

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PRISCILA FRANKEN DICK

**PREPARAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
FLUORESCENTES PARA BICAMADAS LIPÍDICAS**

Porto Alegre, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PRISCILA FRANKEN DICK

**PREPARAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
FLUORESCENTES PARA BICAMADAS LIPÍDICAS**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Profa. Dra. Leandra Franciscato Campo
Orientadora

Este trabalho foi desenvolvido entre janeiro de 2010 e junho de 2010 no Laboratório de Novos Materiais Orgânicos, LMNO, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. O presente trabalho foi realizado inteiramente pela autora sob orientação e auxílio da Professora Doutora Leandra Franciscato Campo.

*“Feliz o homem, e só ele feliz,
Que pode chamar de seu o dia de hoje,
E, com ânimo certo, dizer,
Que amanhã venha o pior, pois
Hoje vivi plenamente.”*

Quinto Horácio Flaco

AGRADECIMENTOS

Analisando meus anos de graduação, posso afirmar que nada saiu como eu planejei. Algumas metas foram alcançadas, tive muitas surpresas boas, muitas ruins... A conclusão que chego é àquela máxima que no fundo todos sabemos, mas que é sofrido de admitir: a vida não aceita regras nem planos pré-estabelecidos. Se minhas escolhas vão me levar ao caminho que um dia pretendi? Não sei. Mas acho que a graça da vida (deve) está(r) nisso.

Muitas pessoas foram importantes para mim, ao longo de minha graduação, e que me ajudaram, de uma forma ou de outra, a chegar até este momento.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha mãe, esteio da minha vida, que me ensinou a nunca desistir, a não me abater pelos pequenos percalços que a vida impõe e a encarar a vida com coragem.

Agradeço ao meu pai por acreditar em mim, me incentivar e me lembrar, sempre, que é preciso ter planos alternativos para tudo que se vai fazer.

À minha irmã, agradeço por não desistir de mim.

Aos meus amigos, a todos, quero dizer um muito obrigado. Sem vocês essa luta teria sido, talvez, uma barreira intransponível.

Agradeço a todos os professores que tive nesta instituição. Serão sempre um exemplo para mim. Alguns como exemplo de como ser e outros, de como não ser futuramente.

Quero dizer um especial muito obrigado à minha orientadora, Prof. Dra. Leandra Franciscato Campo. Agradecimento pelos ensinamentos teóricos e práticos, por sua paciência, altruísmo e amizade. Por ser um exemplo em quem eu me inspiro e que tive a sorte de ter por orientadora.

Agradeço também aos demais professores do LNMO, Prof. Valter Stefani e Prof. Fabiano Severo Rodembusch por seus ensinamentos. Aos colegas deste laboratório, pela convivência, ensinamentos, companheirismo e horas de risadas.

Agradeço também à Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha e aos seus professores. Foram lá os meus primeiros contatos com a química.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS.....	IX
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	X
RESUMO	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. MOTIVAÇÃO E OBJETIVO	3
2. CONCEITOS TEÓRICOS	5
2.1 TIPOS DE MODELOS DE BIOMEMBRANAS	5
2.2 ESTUDO FOTOFÍSICO	7
2.2.1. Ultravioleta-Visível	7
2.2.2. Fluorescência	8
2.3. HETEROCICLOS 2-(2'-HIDROXIFENIL)BENZAZÓLICOS COMO SONDAS FLUORESCENTES.....	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
3.1. SÍNTESE DOS DERIVADOS 2-(2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZÓIS	14
3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS BENZOXAZÓIS 3-5 POR ¹ H-RMN.....	15
3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS BENZOXAZÓIS 3-5 POR INFRAVERMELHO	18
3.4. CARACTERIZAÇÃO DOS BENZOXAZÓIS 3-5 POR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	20
3.5. CARACTERIZAÇÃO DOS BENZOXAZÓIS 3-5 POR FLUORESCÊNCIA	22
4. CONCLUSÃO	25
5. EXPERIMENTAL	26
5.1 EQUIPAMENTOS	26
5.2. REAGENTES UTILIZADOS	26
5.3 SÍNTESE DOS CORANTES	26
5.3.1 <i>Preparação do ácido polifosfórico (APF)</i>	26
5.3.2 <i>2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (3)</i>	27
5.3.3 <i>2-(5'-N-3-cloro-2-hidroxiopropil-2'-hidroxifenil)benzoxazol (4)</i>	27
5.3.4 <i>C18-Benzazol-N+(Me)₂ (5)</i>	27
5.3.5 <i>Solução de Lipossomas</i>	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de um fosfolípido e as diferentes formas (bicamada lipídica e lipossoma) que seus agregados podem assumir quando em solução aquosa.....	2
Figura 2. Localização e orientação representativa dos corantes C18-Benzoxazol-N ⁺ (Me) ₂ Cl ⁻ (esquerda) e C12-Fluoresceína (direita) em uma bicamada lipídica.....	4
Figura 3. Representação esquemática da membrana plasmática.....	5
Figura 4. Estrutura química da Fosfatidilcolina mostrando os seus componentes: duas cadeias de ácidos graxos (palmitoil e oleoil), glicerol, fosfato e uma amina quaternária.....	6
Figura 5. Transições eletrônicas na região do Uv-vis.	7
Figura 6. Diagrama de Jablonski.	9
Figura 7. Heterociclos 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazóis (X = O); 2-(2'-hidroxifenil)benzotiazóis (X = S) e 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazóis (X = NH).....	11
Figura 8. Mecanismo de ESIPT.	12
Figura 9. Representação pictórica de um ensaio de mistura de lipídeos baseada no <i>self-quenching</i> de fluorescência. A fluorescência da octadecilrodamina B incorporada (> 1:100) em um membrana de lipídeos é suprimida devido a interações corante–corante. A fusão com membranas sem o corante provoca a dispersão da sonda, resultando em um aumento de fluorescência, que nesta figura está representado por uma mudança de cor de preto para verde.	13
Figura 10. Esquema de síntese do amino-benzoxazol <u>3</u>	14
Figura 11. Esquema de síntese do precursor cloro-propil-benzoxazol <u>4</u>	14
Figura 12. Esquema de síntese da molécula alvo C18-benzoxazol-N ⁺ (Me) ₂ Cl ⁻ <u>5</u>	15
Figura 13. ¹ H-RMN do compostos <u>4</u> em clorofórmio deuterado.	16
Figura 14. Expansão da região alifática do composto <u>4</u>	16
Figura 15. Expansão do sistema aromático do composto <u>4</u>	16
Figura 16. ¹ H-RMN do composto <u>5</u> em clorofórmio deuterado.	17
Figura 17. Expansão do sistema alifático do composto <u>5</u>	17
Figura 18. Expansão do sistema aromático do composto <u>5</u>	17
Error! Bookmark not defined.	
Figura 19. Comparação das bandas do espectro de infravermelho dos compostos <u>3</u> e <u>4</u>	18
Figura 20. Espectro de IV do composto referência não quaternizado.....	19
Figura 21. Espectro de IV do composto referência quaternizado ²³	20

Figura 22. Espectro de IV do composto <u>5</u>	20
Figura 23. Espectro de absorção para os compostos <u>3-5</u>	22
Figura 24. Espectro de emissão para os compostos <u>3-5</u>	23
Figura 25. Espectros de fluorescência do C18-Benzoxazol <u>5</u> em CH ₂ Cl ₂ (—◊—), em EtOH (—●—) e na solução de lipossoma (—□—).....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Máximos de absorção no UV-Vis para as moléculas <u>3</u> , <u>4</u> e <u>5</u> e absorptividades molares médias.	21
Tabela 2. Máximos de excitação de fluorescência para as moléculas <u>3</u> , <u>4</u> e <u>5</u>	22

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

*	Estado eletrônico excitado
¹ H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
cm	Centímetro
IV	Infravermelho
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
δ	Deslocamento químico
° C	Graus Celcius
ν _{as}	Frequência de estiramento assimétrico
ν _s	Frequência de estiramento simétrico
ESIPT	Excited State Intramolecular Proton Transfer (transferência protônica intramolecular no estado excitado)

RESUMO

Este trabalho apresenta a síntese e caracterização de um novo benzoxazol fluorescente modificado na forma de um sal de amônio quaternário lipofílico. Esta molécula foi idealizada com o objetivo de obter-se uma estrutura mimetizadora de bicamadas lipídicas para ser utilizada como sonda fluorescente destes sistemas. A síntese da nova sonda denominada de C18-benzoxazol- $N^+(Me)_2Cl^-$, foi realizada partindo-se da quaternização de uma amina terciária contendo C18 pela reação com um benzoxazol clorado. Tanto o precursor clorado quanto o C18-benzoxazol foram caracterizados utilizando-se a espectroscopia de absorção no infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono e ponto de fusão. As propriedades fotofísicas destes compostos e dos mesmos inseridos em lipossomas de lecitina foram estudadas através das espectroscopias no UV-vis e de fluorescência.

Palavras-chave: benzoxazol, ESIPT, sonda lipofílica, bicamada lipídica.

1. INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes aspectos estruturais da organização biológica é a presença de uma membrana delimitadora, de tal modo que a própria unidade básica da vida - a célula - é definida física e funcionalmente por uma membrana celular. Compreender os sistemas biológicos requer, portanto uma familiaridade com a química e a física das membranas biológicas¹.

Membranas biológicas são estruturas dinâmicas e heterogêneas que apresentam muitas unidades funcionais ou organelas altamente especializadas. Os componentes da membrana, tal como proteínas e lipídeos, têm um papel fundamental na regulação, sinalização, proteção, reconhecimento, disponibilização de sítios de ligação e catálise, regulação da fusão de membranas na célula, mobilidade celular entre outros. Estes processos celulares estão intimamente ligados às propriedades físicas das membranas como fluidez, formação de microdomínios, variabilidade química e dinâmica estrutural². Isto resulta que, para compreender e prever o comportamento celular, é necessário ter o conhecimento e domínio destes processos. Para tanto, utilizam-se modelos sintéticos de bicamadas lipídicas de maneira a mimetizar *in vitro* as interações célula-célula.

Bicamadas lipídicas criadas pela fusão de vesículas têm sido utilizadas para este propósito. As vesículas compostas de fosfolipídeos (Figura 1) são usualmente denominadas lipossomas, enquanto que o termo genérico vesícula é atribuído às estruturas formadas por outros agentes anfifílicos. Estas estruturas fechadas envolvem um determinado volume de solução aquosa, variando o seu tamanho desde alguns nanômetros a micrômetros de diâmetro. Sem qualquer processamento adicional, a dispersão de fosfolipídeos em água origina uma população polidispersa denominada MLV ("multilamellar vesicles" – vesículas multilamelares), cujos tamanhos estão geralmente compreendidos entre 0,4 e 3,5 μm de diâmetro. Quando em concentrações baixas, estas MLVs mantêm-se espacialmente separadas umas das outras, característica que pode ser explorada por técnicas de fluorescência para estudar a dinâmica de interação celular.

¹ Ferreira, H.; Lúcio, M.; Siquet, C.; Reis, S. *Química* **2005**, 39-51.

² Gao, F.; Mei, E.; Lim, M.; Hochstrasser, R.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4814-4822.

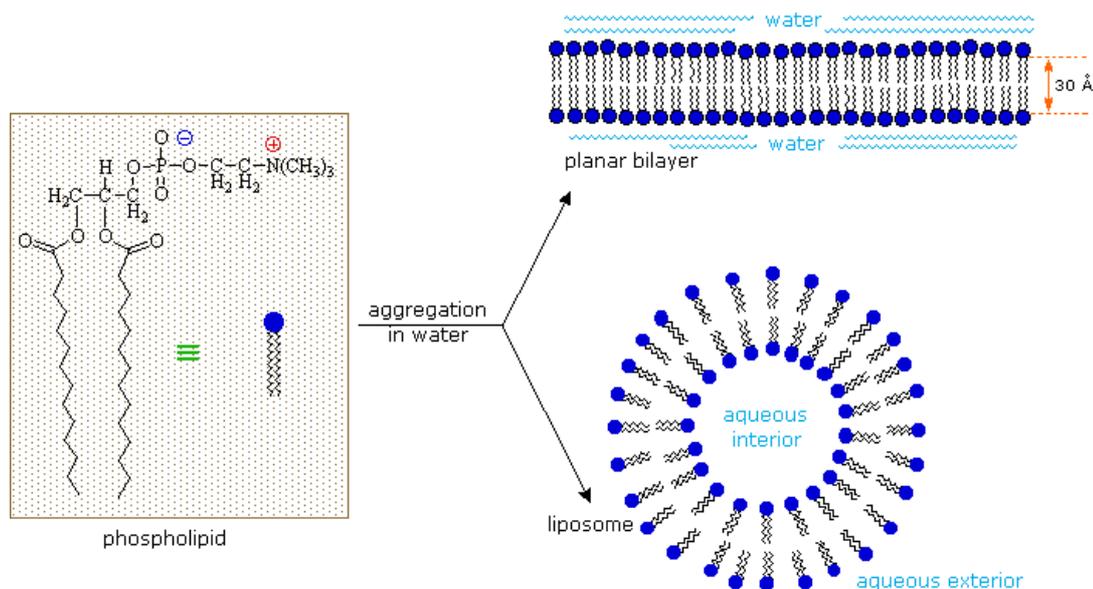


Figura 1. Estrutura de um fosfolípídeo e as diferentes formas (bicamada lipídica e lipossoma) que seus agregados podem assumir quando em solução aquosa³.

Membranas de plasma, membranas intracelulares de células vivas e as membranas artificiais de lipossomas representam uma significativa área de aplicação para sondas fluorescentes^{4,5}. Testes de membrana incluem análogos fluorescentes de lipídeos naturais, bem como corantes orgânicos lipofílicos que possuem pouca semelhança estrutural com as biomoléculas naturais. Estes testes são usados para análise estrutural e biofísica das membranas, para acompanhar o transporte de lipídeos e o metabolismo nas células vivas entre outras aplicações que são bastante detalhadas e divulgadas na página de uma das maiores empresas de sondas fluorescentes do mundo, a InvitrogenTM.

Para servir como um rastreador eficaz da morfologia celular, uma sonda fluorescente, ou outra molécula detectável, deve ter a capacidade de se introduzir em uma célula, bem como ter uma retenção dentro dessa estrutura de longo prazo. Se for usado em células vivas e tecidos, a sonda também deve ser biologicamente inerte e não tóxica. Quando essas condições são satisfeitas, a fluorescência ou outras propriedades detectáveis do marcador podem ser usadas para controlar a posição do marcador ao longo do tempo. Marcadores fluorescentes podem ser empregados para definir a conectividade de células neuronais, acompanhar a divisão celular bem como a fusão de células ou de lipossomas. Além disso, eles podem ser usados para acompanhar os movimentos de células marcadas em culturas, tecidos ou

³ <http://www.cem.msu.edu> consultado em 14/06/2010.

⁴ Maier, O; Oberle, V; Hoekstra, D. *Chemistry and Physics of Lipids*, 116 (2002) 3-18.

⁵ Lakowicz, J.R.; Prendergast, F.G.; Hogen, D., *Biochemistry*, pg 520.

organismos intactos⁶. Por exemplo, o corante *Nile Red* foi utilizado como sonda em experimentos de dinâmica de formação de vesículas. As variações na fluorescência desta sonda foram relacionadas com o tamanho, heterogeneidade e segregação de fase de vesículas formadas pelos surfactantes derivados de fosfolipídeos 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC) e 1-estearoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (SOPC)².

A semelhança do *Nile Red*, os heterociclos 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis (Figura 6) constituem uma importante classe de marcadores fluorescentes por apresentarem uma intensa emissão de fluorescência⁷ e estabilidade fotoquímica. Estes compostos já foram utilizados como sondas fluorescentes em uma grande variedade de sistemas como polímeros orgânicos e inorgânicos, materiais vítreos (sílica) e biopolímeros. Quando devidamente funcionalizados, eles podem ser inseridos em diferentes biomoléculas tais como proteínas, anticorpos, carboidratos e, a partir deste trabalho, estudaremos a viabilidade dos mesmos serem incorporados em lipossomas.

1.1. MOTIVAÇÃO E OBJETIVO

Tendo em vista o que foi apresentado acima, o desenvolvimento de moléculas que se intercalem aos lipídeos em lipossomas e/ou membranas se mostra interessante à medida que pode auxiliar no descobrimento do funcionamento destes sistemas biológicos e, assim, melhorar sua atuação e aplicação.

O objetivo deste trabalho foi sintetizar um fluoróforo da família dos benzoxazóis com emissão de luz via desativação do estado eletrônico excitado, contendo em sua estrutura um sal de amônio quaternário lipofílico com uma cadeia alquílica de dezoito átomos de carbonos (estrutura a esquerda na Figura 1: C18-Benzoxazol-N⁺(Me)₂Cl).

Esta estrutura molecular foi idealizada visando mimetizar uma monocamada lipídica para estudar o seu comportamento fotofísico em uma solução de lecitina (um tipo de fosfolipídeo surfactante formador de bicamada lipídica) através das espectroscopias de excitação e de emissão de fluorescência. Pela resposta espectral desta molécula (variações nos comprimentos de onda de emissão) no sistema de bicamada será possível determinar se a

⁶ <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html> consultado em 14/06/2010.

⁷ Rodembusch, F. S. Tese de Doutorado. Porto Alegre. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

mesma é capaz de se introduzir na membrana lipídica e, assim, estudar o comportamento deste sistema.

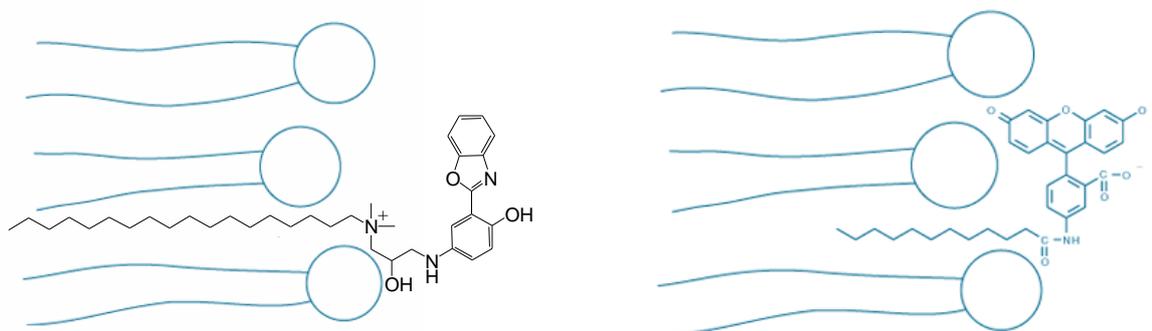


Figura 2. Localização e orientação representativa (fora de escala) dos corantes C18-Benzoxazol-N⁺(Me)₂Cl⁻ (esquerda) e C12-Fluoresceína (direita) em uma bicamada lipídica.

2. CONCEITOS TEÓRICOS

2.1 TIPOS DE MODELOS DE BIOMEMBRANAS

Uma membrana biológica pode ser definida como um tecido separatório que atua como barreira compartimentalizante dentro ou ao redor de uma célula. É quase sempre feita de uma bicamada de lipídeos, na maioria fosfolipídeos, glicolipídeos e colesterol, associados de maneira semifluida com moléculas de proteína que se encontram mergulhadas na bicamada (Figura 3)⁸.

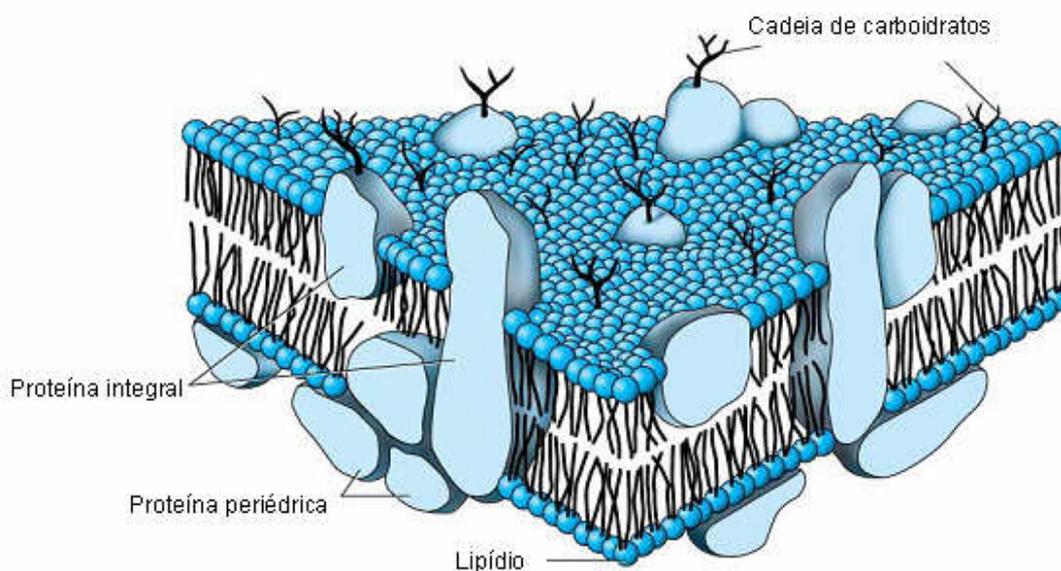


Figura 3. Representação esquemática da membrana plasmática⁹.

A complexidade, o número e diversidade dos fatores envolvidos e operantes nos fenômenos que ocorrem nas membranas celulares, fazem com que os estudos físico-químicos nem sempre possam ser realizados *in vivo* usando sistemas celulares. Assim, e numa primeira fase, podem utilizar-se sistemas *in vitro*, muito simples, que simulem pequenas partes desses sistemas complexos. A partir da informação retirada com estes sistemas pode-se usar sistemas de maior complexidade, numa contínua aproximação dos sistemas biológicos reais, de forma a obter dados que possam ser extrapolados para situações *in vivo*. Dos diversos modelos de biomembranas desenvolvidos, os lipossomas são as estruturas que mostraram ser mais

⁸ Moura, S.P. Tese de Doutorado. São Paulo, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2006.

⁹ Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 2003, McGraw-Hill, USA, 26ª edição.

adequadas uma vez que apresentam o ambiente químico e anisotrópico observado nas membranas biológicas. Os lipossomas são estruturas moleculares anfifílicas, ou seja, moléculas que apresentam duas regiões distintas, uma porção hidrofóbica, composta por uma ou mais cadeias hidrocarbônicas saturadas ou insaturadas, e uma porção hidrofílica, composta por um grupo polar¹⁰. Os anfifílicos podem ser classificados como:

- o aniônicos: dodecilsulfato de sódio – $C_{12}H_{25}SO_4Na^+$
- o catiônicos: brometo de dihexadeciltrimetilamônio – $C_{16}H_{33}N^+Me_3Br^-$
- o não-iônicos: monoéter de dodecilexaoxiétileno glicol – $C_{12}H_{25}[OCH_2CH_2]_6OH$
- o zwitteriônicos: 3-dimetildodecilamino propano sulfonato – $C_{12}H_{25}N^+(Me)_2(CH_2)_3SO_3^-$

Embora se usem surfactantes fosfolipídicos sintéticos na elaboração de lipossomas, a preferência vai para os compostos de origem natural. Os fosfolipídeos contendo colina (fosfatidilcolina), geralmente denominados lecitinas (Figura 4), são os mais abundantes na natureza (encontram-se na gema dos ovos e na soja) e constituem o maior componente das membranas naturais, sendo portanto bastante utilizados na formação de lipossomas para as mais variadas aplicações. As lecitinas são moléculas zwitteriônicas a pH fisiológico e possuem a vantagem de se poder manusear à temperatura ambiente sendo relativamente inertes quimicamente e passíveis de serem obtidas a baixo custo.

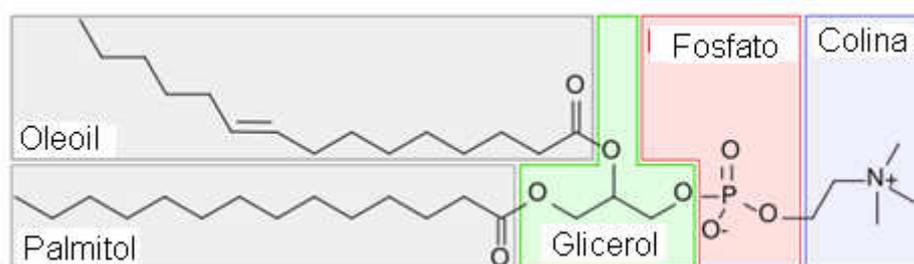


Figura 4. Estrutura química da Fosfatidilcolina mostrando os seus componentes: duas cadeias de ácidos graxos (palmitoil e oleoil), glicerol, fosfato e uma amina quaternária.

Uma das aplicações dos lipossomas sintéticos é como veículo para conter fármacos. Sua utilidade como *delivery* tem como base sua habilidade de incorporar drogas com pouca solubilidade em água. Assim, o contato direto da droga com fluídos sanguíneos e tecidos pode ser evitado (reduzindo irritação) e a droga é liberada por um período de tempo prolongado (liberação sustentada). Dentre os princípios ativos encapsulados nesses carreadores pode-se

¹⁰ Frézard, F.; Schettini, D.A.; Rocha, O.G. F.; Demicheli, C. *Quim. Nova* **2005**, 28, 511.

citar antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais, prostaglandinas brono e vasodilatadoras, agentes imunossupressores, etc¹¹.

2.2 ESTUDO FOTOFÍSICO

2.2.1. Ultravioleta-Visível

A absorção molecular na região do espectro do ultravioleta e do visível é dependente da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada, resultando na elevação dos elétrons de um orbital no estado fundamental, para um orbital de alta energia no estado excitado. Para a maioria das estruturas eletrônicas, a absorção não ocorre espontaneamente na região do ultravioleta. Na prática, a espectroscopia ultravioleta está limitada para a maior parte dos sistemas conjugados¹².

A energia total de uma molécula é a soma das energias eletrônica, vibracional e rotacional. A energia absorvida na região do ultravioleta produz mudança na energia eletrônica da molécula, resultante de uma transição dos elétrons de valência da molécula. Esta transição consiste de um orbital (normalmente de um p não-ligante ou de um orbital π -ligante) para o próximo orbital de mais alta energia (orbital antiligante π^* ou σ^*)¹⁰.

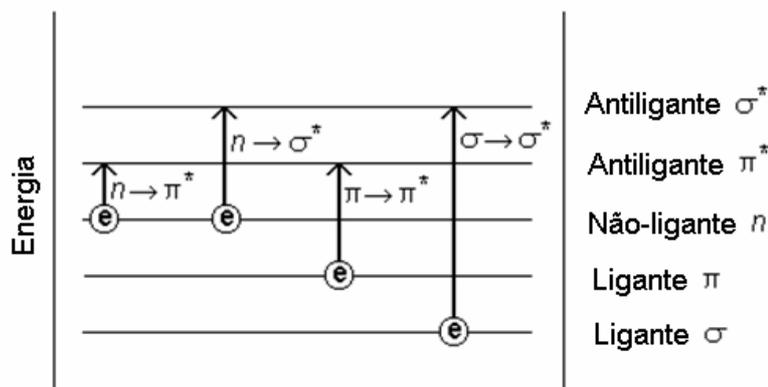


Figura 5. Transições eletrônicas na região do Uv-vis.

As principais características de uma banda de absorção no ultravioleta, são sua intensidade e posição. A posição da absorção corresponde ao comprimento de onda da radiação que é igual à energia requerida para uma transição eletrônica. Já a intensidade da absorção é dependente de dois fatores: da probabilidade de interação entre a energia de radiação e o sistema eletrônico e da diferença entre o nível fundamental e o estado excitado¹².

¹¹ Santos, L.E.R. Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2009.

¹² Silverstein, B. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 4ª edição.

Uma absorção intensa ocorre quando a transição é acompanhada por uma grande mudança no momento de transição. Absorções com valores de $\epsilon_{\text{máx}} > 10^4$ são absorções de alta intensidade; absorções de baixa intensidade correspondem a valores de $\epsilon_{\text{máx}} < 10^3$. A absorvidade (ϵ) de uma molécula pode ser calculada pela Lei de Lambert-Beer, mostrada abaixo, onde A é o valor de absorbância medido, b é o caminho ótico (em centímetros) e c é a concentração da solução utilizada em mol.L⁻¹(12).

$$\epsilon = A/bc$$

Somente espécies moleculares absorvem luz na região compreendida entre 200-800 nm. Esta absorção está relacionada com a presença de elétrons π e heteroátomos que possuem pares de elétrons não-ligantes. Grupos cromóforos e auxocromos presentes nas estruturas moleculares são os responsáveis pela absorção nesta região na estrutura molecular. A medida que ocorre a conjugação destes cromóforos, o máximo de absorção desloca-se para regiões de menor energia. As absorções molares devem ser muito grandes para cromóforos com intensas bandas de absorção e vice-versa. A magnitude de absorvidade reflete o tamanho do cromóforo e a probabilidade da transição em questão¹³.

Os grupos cromóforos são grupos carregadores de cor, geralmente compostos que apresentam insaturações, podendo apresentar ou não conjugação. Os auxocromos, são grupos que intensificam a cor em uma molécula. Geralmente são grupamentos que possuem pelo menos um par de elétrons não-ligantes. A sua presença na estrutura da molécula acarreta em um deslocamento no máximo de absorção. Caso a sua presença aumente a conjugação da molécula, ocorre um deslocamento para o vermelho (deslocamento batocrômico – maiores comprimentos de onda). Caso a sua presença diminua a conjugação da molécula, o deslocamento observado é para o azul (deslocamento hipsocrômico – menores comprimentos de onda)¹³.

2.2.2. Fluorescência

A luminescência molecular é a emissão de radiação eletromagnética (na região do ultravioleta próximo-visível) proveniente de moléculas que foram excitadas, retornando ao seu estado fundamental. Esse fenômeno é denominado de fotoluminescência, quando a absorção de fótons de luz ($h\nu_{\text{ex}}$) é o responsável pela excitação da molécula pela elevação de elétrons de valência de um orbital menos energético para um orbital de maior energia. A luminescência molecular é formalmente dividida em fluorescência e fosforescência,

dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo. Se o estado excitado envolvido é singleto, onde o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original, tem-se a fluorescência. Por outro lado, na fosforescência, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado tripleto). Em consequência da retenção da orientação original, o retorno de uma população que se encontra no estado excitado singleto para o estado fundamental (que tem caráter singleto), é permitido e ocorre muito rapidamente (tempo de vida na ordem de ns). Assim, a fluorescência é intrinsecamente um fenômeno luminescente mais comum que a fosforescência, competindo eficientemente com processos de desativação não-radiativos do estado excitado. Após a absorção de radiação de comprimento de onda característico, a população de moléculas é promovida para um estado excitado singleto. A molécula se desativa por relaxamento através dos níveis vibracionais de estados eletrônicos de mesma multiplicidade até atingir o primeiro nível vibracional do estado excitado singleto de menor energia. Os processos responsáveis pela dissipação do excesso de energia em uma molécula excitada estão mostrados na Figura 6, onde as linhas tracejadas correspondem a processos não-radiativos.

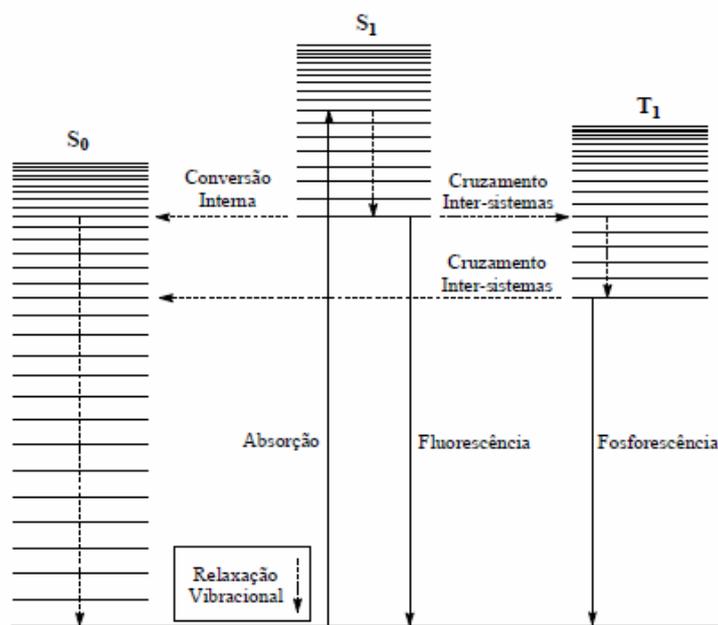


Figura 6. Diagrama de Jablonski.

O fenômeno de fluorescência foi descoberto em meados do século XIX pelo cientista britânico George G. Stokes. Sua primeira observação foi de que o mineral fluorita apresentava fluorescência quando iluminado com luz ultravioleta, e cunhou a palavra “fluorescência”.

¹³ Lakowitz, J.R., Ed. Plennun Press: New York, 1994, Vol 4.

Stokes observou que a luz fluorescente tem comprimento de onda maior que a luz de excitação, um fenômeno que se tornou conhecido como deslocamento de Stokes. O microscópio de fluorescência foi planejado no início do século XX por August Köhler, Reichert Carl e Lehman Heinrich, entre outros. No entanto, seu potencial de aplicação só foi descoberto décadas depois¹⁴.

Alexandre Jablonski (1898-1980) é conhecido como o pai da espectroscopia de fluorescência. O principal interesse deste cientista era a polarização da fotoluminescência em soluções, e para explicar evidências experimentais obtidas em campo, ele diferenciou os momentos de transição entre absorção e emissão. Seu trabalho resultou no conhecido Diagrama de Jablonski (Figura 6), uma ferramenta que pode ser usada para explicar a cinética e os espectros de fluorescência, fosforescência¹⁴.

2.3. HETEROCICLOS 2-(2'-HIDROXIFENIL)BENZAZÓLICOS COMO SONDAS FLUORESCENTES

Compostos heterocíclicos são aqueles que apresentam uma estrutura cíclica com um ou mais heteroátomos presentes em uma estrutura fechada e constituem uma grande quantidade de moléculas¹⁵. Dentro desta família de compostos orgânicos, encontram-se os heterociclos benzazólicos os quais contém um anel azólico condensado a um anel benzênico. Um anel azólico caracteriza-se por apresentar dois heteroátomos nas posições 1 e 3 de um anel de cinco membros, sendo que um deles é sempre o átomo de nitrogênio. A introdução de um grupo 2'-hidroxifenil na posição 2 do anel azólico leva a formação dos heterociclos chamados de 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis (Figura 7). A variação do heteroátomo azólico produz diferentes derivados, sendo estes os benzoxazóis (X = O), benzotiazóis (X = S) e benzimidazóis (X = NH). Os 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis caracterizam-se por apresentar propriedades fotofísicas muito interessantes, como uma intensa emissão de fluorescência com um grande deslocamento de Stokes devido a um mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado. Este fenômeno confere a estes compostos inúmeras aplicações, tais como corantes para laser, sondas fluorescentes para a marcação de biomoléculas, polímeros fluorescentes entre outros.

¹⁴ *Molecular Expression Microscopy Primer: Fluorescence – Jablonski Diagram – Interactive Java Tutorial.*

¹⁵ Campo, L., F., Dissertação de Mestrado, Porto Alegre, Instituto de Química, UFRGS, 1999.

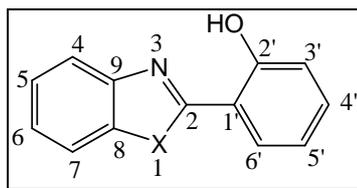


Figura 7. Heterociclos 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazóis (X = O);
2-(2'-hidroxifenil)benzotiazóis (X = S) e 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazóis (X = NH).

Quando uma molécula orgânica contém um grupo doador de um átomo de hidrogênio (na Figura 7 o grupo 2'-OH) e um grupo aceptor adjacente (na Figura 7 o grupo N-3), uma ligação de hidrogênio intramolecular é formada no estado eletrônico fundamental. A absorção de fótons ultravioleta provoca a transferência do átomo de hidrogênio do grupo ácido para o grupo básico no estado eletrônico excitado em um curto intervalo de tempo (10^{12} - 10^{-11} s⁻¹). Este fenômeno é conhecido como transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT é o acrônimo utilizado do inglês). O tautômero com o próton transferido retorna a forma inicial emitindo luz no visível.

A transferência de um próton entre dois grupos de uma mesma molécula ocasiona grandes rearranjos eletrônicos e estruturais, os quais estão associados com mudanças no momento de dipolo e na geometria molecular. A Figura 8 representa o mecanismo de ESIPT para os corantes do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis. Em solventes polares e apróticos, o tautômero enol (E_I) representa a espécie predominante no estado fundamental com uma forte ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio fenólico e o nitrogênio azólico. A excitação dessa espécie gera o enol em um estado vibracional excitado (E_I^{*}) que, para perder o excesso de energia, é sucessivamente convertido no tautômero ceto (C^{*}) através da transferência intramolecular do hidrogênio fenólico para o átomo de nitrogênio.

De um outro ponto de vista, sabe-se que a mudança na distribuição eletrônica ocasionada pela absorção de luz aumenta a acidez de fenóis ao mesmo tempo em que N-heterociclos tornam-se mais básicos. Sendo assim, a transferência do hidrogênio é facilitada pelo maior caráter ácido-base no estado excitado do que no estado fundamental e a forma ceto (E_I^{*}) é a espécie predominante no estado excitado. Desde que a barreira de energia para que ocorra a ESIPT é muito pequena, a velocidade de tautomerização é muito rápida (10^{12} s⁻¹) e por isso torna-se o principal canal de desativação para a forma enol (E_I^{*}). No tautômero ceto excitado (C^{*}), os grupos N-H e C=O também estão ligados por forte ligação de hidrogênio intramolecular que, emite fluorescência dando origem a uma forma de menor energia (C). A

partir desta forma, o próton retorna ao seu estado inicial regenerando a forma normal (E_I) sem qualquer mudança fotoquímica na molécula¹⁶.

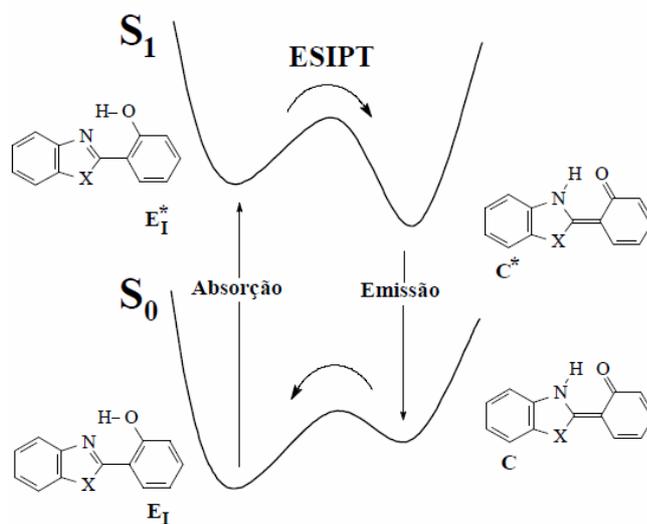


Figura 8. Mecanismo de ESIPT.

A fluorescência ESIPT desta família de moléculas tem sido utilizada como ferramenta na área de biotecnologia para a marcação de biomoléculas como proteínas, além de torná-las interessantes sondas para microambientes, sistemas biológicos e nanocavidades. Moléculas orgânicas fluorescentes têm sido sintetizadas e ligadas a sistemas biológicos para atuarem como sondas fluorescentes, apresentando uma alta sensibilidade em concentrações muito baixas de corante. A interação entre o substrato fluorescente e a biomolécula pode ser de natureza covalente ou simplesmente através de forças de dispersão de van de Waals e/ou London. Para que ocorra uma ligação covalente entre eles é necessário que a molécula de corante tenha grupos que permitam a ligação na biomolécula, como por exemplo, o isotiocianato, isocianato, cloreto de acila, entre outros, que reagirão com grupos amina, tiol, hidroxila e carboxila presentes em algumas biomoléculas.

Um método muito usado em estudos de localização em modelos membranares, membranas naturais e células, é a desativação/ativação da fluorescência de uma sonda (Figura 9). Esta metodologia baseia-se no conhecimento da localização da sonda (fluoróforos) na membrana lipídica. A fluorescência emitida por um determinado fluoróforo contém informações relacionadas não apenas com o fluoróforo, mas também acerca das células que o rodeiam. O fundamento do método em estruturas organizadas envolve um fluoróforo solubilizado no interior da estrutura ou adsorvido à sua superfície, cuja fluorescência é

¹⁶ Campo, L. F. Tese de Doutorado, Porto Alegre, Instituto de Química, UFRGS, 2003.

suprimida pelo efeito da concentração (*fenômeno de auto-absorção*). A fusão com membranas não marcadas leva a diluição do corante que volta a fluorescer^{17, 18}

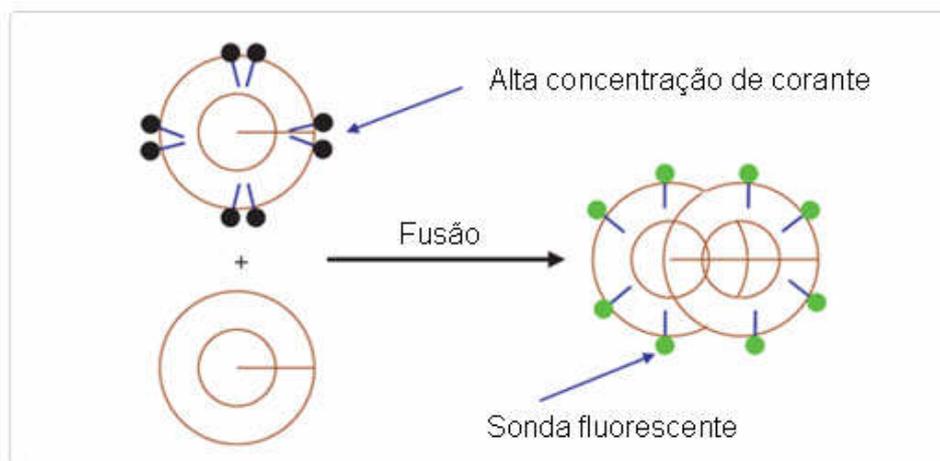


Figura 9. Representação pictórica de um ensaio de mistura de lipídeos baseada no *self-quenching* de fluorescência. A fluorescência da octadecilrodamina B incorporada (> 1:100) em um membrana de lipídeos é suprimida devido a interações corante–corante. A fusão com membranas sem o corante provoca a dispersão da sonda, resultando em um aumento de fluorescência, que nesta figura está representado por uma mudança de cor de preto para verde¹⁹.

¹⁷ Hoekstra, D.; de Boer, T.; Klappe, K.; Wilschut, J. *Biochem.* **1984**, *23*, 5675.

¹⁸ Mertins, Omar, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2008**

¹⁹ <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/Lipid-Mixing-Assays-of-Membrane-Fusion.html> consultado em 15/06/2010.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. SÍNTESE DOS DERIVADOS 2-(2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZÓIS

Para a obtenção de um derivado benzaxazol com características estruturais anfífilas e fluorescente, partiu-se da síntese do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol pela ciclicização térmica em ácido polifosfórico do *orto*-aminofenol e do ácido 5-amino-salicílico, conforme as condições mostradas na Figura 10. Após o término da reação, que foi avaliado por cromatografia em camada delgada, a solução densa e escura foi vertida em gelo picado e o sólido formado foi filtrado e neutralizado. O sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna e a sua estrutura foi confirmada por $^1\text{H-RMN}$.

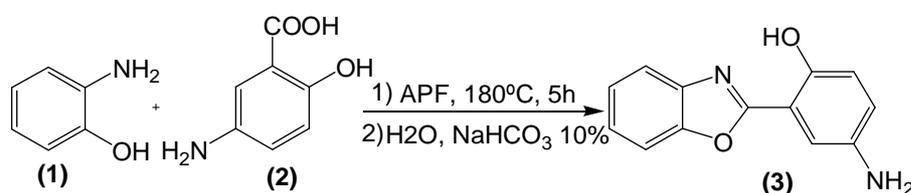


Figura 10. Esquema de síntese do amino-benzoxazol **3**.

A reação do amino-benzoxazol **3** com epiclorigrina formou o cloro-propil-benzoxazol **4** (Figura 11) que foi caracterizado por $^1\text{H-RMN}$. Esta reação foi realizada mais de uma vez e na primeira, o produto foi purificado em coluna cromatográfica utilizando-se uma mistura de clorofórmio e acetona como eluentes (1:1). Comparando-se os resultados de $^1\text{H-RMN}$ para o produto purificado e para os demais, ainda brutos, não observou-se nenhuma mudança significativa. Desta forma, **4** foi utilizado não purificado para a preparação de **5**.

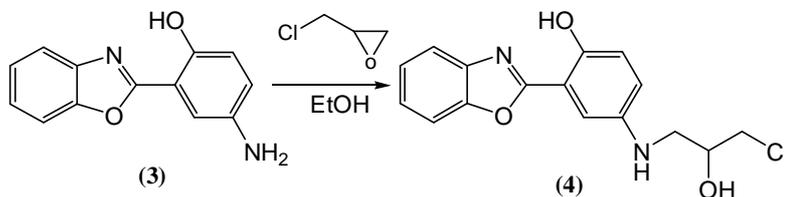


Figura 11. Esquema de síntese do precursor cloro-propil-benzoxazol **4**.

A molécula alvo C18-benzoxazol- $\text{N}^+(\text{Me})_2\text{Cl}^-$ **5** foi obtida a partir da reação de **4** com a N,N-dimetiloctadecilamina (OTA). O benzoxazol **4** foi dissolvido em etanol e o pH da solução foi corrigido até um pH 7. A OTA foi adicionada gota-gota e a mistura ficou sob agitação vigorosa por meia hora. Após este tempo, foi mantida em refluxo por cinco dias e

após a evaporação do solvente, foi recristalizada em acetona. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada. Esta metodologia de síntese foi seguida conforme a literatura^{20,21}.

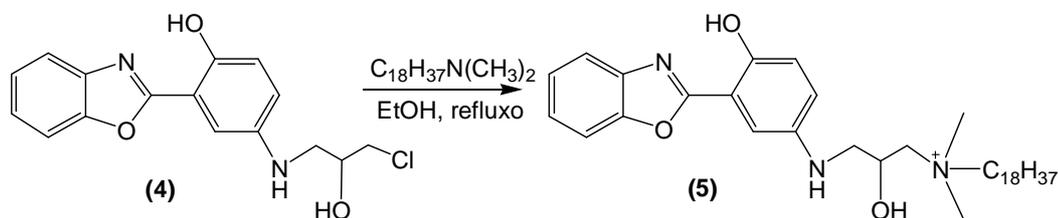


Figura 12. Esquema de síntese da molécula alvo C18-benzoxazol- $\text{N}^+(\text{Me})_2\text{Cl}^-$ **5**.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS BENZOXAZÓIS **3-5** POR ^1H -RMN

Para todas as moléculas sintetizadas neste trabalho, a caracterização espectroscópica por ^1H -RMN foi de vital importância para a elucidação e confirmação da estrutura das mesmas. Para todos os casos, o espectro de ^1H -RMN mostra o hidrogênio da hidroxila fenólica como um singlete bastante estreito e em deslocamento acima de 10 ppm. Um hidroxila fenólica normalmente aparece na região de 4-7 ppm, dependendo do solvente, da temperatura e da concentração. Quando uma ligação intramolecular é formada, este hidrogênio é desblindado e move-se pra frequências mais altas. Os deslocamentos químicos para os sistemas aromáticos são semelhantes para todos os compostos.

Nas Figuras 13-15, temos o espectro de ^1H -RMN do composto **4**. Entre 4,2 e 3,8 ppm vê-se o sistema alifático, onde de 4,2-4,1 está presente um multiplete, correspondente a 1 hidrogênio, referente ao $-\text{CH}$ ligado à hidroxila. Em 3,42 e em 3,27 ppm aparecem dois dubletes de dubletes cada um correspondente á 1 hidrogênio (H_1 e H_3) e em 3,72 ppm um multiplete correspondente à 2 hidrogênios (H_2 e H_4). Também é possível identificar o sinal de $-\text{NH}-\text{H}$ em 2,5 ppm.

²⁰ Moss, R. A., Kotchevar, A. T.; Park, B. D.; Scrimin, P. *Langmuir* **1996**, *12*, 2200..

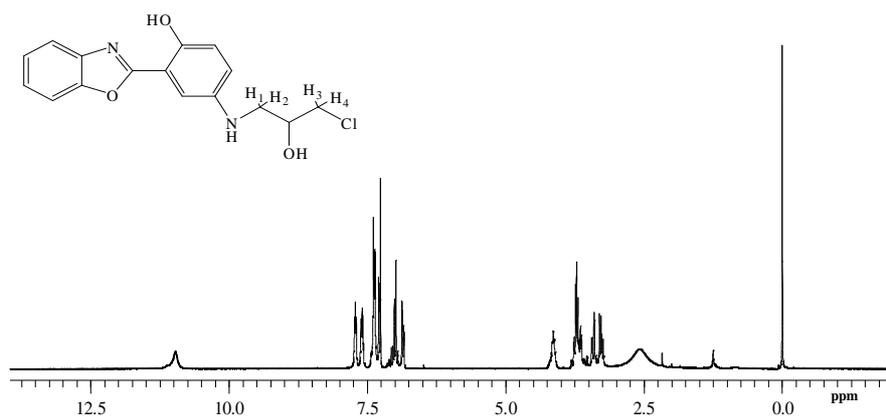


Figura 13. ^1H -RMN do compostos **4** em clorofórmio deuterado.

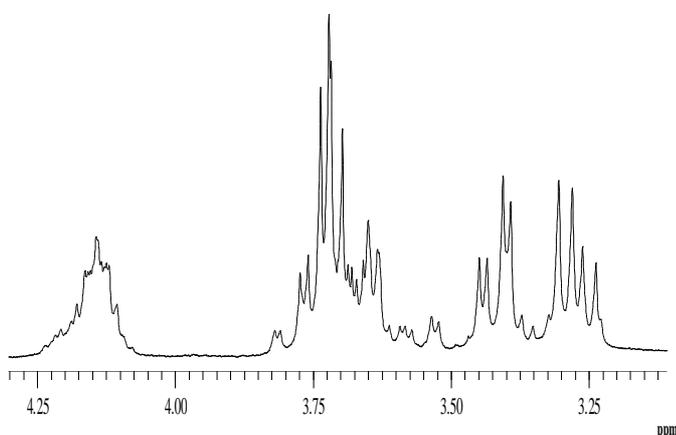


Figura 14. Expansão do sistema alifático de **4**.

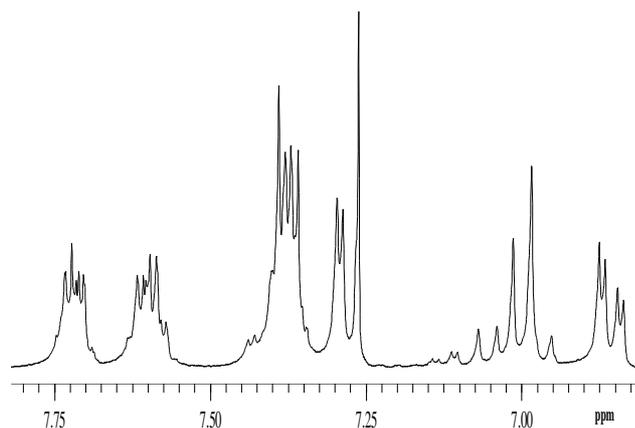


Figura 15. Expansão do sistema aromático de **4**.

As Figuras 16-18 mostram o espectro de ^1H -RMN do produto **5** bem como das regiões alifáticas e aromáticas expandidas. Na região compreendida entre 7,6-6,8 ppm localizam-se os hidrogênios aromáticos com uma área de integração correspondente a sete hidrogênios. Na região dos alifáticos entre 4,7-3,3 ppm observam-se os hidrogênios $\text{H}_1\text{-H}_4$ correspondentes ao

²¹ Kotchevar, A. T.; Moss, R. A.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Zhang, H. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 4927.

benzoxazol **4**. A parte da molécula **5** que é caracterizada pela cadeia do sal de amônio quaternário lipofílico entre 3,4-0,8 ppm. Nesta região podemos observar os sinais característicos das duas metilas ligadas ao átomo de nitrogênio quaternário em torno de 3,2 ppm. Da cadeia de C18, o $-\text{CH}_2$ ligado ao nitrogênio aparece desblindado junto com as metilas, dois $-\text{CH}_2$ aparecem entre 2,4-1,48 ppm na forma de multipletes. Entre 1,3-0,9 ppm aparecem 28 hidrogênios da cadeia alquílica. Em 0,8 ppm aparece como um triplete a metila terminal.

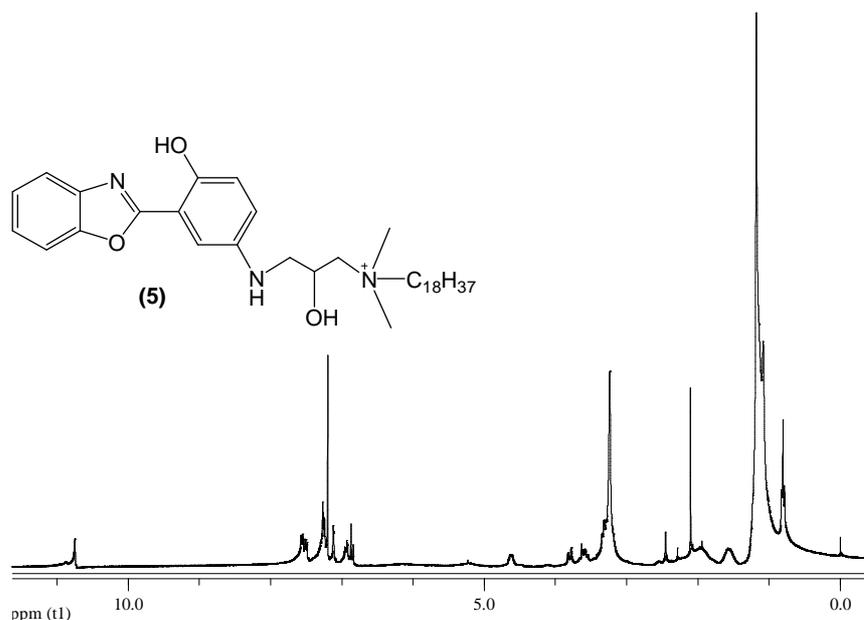


Figura 14. ^1H -RMN do composto **5** em clorofórmio deuterado.

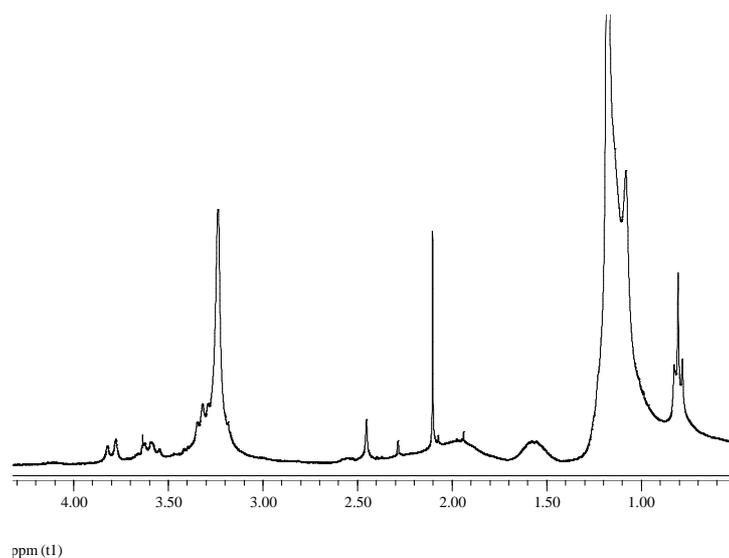


Figura 17. Expansão do sistema alifático do composto **5**.

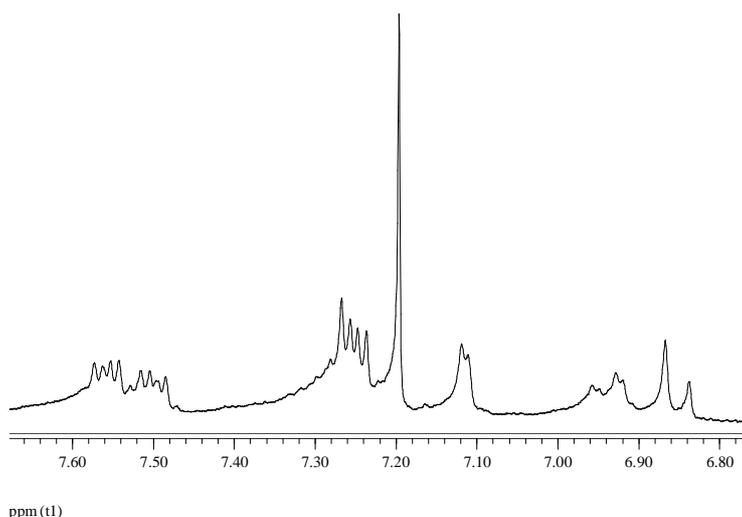


Figura 18. Expansão do sistema aromático para o composto **5**.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS BENZOAZÓIS **3-5** POR INFRAVERMELHO

Todos os compostos sintetizados neste trabalho foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho (IV). Na Figura 20 é possível ver claramente o desaparecimento do sinal do estiramento assimétrico N-H₂ (3407 cm⁻¹) do composto **3** em detrimento do aparecimento do sinal de estiramento N-H (3322 cm⁻¹) indicando a formação de uma amina secundária como esperado para o composto **4**.

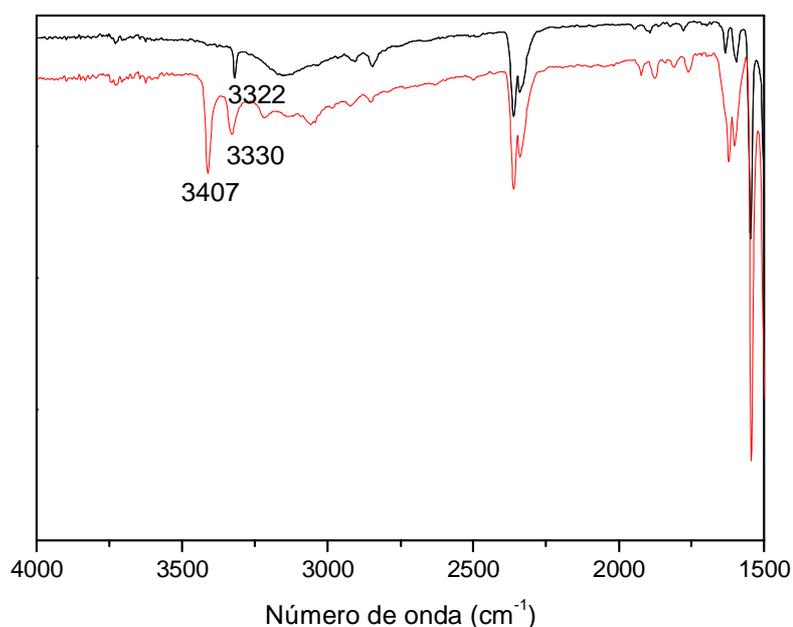


Figura 15. Comparação das bandas do espectro de infravermelho dos compostos **3** e **4**.

O IV do C18-Benzazol-N⁺(CH₃)₂ (**5**) apresentou estiramento C-H alifático bem intenso em 2916 cm⁻¹ e 2849 cm⁻¹ indicando a presença de uma cadeia alifática longa no composto desejado. Comprando o IV do composto **5**, com os espectros encontrados na literatura²² para um sistema similar ao pretendido, com e sem nitrogênio quaternário, é possível ver claramente a semelhança entre o composto **5** obtido e o da referência com o nitrogênio quaternário. É possível ver também uma banda alargada acima de 3000 cm⁻¹ referente a hidroxila da molécula. Em 1636 cm⁻¹ encontra-se o estiramento C=C do sistema aromático. Não foi possível visualizar o estiramento –C=C-H, pois este sai em uma mesma região que o sinal do estiramento –O-H e, provavelmente, foi encoberto pelo mesmo.

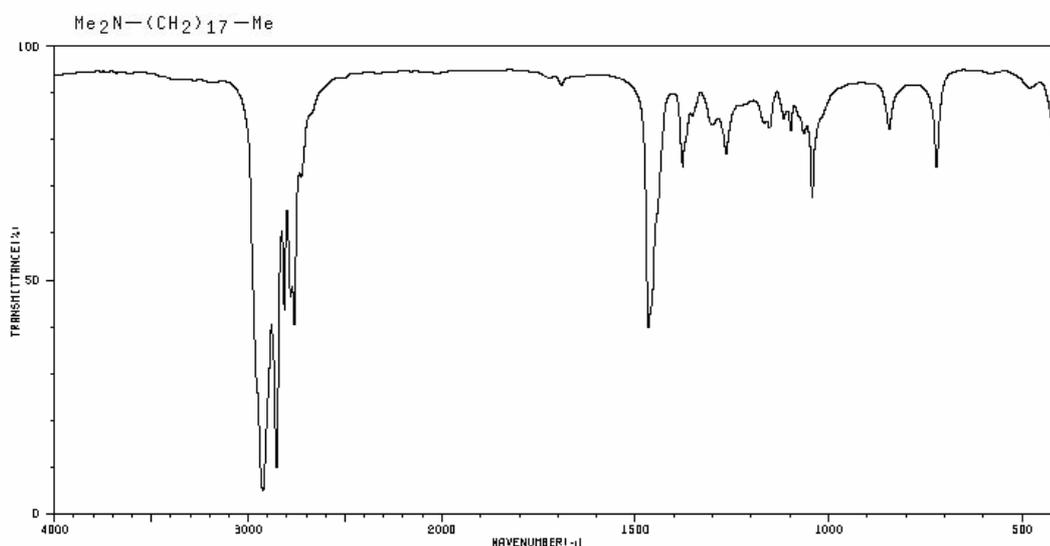


Figura 16. Espectro de IV do composto referência não quaternizado²³.

²³Integrated Spectra Database System of Organic Compounds. (Data were obtained from the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology(Japan)).

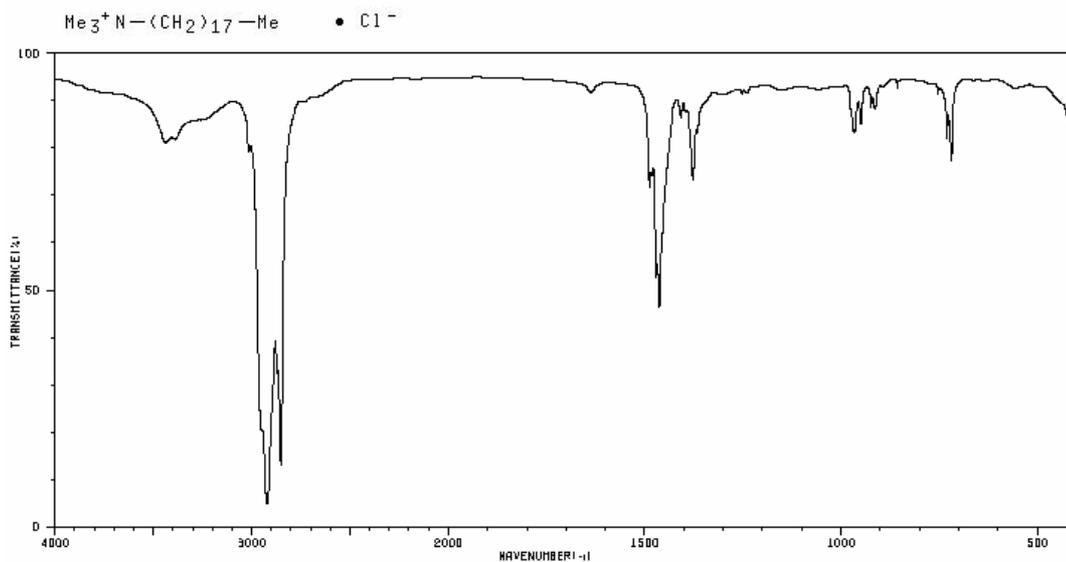


Figura 17. Espectro de IV do composto referência quaternizado²³.

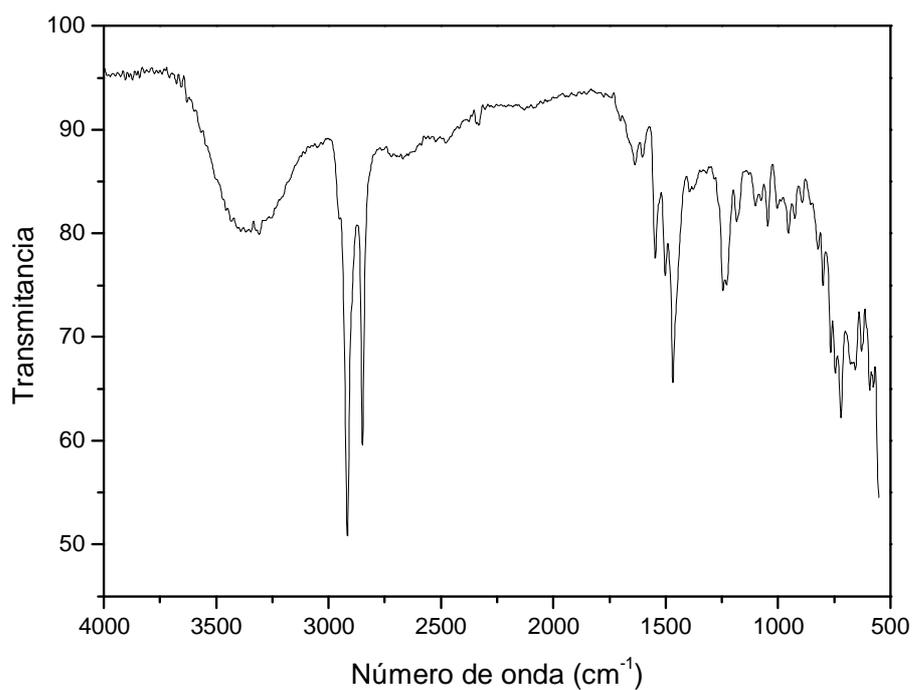


Figura 18. Espectro de IV do composto 5.

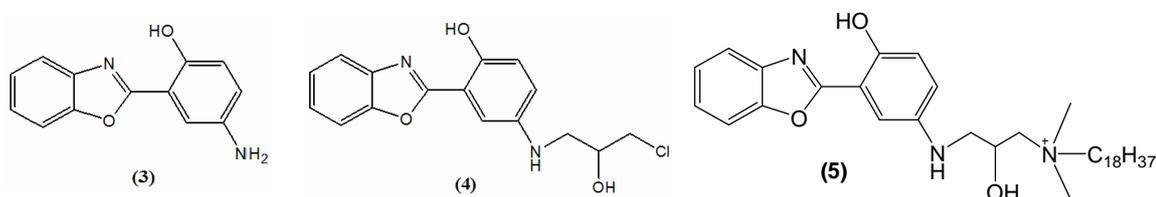
3.4. CARACTERIZAÇÃO DOS BENZOAZÓIS 3-5 POR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Com os três compostos sintetizados (**3**, **4** e **5**) foram preparadas soluções de concentrações na ordem de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol.L⁻¹ e suas absorções na região do UV-vis foram medidas bem como suas fluorescências. Estas foram medidas utilizando-se os

comprimentos de onda referentes aos máximos de absorção. Os valores numéricos obtidos encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 1. Máximos de absorção no UV-Vis para as moléculas **3**, **4** e **5** e absorvidades molares médias.

<i>Molécula</i>	λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
3	368	1,132x10 ⁴
4	377	9,374x10 ³
5	378	4,173x10 ³



A modificação feita no composto **3**, notadamente no NH₂, para a obtenção dos compostos **4** e **5**, provocou um deslocamento batocrômico no espectro de absorção.

A diminuição dos valores de ϵ , significam uma transferência eletrônica π - π^* mais difícil de ocorrer. Quanto maiores os valores de ϵ , mais facilmente uma transição eletrônica acontece, pois mais próximos estão os orbitais envolvidos. O grupo NH₂, por ser um forte doador, diminui o gap de energia entre os orbitais π - π^* , por isso apresenta um maior valor de ϵ . O espectro de absorção para os compostos pode ser visto na Figura 23 onde os máximos foram normalizados.

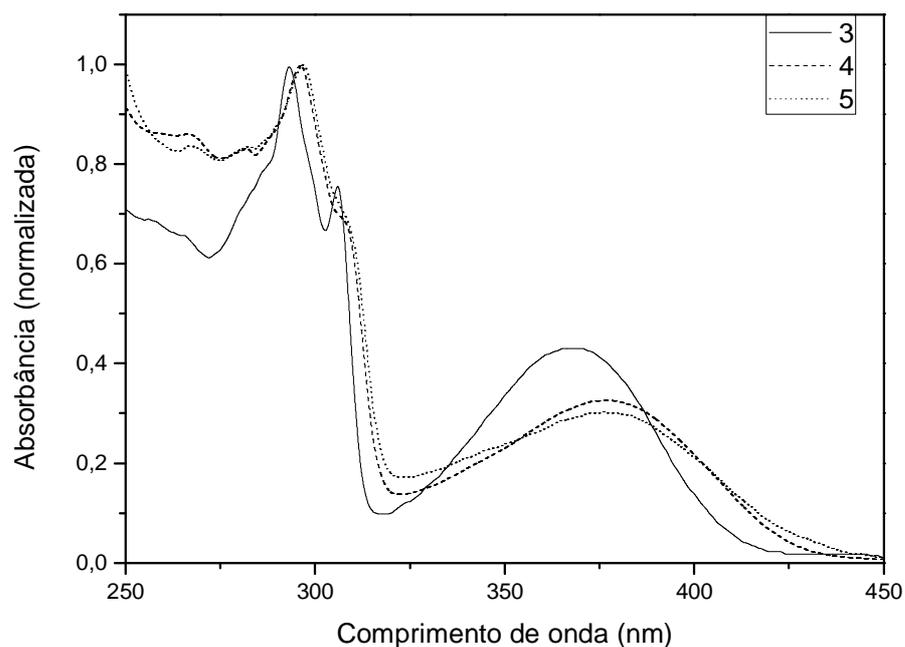


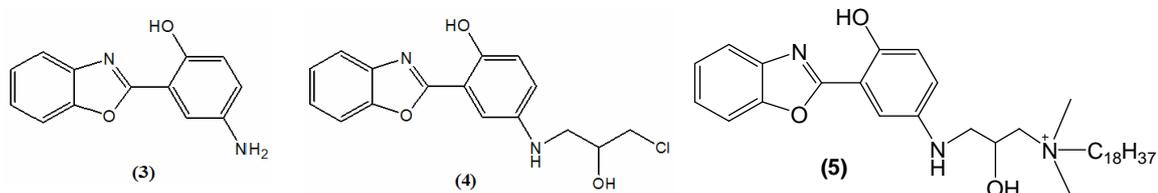
Figura 19. Espectro de absorção para os compostos **3-5**.

3.5. CARACTERIZAÇÃO DOS BENZOAZÓIS **3-5** POR FLUORESCÊNCIA

Os compostos sintetizados apresentam duas bandas de emissão, sendo que os maiores comprimentos de onda estão relacionados ao tautômero ceto. Os menores comprimentos de onda são relativos às espécies na forma enol cuja relaxação está em competição com o mecanismo ESIPT. Estes resultados podem ser vistos na Tabela 2 abaixo e também na Figura 24.

Tabela 2. Máximos de excitação de fluorescência para as moléculas **3**, **4** e **5**.

<i>Molécula</i>	$\lambda 1(\text{nm})$	$\Delta \text{ Stokes}$	$\lambda 2(\text{nm})$	$\Delta \text{ Stokes}$
3	444	76	560	192
4	460	83	565	188
5	468	90	565	187



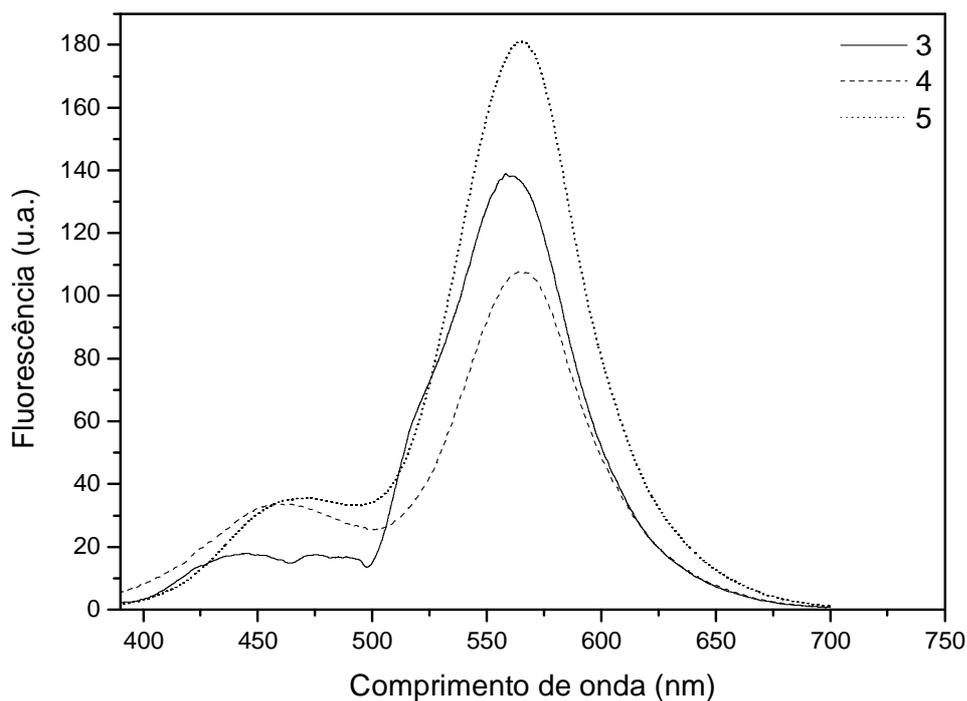


Figura 20. Espectro de emissão para os compostos 3-5.

Para estudar o comportamento fotofísico do C18-Benzoxazol 5 em uma solução de lipossoma feito com fosfatidilcolina (gentilmente cedido pelo laboratório da Professora Nádyá Pesce da Silveira desta Universidade)¹⁸, preparou-se uma solução do corante em etanol com concentração de $2,7 \times 10^{-4}$ mol/L. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 1 mL que foi misturada com 1 mL da solução aquosa de lipossoma com uma concentração de $7,6 \times 10^{-3}$ mol/L. A mistura ficou sob agitação magnética em temperatura ambiente por 1 hora e, transcorrido este tempo, fez-se as medidas de fluorescência. Os resultados estão apresentados na Figura 25. Em clorofórmio observamos que o corante apresenta duas bandas de emissão (ESIPT e enol) e em etanol apenas uma banda de emissão foi observada (enol) conforme o comportamento esperado para estas moléculas. Na solução de lipossoma a emissão enol é predominante, embora a emissão ESIPT também tenha sido observada. Uma análise prévia deste resultado, indica que a maioria das moléculas do corante 5 estão com a parte do fluoróforo em contato com a parte aquosa do lipossoma, e a parte alquílica C18 deve estar no mesmo ambiente apolar que as cadeias alquílicas do lipossoma.

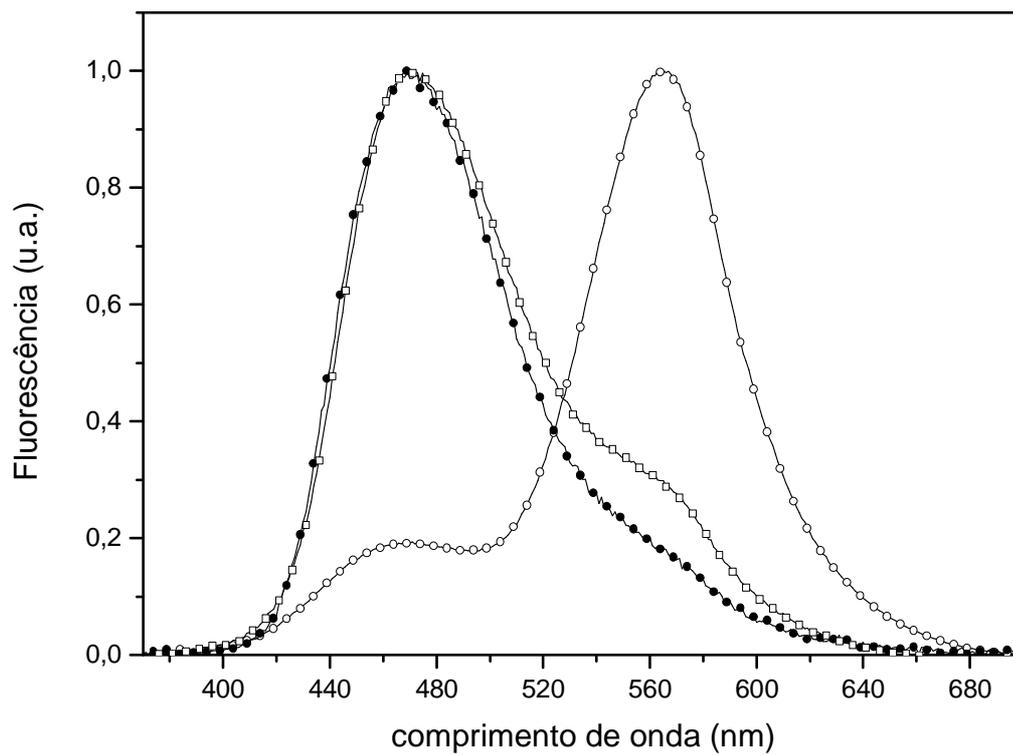


Figura 21. Espectros de fluorescência do C18-Benzoxazol 5 em CH₂Cl₂ (—○—), em EtOH (—●—) e na solução de lipossoma (—□—).

4. CONCLUSÃO

A nova sonda C18-Benzoxazol-N⁺(Me)₂Cl⁻ foi sintetizada com 25% de rendimento e a sua estrutura foi confirmada por ¹H-RMN e por IV. Outras técnicas de determinação estrutural encontram-se em andamento.

A incorporação do sal de amônio lipofílico C18 ao corante 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol provocou um deslocamento batocrômico no espectro de UV-vis e uma diminuição do coeficiente de absorvidade molar devido à supressão do grupo doador NH₂. O sal quaternário mostrou-se fluorescente na região do visível. Os compostos sintetizados apresentam duas bandas de emissão, sendo que os maiores comprimentos de onda estão relacionados ao tautômero ceto e os menores, relativos às espécies na forma enol cuja relaxação está em competição com o mecanismo ESIPT.

Quando incorporada a uma solução de lipossoma de fosfatidilcolina, o novo corante C18 apresentou um aumento na intensidade de fluorescência o que o torna um promissor marcador molecular fluorescente para bicamadas lipídicas.

5. EXPERIMENTAL

5.1 EQUIPAMENTOS

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Novos Materiais Orgânicos (LMNO), nesta universidade e sob a orientação da Prof. Dra. Leandra Franciscato Campo. As análises realizadas foram feitas no Instituto de Química e os equipamentos utilizados foram:

a) RMN ^1H e ^{13}C : As análises de RMN foram realizadas em aparelhos Varian Inova e Varian VNMRs. Os espectros de hidrogênio foram obtidos a 300 MHz e os de carbono 50 MHz e/ou 75,4 MHz em tubos de 5 mm de diâmetro.

b) IV: As análises de absorção no infravermelho foram realizadas em um espectrômetro Mattson Galaxy Série FT-IR3000 modelo 3020 e Varian 640-IR FT-IR pela técnica usando pastilha de KBr e ATR.

c) Absorção UV-VIS: Espectrofotômetro Shimadzu UV 2450.

d) Emissão de fluorescência: Espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC.

e) Evaporação de Solventes: Extração de Solventes: Rotoevaporador Büchi R-114.

5.2. REAGENTES UTILIZADOS

Na realização deste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: pentóxido de fósforo P.A. (Vetec), ácido 5-amino-salicílico (Aldrich), *orto*-aminofenol, ácido polifosfórico P.A. (Riedel-de-Haën), epícloridrina (Alclor) e *n*-octadecildimetilamina (Acros), etanol (Merck), acetona (Vetec), clorofórmio Vetec. Todos os solventes foram utilizados sem purificação prévia. Silicagel 60 (Merck) foi utilizada para cromatografia em coluna. Faz-se necessário ressaltar o cuidado que se deve ter ao trabalhar com a epícloridrina, reagente este que produz vapor inflamável e que é venenoso.

5.3 SÍNTESE DOS CORANTES

5.3.1 Preparação do ácido polifosfórico (APF)

O ácido polifosfórico utilizado foi o adquirido comercialmente ou o preparado pela dissolução de 38g P_2O_5 em 21 mL H_3PO_4 pré-aquecido a 90°C e sob agitação magnética. Após a solubilização do P_2O_5 , a mistura é utilizada imediatamente ou então, é resfriada a temperatura ambiente e guardada em frasco fechado e vedado (muito higroscópica).

5.3.2 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (3)

Uma mistura composta por 13 mmol de ácido 5-amino-salicílico (2) e da correspondente anilina *orto*-substituída (1) em 10 mL de ácido polifosfórico, foi aquecida à temperatura de 200 °C por 4 horas sob agitação. Depois de resfriada, a mistura foi vertida em água gelada. O precipitado obtido foi neutralizado com solução de carbonato de cálcio 10%, filtrado, lavado com água e seco. O produto obtido foi purificado em coluna de silicagel com diclorometano como eluente. O resultado da purificação foi um sólido amarelo com rendimento de 68%.

Ponto de fusão: 174-175 °C.

IV (KBr, cm^{-1}): 3407 (ν_{asNH_2}); 3330 (ν_{sNH_2}); 1630 e 1545 ($\nu_{\text{arom C=C}}$).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ em ppm): 10,94 (s, 1H, OH); 7,83-6,74 (m, 7H, H_4 , H_5 , H_6 , H_7 , H_3' , H_4' , H_6').

5.3.3 2-(5'-N-3-cloro-2'-hidroxipropil-2'-hidroxifenil)benzoxazol (4)

1,29 mmol do produto 3 foi solubilizado em etanol e adicionado (funil de adição) sobre 5,16 mmol de epícloridrina à 45°C. A mistura ficou sob agitação e refluxo por 24 horas, ocorrendo a formação de um precipitado. O solvente foi evaporado. O rendimento para esta reação foi de 88,27%.

Ponto de fusão: 117-120°C.

IV (KBr, cm^{-1}): 3322 (ν NH); 2904; 1622 e 1587 ($\nu_{\text{arom C=C}}$).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ em ppm): 7,6-6,9 ppm (m, 7H, aromáticos); 4,208-4,094 (m, 1H, -CHOH-); 3,42 (dd, $J = 12.86, 4.18$ Hz, 1H); 3,27 (dd, $J = 12.90, 7.31$ Hz, 1H); 3,27 (dd, $J = 12.90, 7.31$ Hz, 1H), 3,72 (dd, $J = 6.46, 5.35$ Hz, 1H).

5.3.4 C18-Benzazol-N+(Me)2 (5)

O composto 5 foi obtido pela solubilização de 0,314 mmol de -(5'-N-3-cloro-2'-hidroxipropil-2'-hidroxifenil)benzoxazol (4) em etanol suficiente e posterior adição sobre 0,689 mmol de OTA. A mistura foi mantida sob agitação e refluxo por 6 dias. Após este tempo, o excesso de solvente foi evaporado. Acetona gelada foi adicionada e o sistema ficou em geladeira durante a noite, ocorrendo a formação de um precipitado que, foi filtrado. A sequência de adição de acetona gelada e precipitação foi repetida até que não houvesse mais a formação de precipitado. O rendimento foi de 25%.

Ponto de fusão: Decompõem acima de 200 °C.

IV (KBr, cm^{-1}): 2916 e 2849 (ν -C-H alifático); 2904; 1636 (C=C arom) >3000 (-OH).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300MHz, δ em ppm): 7,6-6,9 ppm (m, 7H, aromáticos); 4,7-4,5 (m, 1H, -CHOH-); 3,9-3,3 (m, 4H); 3,2-3,1 (s alargado, 8H); 2,2-1,48 (m, 4H); 1,3-0,9 (m, 28H); 0,8 (t, 3H).

5.3.5 Solução de Lipossomas

O preparo da solução de lipossomas utilizada, foi feito conforme literatura¹⁸. 60 mg de lecitina foram dissolvidos em 10 mL de acetato de etila e uma porção aquosa foi adicionada ocorrendo a formação de duas fases. A mistura foi submetida a sonicação, ocorrendo a formação das micelas. O solvente orgânico foi evaporado concentrando as micelas. Na etapa final, sob agitação, os lipossomas são formados e o sistema tornou-se um líquido leitoso.