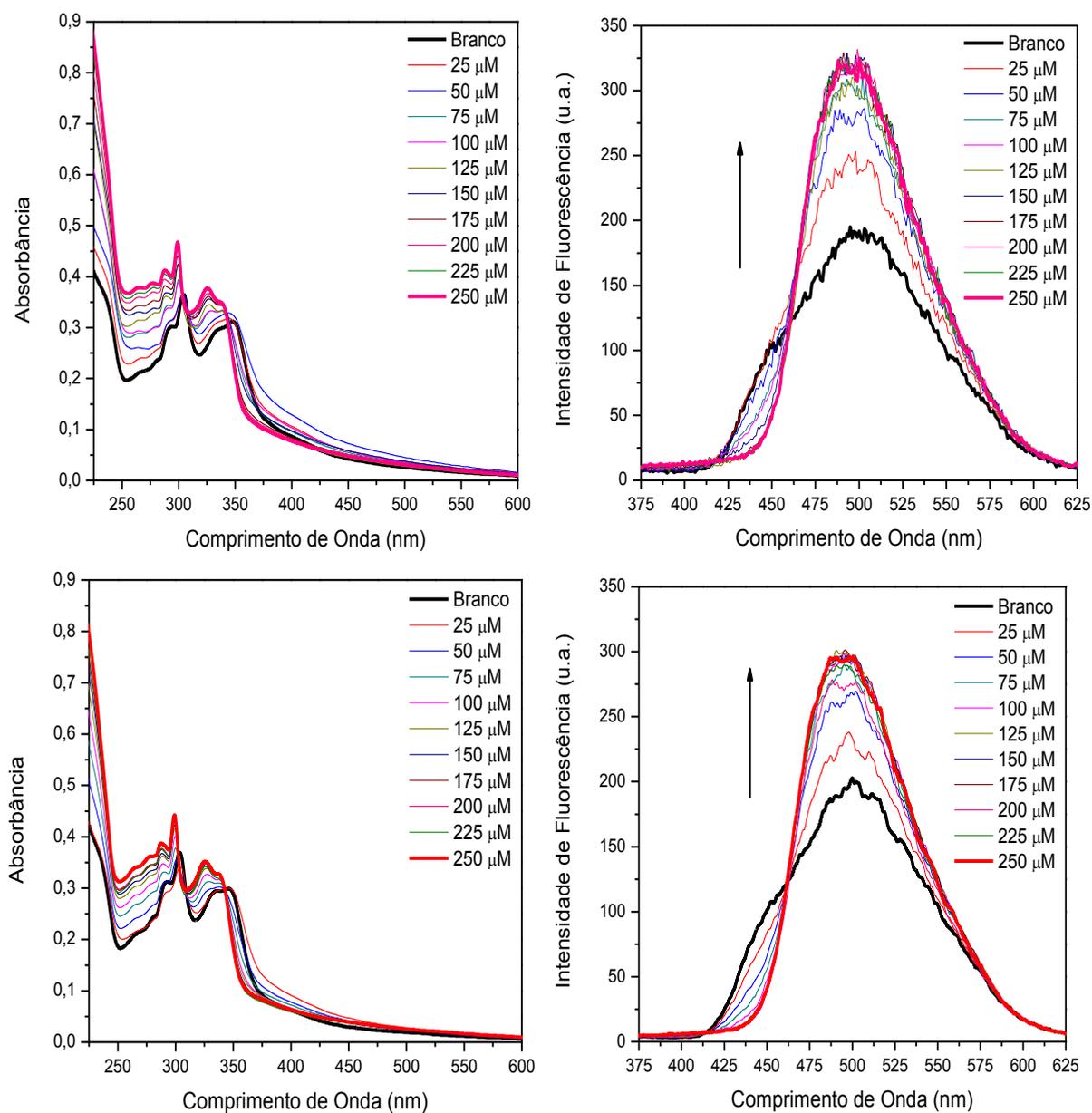
A capacidade de inserção de um composto em uma membrana pode ser medida em termos de sua lipofilicidade. Esta, por sua vez, representa a afinidade de uma molécula por

um ambiente lipofílico e, para compostos orgânicos, pode ser descrita em termos de seu coeficiente de partição ( $K_p$ ).<sup>95</sup> Visando o estudo quantitativo da interação dos corantes sintetizados com os lipossomas PC e lipossomas C<sub>22</sub>PC, foram realizados experimentos de titulação em que foram adicionadas concentrações crescentes dos respectivos lipossomas em uma solução de corante de concentração fixa e, a partir disto, foi possível a determinação dos coeficientes de partição ( $K_p$ ) através de espectroscopia de emissão de fluorescência. A concentração das aminas **40-45** se manteve fixa em  $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , enquanto que a concentração dos lipossomas teve uma variação de  $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  até  $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  para as aminas **40** e **43** e de  $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  até  $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  para as aminas **41, 42, 44** e **45**.

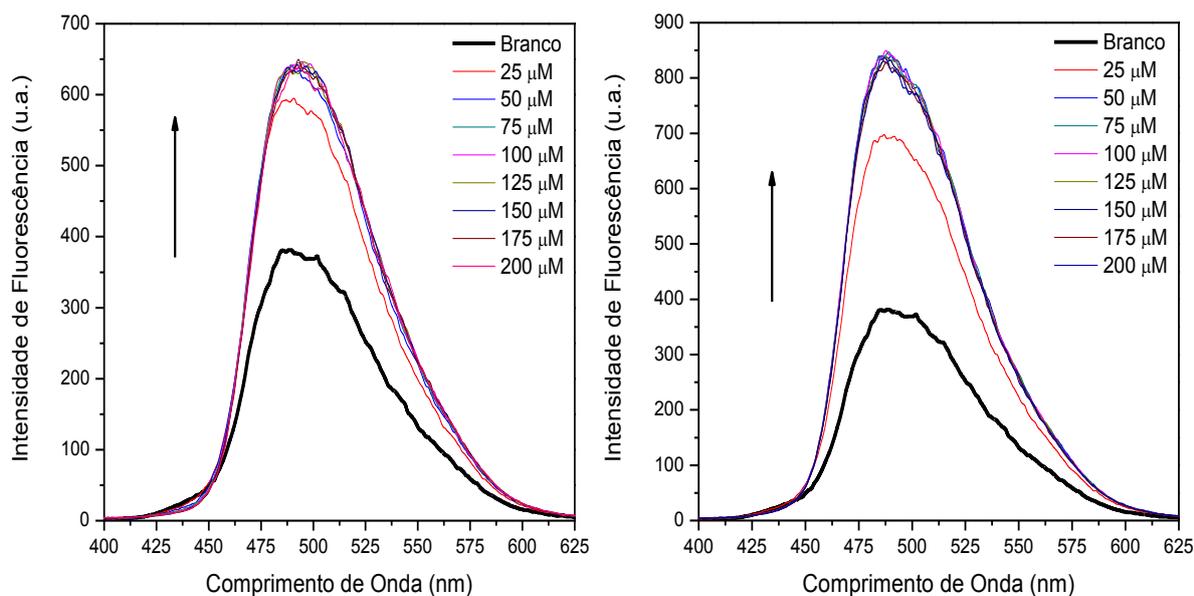
Os espectros de emissão de fluorescência para os corantes **40-42** são apresentados nas Figuras 60-62, enquanto os que se referem aos corantes **43-45**, são apresentados nas Figuras 66-68. Além disso, a nível qualitativo, também são apresentados os espectros de absorção na região do UV-Vis para as aminas **40, 41, 43** e **44**. Os corantes **42** e **45** formaram soluções turvas, o que pode estar relacionado ao tamanho da cadeia carbônica (C<sub>18</sub>). Seus espectros não são apresentados nesse trabalho. Verifica-se que a presença do glicoconjugado anfifílico C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc, nos lipossomas de fosfatidilcolina (PC), não causa nenhuma variação significativa na forma dos espectros.



**Figura 60.** Espectros de absorção na região do UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) do corante **40** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em lipossomas PC (acima) e C<sub>22</sub>PC (abaixo) na presença do respectivo fosfolípido ( $5,0 \times 10^{-5}$  a  $5,0 \times 10^{-4}$  M). Branco (ausência de lipossoma). (Slits 5.0nm/5.0nm,  $\lambda_{exc}=318$  nm).



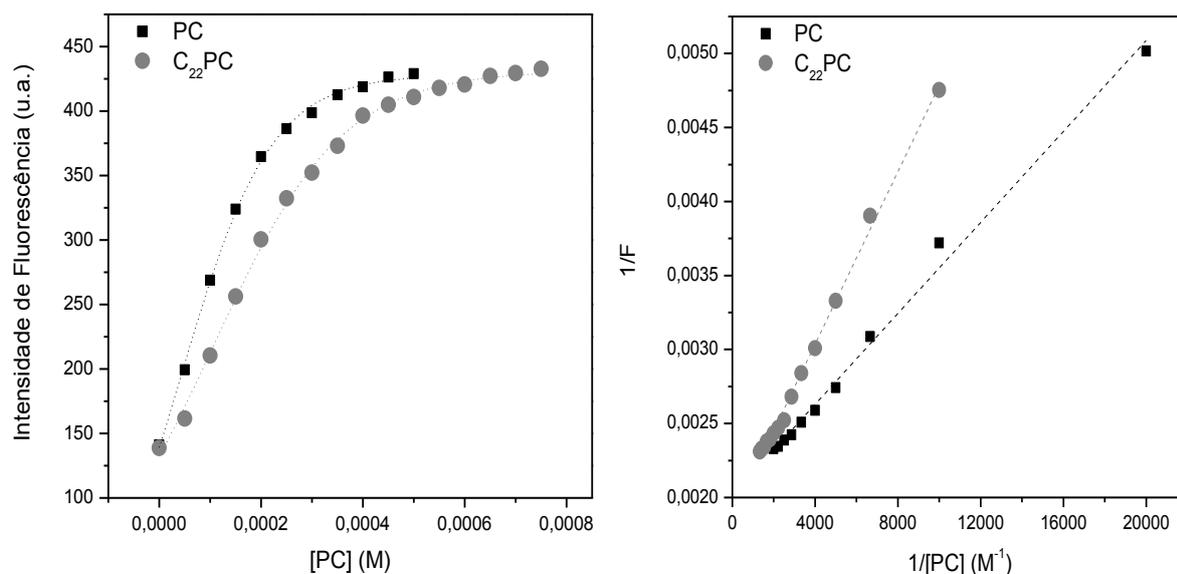
**Figura 61.** Espectros de absorção na região do UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) do corante **41** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em lipossomas PC (acima) e C<sub>22</sub>PC (abaixo) na presença do respectivo fosfolípido ( $2,5 \times 10^{-5}$  a  $2,5 \times 10^{-4}$  M). Branco (ausência de lipossoma). (Slits 5.0nm/5.0nm,  $\lambda_{exc}=325$  nm).



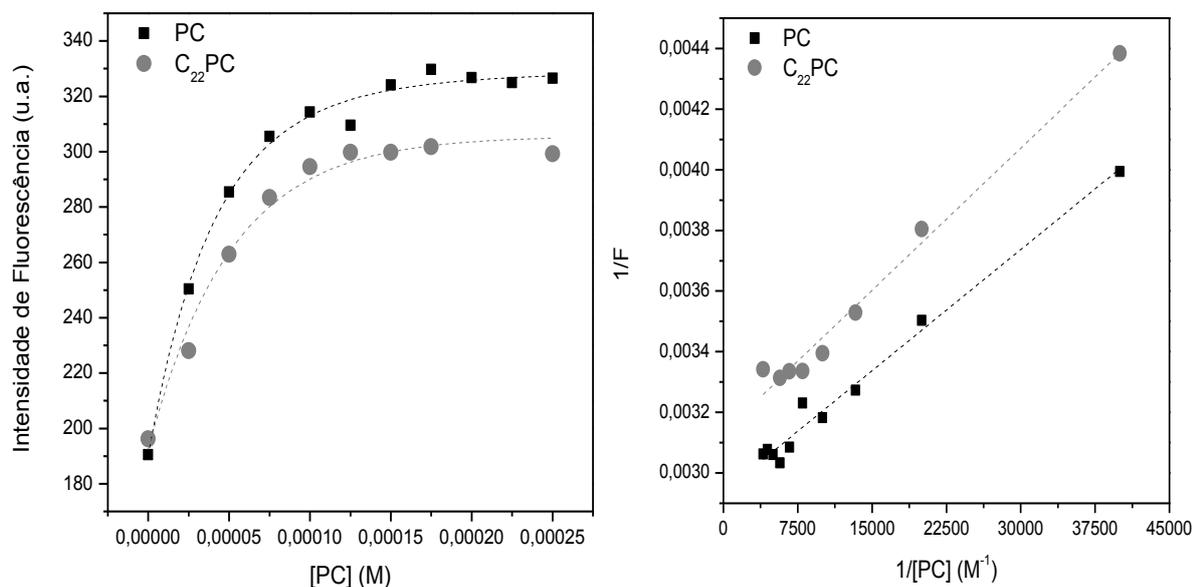
**Figura 62.** Espectros de emissão de fluorescência do corante **42** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em lipossomas PC (esquerda) e  $C_{22}PC$  (direita) na presença do respectivo fosfolípido ( $2,5 \times 10^{-5}$  a  $2,5 \times 10^{-4}$  M). Branco (ausência de lipossoma). (Slits 5.0nm/5.0nm,  $\lambda_{exc}=325$  nm).

Tanto no espectro de absorção quanto no espectro de emissão de fluorescência da amina **40** é observado um deslocamento batocrômico com o aumento da quantidade de lipossoma adicionado. Além disso, verifica-se um aumento gradual na intensidade de fluorescência. Por outro lado, para o corante **41**, é observado um deslocamento hipsocrômico no espectro de absorção, conforme aumenta a concentração de lipossoma no sistema. Um leve deslocamento hipsocrômico também pode ser observado no espectro de emissão de fluorescência. O aumento na intensidade de fluorescência dos corantes estudados, a partir do aumento da concentração de lipossoma, exibe uma tendência à saturação (Figuras 60-62) e ocorre de forma mais pronunciada com o aumento no número de carbonos da cadeia alifática. Sendo assim, houve necessidade de reduzir a faixa de concentração de lipossoma adicionado para os estudos com as aminas **41** e **42**, pois a interação entre eles é tão forte, que mesmo com adição de baixas concentrações de PC, há um aumento considerável na intensidade de emissão de fluorescência, tendendo ao valor máximo.

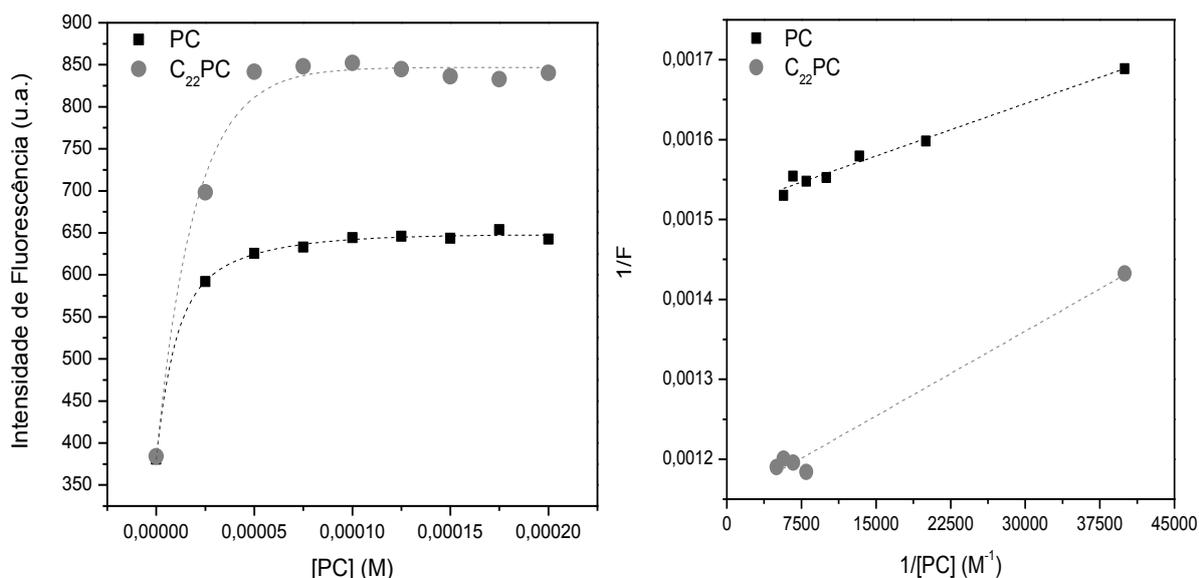
As Figuras 63-65 mostram a variação da intensidade de fluorescência dos corantes **40-42** em função da variação da concentração dos lipossomas PC e  $C_{22}PC$  e as curvas indicam maior tendência à saturação com o aumento da cadeia alifática.



**Figura 63.** Gráfico da intensidade de fluorescência do corante **40** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em função da concentração dos lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC ( $5,0 \times 10^{-5}$  a  $5,0 \times 10^{-4}$  M) (esquerda) e gráfico de 1/F versus 1/[PC] (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência. (PC:  $R^2=0,993$  e C<sub>22</sub>PC:  $R^2=0,996$ ).



**Figura 64.** Gráfico da intensidade de fluorescência do corante **41** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em função da concentração dos lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC ( $2,5 \times 10^{-5}$  a  $2,5 \times 10^{-4}$  M) (esquerda) e gráfico de 1/F versus 1/[PC] (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência. (PC:  $R^2=0,981$  e C<sub>22</sub>PC:  $R^2=0,983$ ).



**Figura 65.** Gráfico da intensidade de fluorescência do corante **42** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em função da concentração dos lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC ( $2,5 \times 10^{-5}$  a  $2,5 \times 10^{-4}$  M) (esquerda) e gráfico de  $1/F$  versus  $1/[PC]$  (direita), onde  $F$  corresponde à intensidade de fluorescência. (PC:  $R^2=0,9793$  e C<sub>22</sub>PC:  $R^2=0,983$ ).

O coeficiente de partição pode ser calculado a partir da regressão linear da reta originada pelo gráfico de  $1/F$  versus  $1/[PC]$ , de acordo com a equação 5:

$$\frac{1}{F} = \frac{55,6}{k_p \cdot F_{\text{máx}} \cdot [PC]} + \frac{1}{F_{\text{máx}}} \quad (5)$$

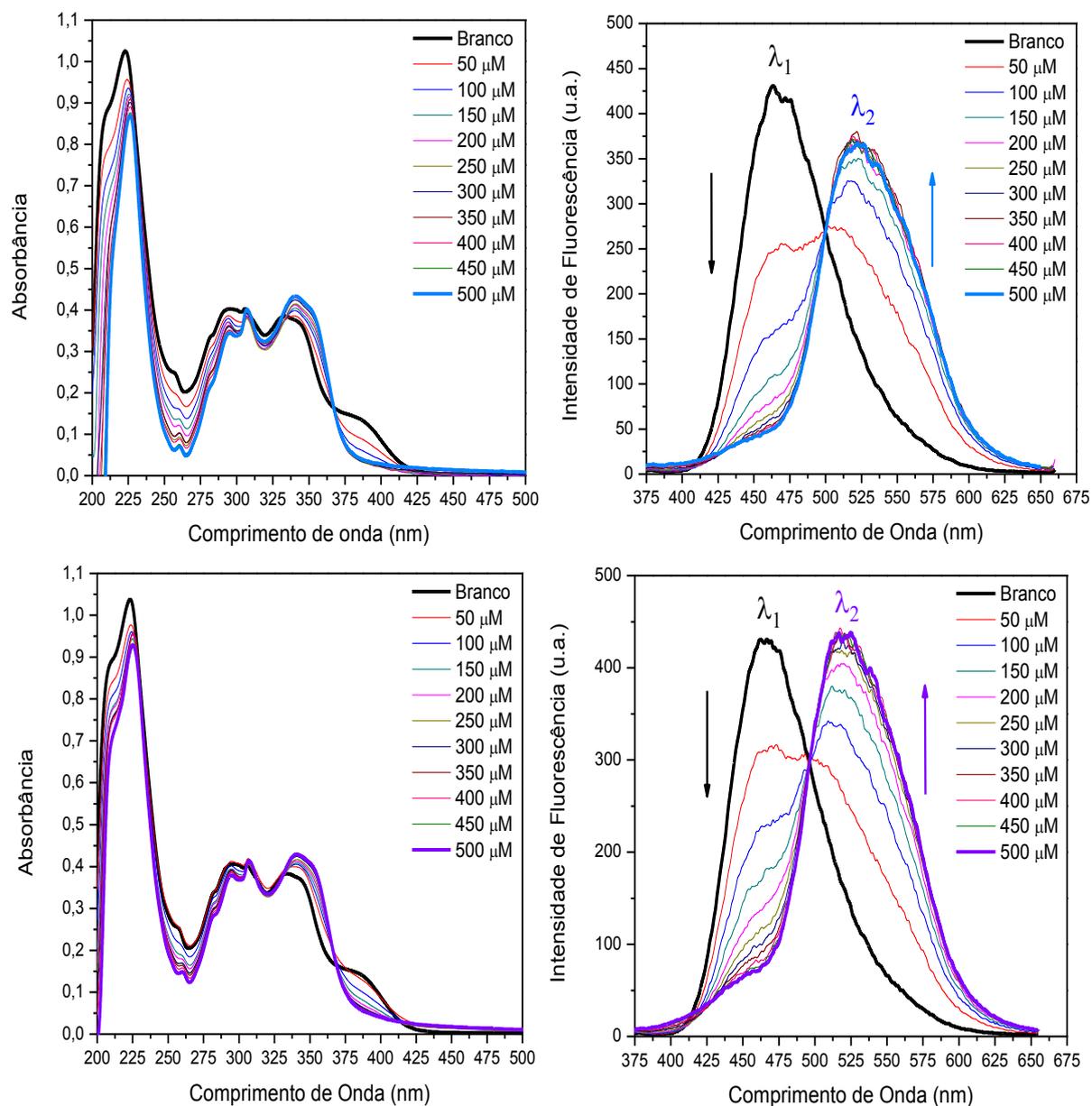
onde  $F_{\text{máx}}$  corresponde a intensidade máxima de emissão resultante da incorporação total do corante no lipossoma e 55,6 a concentração molar da água. Os dados obtidos pelo gráfico de  $1/F$  versus  $1/[PC]$ , assim como os valores relativos ao coeficiente de partição calculado para as moléculas **40-42** encontram-se na Tabela 8.

**Tabela 8.** Valores relativos ao coeficiente de partição ( $K_p$ ) calculado para as moléculas **40-42**.

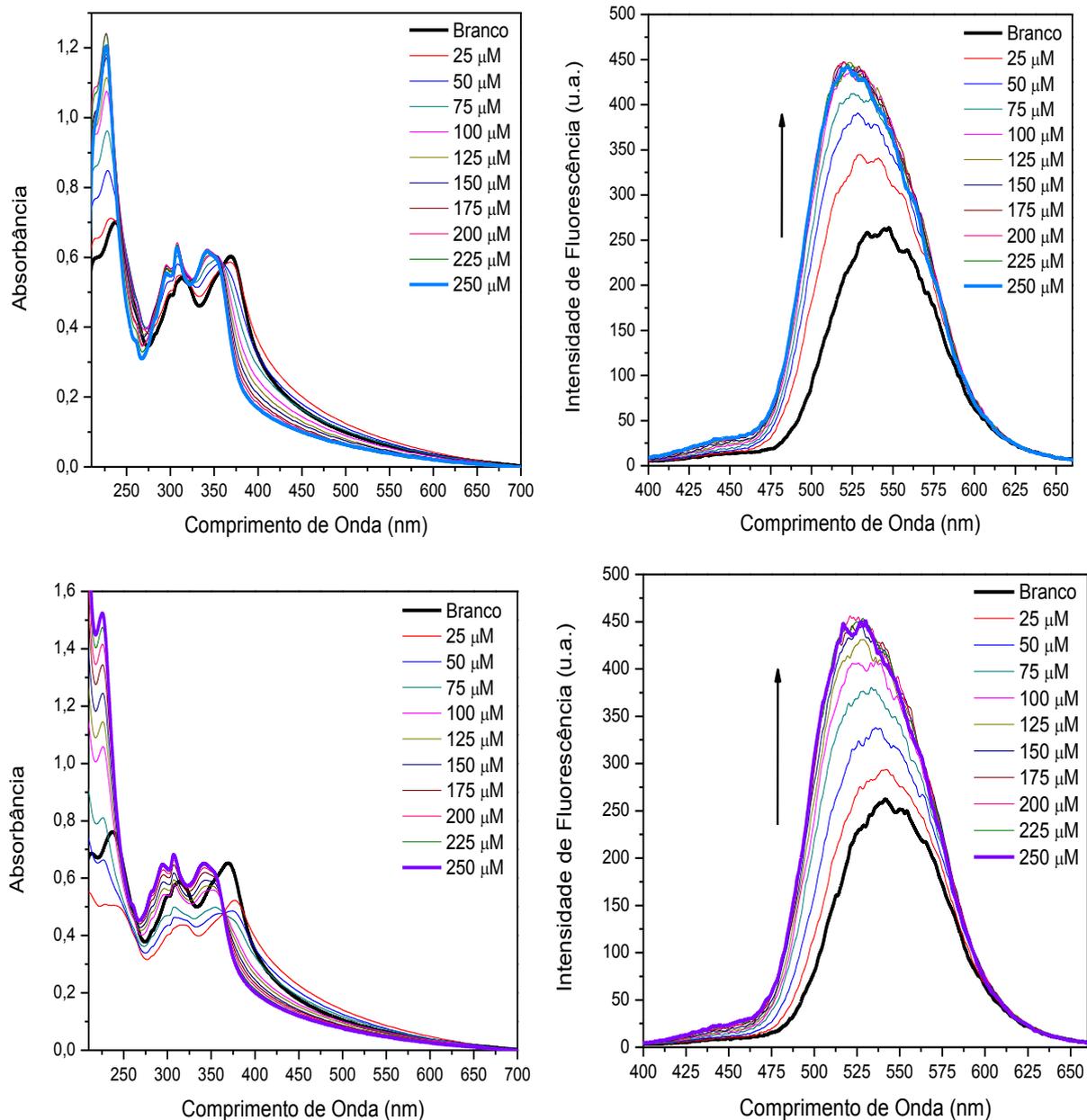
Corante	Lipossoma	Regressão Linear	$R^2$	$K_p$ ( $\times 10^6$ )
<b>40</b>	PC	$1/F=1,5366 \times 10^{-7}(1/[PC])+0,00201$	0,99302	0,73
<b>40</b>	C <sub>22</sub> PC	$1/F=2,9117 \times 10^{-7}(1/[PC])+0,00187$	0,99597	0,36
<b>41</b>	PC	$1/F=2,6631 \times 10^{-8}(1/[PC])+0,00294$	0,98110	6,14
<b>41</b>	C <sub>22</sub> PC	$1/F=3,1256 \times 10^{-8}(1/[PC])+0,00313$	0,98267	5,57
<b>42</b>	PC	$1/F=3,3279 \times 10^{-9}(1/[PC])+0,00117$	0,97949	19,2
<b>42</b>	C <sub>22</sub> PC	$1/F=7,0037 \times 10^{-9}(1/[PC])+0,00115$	0,98348	9,13

Através dos resultados apresentados verifica-se que para os derivados do benzoxazol há um aumento nos valores do coeficiente de partição de acordo com o aumento do número de carbonos da cadeia alifática. Além disso, pode ser destacado o fato de que a incorporação do glicoconjugado anfifílico no lipossoma de fosfatidilcolina em uma proporção de 1:1 (m/m), faz com que o valor do coeficiente de partição dos corantes estudados sofra um leve decréscimo, contudo, isto não causa nenhuma alteração significativa nas características apresentadas.

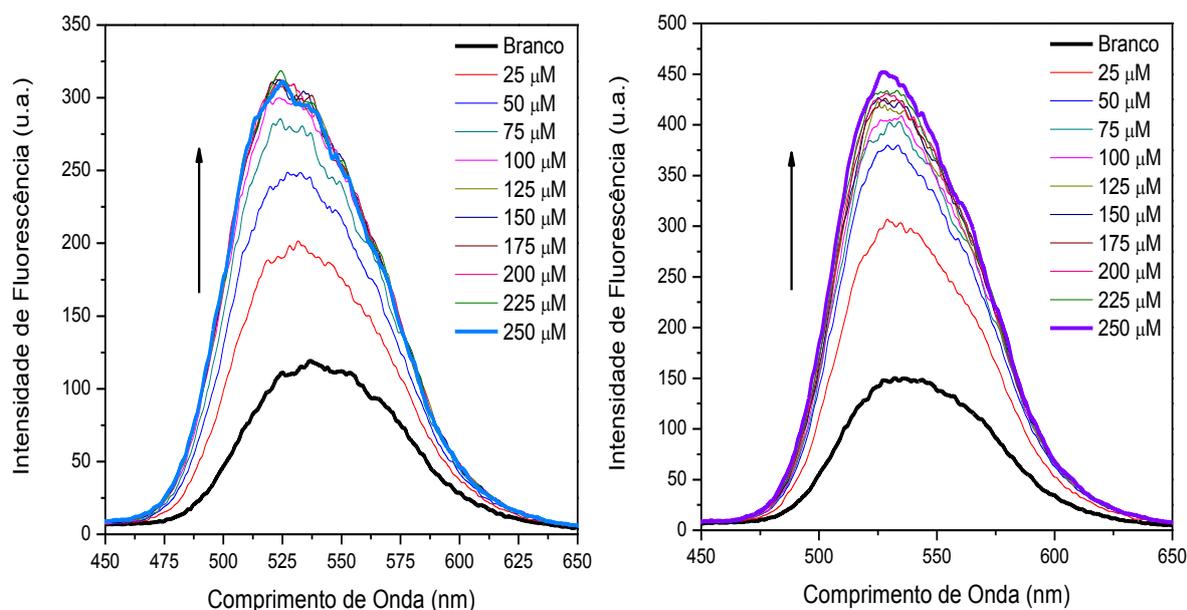
As Figuras 66-68 apresentam os espectros de absorção e emissão de fluorescência das aminas **43-44** e o espectro de emissão da amina **45**. Pela Figura 66, verifica-se um deslocamento batocrômico da banda de absorção localizada em 334 nm e diminuição da banda localizada em 377 nm, com o aumento da quantidade de lipossoma adicionado. Para o corante **43**, no espectro de emissão de fluorescência, não é observado um aumento na intensidade de fluorescência da emissão normal, mas uma diminuição de intensidade desta banda, com formação de dupla emissão de fluorescência e aumento da banda correspondente a emissão ESIPT. Diante destes resultados, pode-se concluir que a inserção desta molécula em lipossomas de fosfatidilcolina (PC), aumenta significativamente a emissão pelo mecanismo de ESIPT, o qual é predominante neste ambiente. Pela Figura 67, verifica-se que, para o corante **44** há um deslocamento hipsocrômico no espectro de absorção, com o aumento da concentração de lipossoma. Um leve deslocamento hipsocrômico também pode ser observado no espectro de emissão de fluorescência, além de aumento na intensidade de fluorescência com tendência à saturação, tanto para o corante **44** como para o **45** (Figura 68).



**Figura 66.** Espectros de absorção na região do UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) do corante **43** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em lipossomas PC (acima) e C<sub>22</sub>PC (abaixo) na presença do respectivo fosfolípido ( $5,0 \times 10^{-5}$  a  $5,0 \times 10^{-4}$  M). Branco (ausência de lipossoma). (Slits 5.0nm/5.0nm,  $\lambda_{exc}=334$  nm).

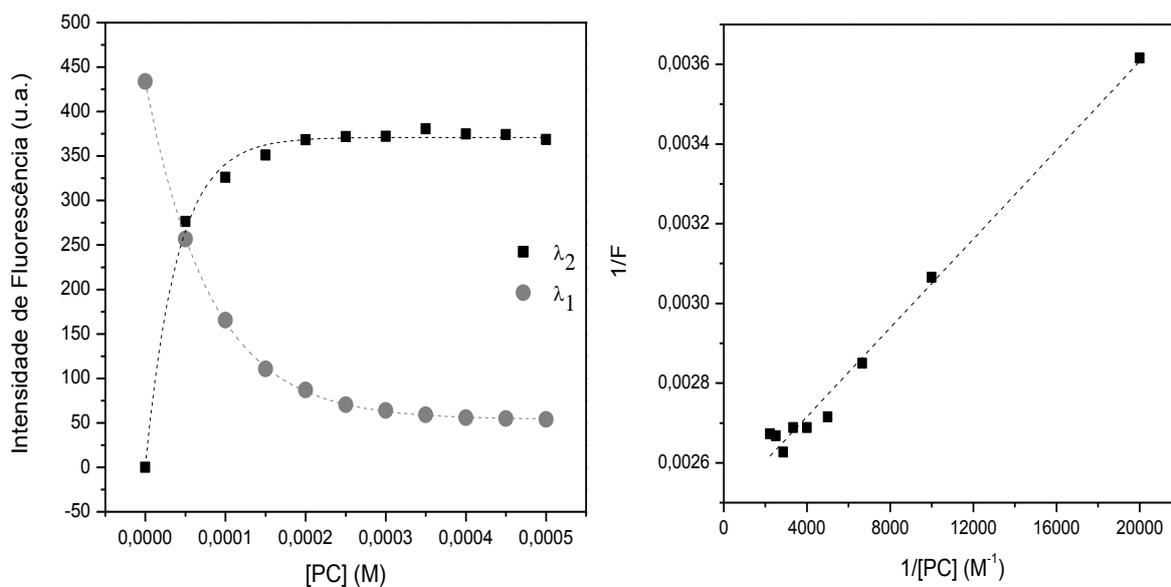


**Figura 67.** Espectros de absorção na região do UV-Vis (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) do corante **44** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em lipossomas PC (acima) e C<sub>22</sub>PC (abaixo) na presença do respectivo fosfolípido ( $2,5 \times 10^{-5}$  a  $2,5 \times 10^{-4}$  M). Branco (ausência de lipossoma). (Slits 5.0nm/5.0nm,  $\lambda_{exc}=340$  nm).

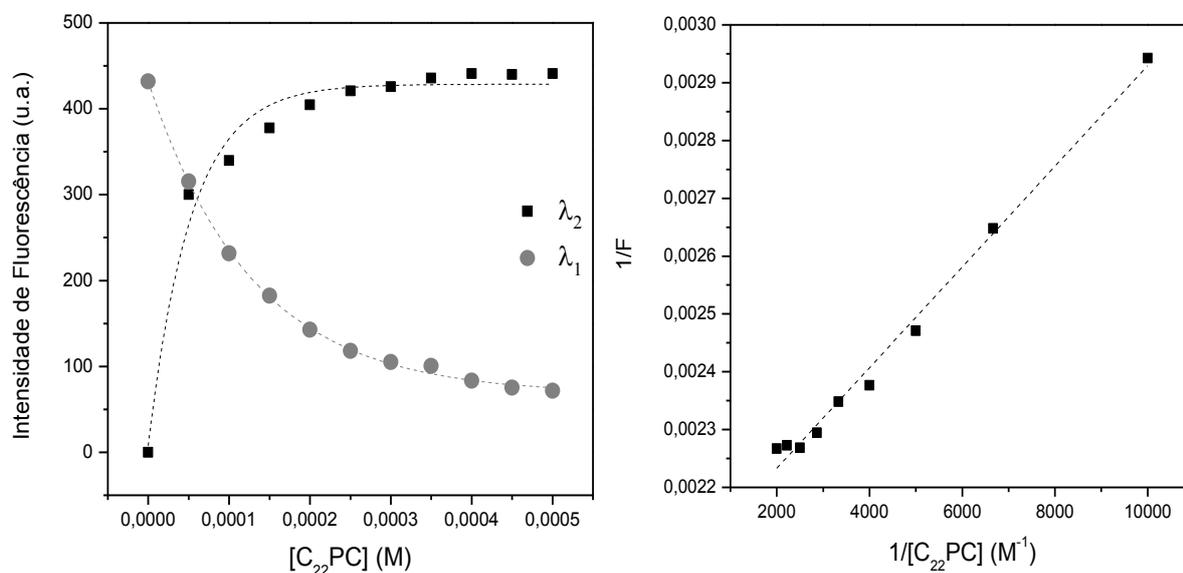


**Figura 68.** Espectros de emissão de fluorescência do corante **45** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em lipossomas PC (esquerda) e  $C_{22}PC$  (direita) na presença do respectivo fosfolípido ( $2,5 \times 10^{-5}$  a  $2,5 \times 10^{-4}$  M). Branco (ausência de lipossoma). (Slits 5.0nm/5.0nm,  $\lambda_{exc}=350$  nm).

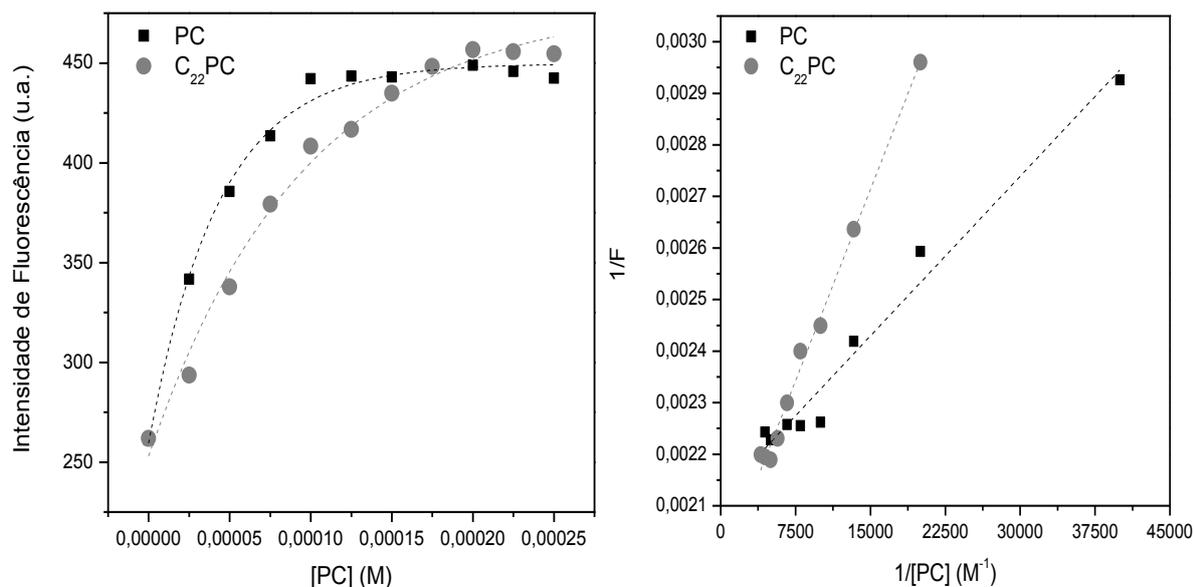
As Figuras 69-72 mostram a variação da intensidade de fluorescência dos corantes **43-45** em função da variação da concentração dos lipossomas PC e  $C_{22}PC$  e as curvas indicam tendência à saturação para todos os compostos. Observa-se concomitantemente a diminuição da banda correspondente à emissão normal, tendendo à zero, e aumento da banda referente à emissão ESIPT que tende ao valor máximo de intensidade de emissão da molécula quando inserida em lipossoma PC.



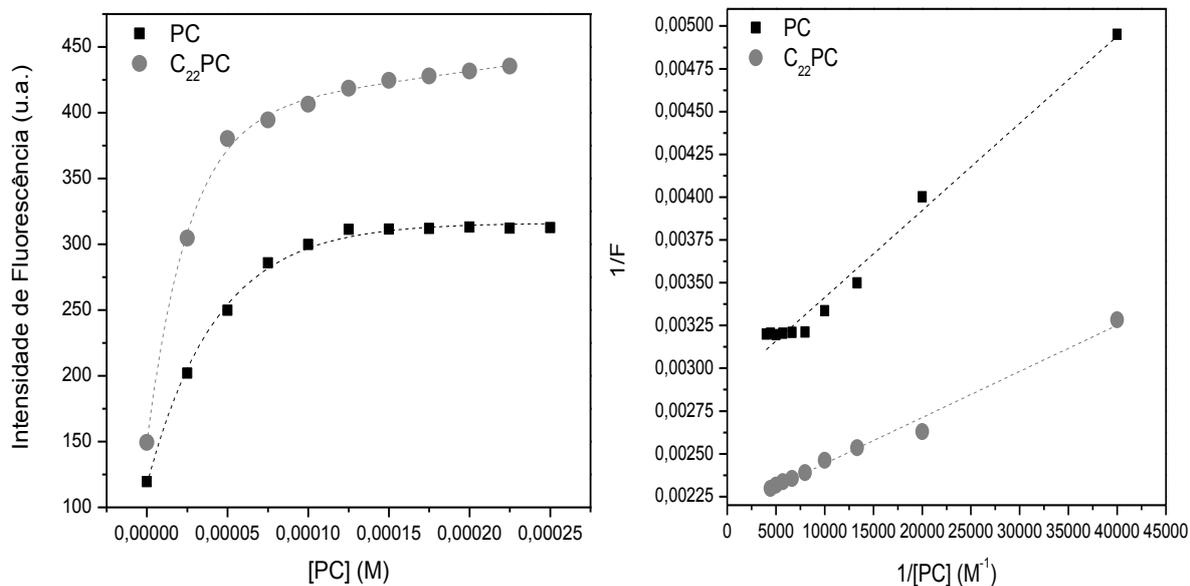
**Figura 69.** Gráfico da intensidade de fluorescência do corante **43** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em função da concentração do lipossoma PC ( $5,0 \times 10^{-5}$  a  $5,0 \times 10^{-4}$  M) (esquerda), onde  $\lambda_1$ =emissão normal e  $\lambda_2$ =emissão ESIPT e gráfico de  $1/F$  versus  $1/[PC]$  (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência ( $R^2=0,987$ ).



**Figura 70.** Gráfico da intensidade de fluorescência do corante **43** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em função da concentração do lipossoma C<sub>22</sub>PC ( $5,0 \times 10^{-5}$  a  $5,0 \times 10^{-4}$  M) (esquerda), onde  $\lambda_1$ =emissão normal e  $\lambda_2$ =emissão ESIPT e gráfico de  $1/F$  versus  $1/[PC]$  (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência ( $R^2=0,990$ ).



**Figura 71.** Gráfico da intensidade de fluorescência do corante **44** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em função da concentração dos lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC ( $2,5 \times 10^{-5}$  a  $2,5 \times 10^{-4}$  M) (esquerda) e gráfico de  $1/F$  versus  $1/[PC]$  (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência. (PC:  $R^2=0,973$  e C<sub>22</sub>PC:  $R^2=0,992$ ).



**Figura 72.** Gráfico da intensidade de fluorescência do corante **45** ( $5,0 \times 10^{-5}$  M) em função da concentração dos lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC ( $2,5 \times 10^{-5}$  a  $2,5 \times 10^{-4}$  M) (esquerda) e gráfico de  $1/F$  versus  $1/[PC]$  (direita), onde F corresponde à intensidade de fluorescência. (PC:  $R^2=0,982$  e C<sub>22</sub>PC:  $R^2=0,987$ ).

O coeficiente de partição foi calculado a partir da regressão linear da reta originada pelo gráfico de  $1/F$  versus  $1/[PC]$  de acordo com a equação 5. Os dados obtidos pelo gráfico

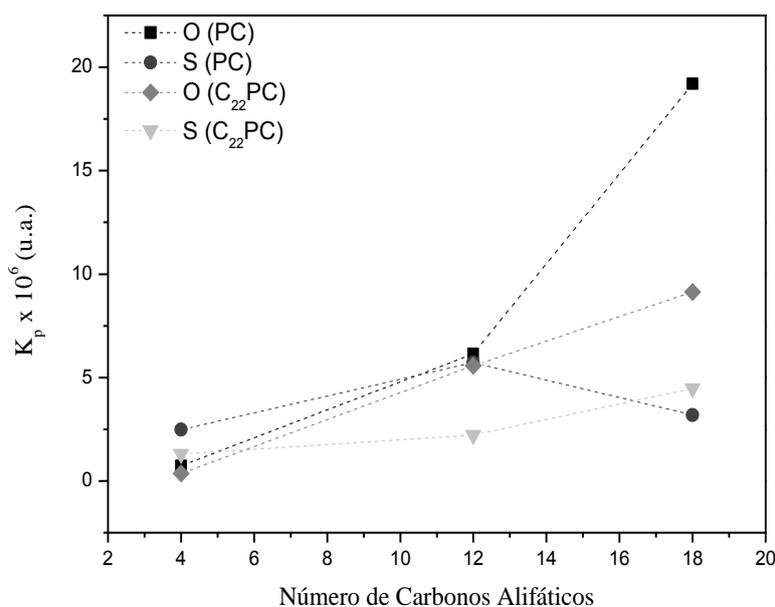
de 1/F versus 1/[PC], assim como os valores relativos ao coeficiente de partição calculado para as moléculas **43-45** encontram-se na Tabela 9.

**Tabela 9.** Valores relativos ao coeficiente de partição ( $K_p$ ) calculado para as moléculas **43-45**.

Corante	Lipossoma	Regressão Linear	$R^2$	$K_p$ ( $\times 10^6$ )
<b>43</b>	PC	$1/F=5,571 \times 10^{-8}(1/[PC])+0,00249$	0,9866	2,48
<b>43</b>	C <sub>22</sub> PC	$1/F=8,707 \times 10^{-8}(1/[PC])+0,00206$	0,9903	1,31
<b>44</b>	PC	$1/F=2,064 \times 10^{-8}(1/[PC])+0,00212$	0,9731	5,72
<b>44</b>	C <sub>22</sub> PC	$1/F=4,948 \times 10^{-8}(1/[PC])+0,00197$	0,9921	2,22
<b>45</b>	PC	$1/F=5,089 \times 10^{-8}(1/[PC])+0,00291$	0,9823	3,18
<b>45</b>	C <sub>22</sub> PC	$1/F=2,697 \times 10^{-8}(1/[PC])+0,00217$	0,9874	4,47

Através dos resultados apresentados na Tabela 9, verifica-se que, para os derivados do benzotiazol, não ocorre um aumento significativo nos valores do coeficiente de partição com o aumento do número de carbonos da cadeia alifática, sendo que para o corante **45** em lipossoma PC há uma diminuição no valor do coeficiente de partição quando em comparação com o corante **44**. Os resultados obtidos através do estudo do coeficiente de partição são um bom indicativo da comprovação da inserção das aminas dentro dos lipossomas de PC e de C<sub>22</sub>PC.

A Figura 73 ilustra a variação nos valores de  $K_p$  em relação com o aumento do número de carbonos alifáticos para as aminas **40-45** nos lipossomas estudados.



**Figura 73.** Valores de coeficiente de partição ( $K_p$ ) das moléculas **40-45** em relação com o número de carbonos da cadeia alifática.

#### 4.5 ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS LIPOSSOMAS COM LECTINA WGA

A funcionalização superficial de lipossomas com glicolípídeos naturais ou sintéticos tem sido proposta com o intuito de aumentar a especificidade destes para lectinas, as quais estão envolvidas em processos de reconhecimento e interações celulares.<sup>96,97</sup> Lectinas representam uma classe de glicoproteínas que possuem sítios específicos de ligação a carboidratos e são capazes de interagir com receptores de superfície celular. Se ligam de forma reversível à componentes da membrana glicosilada, sendo utilizadas como uma ferramenta útil no estudo de sistemas biológicos.<sup>96,97</sup> Estas interações, apesar de serem altamente específicas, normalmente são fracas. Esta classe de proteínas pode ser encontrada em plantas, animais vertebrados, invertebrados e microrganismos, estando presente na superfície celular ou em partículas intracelulares. Enquanto as lectinas possuem propriedades biológicas em comum, elas apresentam variações quanto a tamanho e estrutura.<sup>97,98</sup> A ligação entre o carboidrato e a lectina normalmente envolve dois ou três resíduos de açúcares terminais de glicanos de mamíferos, incluindo galactose, manose, ácido *N*-acetil-neuramínico, fucose ou *N*-acetilglucosamina.<sup>96</sup>

Assim, buscou-se avaliar, através de um estudo por espectroscopia de emissão de fluorescência, a interação entre lipossomas de C<sub>22</sub>PC com a lectina aglutinina de germe de trigo (WGA). A lectina WGA forma um homodímero estável de 36 kDa e possui oito sítios de ligação que apresentam especificidade para o carboidrato *N*-acetilglucosamina.<sup>97,99</sup> Possui

duas subunidades idênticas, sendo que cada uma delas é formada por quatro subdomínios homólogos (A-D) de 43 aminoácidos.<sup>100</sup> Esta proteína quando excitada em 280 nm, apresenta uma banda de fluorescência típica do triptofano em 348 nm, que pode ser alterada com a adição do carboidrato *N*-acetilglucosamina.<sup>101</sup> A Tabela 10 apresenta os resíduos de aminoácidos da WGA envolvidos na interação com o carboidrato, indicando os respectivos sítios de ligação.

**Tabela 10.** Resíduos de aminoácidos envolvidos nas regiões de interação da WGA.

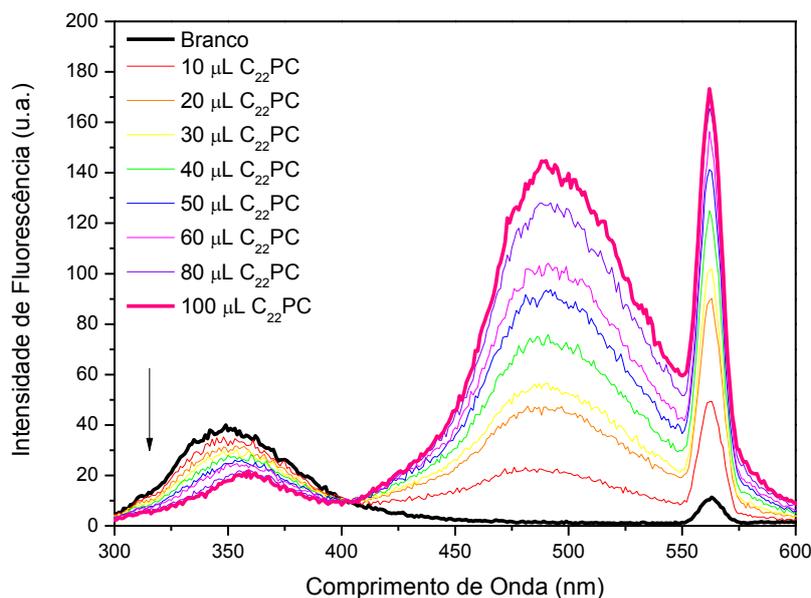
Aminoácidos apresentados em itálico indicam seu envolvimento em ligações de hidrogênio.<sup>100</sup>

Sítios (domínios envolvidos)	Sítios Aromáticos				Sítios Polares	
	Posições dos resíduos				Posições dos resíduos	
	Monômero 1				Monômero 2	
	19	21	23	30	28	29
<b>A1-D2</b>	<i>Ser</i>	Tyr	Tyr	<i>Tyr</i>	Pro	Gly
<b>B1-C2</b>	<i>Ser</i>	Tyr	Tyr/His	<i>Tyr</i>	<i>Ser</i>	<i>Glu</i>
<b>C1-B2</b>	<i>Ser</i>	Trp	Phe	Phe	Ala	<i>Glu</i>
<b>D1-A2</b>	<i>Ser</i>	Trp	Ser	<i>Tyr</i>	Gly	Asp

Neste contexto, através da incorporação dos corantes lipofílicos fluorescentes sintetizados (aminas **40-45**) em lipossomas C<sub>22</sub>PC buscou-se verificar se a interação entre a proteína WGA e o carboidrato *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) afeta de alguma forma a fluorescência destes corantes. Sendo assim, tem-se como perspectiva utilizá-los como sistema-modelo para posteriormente poderem ser aplicados no estudo com lectinas mais complexas que também possuem especificidade ao GlcNAc (localizado na superfície do lipossoma), como por exemplo, lectinas do tipo C, as quais se localizam na superfície das membranas celulares.

Este estudo foi realizado empregando-se uma alíquota fixa de WGA (20 µL de uma solução de concentração 1,0 mg·mL<sup>-1</sup>) em 3 mL de solução tampão, e, a esta, foram adicionadas alíquotas de 10-100 µL de lipossoma C<sub>22</sub>PC (6,0 mg·mL<sup>-1</sup>), na ausência e presença das aminas **40, 42, 43 e 45**, sendo a concentração destas nos lipossomas de 0,6 mg·mL<sup>-1</sup>. A cada adição, foi feita uma medida da emissão de fluorescência para avaliação do comportamento da lectina frente aos lipossomas glicosilados. A Figura 74 mostra a variação

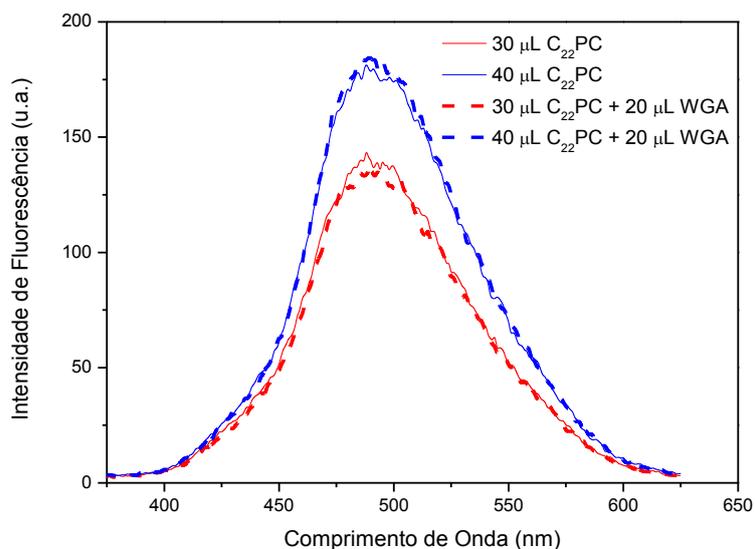
no espectro de fluorescência da lectina WGA com a adição do lipossoma C<sub>22</sub>PC contendo a amina **40**.



**Figura 74.** Diminuição da banda de fluorescência da lectina WGA (350 nm) com crescente adição do lipossoma C<sub>22</sub>PC contendo a amina **40** (10-100 μL). Indicado pela seta preta.

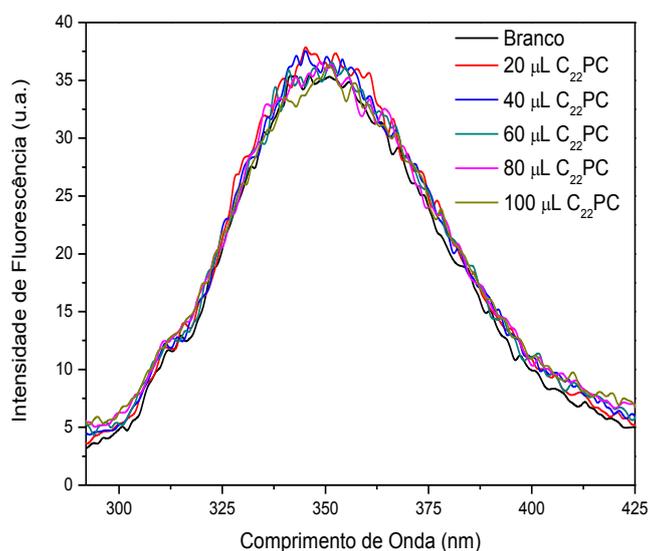
Através da Figura 74, verifica-se uma diminuição na intensidade de fluorescência e deslocamento batocrômico da banda em 350 nm, referente à emissão da lectina WGA, conforme aumenta a concentração de lipossoma adicionado, o que indica interação deste com os resíduos de triptofano da WGA. O mesmo comportamento pode ser observado para os lipossomas em que se encontram inseridas as aminas **42**, **43** e **45**.

Com o intuito de avaliar se a adição da lectina afeta a emissão de fluorescência do corante inserido no lipossoma, foi feita uma comparação entre os espectros de emissão do lipossoma C<sub>22</sub>PC contendo a amina **40**, na presença e na ausência da WGA, e constatou-se que a adição da lectina não afeta a banda de emissão de fluorescência do corante **40** (Figura 75).



**Figura 75.** Comparação na banda de emissão do lipossoma  $C_{22}PC$  contendo a amina **40**, com e sem adição de 20  $\mu L$  da lectina WGA.

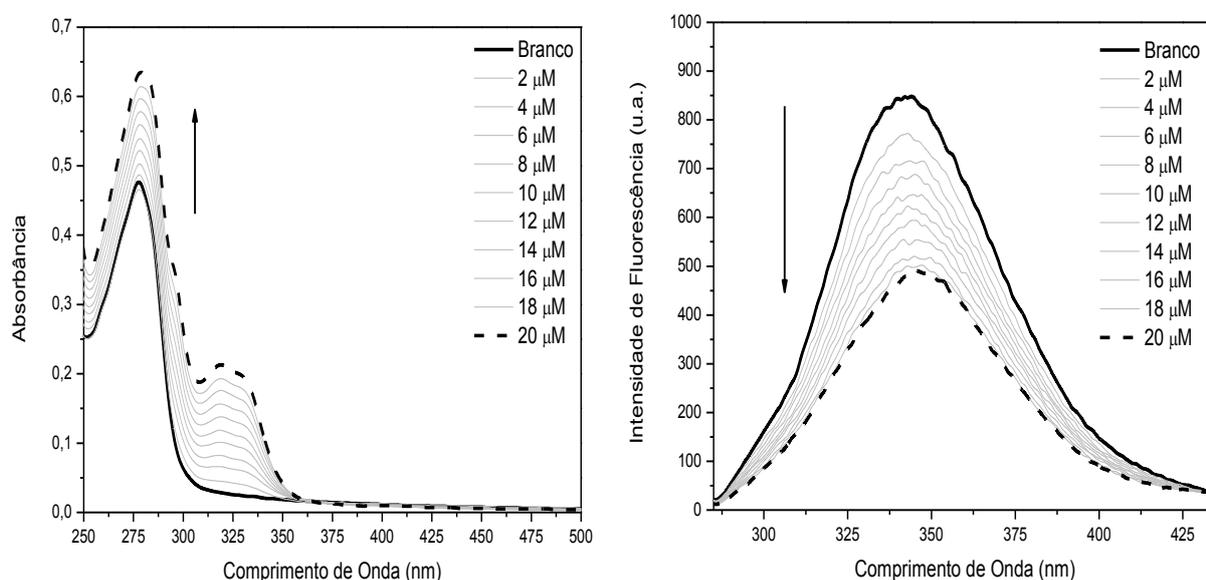
No entanto, no que se refere à adição do lipossoma  $C_{22}PC$  na ausência de corante (Figura 76), não é observada alteração no espectro de emissão proveniente da lectina WGA. Este resultado preliminar provavelmente indica que a interação entre lipossoma  $C_{22}PC$  e WGA ocorre em um sítio de ligação que não possui resíduos de triptofano, porém mais estudos devem ser feitos para comprovação desta suposição.



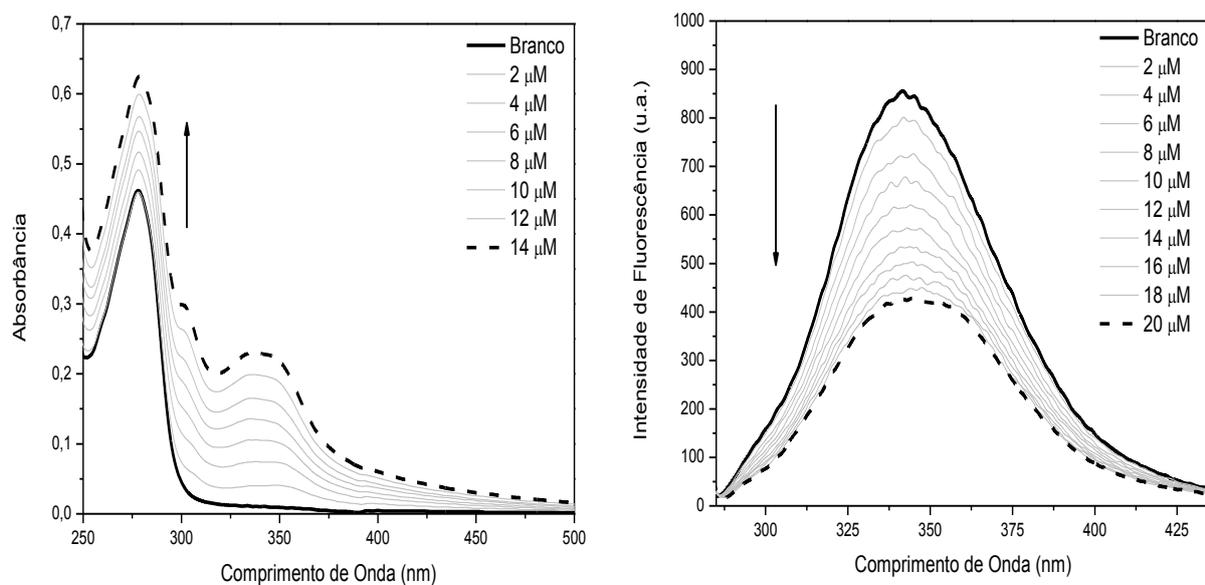
**Figura 76.** Espectro de emissão de fluorescência da lectina WGA em presença de diferentes alíquotas do lipossoma  $C_{22}PC$ .

#### 4.6 ESTUDO DA INTERAÇÃO DAS AMINAS 40-45 COM BSA

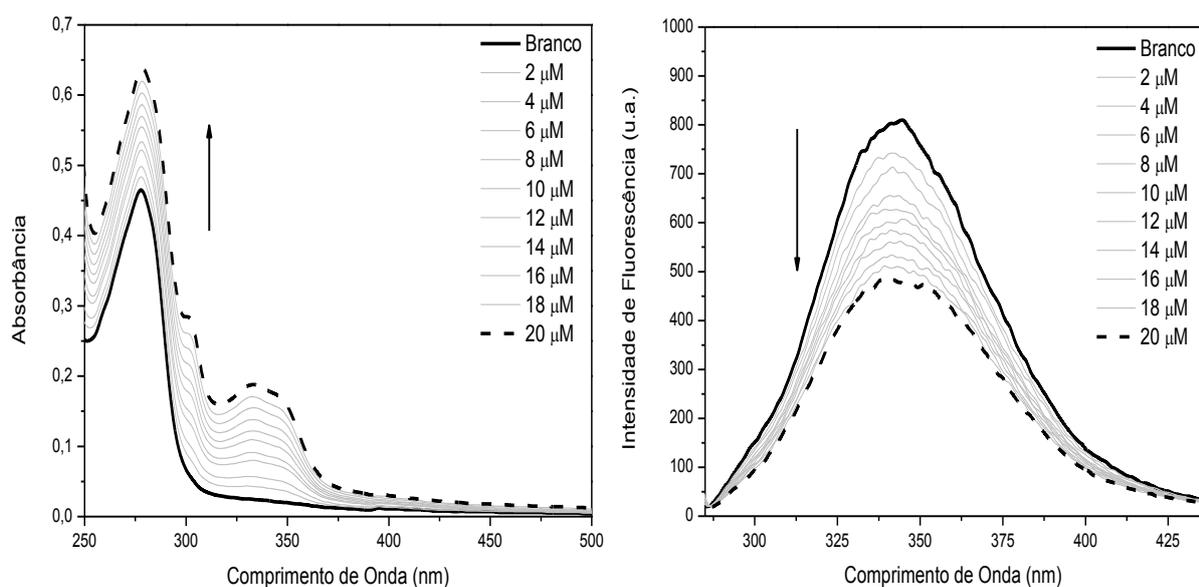
Foram realizados estudos a fim de investigar a interação das aminas **40-45** com a albumina sérica bovina (BSA). A BSA possui uma banda de absorção na região do UV-Vis com máximo localizado em aproximadamente 280 nm e emissão de fluorescência com máximo em torno de 348 nm, originadas devido aos resíduos de triptofano, os quais são os principais responsáveis pela sua fluorescência intrínseca. A interação de um composto com a BSA geralmente conduz a uma supressão na emissão de fluorescência da albumina sérica.<sup>35</sup> Para o estudo de supressão de fluorescência da BSA com os corantes **40-45**, foi realizada a titulação de uma solução de BSA, com concentração fixa de 11  $\mu\text{M}$  (1 mL), com diferentes concentrações para cada composto, que variaram de 2-20  $\mu\text{M}$ , em solução de tampão fosfato salino PBS (pH 7,2). Este estudo foi realizado à temperatura ambiente (25°C). Para o cálculo da porcentagem de supressão da BSA, foram considerados os valores da intensidade do máximo de emissão em 277 nm. Nas Figuras 77-82 são apresentados os espectros de absorção na região do UV-Vis e emissão de fluorescência da BSA, com  $\lambda_{\text{exc}} = 277 \text{ nm}$  e Slits = 5.0 nm/5.0 nm (Em/Exc).



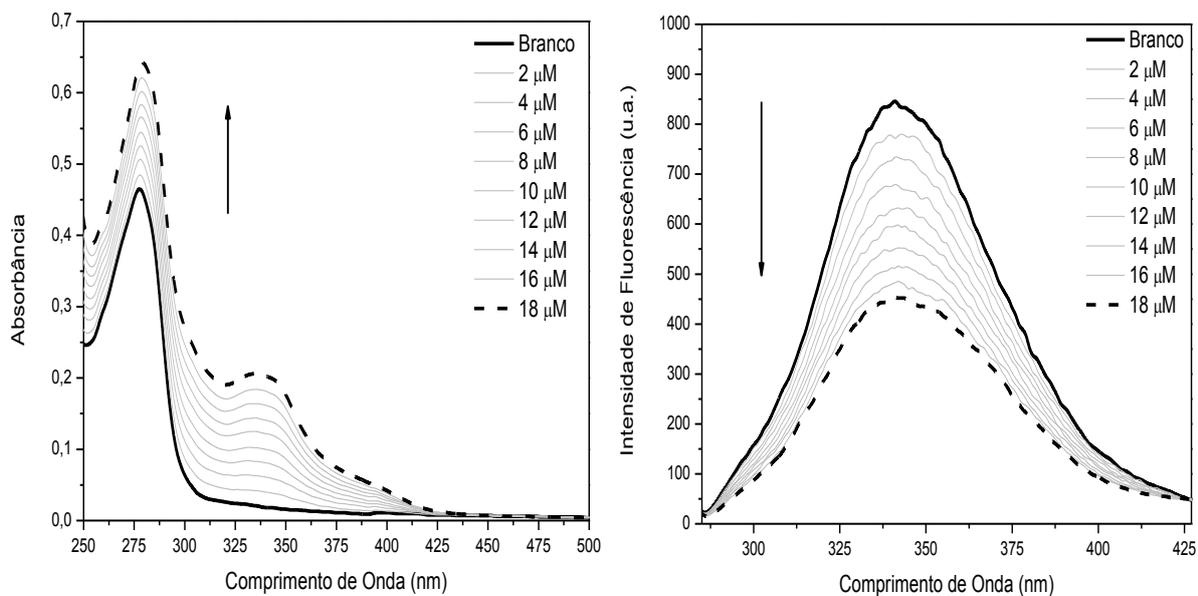
**Figura 77.** Espectros de absorção de UV-Vis (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) de BSA (11  $\mu\text{M}$  – 1 mL) na presença de diferentes concentrações de **40** (2-20  $\mu\text{M}$ ). Supressão de fluorescência: 42%.



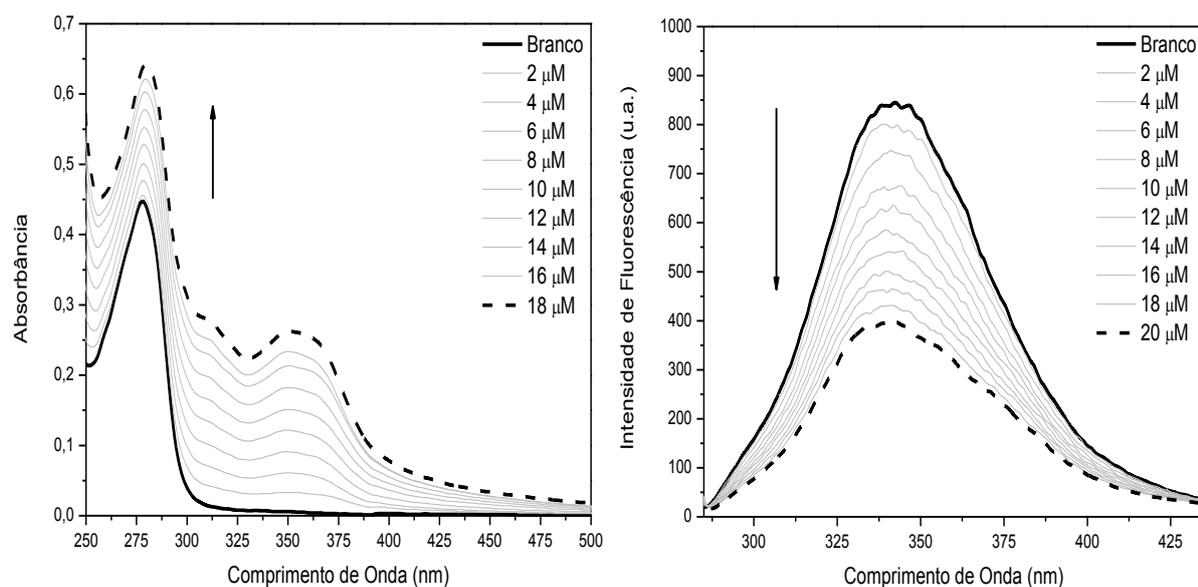
**Figura 78.** Espectros de absorção de UV-Vis (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) de BSA (11  $\mu\text{M}$  – 1mL) na presença de diferentes concentrações de **41** (2-20  $\mu\text{M}$ ). Supressão de fluorescência: 50%.



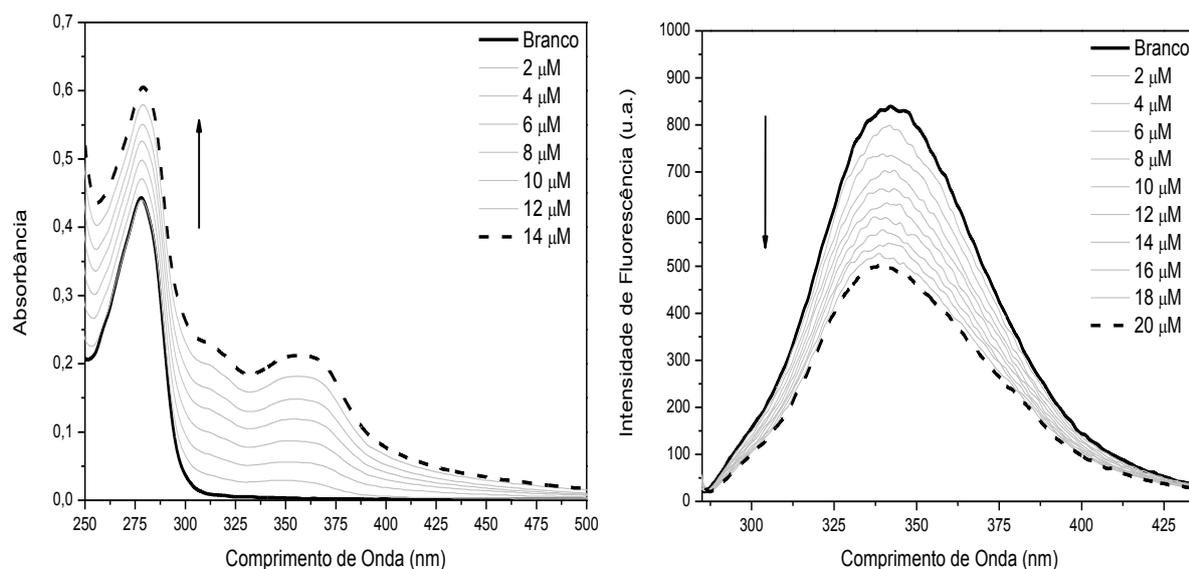
**Figura 79.** Espectros de absorção de UV-Vis (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) de BSA (11  $\mu\text{M}$  – 1mL) na presença de diferentes concentrações de **42** (2-20  $\mu\text{M}$ ). Supressão de fluorescência: 41%.



**Figura 80.** Espectros de absorção de UV-Vis (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) de BSA ( $11 \mu\text{M} - 1\text{mL}$ ) na presença de diferentes concentrações de **43** ( $2-20 \mu\text{M}$ ). Supressão de fluorescência: 48%.



**Figura 81.** Espectros de absorção de UV-Vis (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) de BSA ( $11 \mu\text{M} - 1\text{mL}$ ) na presença de diferentes concentrações de **44** ( $2-20 \mu\text{M}$ ). Supressão de fluorescência: 53%.



**Figura 82.** Espectros de absorção de UV-Vis (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) de BSA (11  $\mu\text{M}$  – 1mL) na presença de diferentes concentrações de **45** (2-20  $\mu\text{M}$ ). Supressão de fluorescência: 41%.

Pelos espectros de absorção e emissão de fluorescência verifica-se que com o aumento da concentração dos corantes **40-45**, ocorre um aumento na absorbância em aproximadamente 277 nm, que corresponde à região de absorção da BSA e supressão da intensidade fluorescência da BSA em 342 nm. Todas as moléculas estudadas apresentaram boa interação com a BSA, com supressão de fluorescência em torno de 40-50% (Figuras 77-82), sendo estas maiores para os compostos contendo 12 átomos de carbono na cadeia alifática (Tabela 11).

**Tabela 11.** Porcentagem de supressão da banda de emissão da BSA (277 nm) pela interação com os corantes **40-45**.

Corante	Porcentagem de supressão (%)
<b>40</b>	42
<b>41</b>	50
<b>42</b>	41
<b>43</b>	48
<b>44</b>	53
<b>45</b>	41

A supressão da fluorescência pode ser classificada como dinâmica ou estática. O mecanismo dinâmico é resultante das colisões entre o fluoróforo e o supressor, enquanto que o mecanismo estático resulta da formação de um complexo no estado fundamental entre o fluoróforo e o supressor.<sup>36</sup> Para se investigar o mecanismo de supressão, foram feitos gráficos

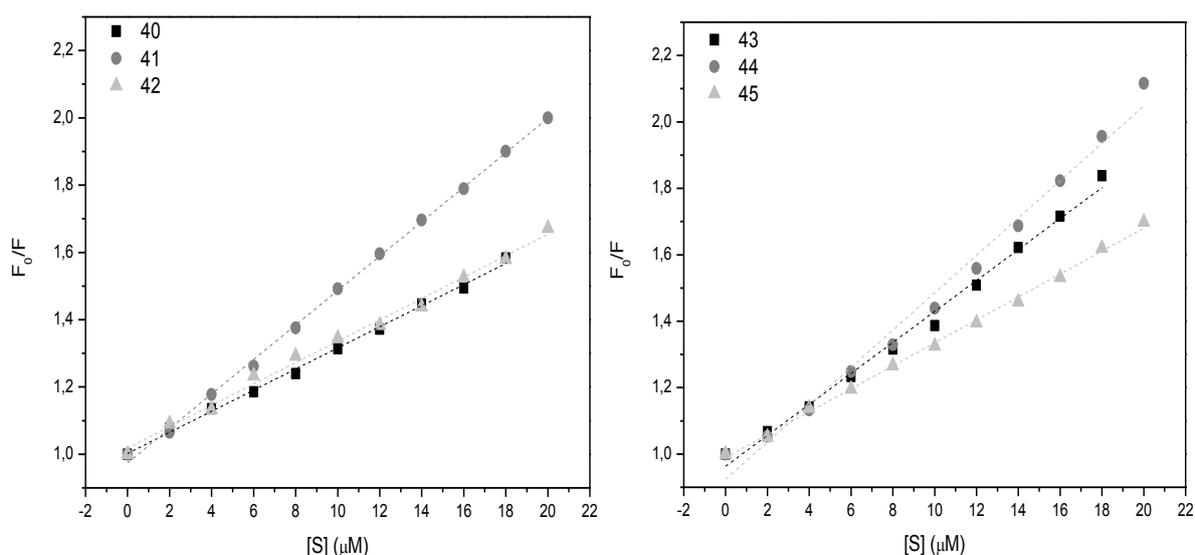
de  $F_0/F$  em relação à concentração de corante adicionada (Curvas de Stern-Volmer) (Figura 83) para as seis titulações, e, as constantes de supressão foram obtidas através da Equação de Stern-Volmer (Equação 6).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [S] \quad (6)$$

onde  $F_0$  é a intensidade de fluorescência da solução de BSA pura (branco),  $F$  é a intensidade de fluorescência da BSA na presença do supressor;  $K_q$  é a constante bimolecular de supressão;  $\tau_0$  é o tempo de vida do fluoróforo no estado excitado na ausência do supressor, com valor de  $10^{-8}$  s para biomoléculas;<sup>102</sup>  $[S]$  é a concentração do supressor e  $K_{SV}$  é a constante de supressão de Stern-Volmer. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 12.

**Tabela 12.** Resultados obtidos a partir da equação de Stern-Volmer, à 25°C.

Corante	Regressão Linear	R <sup>2</sup>	K <sub>SV</sub> (L·mol <sup>-1</sup> )	K <sub>q</sub> (L·mol <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )
40	$F_0/F=3,14 \times 10^4 [S]+1,0022$	0,9969	$3,14 \times 10^4$	$3,14 \times 10^{12}$
41	$F_0/F=5,12 \times 10^4 [S]+0,9746$	0,9986	$5,12 \times 10^4$	$5,12 \times 10^{12}$
42	$F_0/F=3,18 \times 10^4 [S]+1,0180$	0,9927	$3,18 \times 10^4$	$3,18 \times 10^{12}$
43	$F_0/F=4,66 \times 10^4 [S]+0,9663$	0,9916	$4,66 \times 10^4$	$4,66 \times 10^{12}$
44	$F_0/F=5,62 \times 10^4 [S]+0,9237$	0,9859	$5,62 \times 10^4$	$5,62 \times 10^{12}$
45	$F_0/F=3,46 \times 10^4 [S]+0,9890$	0,9975	$3,46 \times 10^4$	$3,46 \times 10^{12}$



**Figura 83.** Curvas de Stern-Volmer aplicadas ao máximo de emissão da BSA em 342 nm na presença dos corantes 40-45.

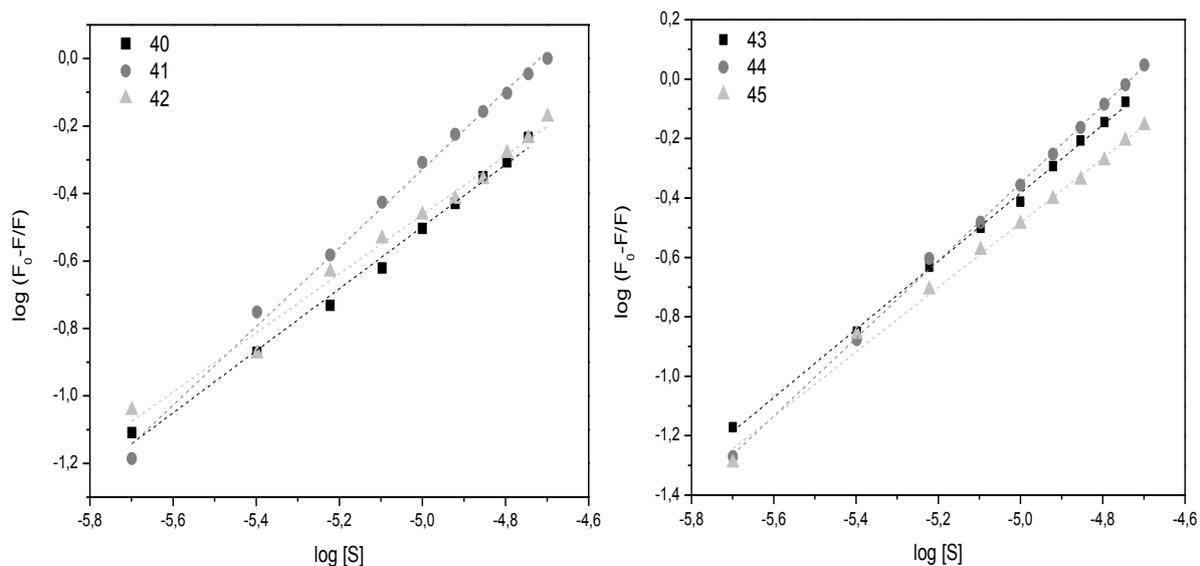
A partir dos dados obtidos pela equação de Stern-Volmer (Tabela 12), verifica-se que os valores de  $K_{SV}$  se encontram entre  $10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ , enquanto que para  $K_q$  se encontram entre  $10^{12} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Estes resultados indicam um mecanismo de supressão de natureza estática, em que ocorre a formação de um complexo entre as amins e a BSA, pois, de acordo com a literatura,<sup>78</sup> os valores limites da constante bimolecular de supressão ( $K_q$ ) para mecanismos dinâmicos são de  $2,0 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Considerando mecanismo estático, pode-se calcular a constante de ligação ( $K_A$ ) e o número de sítios de ligação ( $n$ ) entre a BSA e o supressor através da equação 7.<sup>73</sup>

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log K_A + n \log [S] \quad (7)$$

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 13 e os gráficos das regressões lineares encontram-se na Figura 84.

**Tabela 13.** Constante de ligação com BSA e número de sítios de ligação para as amins **40-45**, à 25°C.

Corante	Regressão Linear	R <sup>2</sup>	K <sub>A</sub> (L·mol <sup>-1</sup> )	N
<b>40</b>	$\log(F_0-F/F)=4,10+0,92 \log[S]$	0,9928	$1,26 \times 10^4$	0,92
<b>41</b>	$\log(F_0-F/F)=5,50+1,16 \log[S]$	0,9953	$3,13 \times 10^5$	1,16
<b>42</b>	$\log(F_0-F/F)=3,91+0,88 \log[S]$	0,9878	$8,19 \times 10^3$	0,88
<b>43</b>	$\log(F_0-F/F)=5,35+1,15 \log[S]$	0,9983	$2,24 \times 10^5$	1,15
<b>44</b>	$\log(F_0-F/F)=6,18+1,31 \log[S]$	0,9989	$1,51 \times 10^6$	1,31
<b>45</b>	$\log(F_0-F/F)=4,95+1,09 \log[S]$	0,9933	$8,91 \times 10^4$	1,09



**Figura 84.** Curvas de  $\log [S]$  x  $\log (F_0-F/F)$  utilizadas para o cálculo da constante de ligação ( $K_A$ ) e número de sítios de ligação das moléculas **40-45** com a BSA.

Com estes resultados, verifica-se que os valores de constante de ligação se encontram entre  $10^3$ - $10^6$   $L \cdot mol^{-1}$ , sendo maiores para moléculas que contêm 12 carbonos na cadeia alifática. Além disso, pode-se destacar que para todas as moléculas há apenas 1 sítio de ligação com a BSA na temperatura de  $25^\circ C$ .

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram sintetizadas seis novas aminas lipofílicas fluorescentes com rendimentos satisfatórios, contendo cadeias alquílicas de diferentes tamanhos, derivadas de compostos heterocíclicos benzazólicos.

As moléculas sintetizadas foram incorporadas em dois tipos de lipossomas, sendo um deles composto por fosfatidilcolina da lecitina de soja (PC) e o outro composto por PC contendo o anfifílico glicoconjugado (C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc), ambos em proporção de 1:1 (m/m). Os elevados valores de potencial zeta encontrados tanto na ausência quanto na presença das aminas, demonstrou que estes sistemas apresentam estabilidade coloidal contra processos de agregação, mesmo quando mantidos à temperatura ambiente por um período de 30 dias. Análises de feitas por DLS indicaram um diâmetro para as vesículas de 100 nm, além disso, foi verificado que a presença da molécula não causou alteração significativa no tamanho das vesículas.

Todas as moléculas apresentaram valores de  $\epsilon \sim 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , característicos para transições eletrônicas do tipo  ${}^1\pi\text{-}\pi^*$  e emissão de fluorescência proveniente do processo de ESIPT. A perda de energia no estado excitado pelo mecanismo de ESIPT e por outros processos não-radiativos, explica os baixos valores de rendimento quântico de fluorescência nos três solventes orgânicos. Outro aspecto a ser destacado é o fato de que em solventes orgânicos não há variação significativa no comprimento de onda do máximo de absorção e emissão com o aumento do tamanho da cadeia alquílica das moléculas, contudo, quando em solução de tampão PBS (pH 7,2) verifica-se um deslocamento batocrômico com o aumento da cadeia alifática de 4 para 12 e 18 carbonos, no espectro de absorção, além de favorecimento do processo de ESIPT no espectro de emissão. Esta característica apresentada pelas aminas **40-45** possivelmente pode ser atribuída à processos de formação de estruturas supramoleculares (agregados) quando em solução de PBS, devido à presença das longas cadeias alquílicas que são altamente hidrofóbicas.

O estudo fotofísico das moléculas **40-45** inseridas nos lipossomas PC e C<sub>22</sub>PC em solução de tampão PBS indica que para moléculas que possuem 4 carbonos na cadeia alifática foi verificado deslocamento batocrômico nos espectros de absorção com a incorporação do corante no lipossoma. No espectro de emissão de fluorescência, verificou-se predominância da emissão resultante do mecanismo de ESIPT. Para as moléculas que possuem 12 e 18 carbonos na cadeia alifática, a inserção no ambiente hidrofóbico do lipossoma foi verificada através de um leve deslocamento hipsocrômico, tanto nos espectros de absorção, quanto nos espectros de emissão de fluorescência. A preferência pela emissão ESIPT, para os corantes

sintetizados, indica que estes se encontram preferencialmente no ambiente hidrofóbico da bicamada lipídica, onde ligações de hidrogênio da hidroxila fenólica com a água, que favorecem a emissão normal são minimizadas.

Os altos valores de coeficiente de partição apresentados pelas aminas sintetizadas indicam que estas moléculas apresentam alta lipofilicidade e boa incorporação com as vesículas de lipossomas. A tendência à saturação com o aumento da cadeia alifática para derivados benzoxazólicos indica um aumento na lipofilicidade das mesmas em relação ao aumento do tamanho da cadeia alifática. No entanto, foi verificado que, para moléculas derivadas do benzotiazol não ocorreu aumento significativo nos valores do coeficiente de partição com o aumento do número de carbonos da cadeia alifática.

Para os lipossomas contendo as aminas, foi verificada diminuição na intensidade de fluorescência e deslocamento batocrômico da banda em 350 nm, referente à emissão da lectina WGA, conforme aumento da concentração de lipossoma adicionado, indicando interação deste com os resíduos de triptofano da WGA. No entanto, para adição do lipossoma na ausência de aminas (puro) não houve alteração na banda correspondente à emissão da lectina WGA, apesar de ter sido comprovado em trabalhos anteriores a interação entre lipossomas C<sub>22</sub>PC com a lectina aglutinina de germe de trigo (WGA), através de análises de DLS.

Verificou-se que todas as moléculas estudadas apresentaram boa interação com a BSA, com supressão de fluorescência da proteína em torno de 40-50%, sendo estas maiores para os compostos contendo 12 átomos de carbono na cadeia alifática. A partir dos dados obtidos pela equação de Stern-Volmer, verificou-se que os valores apresentados pela constante bimolecular de supressão indicaram mecanismo de supressão de natureza estática, em que ocorre a formação de um complexo entre as aminas e a BSA. Além disso, pode-se destacar que para todas as moléculas há apenas 1 sítio de ligação com a BSA na temperatura de 25°C.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as moléculas sintetizadas apresentaram boa incorporação aos lipossomas estudados e possivelmente podem ser utilizadas como sondas lipofílicas de membrana ou serem incorporadas em veículos carreadores de fármacos para diagnósticos por imagem, porém, estudos mais aprofundados devem ser feitos.

## 6. EXPERIMENTAL

### 6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental desta dissertação foi realizada no Grupo de Pesquisa em Fotoquímica Orgânica Aplicada (GPFOA), localizado no Instituto de Química da UFRGS. Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e solventes: ácido acético glacial P.A., diclorometano P.A., acetato de etila P.A., n-Hexano P.A., *N,N*-dimetilformamida, acetonitrila HPLC, clorofórmio P.A., álcool isopropílico P.A., álcool metílico P.A., álcool etílico P.A., tolueno P.A., ácido trifluoroacético 99% , o-aminofenol 99%, ácido polifosfórico 105%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , octadecilamina 97%, ácido 3-metil-salicílico 97%, o-aminotiofenol 99%, hexametilenotetramina P.A., butilamina 99,5%, dodecilamina 98%, borohidreto de sódio 99%, bicarbonato de sódio P.A., sulfato de sódio anidro P.A., cloreto de sódio P.A., fosfato de potássio monobásico –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , fosfato de sódio dibásico anidro -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , albumina bovina fração V (Alamar Tecno-Científica). Todos os reagentes foram utilizados sem a necessidade de tratamento prévio, contudo, procedeu-se a secagem do álcool isopropílico com o auxílio de peneira molecular com poros de diâmetro de 3Å a qual foi previamente ativada em mufla a 200°C por um período de 2 horas. Tampão fosfato salino (PBS) foi preparado a partir de 9,0 g de cloreto de sódio, 1,18 g de fosfato de potássio monobásico, 4,32 g de fosfato de sódio dibásico anidro e 1 L de água Milli-Q, resultando em uma solução salina de pH 7,2.

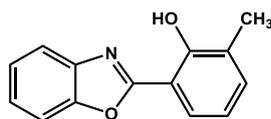
O acompanhamento das reações foi feito por cromatografia em camada delgada, enquanto que a purificação dos produtos foi realizada por cromatografia em coluna empregando Sílica-Gel 60 (70-230 Mesh) como fase estacionária. Estes foram caracterizados através de ponto de fusão, Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) e Carbono (APT) assim como Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS). Os pontos de fusão foram determinados através de aquecimento controlado por um aparelho de ponto de fusão a seco Q340S-Quimis (valores não corrigidos). Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro com transformada de Fourier, IR Prestige-21 - Shimadzu, na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando pastilhas de KBr ou Alpha FTIR - Bruker em modo ATR. As medidas de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) e de carbono-13 (RMN de  $^{13}\text{C}$  - APT) foram realizadas à 25°C nos espectrômetros Varian Inova ou Varian VNRs (300 MHz ou 75,4 MHz) ou Bruker BioSpin (400 MHz ou 100,6 MHz). Os deslocamentos químicos foram expressos como  $\delta$  (ppm) relativos ao tetrametilsilano (TMS) como padrão. Clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) (Aldrich) foi usado

como solvente em tubos de 5 mm de diâmetro. A espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) foi realizada com infusão direta e ionização por Eletrospray (ESI-MS) em modo positivo utilizando um espectrômetro de massas microQTOF-Q II da marca Bruker e modelo Impact II. As condições empregadas para a aquisição dos espectros foram: pressão do nebulizador 0,3 Bar com fluxo de 4 L·min<sup>-1</sup> em uma temperatura do gás de secagem a 200°C. Os dados foram coletados na faixa de 50-1200 m/z. A voltagem no capilar foi de + 4500 V, enquanto que a voltagem End Plate Offset foi de + 500 V. A calibração foi feita antes das análises com formato de sódio. Os espectros de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV 2450. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301PC onde o comprimento de onda do máximo de absorção ( $\lambda_{\text{abs}}$ ) foi usado como comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{\text{exc}}$ ). Estes experimentos foram realizados à temperatura ambiente (25°C) em solução com concentração de aproximadamente 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup> em etanol absoluto, acetonitrila, tolueno e tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2. Para o cálculo do rendimento quântico em solução, foram feitas medidas considerando absorbâncias menores que 0,1. Como padrão foi utilizado sulfato de quinina (Riedel) ( $\Phi_{\text{F}} = 0,55$ ).<sup>103</sup>

## 6.2 SÍNTESE DOS PRECURSORES BENZAZÓLICOS

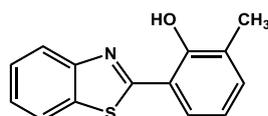
### 6.2.1 Síntese dos precursores 27 e 28

Em um balão de 100 mL foram adicionados 20 mmol (3,04 g) do ácido 3-metilsalicílico (**26**) e 20 mmol da respectiva amina aromática (**24-25**) (2,18 g de *o*-aminofenol (**24**) ou 2,14 mL de *o*-aminotiofenol (**25**)). Ácido polifosfórico (30 mL) foi adicionado ao sistema até completa homogeneização. A mistura viscosa foi agitada a 120°C por 2 horas e 170°C por 3 horas, sendo o final da reação verificado através de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando diclorometano como eluente. Após resfriamento, a mistura reacional foi vertida em gelo, neutralizada com solução saturada bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) e mantida em repouso por 24 horas para garantir completa formação de precipitado. A mistura foi filtrada em funil de Büchner e o bruto reacional foi seco à temperatura ambiente. Posteriormente foi feita purificação por cromatografia em coluna utilizando diclorometano como eluente.



**2-(2'-Hidroxi-3'-metilfenil)benzoxazol (27).** Sólido branco.

Rendimento: 58% (2,61 g). Ponto de fusão: 125-126°C. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 11,66 (s, 1H, OH), 7,86–7,84 (m, 1H), 7,71–7,67 (m, 1H), 7,59–7,54 (m, 1H), 7,37–7,32 (m, 2H), 7,29–7,26 (ddd,  $J = 7,2, 1,6$  e  $0,8$  Hz, 1H), 6,89 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H), 2,34 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). FTIR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3060 (v C-H aromático), 2952 ( $\nu_{\text{as}}$  CH alifático), 2917 ( $\nu_{\text{s}}$  CH alifático), 1628 (C=C anel aromático), 1244 (C-O), 740 (intensa, benzeno *o*-substituído).

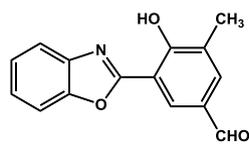


**2-(2'-Hidroxi-3'-metilfenil)benzotiazol (28).** Sólido branco.

Rendimento: 70% (3,37 g). Ponto de fusão: 135-137°C. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 12,76 (s, 1H, OH), 7,95 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,86 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,54-7,46 (m, 2H), 7,38 (t,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,24 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 6,85 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 2,37 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). FTIR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3428 (v OH), 3055 (v C-H aromático), 2911 ( $\nu_{\text{as}}$  CH alifático), 2856 ( $\nu_{\text{s}}$  CH alifático), 1618 (C=C anel aromático), 1240 (C-O), 763 (benzeno *o*-substituído).

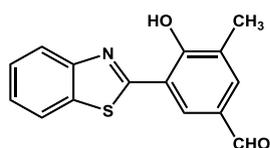
### 6.2.2 Síntese dos precursores formilados 29 e 30

Em um Schlenck foram adicionados 1 mmol do precursor benzazólico **27** (0,225 g) ou **28** (0,241 g) e 10 mmol (1,4 g) de hexametilenotetramina (HMTA). Em seguida, foi adicionado 5 mL de ácido trifluoroacético. A mistura foi aquecida à temperatura de 90°C e mantida sob refluxo por aproximadamente 7 horas e o monitoramento da reação foi feito por CCD, utilizando diclorometano como eluente. Após este período, 10 mL de água foram adicionados ao sistema reacional e a mistura permaneceu em refluxo por um período de 60 minutos. O precipitado obtido foi filtrado em funil de Büchner, lavado com diversas porções de água deionizada e o sólido bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando diclorometano como eluente.



**2-(5'-Formil-2'-hidroxi-3'-metilfenil)benzoxazol (29).** Sólido branco.

Rendimento: 90% (0,228 g). Ponto de fusão: 170-172°C (Lit. 162-166°C [22]). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 12,35 (s, 1H, OH), 9,91 (s, 1H, CHO), 8,39 (s, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,75–7,71 (m, 1H), 7,65–7,60 (m, 1H), 7,43–7,39 (m, 2H), 2,39 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). FTIR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3094 (v C-H aromático), 2952 ( $\nu_{\text{as}}$  CH alifático), 2919 ( $\nu_{\text{s}}$  CH alifático), 2815 e 2716 (v CH aldeído), 1698 (C=O aldeído).

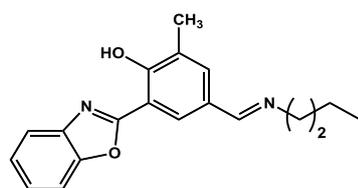


**2-(5'-Formil-2'-hidroxi-3'-metilfenil)benzotiazol (30).** Sólido amarelo pálido. Rendimento: 88% (0,237 g). Ponto de fusão: 185-187°C (Lit. 180-186°C [22]). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 13,57 (s, 1H, OH), 9,90 (s, 1H, CHO), 8,06 (d,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 7,99 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 7,94 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7,77 (d,  $J = 0,4$  Hz, 1H), 7,54 (td,  $J = 7,2$  e 1,2 Hz, 1H), 7,46 (td,  $J = 7,2$  e 1,2 Hz, 1H), 2,41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). FTIR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3059 ( $\nu$  C-H aromático), 2955 ( $\nu_{\text{as}}$  CH alifático), 2920 ( $\nu_{\text{s}}$  CH alifático), 2806 e 2719 ( $\nu$  CH aldeído), 1687 (C=O aldeído).

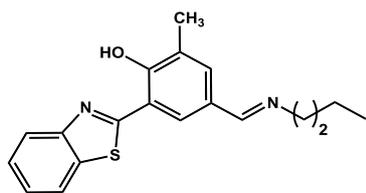
## 6.3 SÍNTESE DAS IMINAS 34-39

### 6.3.1 Procedimento I - Síntese das iminas 34 e 37

Em um balão de 50 mL foram adicionadas as benzazolas formiladas (**29-30**) (1 mmol) e a amina alifática (**31**) (2 mmol), em proporção 1:2 respectivamente. Isopropanol (20 mL) foi utilizado como solvente e 50  $\mu\text{L}$  de ácido acético foram adicionadas em sequência. A mistura reacional foi mantida sob agitação à 50°C por 48 horas em sistema fechado. Após este período, o balão foi aberto e houve aumento da temperatura até aproximadamente 110-120°C, para garantir o deslocamento do equilíbrio reacional a favor da formação dos produtos, que ocorre a partir da evaporação do solvente, da água formada no meio reacional e de resquícios de ácido acético presentes. O solvente foi evaporado até *secura* e, cessado o aquecimento, foi observada a formação de um líquido viscoso. Após atingir temperatura ambiente, é formado um sólido correspondente à imina desejada (**34 e 37**). Devido à instabilidade destas iminas não foi procedida a purificação das mesmas.



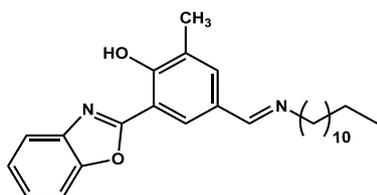
**Imina 34.** Sólido amarelo. Rendimento: 94% (0,290 g). Ponto de fusão: 104-108°C. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 11,93 (s, 1H, OH), 8,24 (s, 1H, H-C=N), 8,18 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H), 7,76 (d,  $J = 1,2$  Hz, 1H), 7,74–7,71 (m, 1H), 7,62–7,59 (m, 1H), 7,42–7,36 (m, 2H), 3,62 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 2,38 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,71 (quint.,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,41 (sext,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 0,97 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H). FTIR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3099 ( $\nu$  C-H aromático), 3031 ( $\nu$  C-H aromático), 2952 ( $\nu_{\text{as}}$  CH alifático), 2926 ( $\nu_{\text{s}}$  CH alifático), 1648 (C=N imina).



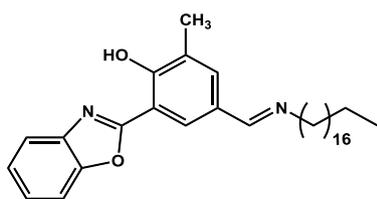
**Imina 37.** Sólido marrom avermelhado. Rendimento: 88% (0,285 g). Ponto de fusão: 44-46°C. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 13,08 (s, 1H, OH), 8,22 (s, 1H, H-C=N), 7,97 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,91 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,84 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,51 (td,  $J = 7,2$  e 1,2 Hz, 1H), 7,41 (td,  $J = 7,5$  e 1,2 Hz, 1H), 3,61 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 2,37 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,70 (quint.,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,41 (sext,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 0,97 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H). FTIR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3060 (v C-H aromático), 2955 ( $\nu_{\text{as}}$  CH alifático), 2923 ( $\nu_{\text{s}}$  CH alifático), 1644 (C=N imina).

### 6.3.2 Procedimento II - Síntese das iminas 35, 36, 38 e 39

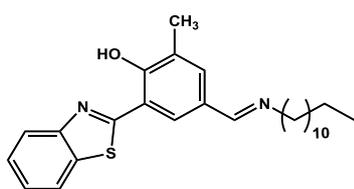
Em um balão de 50 mL foram adicionadas quantidades equimolares das benzazolas formiladas (**29-30**) (1 mmol) e as respectivas aminas alifáticas (**32-33**) (1 mmol). Isopropanol (20 mL) foi utilizado como solvente e 50  $\mu\text{L}$  de ácido acético foram adicionadas em sequência. A mistura reacional foi mantida sob agitação à 80°C por aproximadamente 5 horas, sendo o solvente adicionado em pequenas porções (5 mL) ao sistema ao longo do progresso da reação. Após este período, houve aumento da temperatura até aproximadamente 110-120°C, para garantir o deslocamento do equilíbrio reacional a favor da formação dos produtos, que ocorre a partir da evaporação do solvente, da água formada no meio reacional e de resquícios de ácido acético presentes. O solvente foi evaporado até secura e, cessado o aquecimento, foi observada a formação de um líquido viscoso. Após atingir temperatura ambiente, é formado um sólido correspondente à imina desejada (**35, 36, 38 e 39**). Por meio de caracterização por espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e de infravermelho, verificou-se que não foi necessária a etapa de purificação.



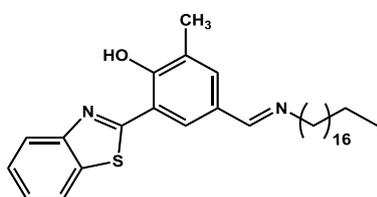
**Imina 35.** Sólido branco. Rendimento: 99% (0,418 g). Ponto de fusão: 88-92°C. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 11,94 (s, 1H, OH), 8,24 (s, 1H, H-C=N), 8,19 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H), 7,77 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H), 7,75-7,72 (m, 1H), 7,63-7,59 (m, 1H), 7,42-7,36 (m, 2H), 3,61 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,38 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,72 (quint.,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,26 (m, 18 H), 0,87 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H). FTIR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3100 (v C-H aromático), 3043 (v C-H aromático), 2921 ( $\nu_{\text{as}}$  CH alifático), 2847 ( $\nu_{\text{s}}$  CH alifático), 1647 (C=N imina).



**Imina 36.** Sólido laranja. Rendimento: 98% (0,494 g). Ponto de fusão: 80-84°C. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 11,88 (s, 1H, OH), 8,24 (s, 1H, H-C=N), 8,18 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,74–7,71 (m, 1H), 7,62–7,59 (m, 1H), 7,41–7,36 (m, 2H), 3,61 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 2,38 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,72 (quint.,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 1,25 (m, 30 H), 0,88 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H). FTIR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3104 ( $\nu$  C-H aromático), 2920 ( $\nu_{\text{as}}$  CH alifático), 2846 ( $\nu_{\text{s}}$  CH alifático), 1645 (C=N imina).



**Imina 38.** Sólido marrom avermelhado. Rendimento: 100% (0,436 g). Ponto de fusão: 78-82°C. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 13,12 (s, 1H, OH), 8,22 (s, 1H, H-C=N), 7,98 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,92 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,84 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,51 (dt,  $J = 7,8$  e 0,9 Hz, 1H), 7,42 (dt,  $J = 8,1$  e 0,9 Hz, 1H), 3,61 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,38 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,71 (quint.,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,26 (m, 18H), 0,87 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H). FTIR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3061 ( $\nu$  CH aromático), 2917 ( $\nu_{\text{as}}$  CH alifático), 2848 ( $\nu_{\text{s}}$  CH alifático), 1643 (C=N imina).



**Imina 39.** Sólido amarelo. Rendimento: 81% (0,421 g). Ponto de fusão: 90-94°C. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 13,12 (s, 1H, OH), 8,21 (s, 1H, H-C=N), 7,97 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,91 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,83 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,54-7,47 (dt,  $J = 8,1$  e 1,2 Hz, 1H), 7,44-7,38 (dt,  $J = 8,1$  e 1,2 Hz, 1H), 3,60 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,38 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,71 (quint.,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 1,25 (m, 30H), 0,88 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H). FTIR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3055 ( $\nu$  CH aromático), 2921 ( $\nu_{\text{as}}$  CH alifático), 2849 ( $\nu_{\text{s}}$  CH alifático), 1644 (C=N imina).

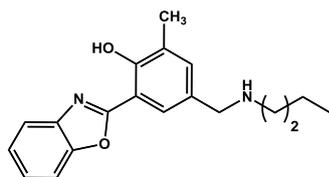
## 6.4 ESTUDO DA HIDRÓLISE DAS IMINAS 34-39

Cerca de 3 mg da respectiva imina (**34-39**) foi solubilizada em um 1 mL de diclorometano, gerando uma solução-mãe de concentração aproximada de  $10^{-3}$  mol·L $^{-1}$ . Cerca de 10  $\mu\text{L}$  desta solução foram adicionadas em 3 mL de etanol absoluto resultando em uma concentração final de aproximadamente  $10^{-5}$  mol·L $^{-1}$ . À esta solução foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de ácido acético 0,1 mol·L $^{-1}$ . As medidas foram acompanhada por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis em intervalos de 60 segundos. Por um período de 15 minutos para as iminas **34-36** e 45 minutos para as iminas **37-39**. Para as iminas

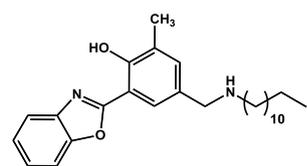
**38 e 39**, foi feito o estudo da cinética de hidrólise, em que foram calculadas as concentrações a partir dos valores das absorbâncias no comprimento de onda do máximo de absorção. As concentrações foram utilizadas para a determinação da ordem da reação.

## 6.5 SÍNTESE DAS AMINAS 40-45

Em um balão de 50 mL foi adicionada a respectiva imina (**34-39**) (0,4 mmol), borohidreto de sódio (0,9 mmol), isopropanol seco (5 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente e o fim da reação foi confirmado por CCD, utilizando acetato de etila como eluente. O solvente foi removido em evaporador rotatório. O sólido resultante foi dissolvido em clorofórmio (30 mL), lavado com solução de bicarbonato de sódio (20 mL), seco com sulfato de sódio anidro e filtrado em funil. O clorofórmio foi removido em evaporador rotatório e o sólido bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando acetato de etila como eluente para obtenção dos produtos **40-45**.

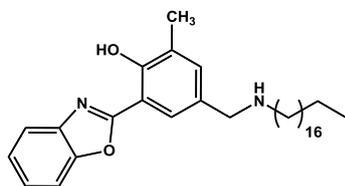


**Amina 40.** Sólido amarelo pálido. Rendimento: 76% (0,094 g). Ponto de fusão: 58-60°C. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 11,60 (s, 1H, OH), 7,85 (d,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 7,75-7,71 (m, 1H), 7,63-7,59 (m, 1H), 7,41-7,36 (m, 2H), 7,30 (d,  $J = 1,2$  Hz, 1H), 3,78 (s, 2H), 2,68 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,37 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,67 (s, 1H, NH amina), 1,55 (quint.,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,39 (sext,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 0,95 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (APT) (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 163,3; 156,2; 149,1; 140,0; 134,8; 130,5; 126,6; 125,2; 124,9; 124,2; 119,1; 110,5; 109,5; 53,3; 49,0; 32,0; 20,5; 16,0; 14,0. FTIR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3410 (v NH amina), 3025 (v C-H aromático), 2955 (v CH alifático), 2924 (v CH alifático), 2854 (v CH alifático), 2815 (v CH alifático). HRMS (ESI-qTOF)  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2$ : 311,1754; encontrado: 311,1752.

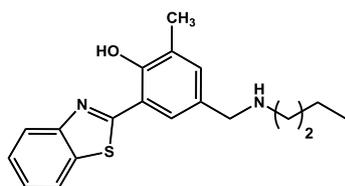


**Amina 41.** Sólido amarelo pálido. Rendimento: 72% (0,123 g). Ponto de fusão: 74-76°C. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 11,61 (s, 1H, OH), 7,85 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 7,76-7,71 (m, 1H), 7,64-7,59 (m, 1H), 7,41-7,36 (m, 2H), 7,31 (d,  $J = 1,2$  Hz, 1H), 3,79 (s, 2H), 2,68 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,37 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,72 (s, 1H, NH amina), 1,56 (quint.,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,27 (m, 18 H), 0,90 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H). APT (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 163,4; 156,2; 149,2; 140,1; 134,8; 131,0; 126,6; 125,2; 124,9; 124,1; 119,2; 110,6; 109,5; 53,4; 49,5; 31,9; 30,1; 29,7; 29,6; 29,6; 29,4; 27,4; 22,7; 16,0; 14,1. FTIR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3410 (v NH

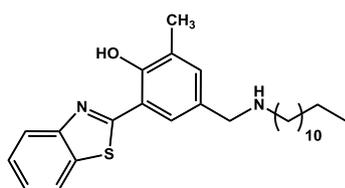
amina), 3076 (v C-H aromático), 2918 (v CH alifático), 2853 (v CH alifático). HRMS (ESI-qTOF) m/z:  $[M + H]^+$  calculado para  $C_{27}H_{39}N_2O_2$ : 423,3006; encontrado: 423,3004.



**Amina 42.** Sólido amarelo Pálido. Rendimento: 80% (0,162 g). Ponto de fusão: 85-88°C. RMN de  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 11,61 (s, 1H, OH), 7,82 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H), 7,74-7,70 (m, 1H), 7,60-7,56 (m, 1H), 7,40-7,34 (m, 2H), 7,28 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H), 3,76 (s, 2H), 2,65 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,35 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,74 (s, 1H, NH amina), 1,55-1,48 (m, 2H), 1,24 (m, 30H), 0,88 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H). APT (75,4 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 163,3; 156,1; 149,1; 140,1; 134,7; 131,1; 126,5; 125,2; 124,9; 124,1; 119,1; 110,5; 109,4; 53,5; 49,5; 31,9; 30,1; 29,7; 29,6; 29,6; 29,4; 27,4; 22,7; 16,0; 14,1. FTIR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3418 (v NH amina), 3066 (v C-H aromático), 2918 (v CH alifático), 2847 (v CH alifático). HRMS (ESI-qTOF) m/z:  $[M + H]^+$  calculado para  $C_{33}H_{51}N_2O_2$ : 507,3945; encontrado: 507,3942.

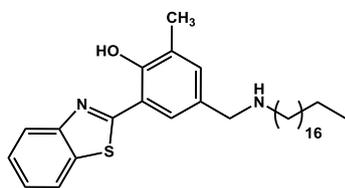


**Amina 43.** Sólido laranja. Rendimento: 68% (0,085 g). Ponto de fusão: 48-50°C. RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 12,73 (s, 1H, OH), 7,97 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7,91 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H), 7,53-7,49 (m, 2H), 7,41 (dt,  $J = 8$  e 0,8 Hz, 1H), 7,25 (s, 1H), 3,77 (s, 2H), 2,69 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,37 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,65 (s, 1H, N-H amina), 1,55 (quint.,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,40 (sext.,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 0,95 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H). APT (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 169,8; 155,4; 151,9; 133,9; 132,8; 130,9; 127,0; 126,6; 125,5; 125,4; 122,0; 121,5; 115,7; 53,4; 49,2; 32,2; 20,5; 16,1; 14,1. FTIR (ATR,  $cm^{-1}$ ): 3449 (v NH amina), 3057 (v CH aromático), 2958 (v CH alifático), 2924 (v CH alifático), 2850 (v CH alifático), 2810 (v CH alifático). HRMS (ESI-qTOF) m/z:  $[M + H]^+$  calculado para  $C_{19}H_{23}N_2OS$ : 327,1526; encontrado: 327,1521.



**Amina (44).** Sólido amarelo. Rendimento: 67% (0,117 g). Ponto de fusão: 70-74°C. RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 12,72 (s, 1H, OH), 7,98 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7,91 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7,51 (m, 2H), 7,41 (dt,  $J = 8$  e 1,2 Hz, 1H), 7,25 (s, 1H), 3,77 (s, 2H), 2,68 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,37 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,64 (s, 1H, N-H amina), 1,56 (quint.,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,27 (m, 18H), 0,90 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H). APT (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 169,8; 155,4; 151,9; 133,9; 132,8; 131,0; 127,0; 126,6; 125,5; 125,4; 122,0; 121,5; 115,7; 53,5; 49,6;

31,9; 30,1; 29,7; 29,7; 29,6; 29,4; 27,4; 22,7; 16,1; 14,1. FTIR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3420 (v NH amina), 3062 (v CH aromático), 2915 (v CH alifático), 2847 (v CH alifático). HRMS (ESI-qTOF) m/z:  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{OS}$ : 439,2778; encontrado: 439,2776.



**Amina (45).** Sólido Amarelo. Rendimento: 84% (0,175 g). Ponto de fusão: 70-74°C. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 12,71 (s, 1H, OH), 7,95 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,89 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,52-7,48 (m, 2H), 7,39 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 7,23 (s, 1H), 3,74 (s, 2H), 2,66 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,37 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,72 (s, 1H, N-H amina), 1,56–1,49 (m, 2H), 1,25 (m, 30H), 0,88 (t,  $J = 6,6$  Hz, 3H). APT (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 169,8; 155,3; 151,8; 133,9; 132,7; 131,0; 126,9; 126,6; 125,4; 125,4; 122,0; 121,5; 115,6; 53,4; 49,6; 31,9; 30,1; 29,7; 29,7; 29,7; 29,7; 29,6; 29,4; 27,4; 22,7; 16,1; 14,1. FTIR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3409 (v NH amina), 3062 (v CH aromático), 2918 (v CH alifático), 2847 (v CH alifático). HRMS (ESI-qTOF) m/z:  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{OS}$ : 523,3717; encontrado: 523,3699.

## 6.6 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA

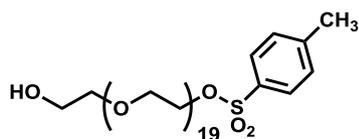
O método de preparação dos lipossomas consistiu na evaporação de fase reversa. Fosfatidilcolina (PC) (24 mg) previamente purificada foi dissolvida em clorofórmio e dispersa em 200  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato (pH 7,2) com formação de duas fases imiscíveis. A suspensão foi sonicada por 3 minutos em banho de ultrassom. O clorofórmio foi evaporado em evaporador rotatório à pressão reduzida em temperatura de 30°C, resultando em um organogel. Para a hidratação do filme lipídico, 4 mL de tampão fosfato salino (pH 7,2) foram adicionados e a solução foi agitada em vortex até formação de uma solução homogênea e leitosa o que indica a formação dos lipossomas. Estes foram filtrados utilizando filtros de membrana de nylon com poros 0,45  $\mu\text{m}$  para remoção de grandes agregados e obtenção de LUVs de tamanho uniforme.

Para a preparação de lipossomas de fosfatidilcolina (PC) contendo os corantes, na etapa inicial, foram adicionados aproximadamente de 1,2 mg da respectiva amina (**40-45**) juntamente com 24 mg da fosfatidilcolina (PC) e estes foram dissolvidos em clorofórmio. As etapas posteriores são idênticas àquelas apresentadas anteriormente para a preparação de lipossomas.

## 6.7 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS C<sub>22</sub>PC

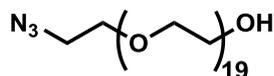
### 6.7.1 Síntese do anfifílico glicosilado C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc

O conjugado polimérico anfifílico glicosilado N-acetil-β-D-glucosaminil-PEG<sub>900</sub>-docosanoato (C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc) foi fornecido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Alexandre Gonçalves Dal-Bó (UNESC) e sintetizado através de uma série de etapas, a partir de procedimentos já descritos na literatura (Figura 42).<sup>37, 91</sup>

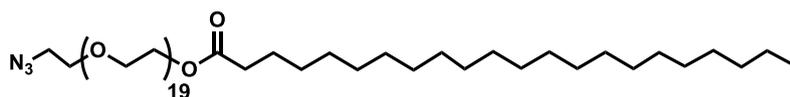


**Monotosilação do PEG<sub>900</sub>.** Em uma solução de PEG<sub>900</sub> (8,0 g; 8,9 mmol) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 mL), mantida a 0°C foi adicionado óxido de prata (3,1 g; 13,4 mmol) e iodeto de potássio (0,6 g; 3,6 mmol). Cloreto de tosila previamente recristalizado (1,78 g;

9,4 mmol) foi adicionado em uma única porção. Após 2 h, a mistura foi filtrada sobre Celite® e evaporada sob pressão reduzida resultando em um óleo incolor. O produto purificado (5,16 g; 55%) foi isolado após purificação por cromatografia em coluna utilizando sílica flesh em uma mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9:1 v/v) como eluente. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7,78 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 4,12 (t, *J* = 4,4 Hz, 2H), 3,71-3,55 (m, ~78H), 2,42 (s, 3H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 144,8; 133,0; 129,8; 128,0; 72,5; 70,7; 70,5; 70,3; 69,2; 68,6; 61,7; 21,6.



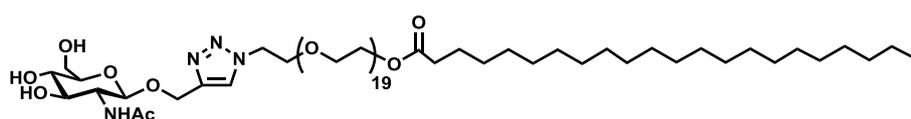
**Monoazida PEG<sub>900</sub>.** Uma solução contendo PEG<sub>900</sub>-monotosilado (2,5 g; 2,4 mmol) e NaN<sub>3</sub> (0,618 g; 9,5 mmol) dissolvidos em DMF anidro (25 mL), foi aquecida a 60°C por 18 horas e então concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica flesh em uma mistura de diclorometano:metanol (9:1 v/v) como eluente resultando na monoazida PEG<sub>900</sub> (1,86 g, 85%). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3,71-3,58 (m, ~78H), 3,37 (m, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 72,5; 70,6; 70,3; 70,0; 61,7; 50,7.



#### **Azida-PEG<sub>900</sub>-docosanoato.**

*N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,189 g; 0,911 mmol) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,0214 g; 0,175 mmol) foram adicionados em uma solução sob agitação de ácido docosanoico (0,885 g; 2,60 mmol) e a mono-azida-PEG<sub>900</sub> (0,800 g, 0,867 mmol) em diclorometano anidro (25 mL). Após 48 horas em temperatura ambiente sob atmosfera de N<sub>2</sub>, a mistura foi filtrada sobre Celite® e evaporada sob pressão reduzida resultando em um óleo incolor. A azida-PEG<sub>900</sub>-docosanoato

purificada (0,809 g; 7 5%) foi isolada após purificação por cromatografia em coluna utilizando sílica flesh em uma mistura de diclorometano:metanol (9:1 v/v) como eluente. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 4,20 (t,  $J$  = 4,8 Hz, 2H), 3,65-3,62 (m, ~78H), 3,36 (t,  $J$  = 4,9 Hz, 2H), 2,32-2,27 (m, 2H), 1,61-1,57 (m, 2H), 1,23 (m, 26H), 0,85 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 173,8; 70,6; 70,0; 69,2; 63,3; 50,7; 34,2; 33,7; 31,9; 29,6; 29,4; 29,3; 24,9; 24,80; 22,6; 14,1.



**C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc.**

Sulfato de cobre  
(0,0894g, 0,562

mmol) e ascorbato de sódio (0,1113g, 0,562 mmol) foram adicionados em uma solução sob agitação de propargil-2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (0,189g, 0,730 mmol) e azida-PEG<sub>900</sub>-docosanato (0,700 g, 0,562 mmol) em água/THF (1:1 v/v). A mistura foi aquecida a 40°C. Após 24 horas, a solução foi concentrada sob vácuo. Ao resíduo foi adicionado diclorometano, e, em seguida filtrado e concentrado. C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc puro (0,705g; 67%) foi isolado após purificação por cromatografia em coluna utilizando sílica flesh em uma mistura de diclorometano:metanol (8:2 v/v) como eluente. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,96 (s, 1H), 7,63 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 4,80-4,48 (m, 8H), 4,12 (t,  $J$  = 4,2 Hz, 2H), 3,81 (t,  $J$  = 4,8 Hz, 2H), 3,57-3,43 (m, 78H), 3,10 (2H,  $J$  = 4,8 Hz), 2,27 (t,  $J$  = 4 Hz, 2H), 1,79 (s, 3H), 1,50 (m, 2H), 1,26 (m, 26H), 0,85 (t,  $J$  = 6,6Hz, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 172,7; 168,9; 143,5; 124,2; 100,2; 77,0; 74,2; 74,3; 71,6; 69,7; 69,6; 69,5; 68,3; 67,9; 62,9; 61,2; 61,2; 55,3; 54,8; 33,4; 31,2; 30,6; 28,9; 28,6; 28,4 24,4; 23,0; 22,0; 13,9.

### 6.7.2 Preparação dos Lipossomas C<sub>22</sub>PC

PC (12,0 mg) e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc (12,0 mg) foram dissolvidos em 4 mL de clorofórmio e dispersos em 200  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato salino (pH 7,2), com formação de duas fases imiscíveis. A suspensão foi sonicada por 3 minutos em banho de ultrassom, resultando em uma dispersão de micelas em fase reversa. O clorofórmio foi evaporado em evaporador rotatório à pressão reduzida em temperatura de 30°C, resultando em um organogel. Para a hidratação do filme lipídico, 4 mL de PBS (pH 7,2), foram adicionados e a solução foi agitada em vortex até formação de uma solução homogênea e leitosa o que indica a formação dos lipossomas. Estes foram filtrados utilizando filtros de membrana de nylon com poros 0,45  $\mu\text{m}$  para remoção de grandes agregados e obtenção de LUVs de tamanho

uniforme. Para a preparação de lipossomas C<sub>22</sub>PC contendo os corantes, na etapa inicial foram adicionados aproximadamente de 2,4 mg da respectiva amina (**40-45**) juntamente com 12,0 mg da PC e 12,0 mg do C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc e estes foram dissolvidos em clorofórmio. As etapas posteriores são idênticas às aquelas apresentadas anteriormente para a preparação de lipossomas puros (sem as aminas).

## 6.8. CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram caracterizados por Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS) para medidas de Potencial Zeta e Espelhamento de Luz Dinâmico (DLS). Estas análises foram realizadas pelo grupo de pesquisas do Professor Doutor Alexandre Gonçalves Dal-Bó – UNESC (Universidade do Extremo Sul Catarinense), Santa Catarina.

### 6.8.1 Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS)

As medidas de potencial zeta foram realizadas em um equipamento ZetaPALS, Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments) com laser He-Ne ( $\lambda_0 = 632,8$  nm). Os lipossomas C<sub>22</sub>PC (6,0 mg·mL<sup>-1</sup>) em solução tampão fosfato salino (PBS, 10mM, pH 7,2) contendo ou não as aminas sintetizadas (**40-45**) e lipossoma PC (6,0 mg·mL<sup>-1</sup>) (puro), foram diluídos até 1,0 mg·mL<sup>-1</sup> e as medidas foram realizadas à 20±1°C. Para cada amostra, foram feitas 10 medidas em triplicata.

### 6.8.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (Dynamic Light Scattering - DLS)

O tamanho das vesículas lipossômicas foram obtidos por DLS. O experimento foi realizado para o lipossoma C<sub>22</sub>PC (6,0 mg·mL<sup>-1</sup>) na ausência e presença da amina **40**. Foi utilizado um sistema Goniômetro ALV, que consiste em um laser cilíndrico linearmente polarizado 22 mW He-Ne ( $\lambda=632,8$  nm) e um ALV-5000/ALV *Multiple Tau Digital Correlator* com um tempo inicial de amostragem de 125 ns. A amostra foi mantida à 25°C. As análises foram realizadas em um ângulo de 90°. As soluções foram adicionadas em uma célula de vidro de 10 mm de diâmetro. Os dados foram obtidos com um Software ALV-Correlator Control. As distribuições do tempo de relaxação A(t) foram obtidas através de análise CONTIN da função de auto-correlação C(q,t).<sup>104,105</sup> A frequência de relaxação,  $\Gamma=1/\tau$  é uma função do ângulo de espalhamento.<sup>104,106</sup> O coeficiente de difusão aparente ( $D_{app}$ ) dos lipossomas foi calculado pela equação (8).

$$\frac{\Gamma}{q^2} q \rightarrow 0 = D_{app} \quad (8)$$

Onde  $q$  é o vetor de onda, definido como:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (9)$$

$\lambda$  é o comprimento de onda do feixe do laser incidente (632,8 nm),  $n$  é o índice de refração da amostra, e  $\theta$  o ângulo de espalhamento. O raio hidrodinâmico ( $R_H$ ) (ou diâmetro,  $2R_H$ ) foi calculado pela relação de Stokes-Einstein dada na Eq. (10).

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_{app}} \quad (10)$$

Onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura da amostra e  $\eta$  é a viscosidade do solvente (água).<sup>104,107</sup>

## 6.9 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DAS AMINAS 40-45 NOS LIPOSSOMAS PC E C<sub>22</sub>PC

Aproximadamente 1 mg das respectivas aminas (**40-45**) foram solubilizadas em metanol, sendo preparada uma solução-mãe dos corantes em concentração  $\sim 10^{-4}$  M. Desta solução, foi retirada uma alíquota e adicionada em solução de tampão fosfato salino (pH 7,2) completando 3 mL em uma cubeta, o que resultou em uma concentração final de corante de  $5,0 \times 10^{-5}$  M.

A esta solução foram adicionadas alíquotas de lipossomas PC ou lipossomas C<sub>22</sub>PC, a fim de se obter uma razão de concentração molar lipossoma/corante que variou de 0,5-5 (concentração do corante:  $5,0 \times 10^{-5}$  M; concentração dos lipossomas após cada adição:  $2,5 \times 10^{-5}$  M;  $5,0 \times 10^{-5}$  M;  $7,5 \times 10^{-5}$  M;  $1,0 \times 10^{-4}$  M;  $1,25 \times 10^{-4}$  M;  $1,5 \times 10^{-4}$  M;  $1,75 \times 10^{-4}$  M;  $2,0 \times 10^{-4}$  M;  $2,25 \times 10^{-4}$  M e  $2,5 \times 10^{-4}$  M) para as aminas **41**, **42**, **44** e **45** ou 1-10 (concentração do corante:  $5,0 \times 10^{-5}$  M; concentração dos lipossomas após cada adição:  $5,0 \times 10^{-5}$  M;  $1,0 \times 10^{-4}$  M;  $1,5 \times 10^{-4}$  M;  $2,0 \times 10^{-4}$  M;  $2,5 \times 10^{-4}$  M;  $3,0 \times 10^{-4}$  M;  $3,5 \times 10^{-4}$  M;  $4,0 \times 10^{-4}$  M;  $4,5 \times 10^{-4}$  M e  $5,0 \times 10^{-4}$  M) para as aminas **40** e **43**. Foram realizadas análises de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis e de emissão de fluorescência a cada adição, sendo todas as medidas realizadas diretamente na cubeta de análise.

## 6.10 TESTE DE INTERAÇÃO DOS LIPOSSOMAS C<sub>22</sub>PC COM LECTINA WGA

A interação entre os lipossomas C<sub>22</sub>PC com a lectina aglutinina de germe de trigo (WGA) foi avaliada através de um estudo por espectroscopia de emissão de fluorescência. Foi utilizada uma alíquota fixa de WGA (20 µL de uma solução de concentração 1,0 mg·mL<sup>-1</sup>) em 3 mL de solução tampão PBS, e, a esta, foram adicionadas alíquotas de lipossoma C<sub>22</sub>PC (6,0 mg·mL<sup>-1</sup>) (10-100 µL), na ausência e presença das aminas **40**, **42**, **43** e **45**. A cada adição, foi feita uma medida da emissão de fluorescência para avaliação do comportamento da lectina frente aos lipossomas glicosilados.

## 6.11 ESTUDO DA INTERAÇÃO COM BSA

Para o estudo de interação das moléculas em BSA, foi inicialmente preparada uma solução estoque de BSA (2,0 mg·mL<sup>-1</sup>) de concentração 31 µM, em solução de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2. Para a análise de supressão da fluorescência da BSA, foram preparadas soluções com volume final de 3 mL com concentração fixa da BSA de 11 µM (1 mL) em PBS, pH 7,2. Os corantes foram adicionados em concentrações de 0-20 µM, a partir de uma solução estoque em dimetilformamida (DMF). Foram feitas medidas de absorção e emissão de fluorescência, com  $\lambda_{exc} = 277$  nm, referente ao comprimento de onda de absorção da BSA.

## 7. REFERÊNCIAS

---

1. Gao, F.; Mei, E.; Lim, M.; Hochstrasser, R.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4814.
2. Knobloch, J.; Suhendro, D.K.; Zielenjecki, J.L.; Shapter, J.G.; Köper, I. *Saudi J. Biol. Sci.* **2015**, *22*, 714.
3. Haratake, M.; Osei-Asante, S.; Fuchigami, T.; Nakayama, M. *Colloid. Surface B* **2012**, *100*, 190.
4. Collot, M.; Kreder, R.; Tatarets, A.L.; Patsenker, L.D.; Mely, Y.; Klymchenko, A.S. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 17136.
5. Saxena, R.; Shrivastava, S.; Haldar, S.; Klymchenko, A.S.; Chattopadhyay, A. *Chem. Phys. Lipids* **2014**, *183*, 1.
6. Pazin, W.M. *Anisotropia de fluorescência: aplicações em membranas modelo*. **2012**. 137 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
7. Bouvrais, H.; Pott, T.; Bagatolli, L.A.; Ipsen, J.H.; Méléard, P. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 1333.
8. Mason, W.T. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis*. Academic Press: San Diego - California, **1999**, 2 ed., p.647.
9. Fei, X.; Gu, Y. *Prog. Nat. Sci.* **2009**, *19*, 1.
10. Terai, T.; Nagano, T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 515.
11. Johnson, I. *Histochem. J.* **1998**, *30*, 123.
12. Johnson, I.D.; Spence, M.T.Z. *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. Life Technologies Corporation. **2010**, 11.ed., p.1060.
13. Sinkeldam, R.W.; Greco, N.J.; Tor, Y. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579.
14. Loura, L.M.S.; Fernandes, F.; Fernandes, A.C.; Ramalho, J.P.P. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 467.
15. Stöckl, M.T.; Herrmann, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 1444.
16. Acuña, A.U. Costela, A. *Phys. Chem.* **1986**, *90*, 2807.
17. Acuña, A.U. *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *132*, 567.
18. Costela, A. *Opt. Commun.* **1987**, *64*, 457.
19. Täuber, U.; Carvalho, C.E.M.; dos Santos, R.F.; Carvalhaes, C.G.; Fellows, C.E. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* **2007**, *87*, 475.
20. Zhao, J.; Ji, S.; Chen, Y.; Guo, H.; Yang, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 8803.

- 
21. Abeywickrama, C.S.; Pang, Y. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 3518.
  22. Santos, F.S.; Medeiros, N.G.; Affeldt, R.F.; Duarte, R.C.; Moura, S.; Rodembusch, F.S. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 2785.
  23. Tian, Y.; Chen, C.; Yang, C.; Young, A.C.; Jang, S.; Chen, W.; Jen, A.K.Y. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 1977.
  24. Taki, M.; Wolford, J.L.; O'Halloran, T.V. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 712.
  25. Hu, R.; Feng, J.; Hu, D.; Wang, S.; Li, S.; Li, Y.; Yang, G. *Angew. Chem.* **2010**, *49*, 4915.
  26. Rodembusch, F.S.; Leusin, F.P.; Medina, L.F.C.; Brandelli, A.; Stefani, V. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 254.
  27. Rodembusch, F.S.; Buckup, T.; Segala, M.; Tavares, L.; Correia, R.R.B.; Stefani, V. *Chem. Phys.* **2004**, *305*, 115.
  28. Tang, G.Q.; Shang, X.; Zhang, G.; Du, R.; Chen, W. *Chem. J. Chin. Univ.* **1996**, *17*, 906.
  29. Coelho, F.L.; Rodembusch, F.S.; Campo, L.F. *Dyes Pigm.* **2014**, *110*, 134.
  30. Dick, P.F.; Coelho, F.L.; Rodembusch, F.S.; Campo, L.F. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 3024.
  31. Sulaiman, S.A.J.; Al-Rasbi, G.S.; Abou-Zied, O.K. *Luminescence* **2016**, *31*, 614.
  32. Gupta, B.S.; Taha, M.; Lee, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 1114.
  33. Li, R.; Wu, Z.; Wang, Y.; Ding, L.; Wang, Y. *Biotechnol. Rep.* **2016**, *9*, 46.
  34. Hong, M.; Chang, G.; Li, R. Niu, M. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 7889.
  35. Ma, X.; Sun, X.; Hargrove, D.; Chen, J.; Song, D.; Dong, Q.; Lu, X.; Fan, T.; Fu, Y.; Lei, Y. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19370.
  36. Patel, R.; Kumari, M.; Dohare, N.; Khan, A.B.; Singh, P.; Malik, M.A.; Kumar, A. *Biochem. Anal. Biochem.* **2016**, *5*, 265.
  37. Micheletto, Y.M.S.; da Silveira, N.P.; Barboza, D.M.; dos Santos, M.C.; de Lima, V.R.; Giacomelli, F.C.; Martinez, J.C.V.; Frizon, T.E.A.; Dal-Bó, A.G. *Colloid. Surface A* **2015**, *467*, 166.
  38. Mansilha, C.I.G.R. *Estudos de partição e localização de fármacos em lipossomas por Técnicas Espectroscópicas.* **2002**. 257 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – Universidade do Porto, Portugal.
  39. Mertins, O. *Estudos Físico-Químicos e estruturais de lipossomas Compósitos de Fosfatidilcolina e Quitosana.* **2008**. 206 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

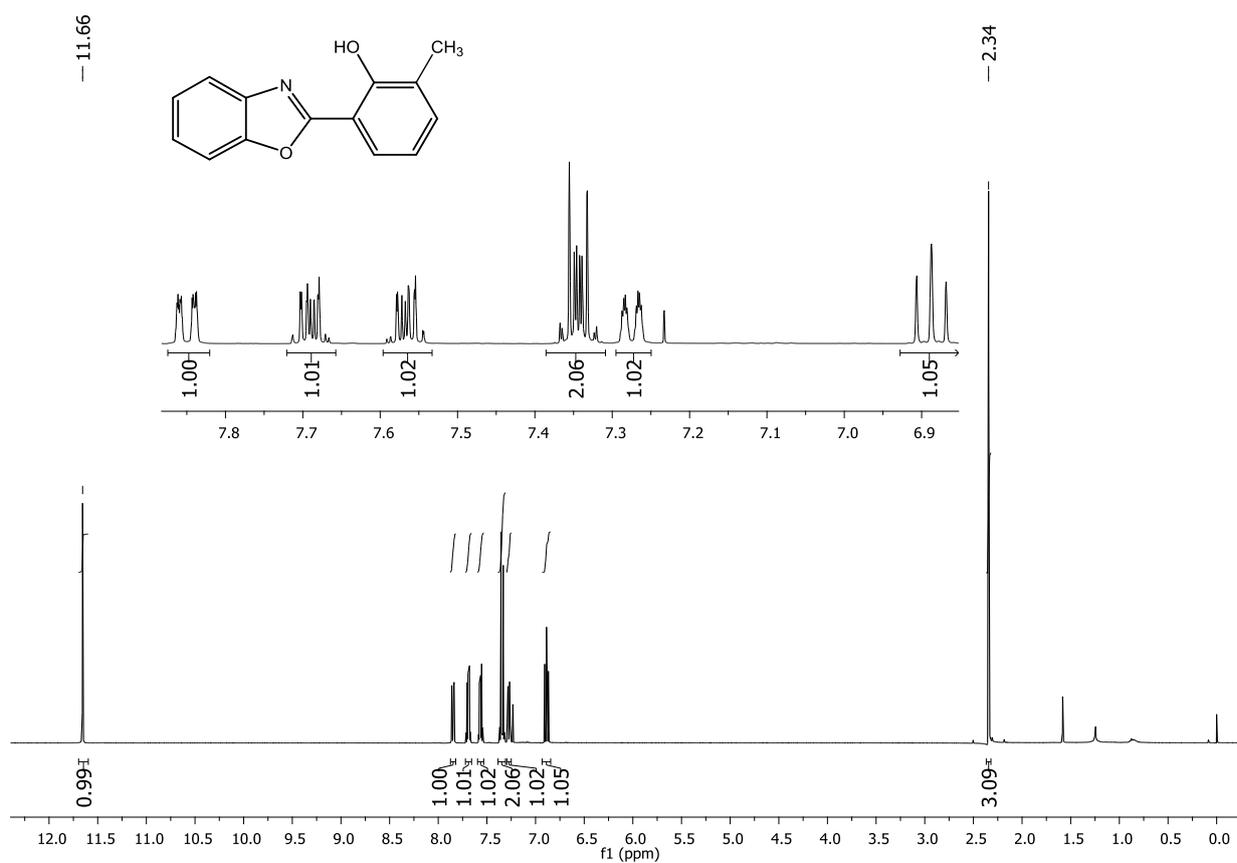
- 
40. Rodrigues, A.R.O. *Desenvolvimento de Magnetolipossomas baseados em nanopartículas de níquel com coroa de sílica para aplicações na entrega de fármacos antitumorais*. **2012**. 105 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas) - Universidade do Minho, Braga – Portugal.
41. Israelachvili, J.N. *Intermolecular and Surface Forces*, Elsevier – Santa Barbara, California. **2011**, 3.ed., p. 706.
42. Bangham, A.D.; Horne, R.W. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 660.
43. Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238.
44. Duzgunes, N. *Liposomes – Methods in Enzymology*, Academic Press: Pasadena - California, **2003**, 367, p. 311.
45. Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2012**, *65*, 36.
46. Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S.W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8*, 102.
47. Batista, C.M.; Carvalho, C.M.B.; Magalhães, N.S.S. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2007**, *43*, 167.
48. Mertins, O. *Desenvolvimento e caracterização de Nanovesículas Lipossômicas Compósitas de Fosfatidilcolina da Lecitina de Soja e Quitosana*. **2004**. 78 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
49. Zhang, L.; Gu, F.X.; Chan, J.M.; Wang, A.Z.; Langer, R.S.; Farokhzad, O.D. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *83*, 761.
50. Monteiro, N.; Martins, A.; Reis, R.L.; Neves, N.M. *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*.
51. Kleusch, C.; Hersch, N.; Hoffmann, B.; Merkel, R.; Csiszár, A. *Molecules* **2012**, *17*, 1055.
52. Carneiro, C.A.V. *O papel das interações fármaco-membrana nos efeitos cardiovasculares de  $\beta$ -carreadores*. **2010**. 153 f. Dissertação de Mestrado - Universidade do Porto, Portugal.
53. Oliveira, F.F.D.; Santos, D.C.B.D.; Lapis, A.A.M.; Corrêa, J.R.; Gomes, A.F.; Gozzo, F.C.; Moreira, P.F.; Oliveira, V.C.; Quina, F.H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6001.
54. Neto, B.A.D.; Carvalho, P.H.P.R.; Correa, J.R. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1560.
55. Ueno, T.; Nagano, T. *Nature Methods* **2011**, *8*, 642.
56. Suzuki, Y.; Yokoyama, K. *Biosensors* **2015**, *5*, 337.
57. Kroetz, T. *Compostos fotoativos com potencial uso como sondas fluorescentes de membrana*. **2015**. 78 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Instituto de Química. UFRGS, Porto Alegre.

- 
58. Yi, X.; Wang, F.; Qin, W.; Yang, X.; Yuan, J. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 1347.
59. Santos, F.S. *Heterociclos fotoativos por transferência protônica intramolecular no estado excitado: estudo fotofísico em solução, em matrizes híbridas e em sistemas confinados do tipo guest-host.* **2015**. 297 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
60. Padalkar, V.S.; Borse, B.N.; Gupta, V.D.; Phatangare, K.R.; Patil, V.S.; Umape, P.G.; Sekar, N. *Arab. J. Chem.* **2016**, *9*, 1125.
61. Nunes, A.C. *Síntese e estudo fotofísico de novas cianinas conjugadas com heterociclos fotoativos por ES IPT.* **2015**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
62. Known, J.E.; Park, S.Y. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 3615.
63. Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications.* Wiley - VCH: Weinheim, **2002**, p. 399.
64. Wardle, B. *Principles and Applications of Photochemistry.* Wiley, 1 ed. **2010**, p. 266.
65. Rouessac F.; Rouessac, A. *Chemical Analysis, Modern Instrumentation Methods and Techniques.* John Wiley & Sons, 2. ed. **2007**, p. 599.
66. Ferreira, G.C. *Fotopolimerização iniciada por tioxantona e outros iniciadores - estudos fundamentais e aplicações.* **2006**. 134 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos.
67. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J. *Fundamentos de Química Analítica.* Thomson - São Paulo, 8 ed. **2006**, p.1026.
68. Sharma, A.; Schulman, S.G. *Introduction to Fluorescence Spectroscopy.* Wiley - Interscience, 1. ed. **1999**, p. 192.
69. Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U. *Nature Prot.* **2013**, *8*, 1535.
70. Aroche, D.M.P. *Glicoconjugação de Bases de Tröger via reações de cicloadição azida-acetileno.* **2014**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
71. Zhang, Y.; Yang, Q.; Du, H.; Tang, Y.; Xu, G.; Yan, W. *Chin. J. Chem.* **2008**, *26*, 397.
72. Itri, R.; Caetano, W.; Barbosa, L.R.S.; Baptista, M.S. *Braz. J. Phys.* **2004**, *34*, 58.
73. Sun, T.; Liu, L.; Sun, Y.; Tan, C.; Yao, F.; Liang, X.; Wang, Y.; Yang, Y.; Hu, X.; Fan, J. *Anal. Sci.* **2012**, *28*, 491.

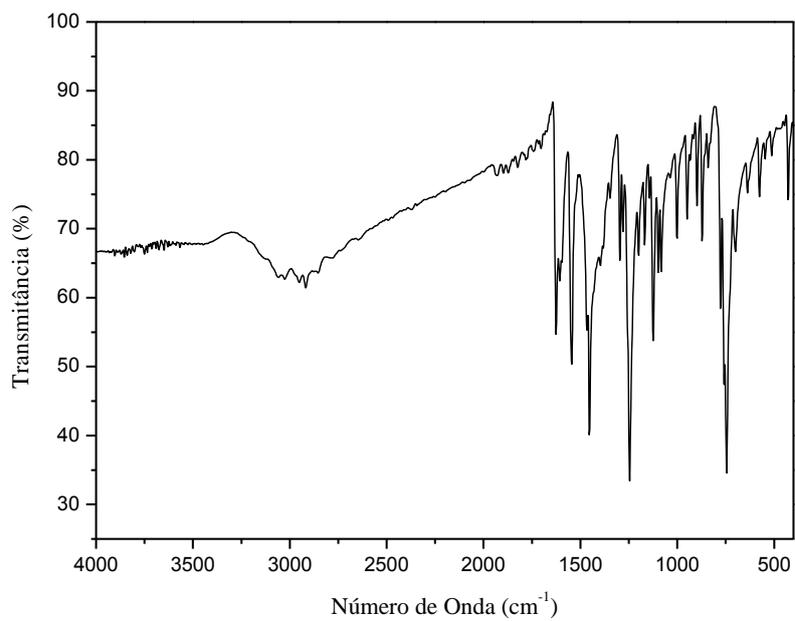
- 
74. Dijck, A.V. *Bovine Serum Albumin (BSA) encapsulated in DODAB:MO (1:2) liposomes for targeted drug delivery: development and characterization*. **2014**. Dissertação de Mestrado – Universidade do Minho.
75. Loureiro, A.; Abreu, A.S.; Sárria, M.P.; Figueiredo, M.C.O.; Saraiva, L.M.; Bernardes, G.J.L.; Gomes, A.C.; Cavaco-Paulo, A. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 4976.
76. Chen, B.; Wu, C.; Zhuo, R.; Cheng, S. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 6807.
77. Belatik, A.; Hotchandani, S.; Carpentier, R.; Riahi, H. *Plos One* **2012**, *7*, 36723.
78. Tong, J.; Tian, F.; Li, Q.; Li, L.; Xiang, C.; Liu, Y.; Dai, J.; Jiang, F. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 1868.
79. Affeldt, R.F.; Borges, A.C.A.; Russowsky, D.; Rodembusch, F.S. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 4607.
80. Masurier, N.; Moreau, E.; Lartigue, C.; Gaumet, V.; Chezal, J.; Heitz, A.; Teulade, J.; Chavignon, O. *J.Org. Chem.* **2008**, *73*, 5989.
81. Qin, W.; Long, S.; Panunzio, M.; Biondi, S. *Molecules* **2013**, *18*, 12264.
82. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic Chemistry*. Oxford University Press Inc. – New York. 2 ed. **2012**, p. 1234.
83. Bruice, P.Y. *Organic Chemistry*. Prentice Hall. 4ed. **2004**, p. 1344.
84. Solomons, T.W.G.; Fryhle, C.B. *Organic Chemistry*. Hoboken, NJ: John Wiley. 7 ed. **2008**, p. 1656.
85. Ball, D.W. *Physical Chemistry*. Cengage Learning, 1 ed. **2002**, p. 836.
86. Mertins, O.; Sebben, M.; Schneider, P.H.; Pohlmann, A.R.; da Silveira, N.P. *Quím. Nova* **2008**, *31*, 1856.
87. Szoka, F.; Papahadjopoulos, D. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 4194.
88. Soppimath, S.K.; Aminabhavi, T.M.; Kulkarni, A.R.; Rudzinski, W.E. *J. Control. Release* **2001**, *70*, 1.
89. Mouritsen, O.G.; Jorgensen, K. *Mol. Membr. Biol.* **1995**, *12*, 15.
90. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier. 7 ed. **2012**, p. 513.
91. Dal-Bó A.G.; Soldi, V.; Giacomelli, F.C.; Jean, B.; Pignot-Paintrand, I.; Borsali, R.; Fort, S. *Soft Matter* **2011**, *7*, 3453.
92. Bouzide, A.; LeBerre, N.; Sauve, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8781.
93. Guo, C.; Liu, S.; Dai, Z.; Jiang, C.; Li, W. *Colloid. Surface B* **2010**, *76*, 362.
94. Mertins, O.; Schneider, P.H.; Pohlmann, A.R.; da Silveira, N.P. *Colloid. Surface B* **2010**, *75*, 294.

- 
95. Smith, D.A.; Waterbeemd, H.; Walker, D.K. *Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design*. Wiley-VCH: Weinheim, **2001**, p. 155.
96. dos Santos, M.C.; Micheletto, Y.M.S.; da Silveira, N.P.; Pinto, L.S.; Giacomelli, F.C.; de Lima, V.R.; Frizon, T.E.A.; Dal-Bó, A.G. *Colloid. Surface B* **2016**, *148*, 12.
97. Sell, A.M.; da Costa, C.P. *Acta Scientiarum* **2000**, *22*, 297.
98. Ting, S.R.S.; Chen, G.; Stenzel, M.H. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1392.
99. Pieters, R.J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2013
100. Wrigt, C.S.; Kellogg, G.E. *Protein Science* **1996**, *5*, 1466
101. Lotan, R.; Sharon, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *55*, 1053.
102. Wang, Q.; Liu, P.; Zhou, X.; Zhang, X.; Fang, T.; Min, X.; Li, X. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2012**, *230*, 23.
103. Chekalyuk, A.; Fadeev, V.; Georgiev, G.; Kalkanjjev, T.; Nickolov, Z. *Spectrosc. Lett.* **1982**, *15*, 355.
104. Dal-Bó, A.G.; Soldi, V.; Giacomelli, F.C.; Travelet, C.; Jean, B.; Pignot-Paintrand, I.; Borsali, R.; Fort, S. *Langmuir* **2012**, *28*, 1418.
105. Provencher, S.W. *Makromol. Chem.* **1979**, *180*, 201.
106. Tammer, M.; Horsburgh, L.; Monkman, A.P.; Brown, W.; Burrows, H.D. *Adv. Funct. Mater.* **2002**, *12*, 447.
107. Giacomelli, C.; Schmidt, V.; Borsali, R. *Macromolecules* **2007**, *40*, 2148.

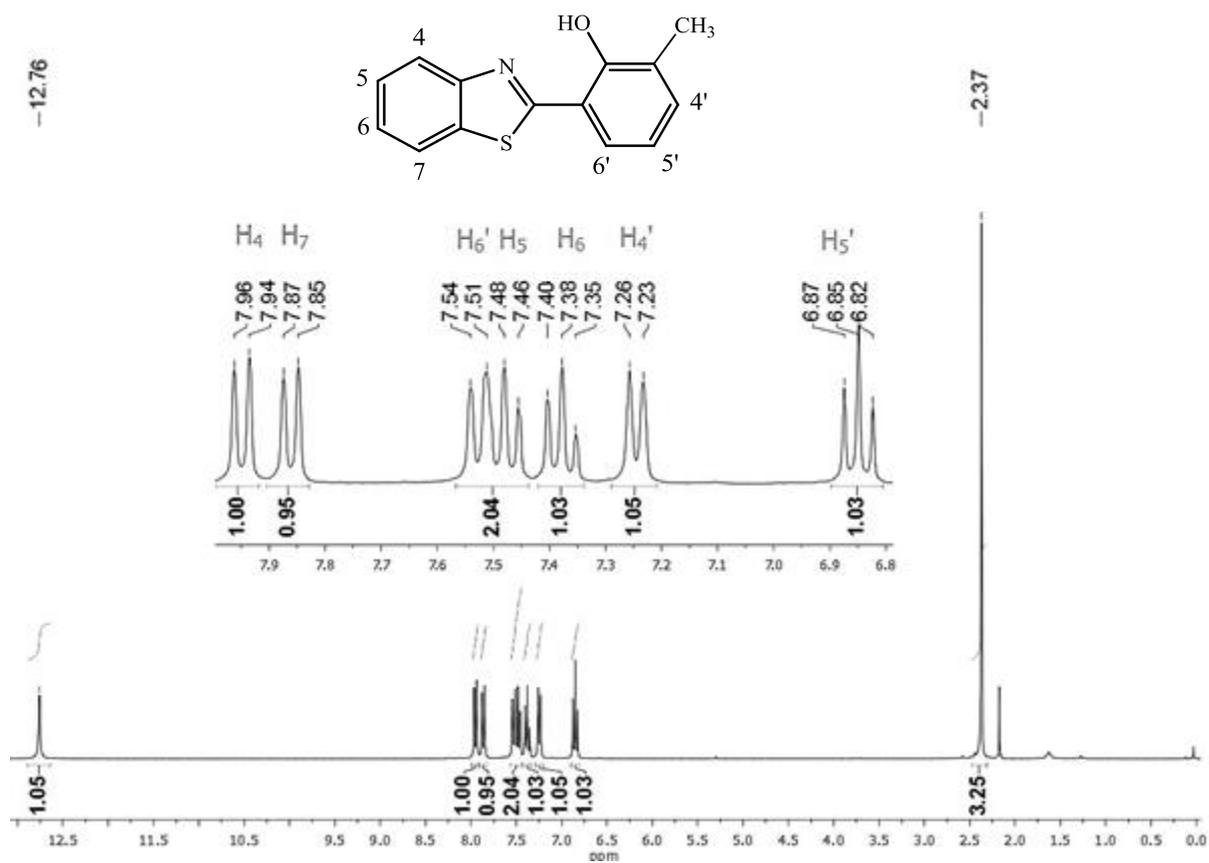
## ANEXO



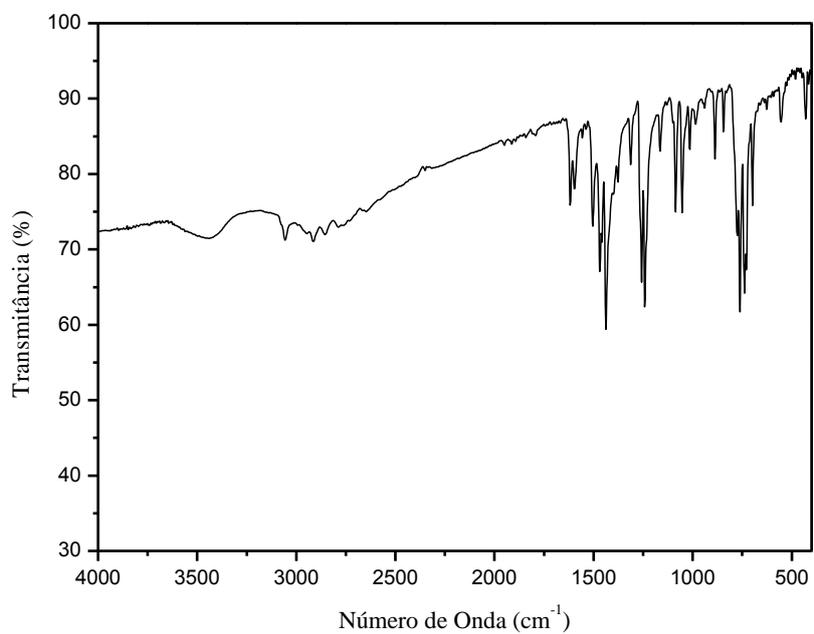
**Figura A1.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) do precursor benzazólico **27** em  $\text{CDCl}_3$ .



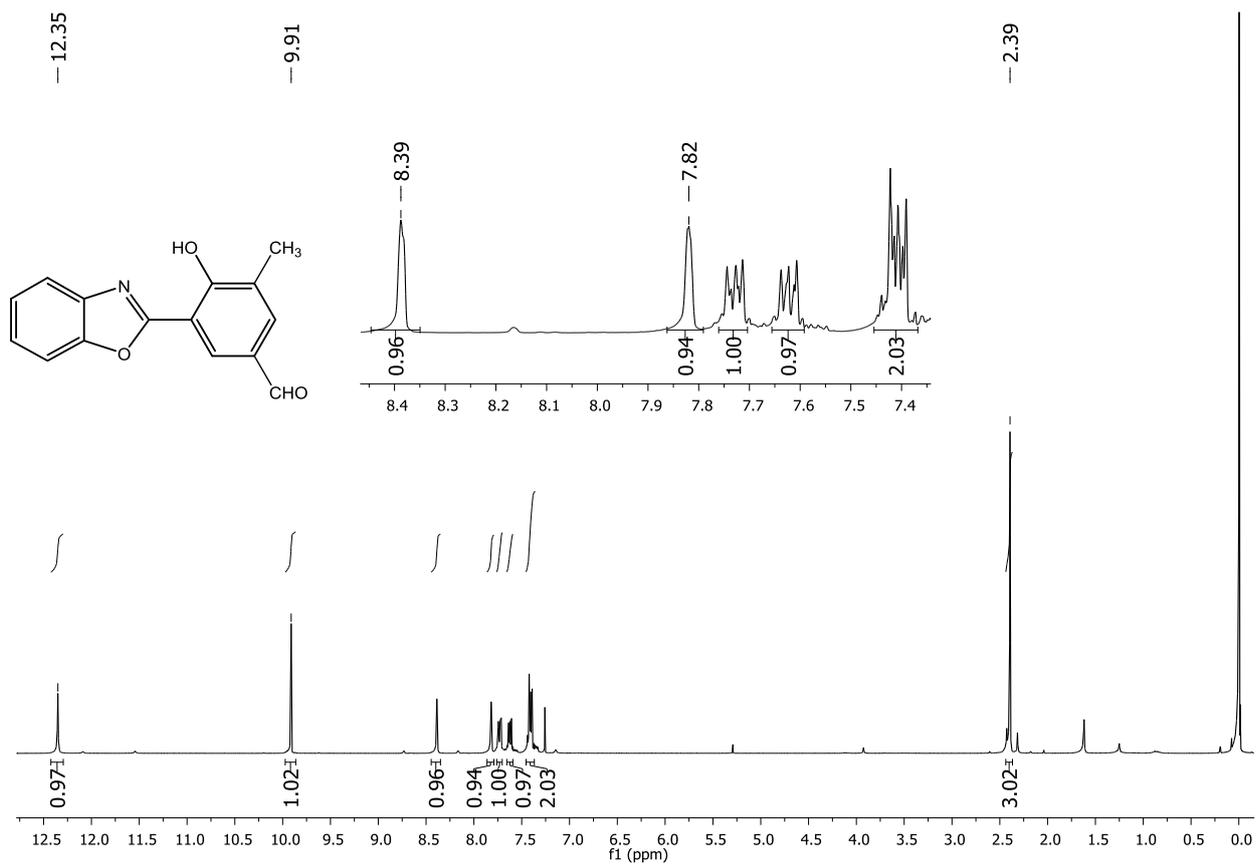
**Figura A2.** Espectro de FTIR do composto **27** em KBr.



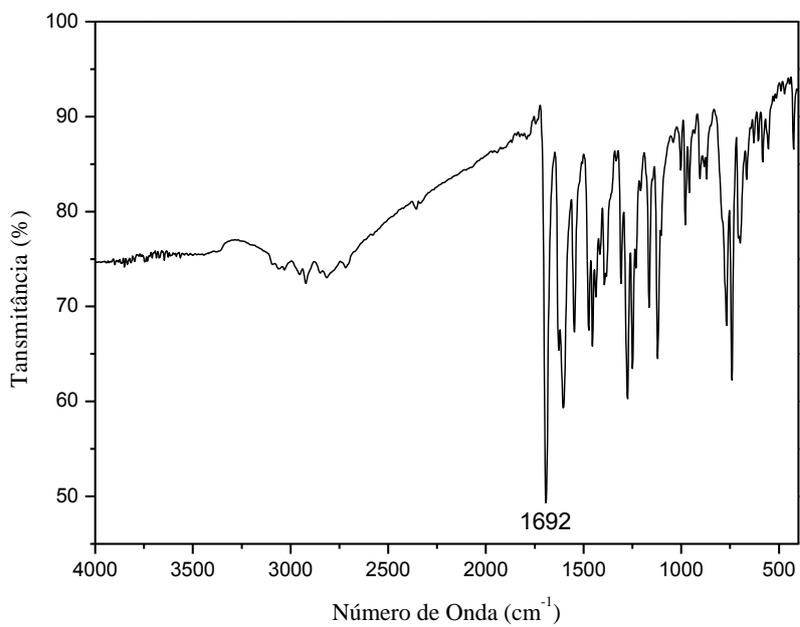
**Figura A3.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) do precursor benzazólico **28**, em  $\text{CDCl}_3$ .



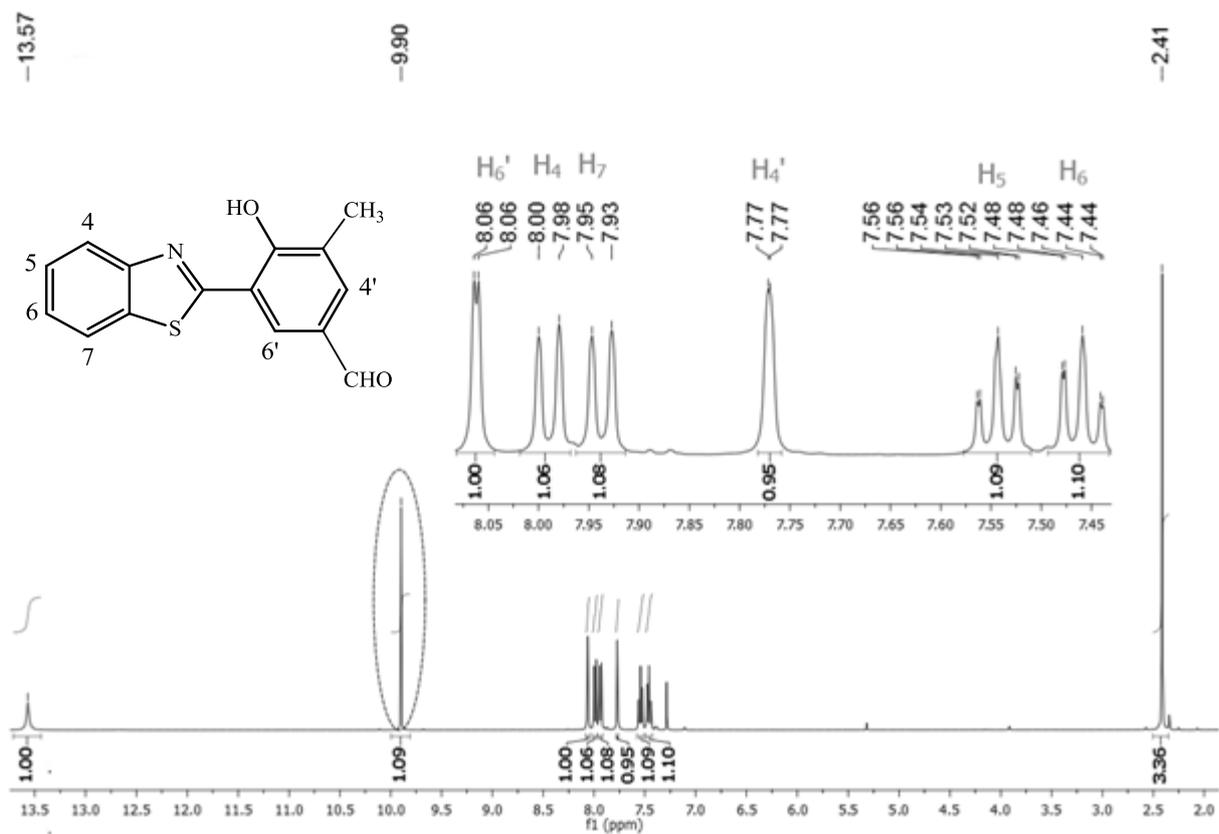
**Figura A4.** Espectro de FTIR do composto **28** em KBr.



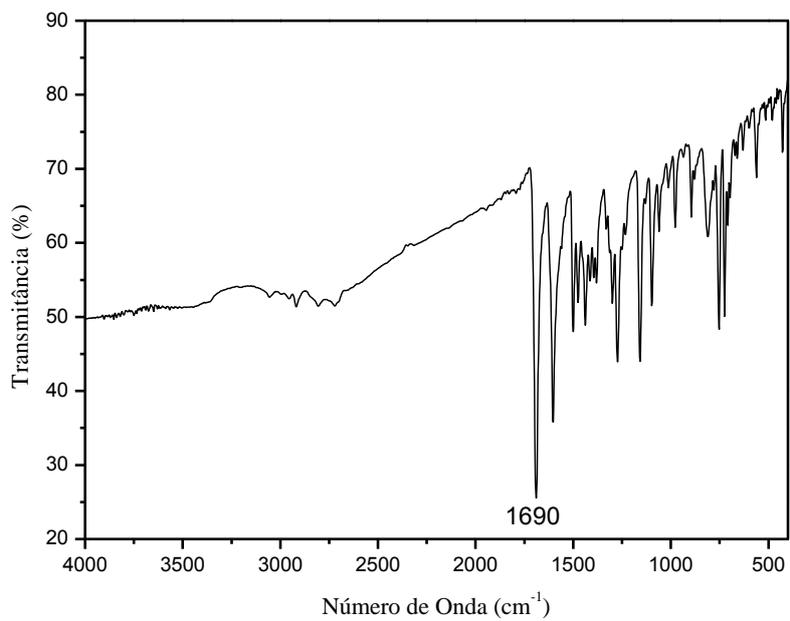
**Figura A5.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) do precursor **29** em CDCl<sub>3</sub>.



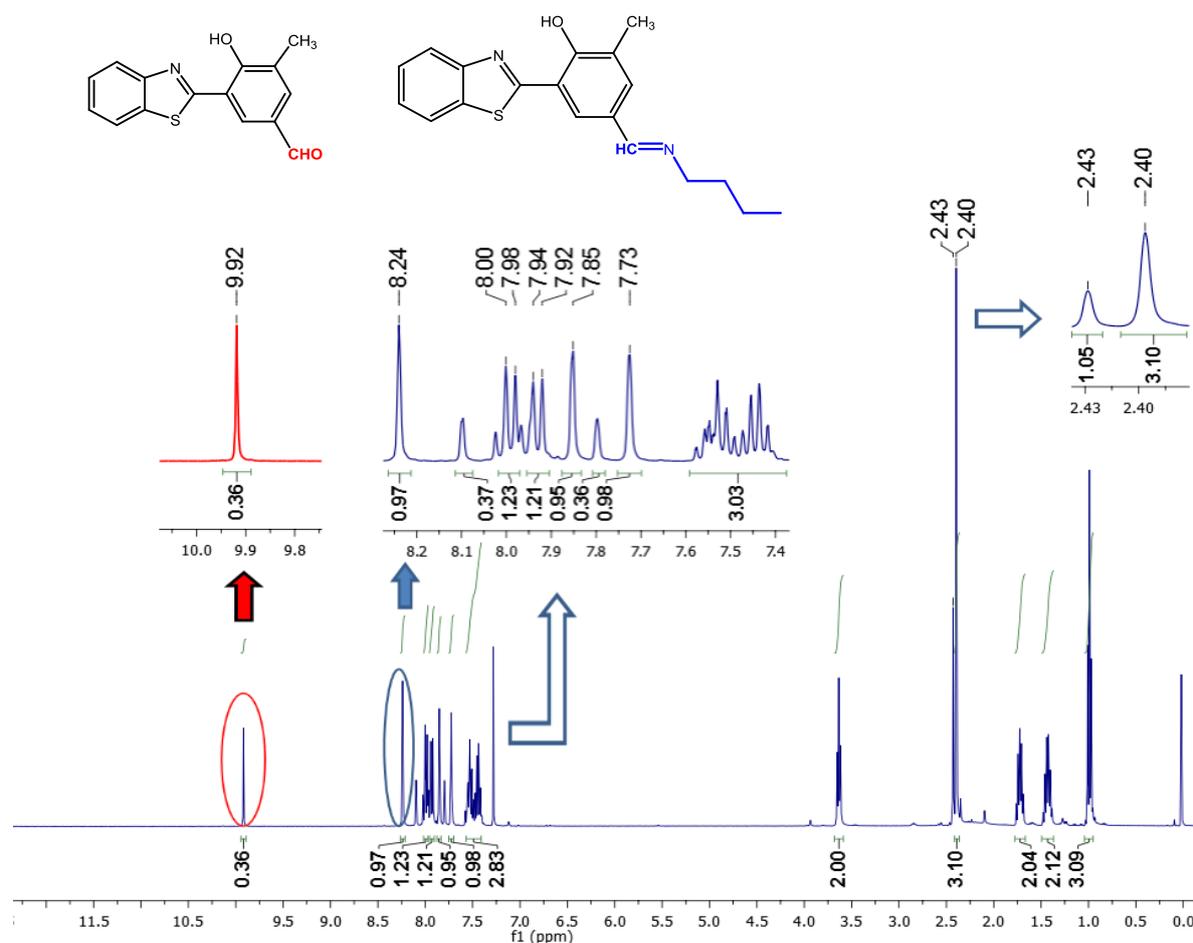
**Figura A6.** Espectro de FTIR do composto **29** em KBr.



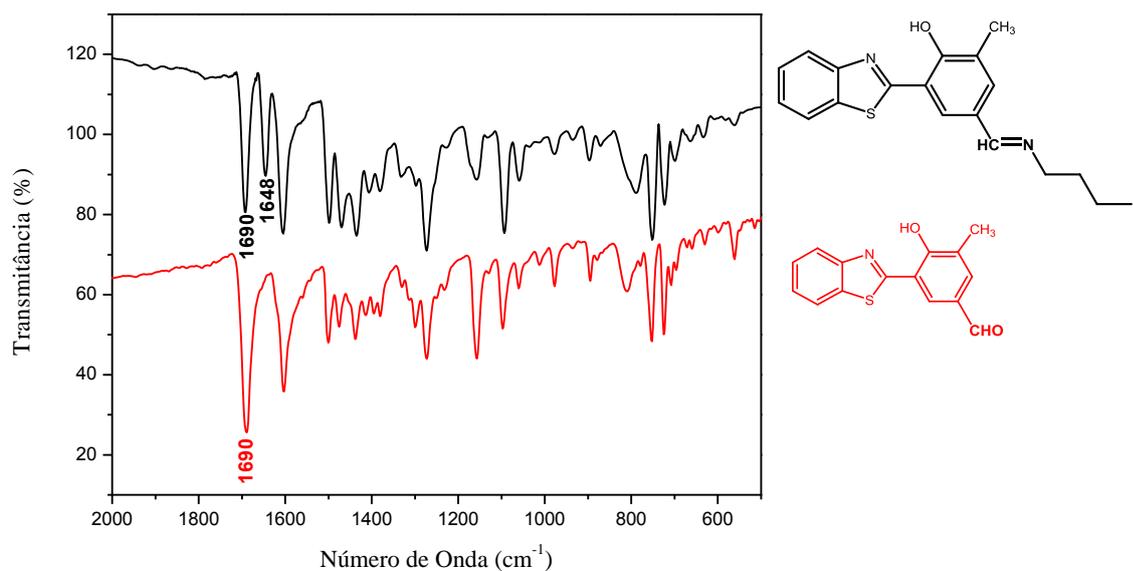
**Figura A7.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) do precursor **30** em  $\text{CDCl}_3$ .



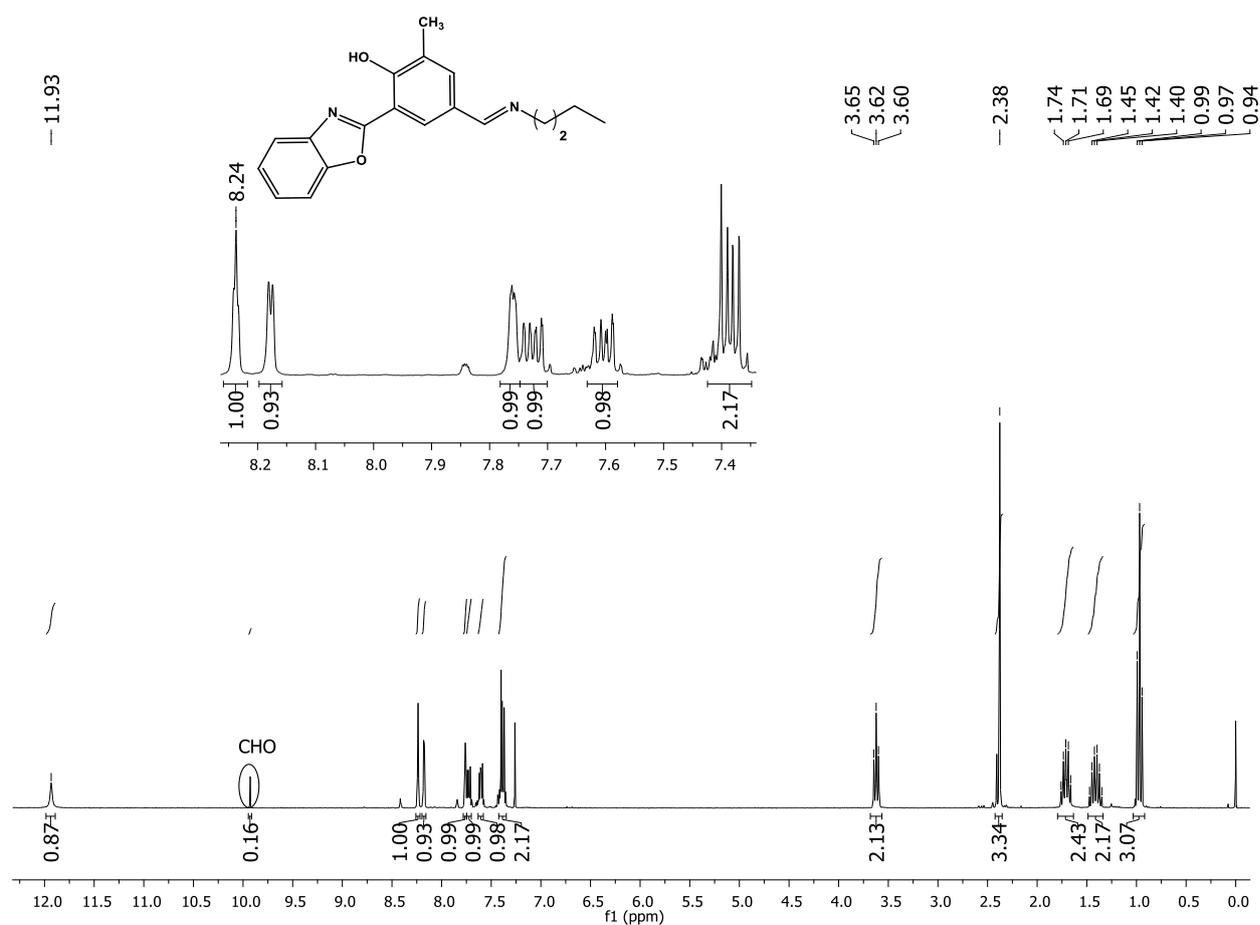
**Figura A8.** Espectro de FTIR do composto **30** em KBr.



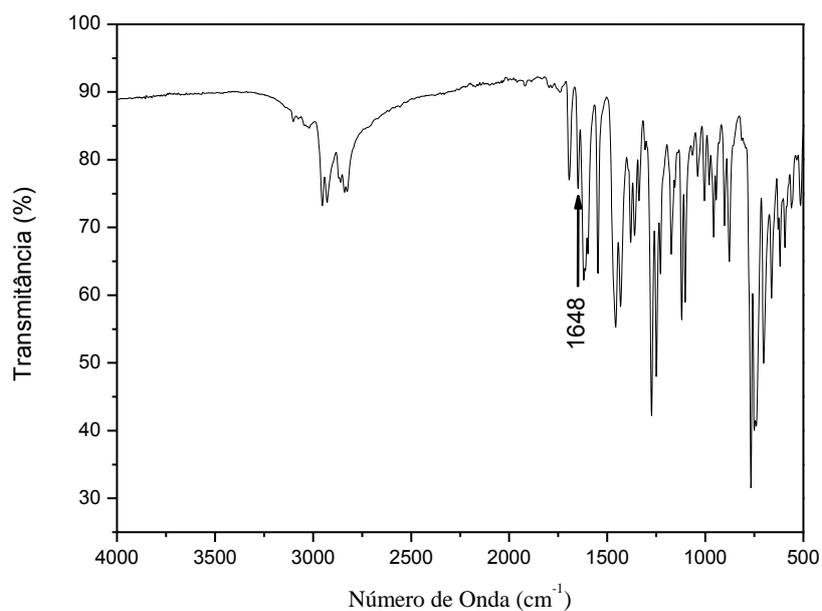
**Figura A9.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) da mistura de produtos obtida a partir da tentativa de obtenção da imina **37**, em CDCl<sub>3</sub>, com ampliação da região aromática. Estão destacados o singlete referente ao hidrogênio do aldeído (vermelho) e o singlete correspondente ao hidrogênio da imina (azul)



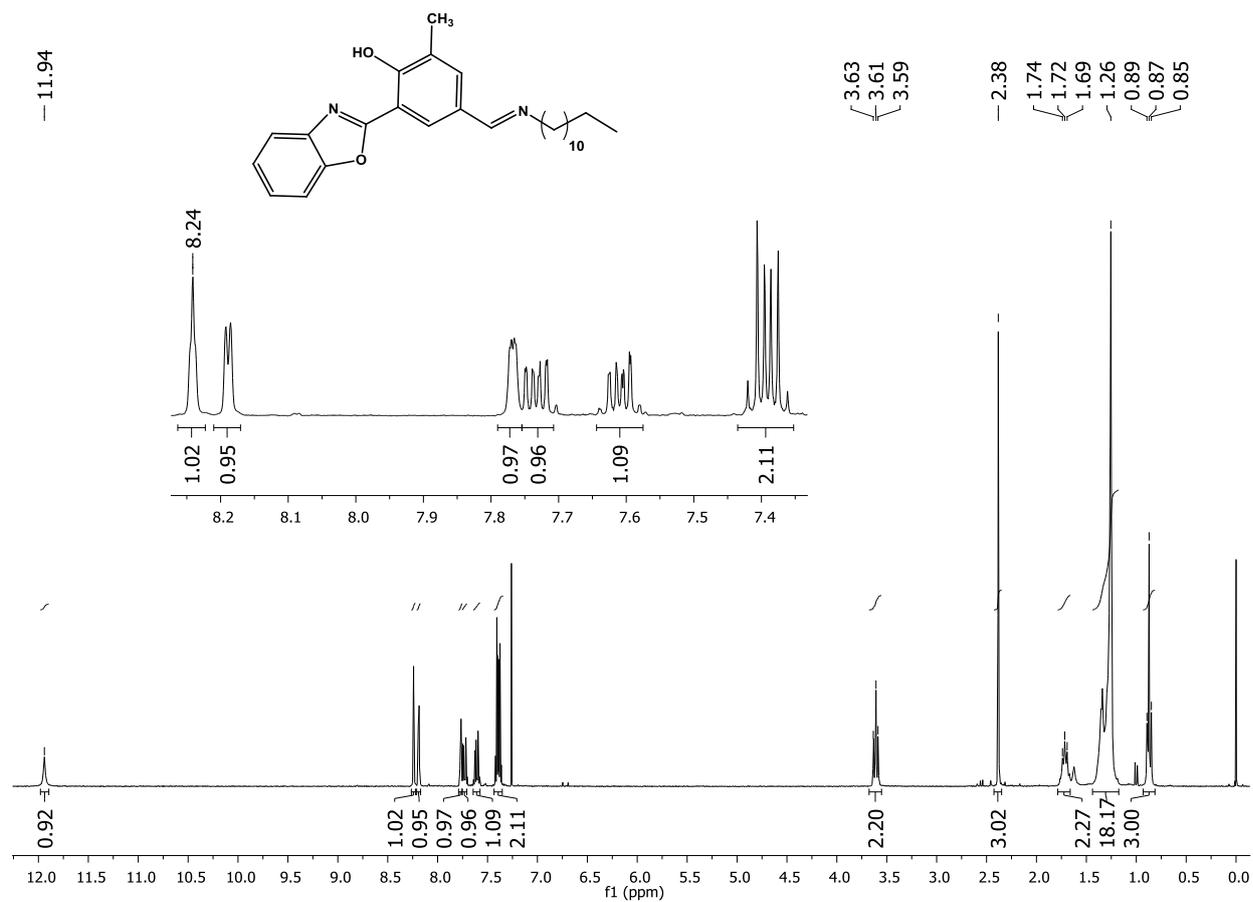
**Figura A10.** Comparação entre os espectro de FTIR ampliados do composto **30** (vermelho) e da mistura de produtos obtida a partir da tentativa de obtenção da imina **37** (preto) em KBr.



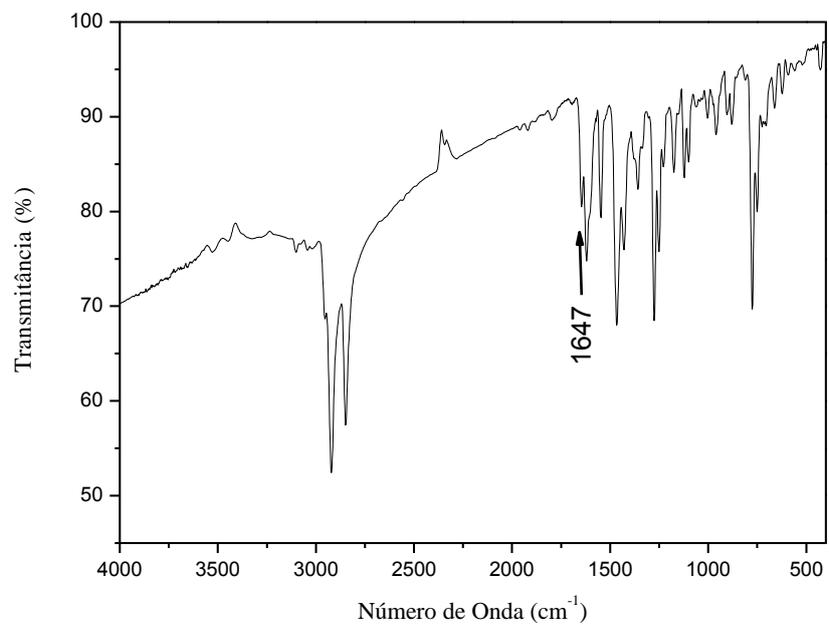
**Figura A11.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) da imina **34** em CDCl<sub>3</sub>.



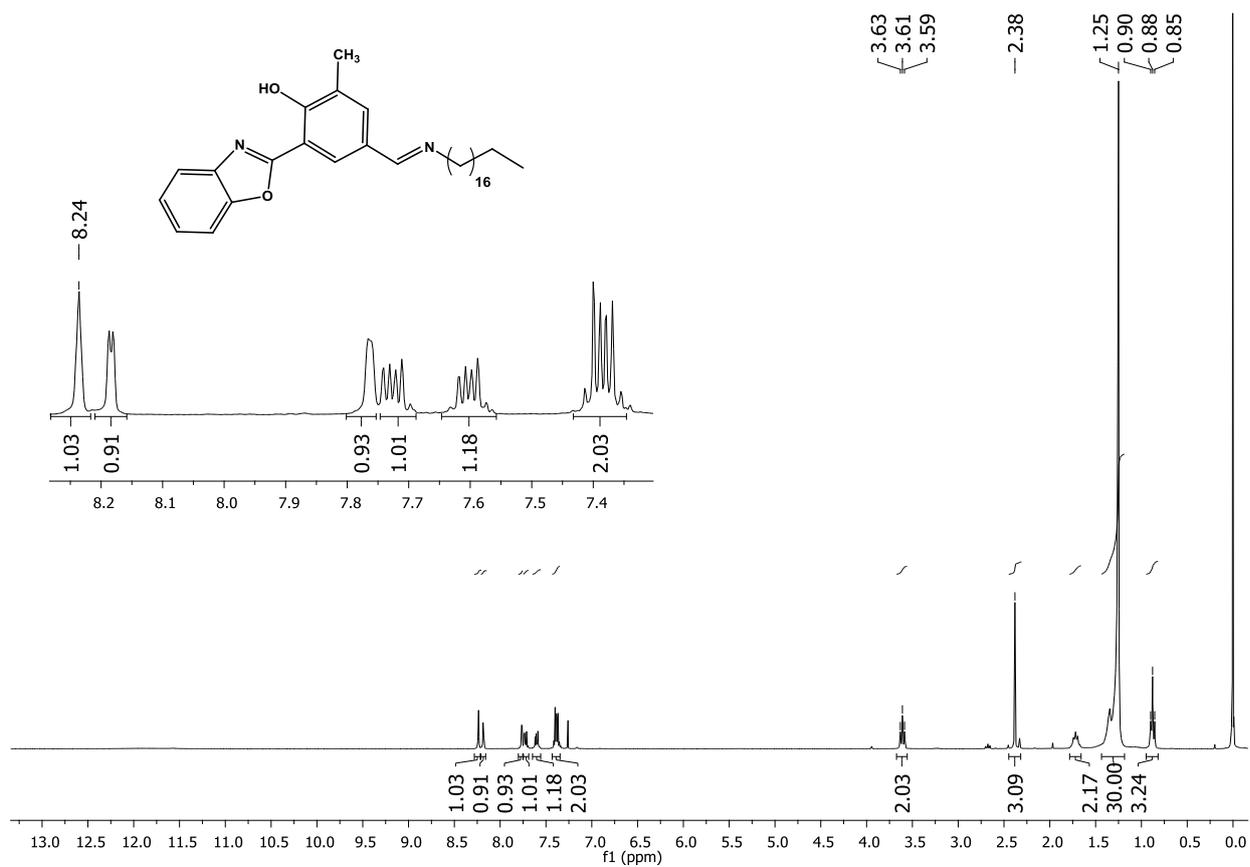
**Figura A12.** Espectro de FTIR do composto **34** em ATR.



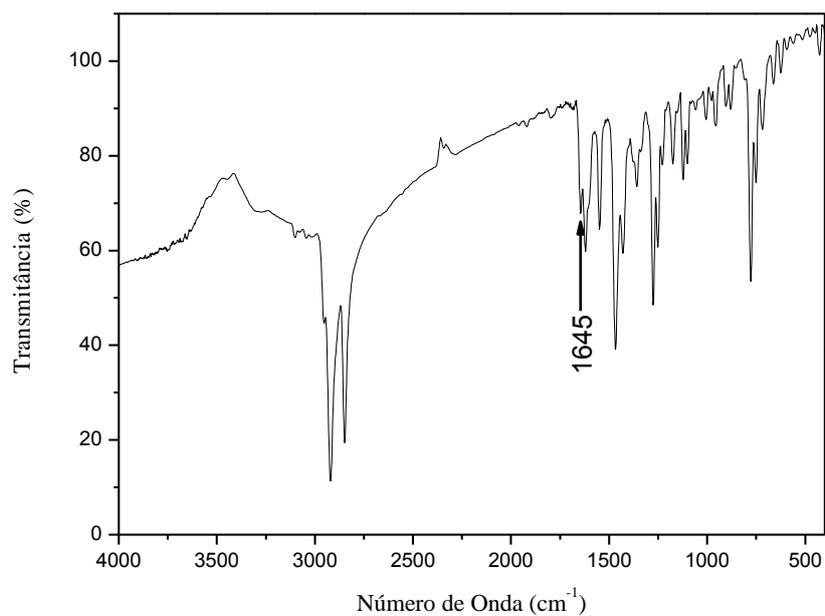
**Figura A13.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) da imina **35** em CDCl<sub>3</sub>.



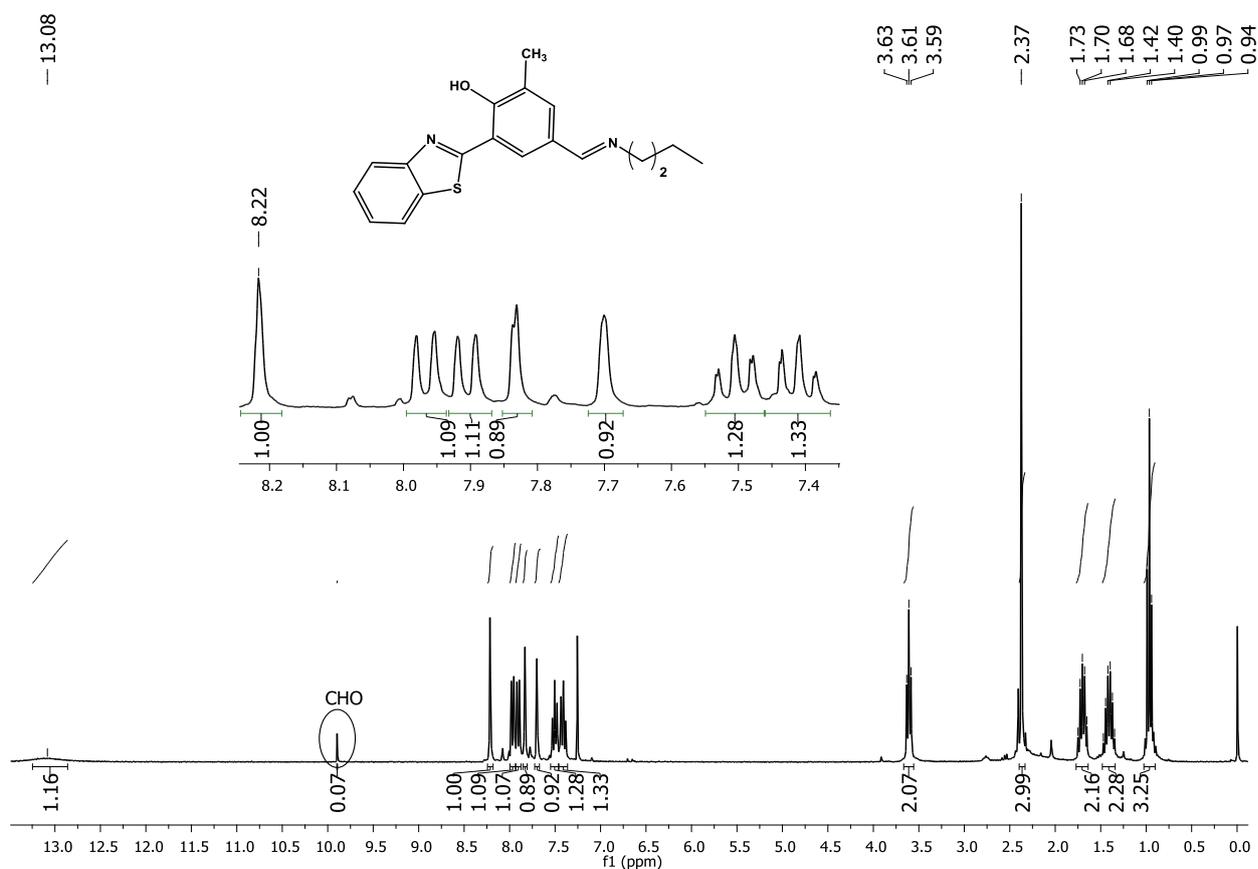
**Figura A14.** Espectro de FTIR do composto **35** em KBr.



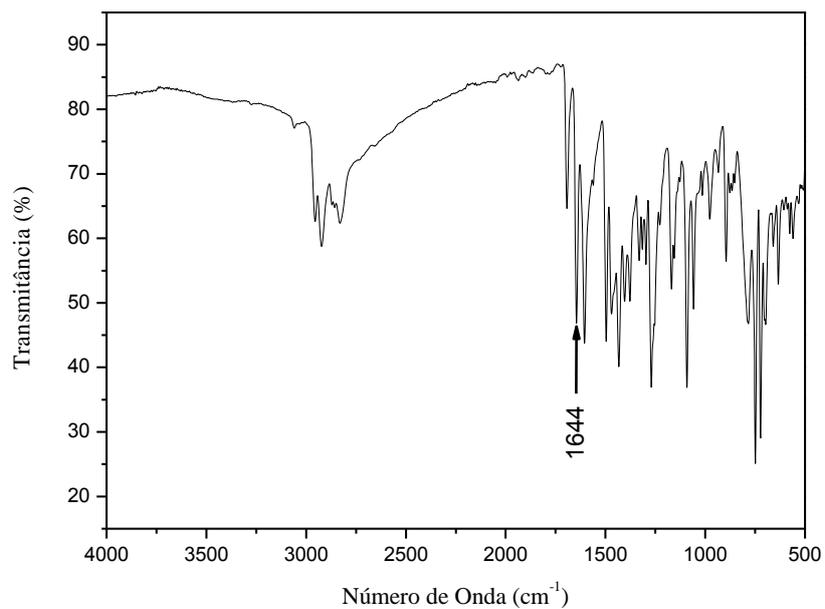
**Figura A15.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) da imina **36** em CDCl<sub>3</sub>.



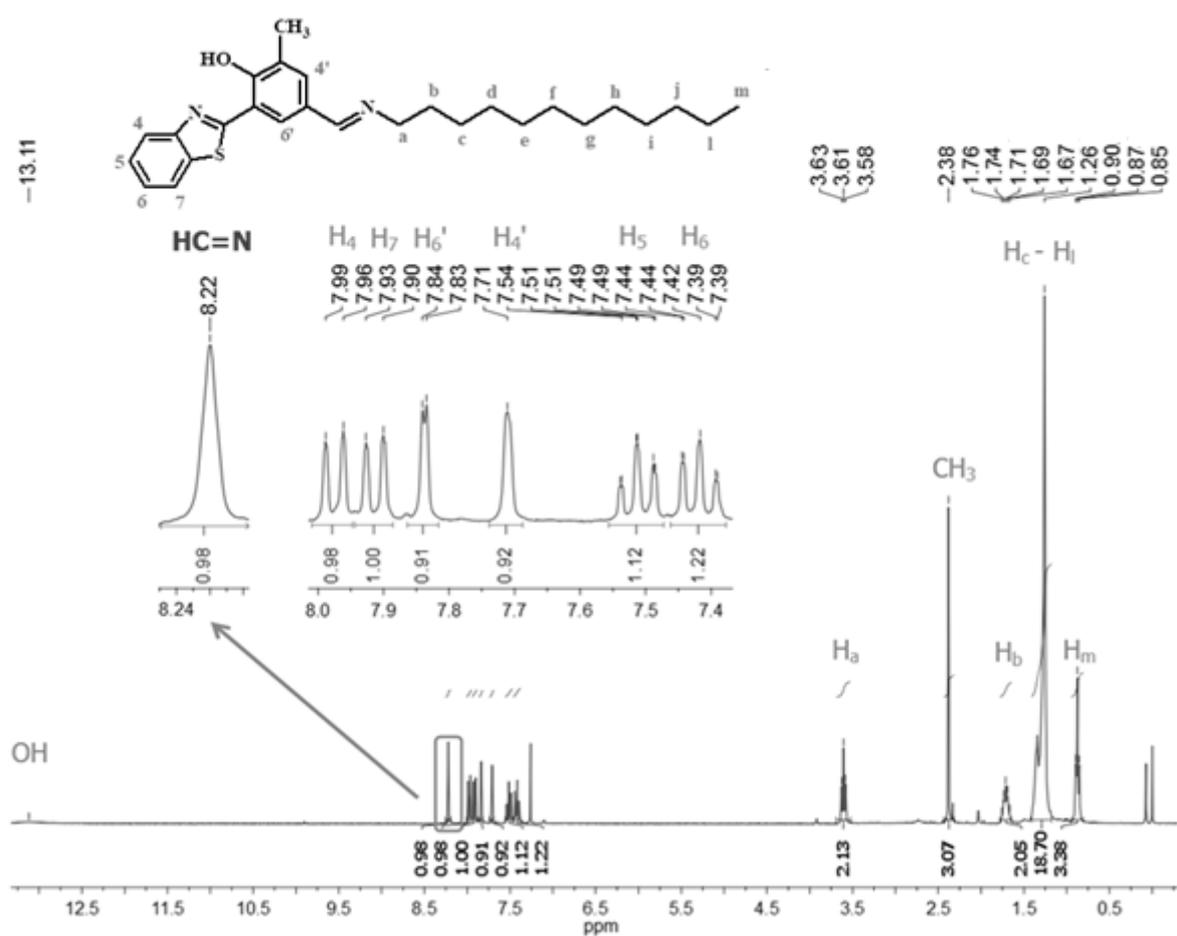
**Figura A16.** Espectro de FTIR do composto **36** em KBr.



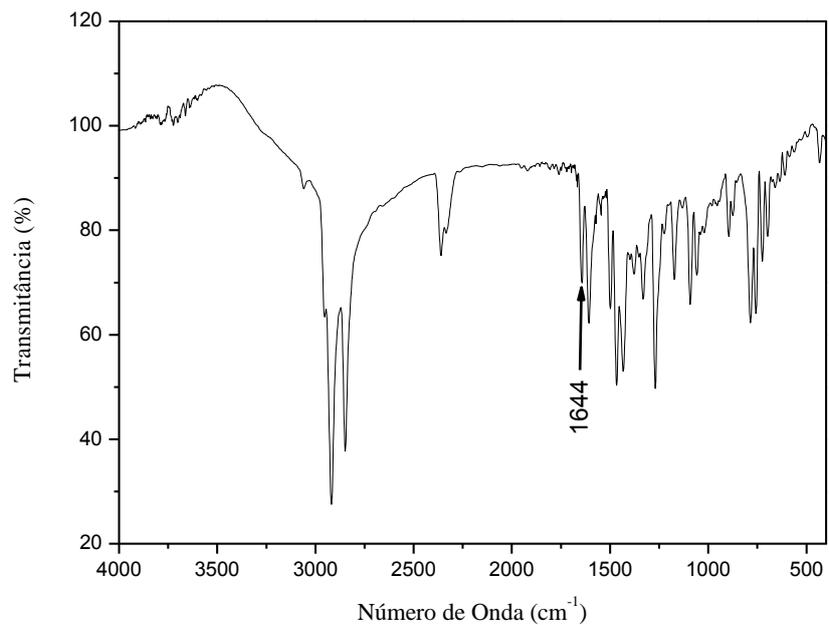
**Figura A17.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) da imina **37** em CDCl<sub>3</sub>.



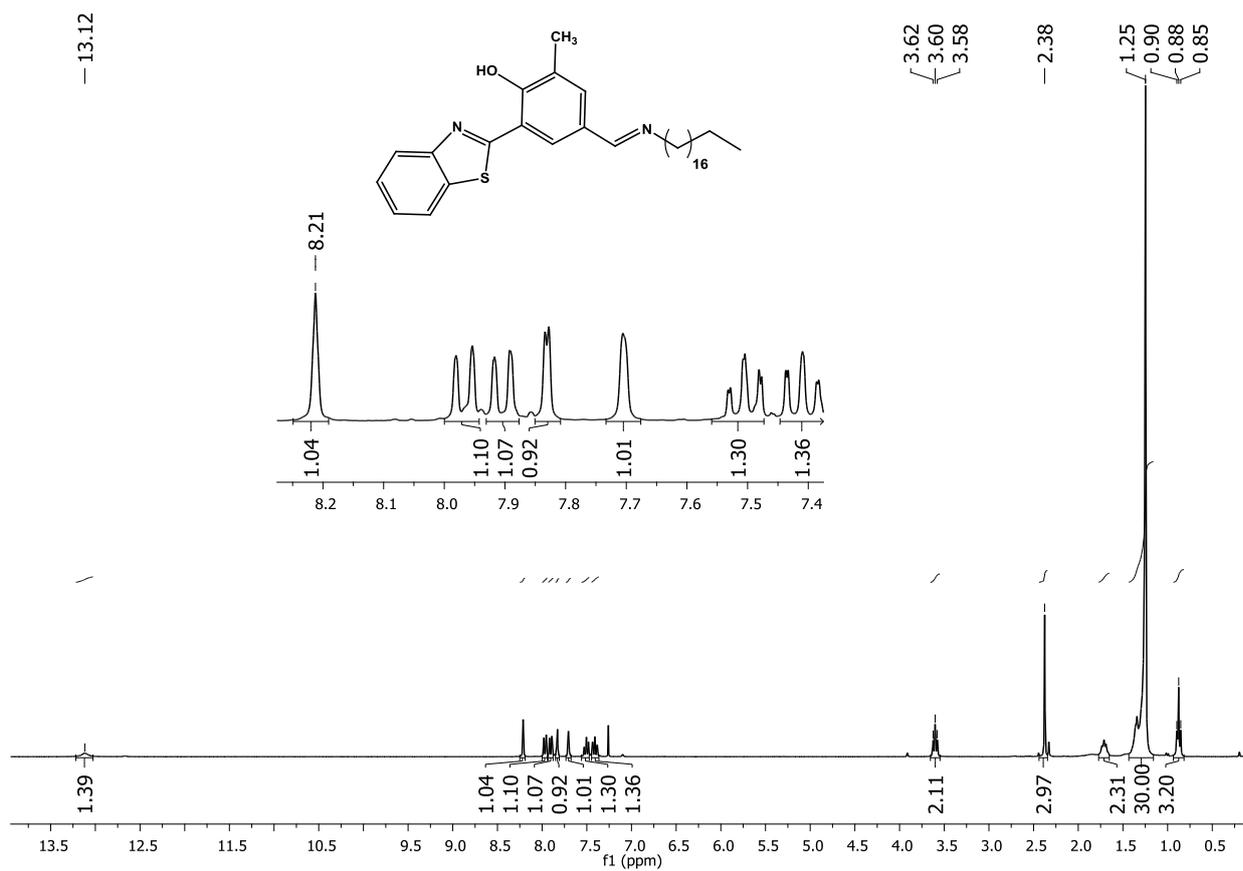
**Figura A18.** Espectro de FTIR do composto **37** em ATR



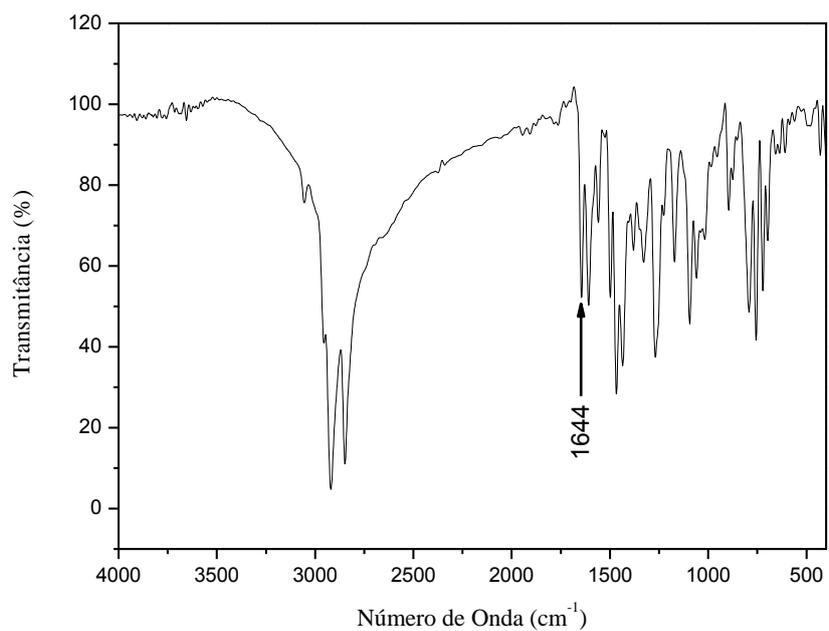
**Figura A19.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) da imina **38** em CDCl<sub>3</sub>.



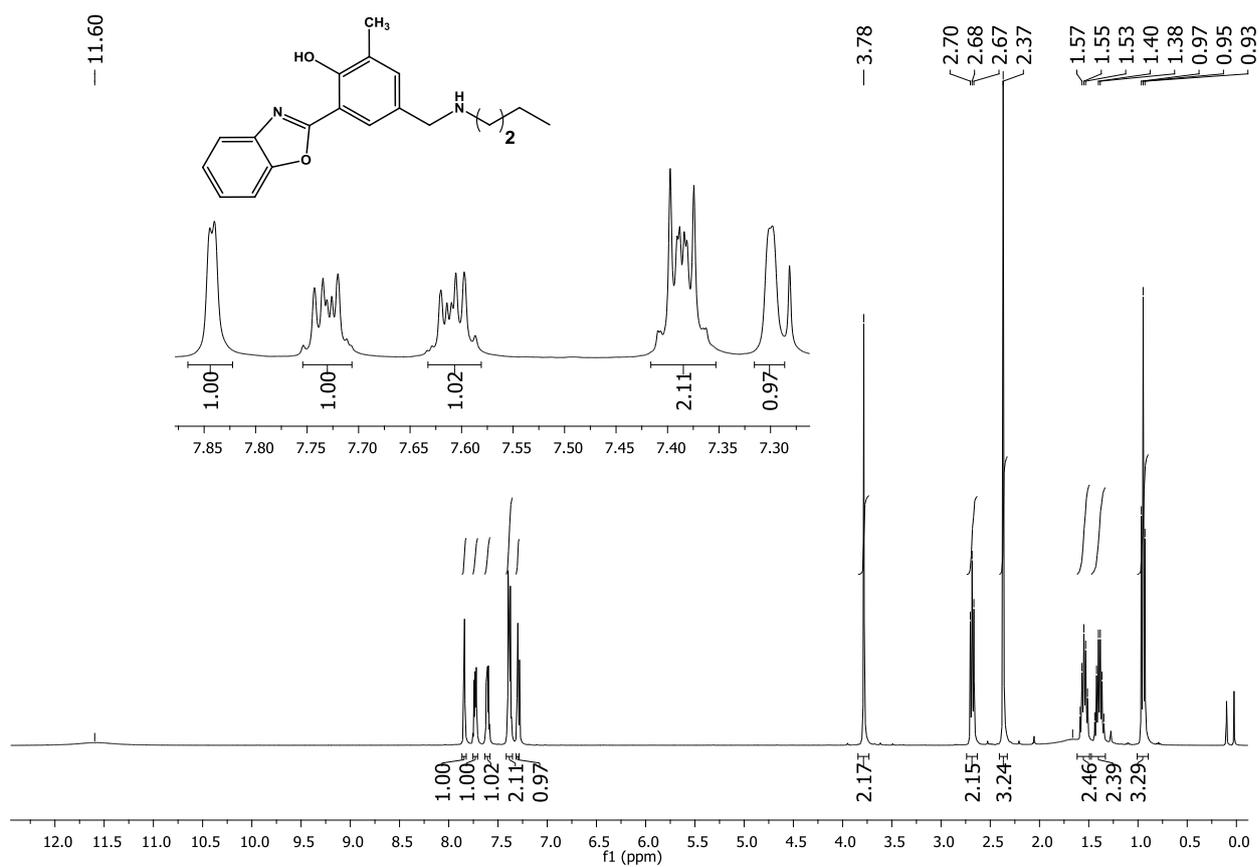
**Figura A20.** Espectro de FTIR do composto **38** em KBr.



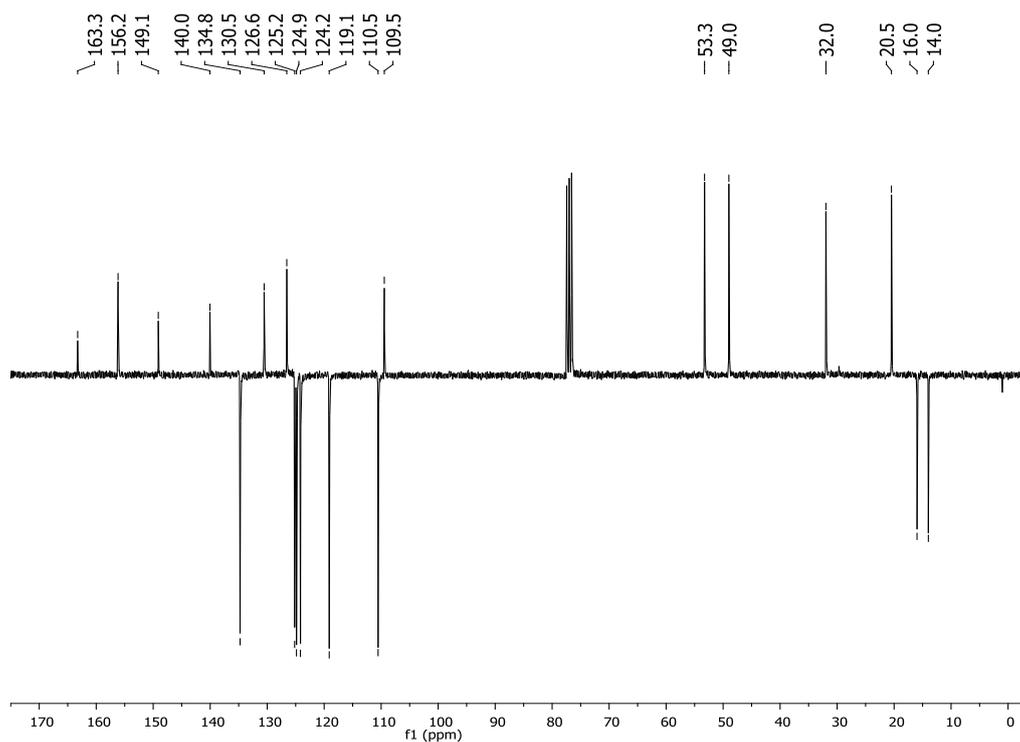
**Figura A21.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) da imina **39** em CDCl<sub>3</sub>.



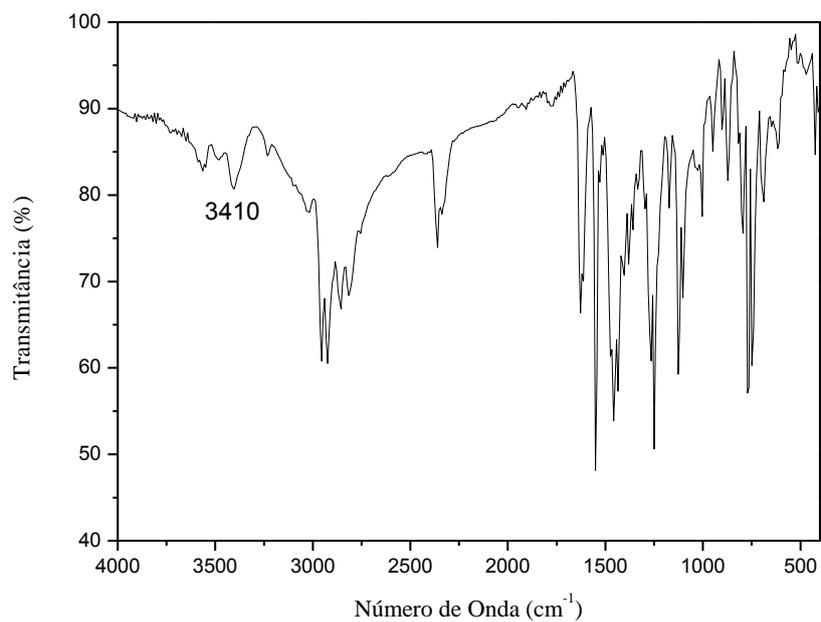
**Figura A22.** Espectro de FTIR do composto **39** em KBr.



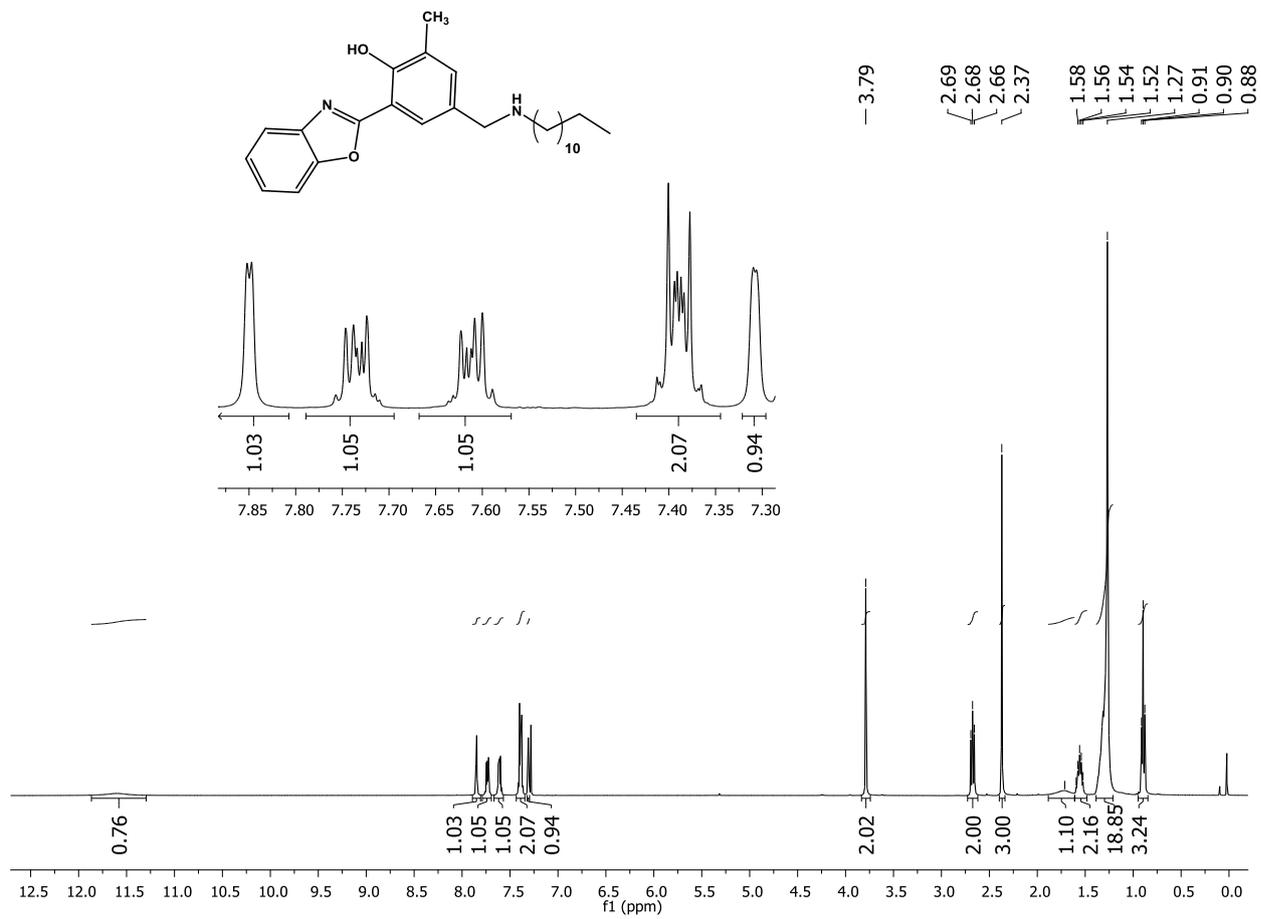
**Figura A23.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) da amina **40** em CDCl<sub>3</sub>.



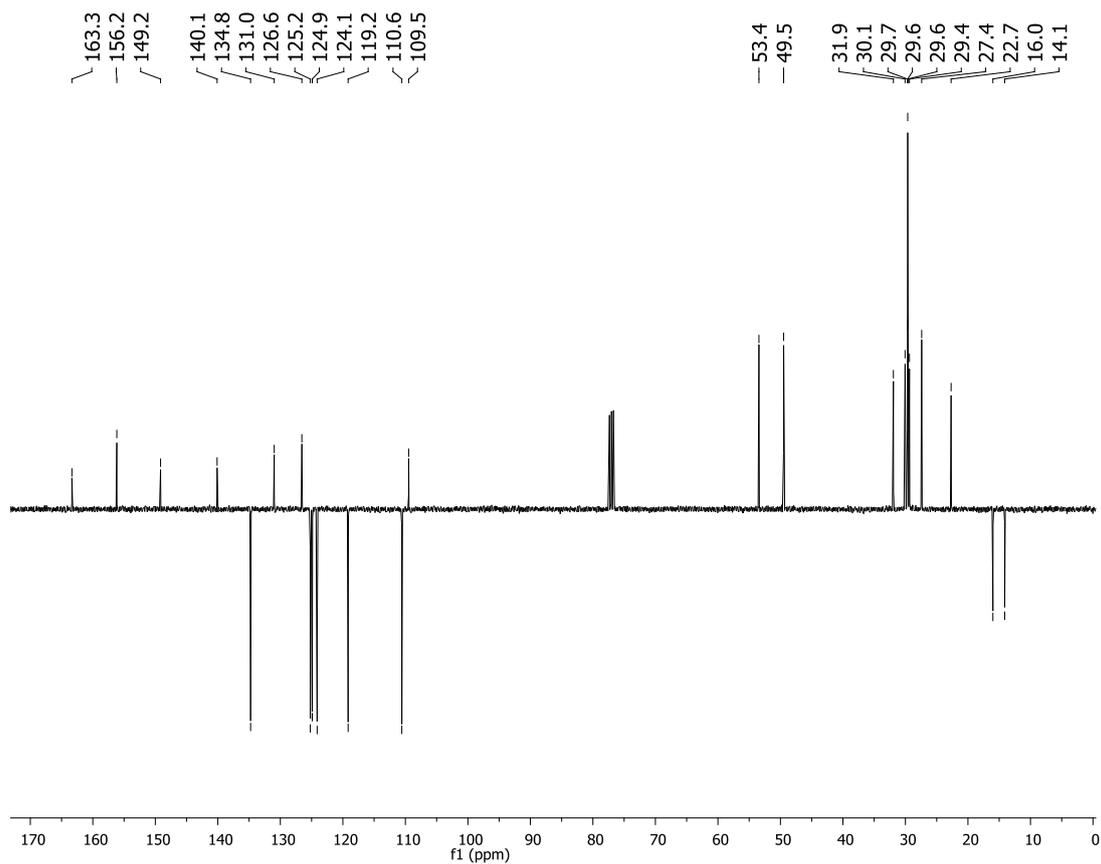
**Figura A24.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APT) (75,4 MHz) da amina **40** em  $\text{CDCl}_3$ .



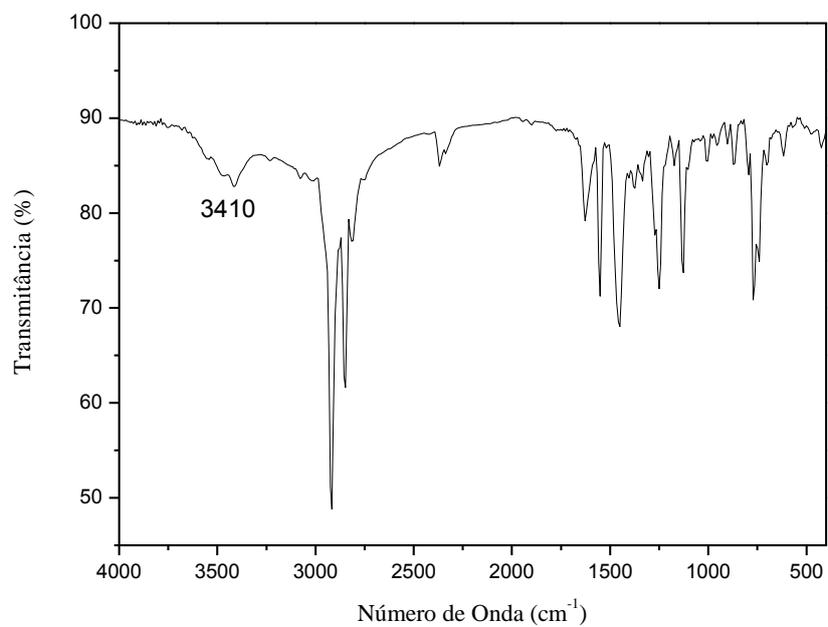
**Figura A25.** Espectro de FTIR do composto **40** em KBr.



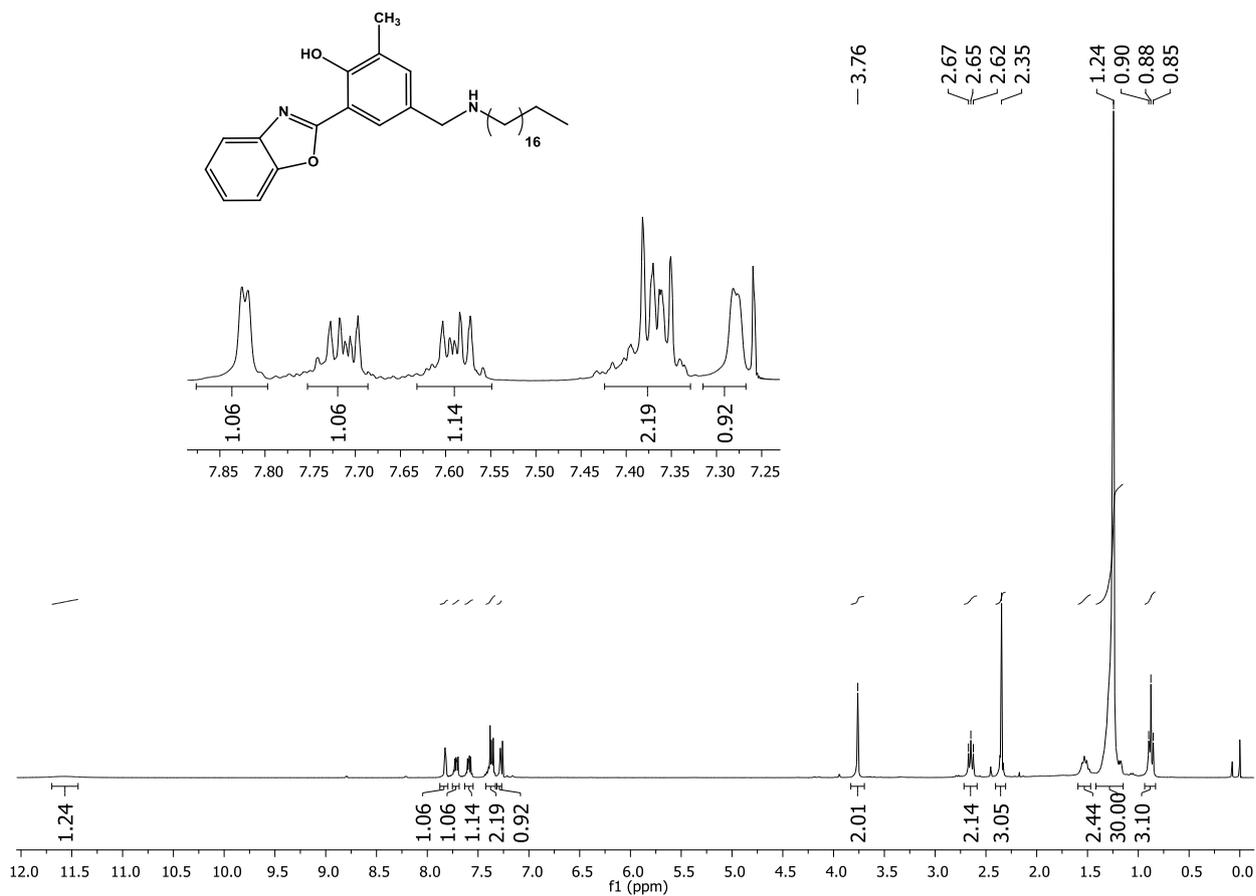
**Figura A26.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) da amina **41** em  $\text{CDCl}_3$ .



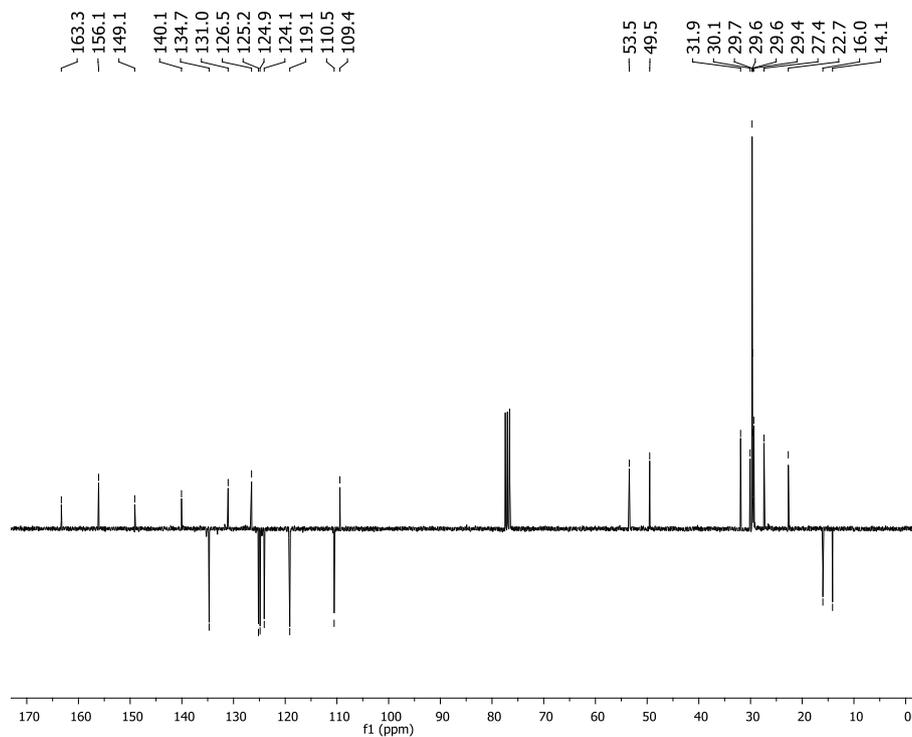
**Figura A27.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APT) (100,6 MHz) da amina **41** em  $\text{CDCl}_3$ .



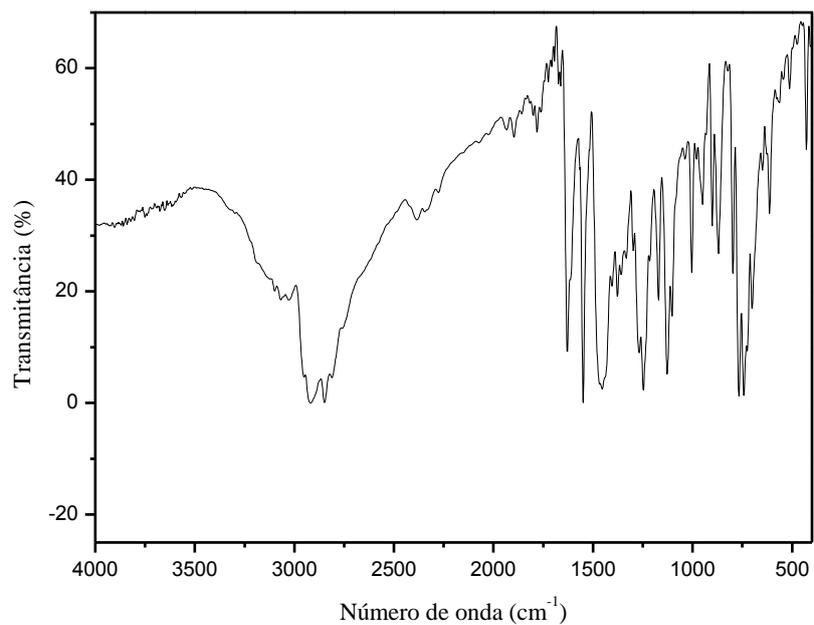
**Figura A28.** Espectro de FTIR do composto **41** em KBr.



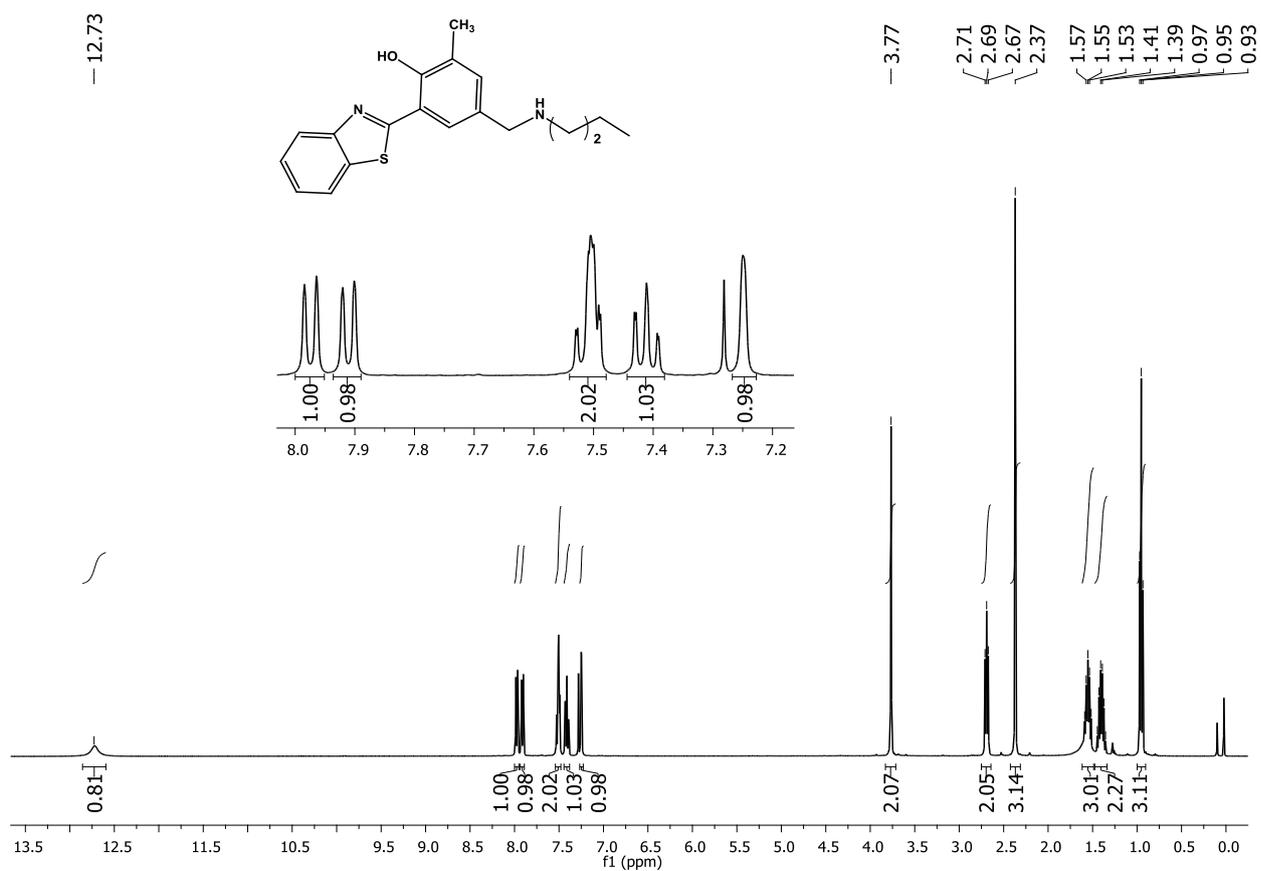
**Figura A29.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) da amina **42** em  $\text{CDCl}_3$ .



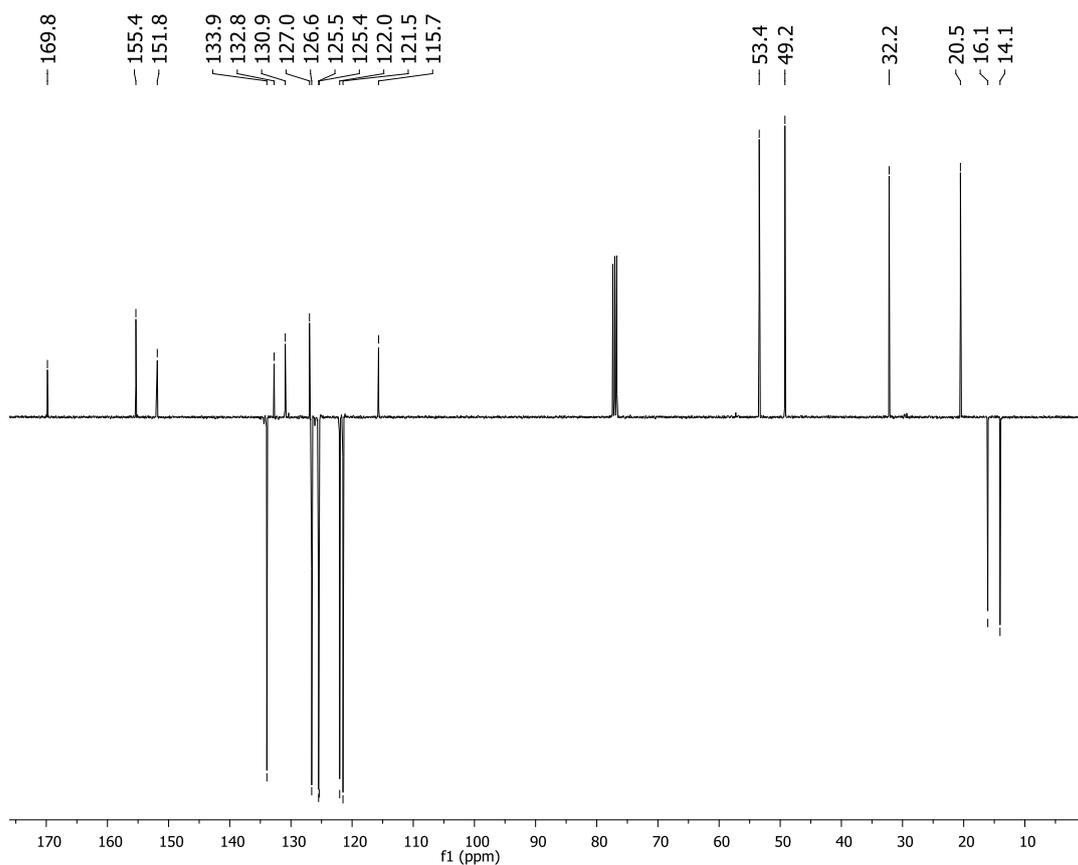
**Figura A30.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APT) (75,4 MHz) da amina **42** em  $\text{CDCl}_3$ .



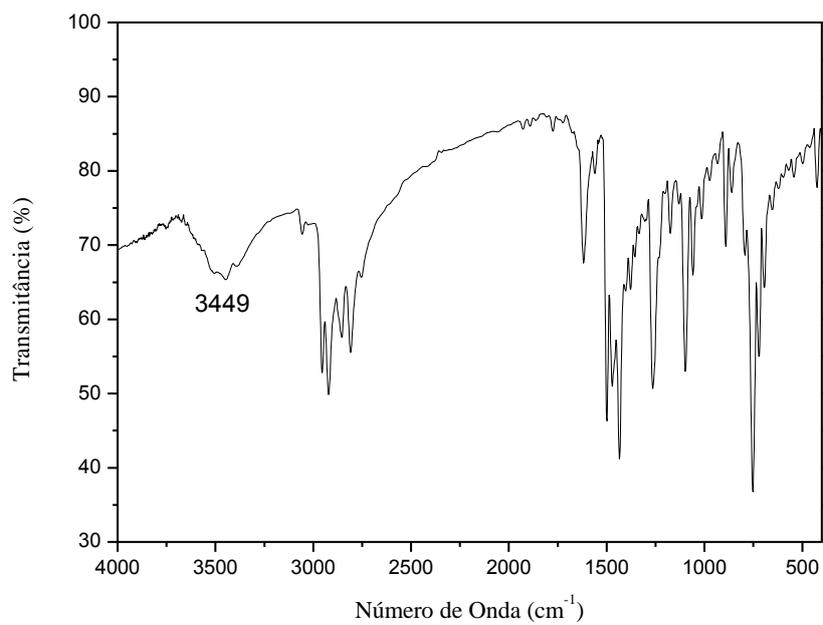
**Figura A31.** Espectro de FTIR do composto **42** em KBr.



**Figura A32.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) da amina **43** em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura A33.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APT) (100,6 MHz) da amina **43** em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura A34.** Espectro de FTIR do composto **43** em KBr.



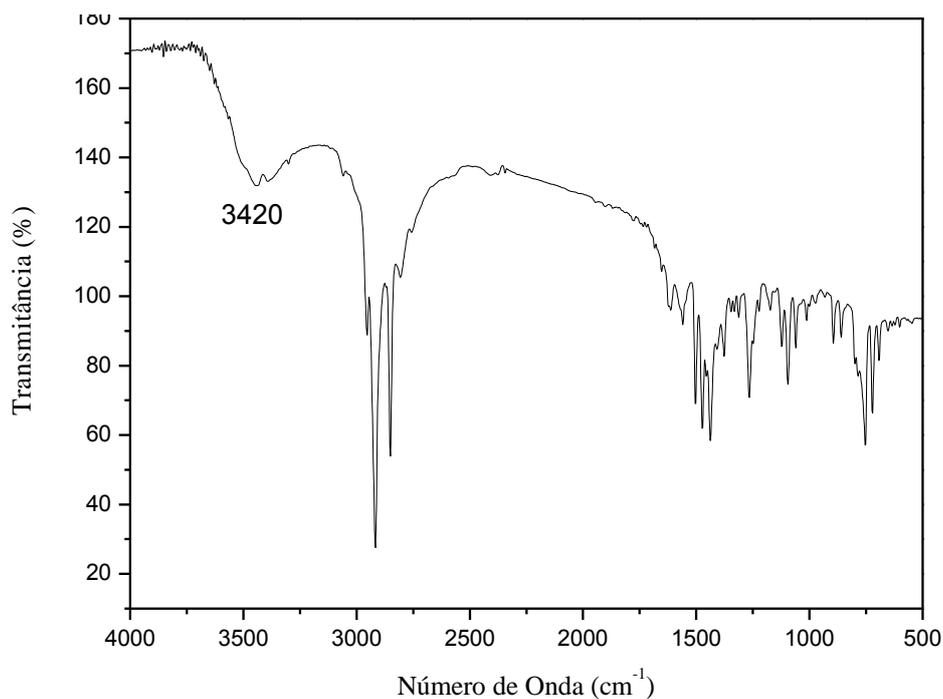


Figura A37. Espectro de FTIR da amina secundária **44** em ATR.

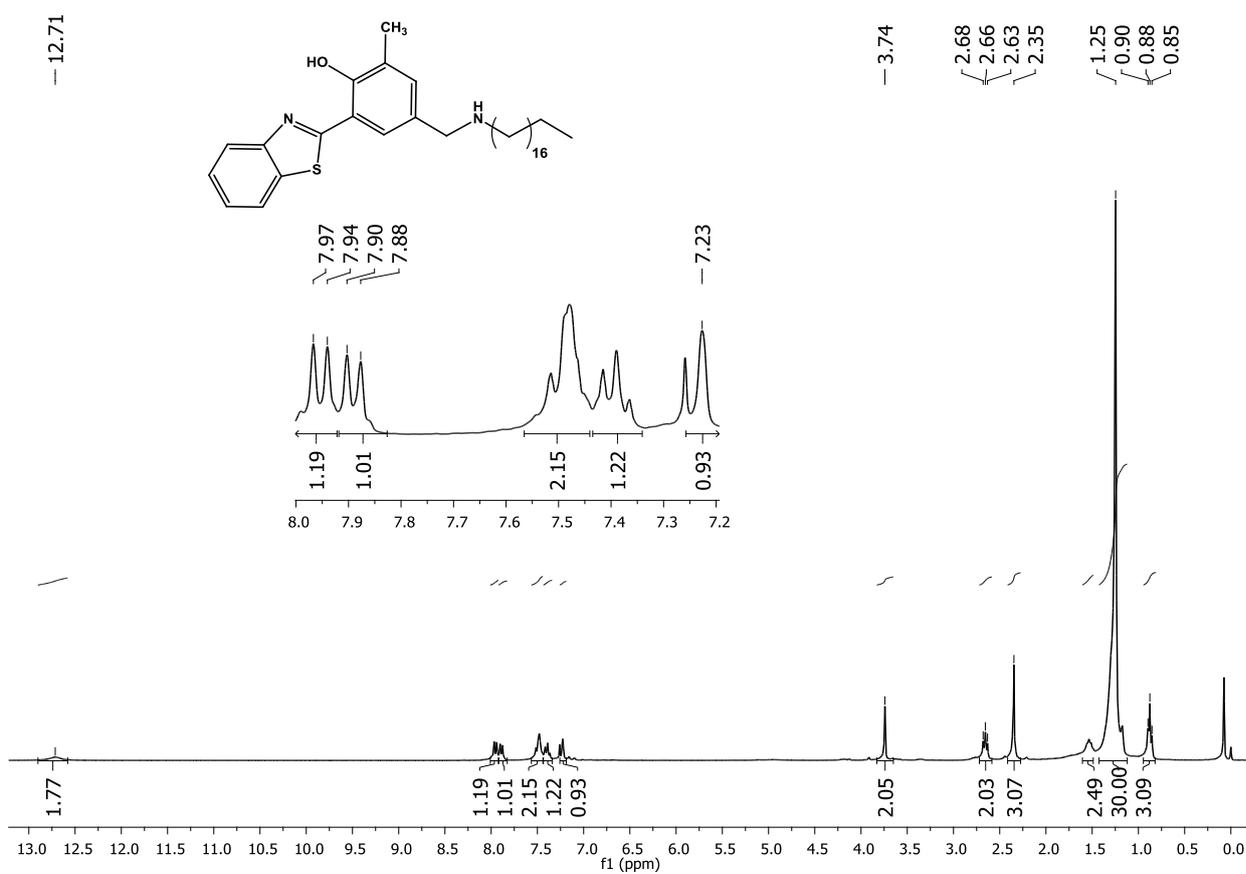
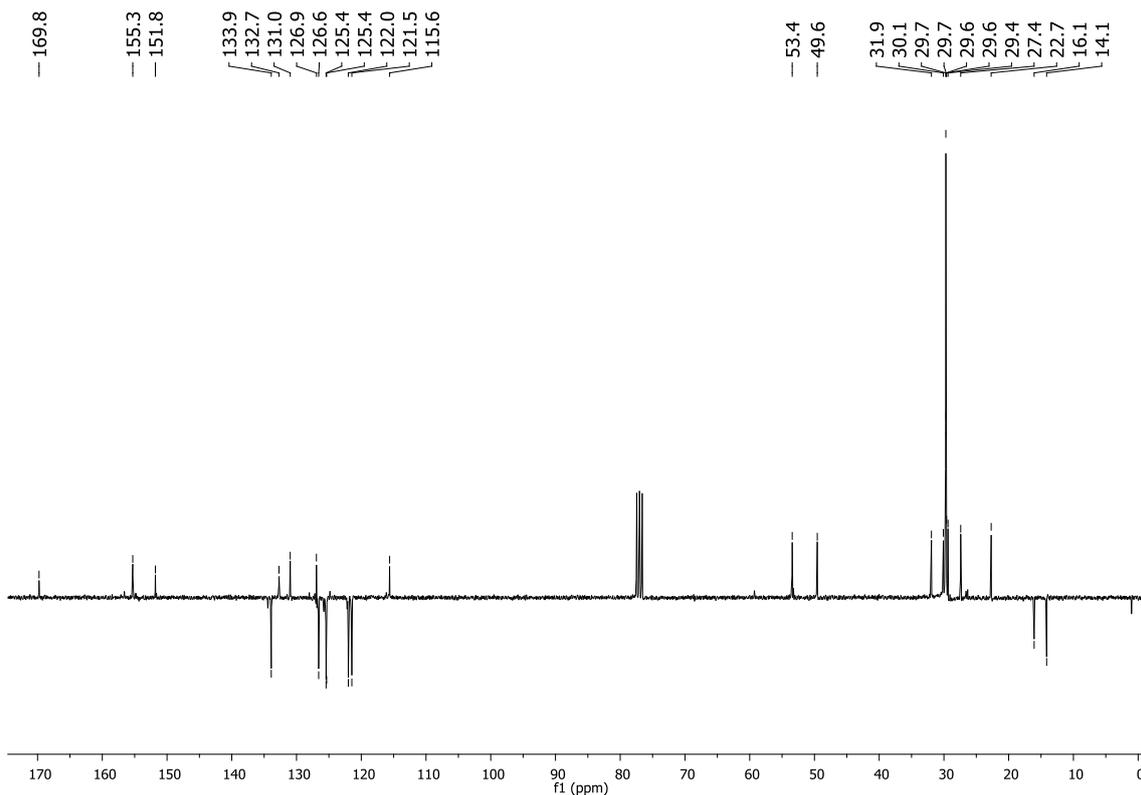
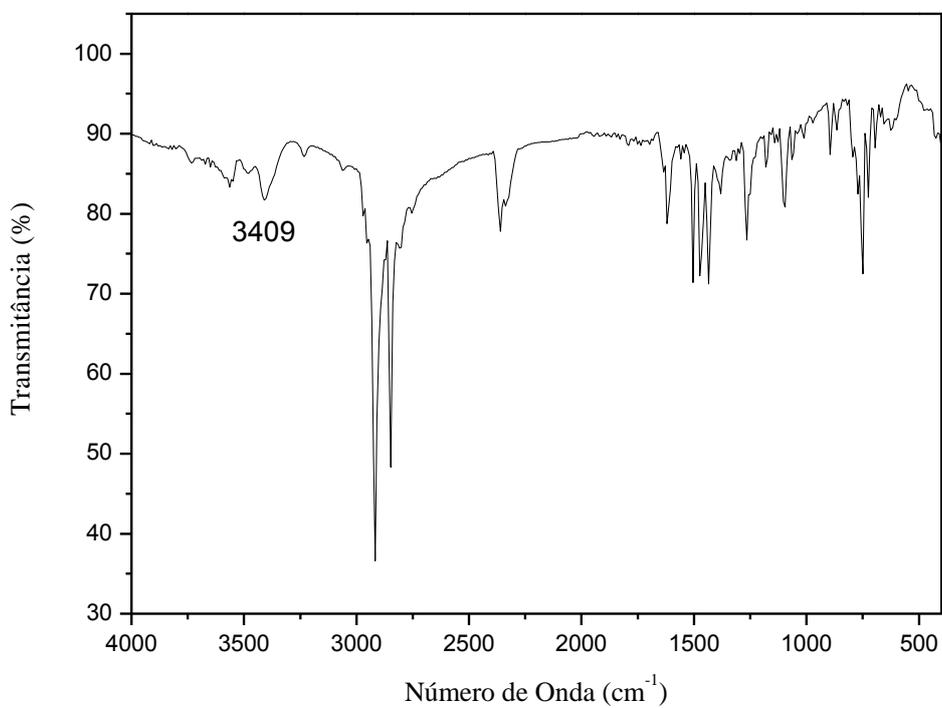


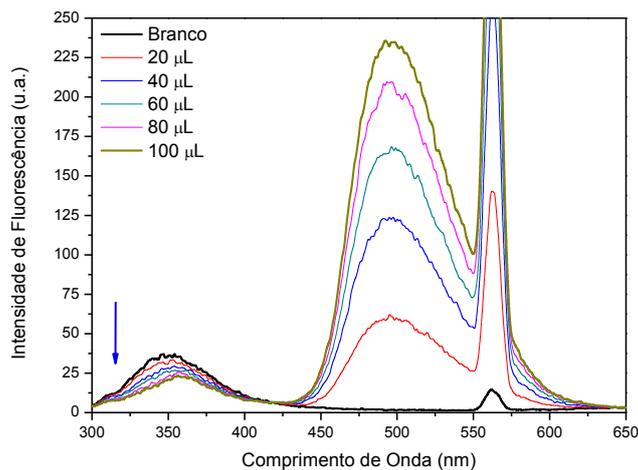
Figura A38. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) da amina **45** em CDCl<sub>3</sub>.



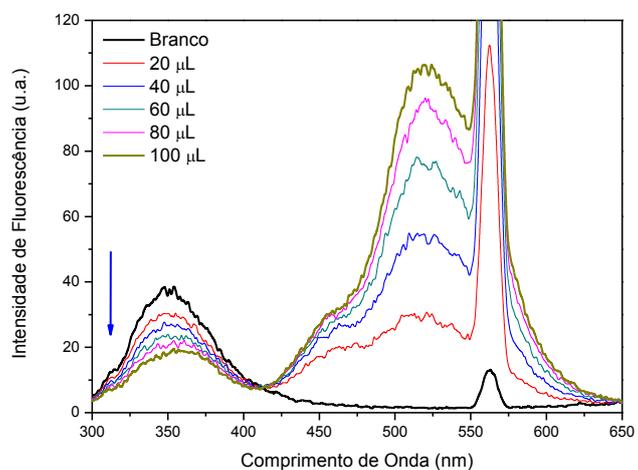
**Figura A39.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APT) (75,4 MHz) da amina **45** em  $\text{CDCl}_3$ .



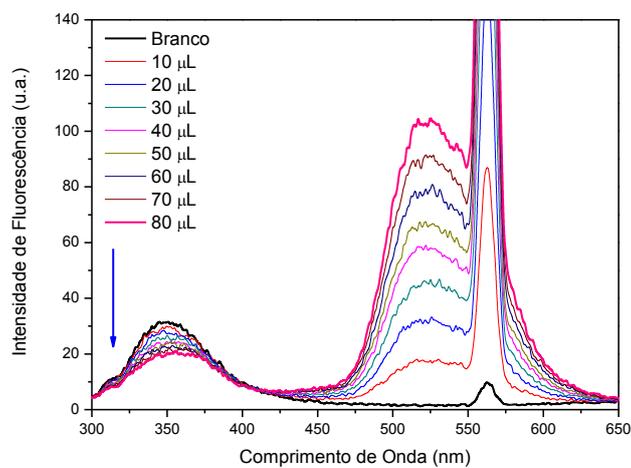
**Figura A40.** Espectro de FTIR do composto **45** em KBr.



**Figura A41.** Espectro de emissão de fluorescência de WGA em presença do lipossoma  $C_{22}PC$  contendo o composto **42**.



**Figura A42.** Espectro de emissão de fluorescência de WGA em presença do lipossoma  $C_{22}PC$  contendo o composto **43**.



**Figura A43.** Espectro de emissão de fluorescência de WGA em presença do lipossoma  $C_{22}PC$  contendo o composto **45**.