

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

FELIPE LANGE COELHO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E FOTOFÍSICA DE
BENZOXAZÓIS LIPOFÍLICOS FLUORESCENTES E APLICAÇÃO EM
MEMBRANAS MODELO**

PORTO ALEGRE, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

FELIPE LANGE COELHO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E FOTOFÍSICA DE
BENZOXAZÓIS LIPOFÍLICOS FLUORESCENTES E APLICAÇÃO EM
MEMBRANAS MODELO**

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.

Prof^a. Dr. Leandra Franciscato Campo
Orientadora

PORTO ALEGRE, 2012

AGRADECIMENTOS

À UFRGS, pelos excelentes professores, pela infraestrutura e ensino de qualidade e por me proporcionar todo o conhecimento científico que possuo.

Aos meus pais, pelo apoio emocional, motivação e por serem meus eternos modelos de vida.

Às Fernandas, pelos momentos de alegria, carinho e também por ouvirem meus longos discursos científicos.

Aos amigos, pelas risadas e pelos momentos de descontração.

À Leandra Franciscato Campo, pela orientação dedicada e excepcional, por todos os ensinamentos, conselhos e pela ajuda em todos os momentos.

Aos demais orientadores do laboratório, pela atenção e apoio, em especial ao Fabiano Rodembusch pelo acolhimento e orientação em vários momentos.

Aos colegas de laboratório e de graduação, pelo excelente convívio, pelas discussões científicas ou não, pelo companheirismo, essencial ao desenvolvimento de qualquer aluno. Ao Fabiano Santos pela paciência, orientação e por todo o apoio. Ao Diego pelas análises feitas e também pelos conselhos muito úteis.

RESUMO

Os compostos benzazólicos representam uma importante classe de fluoróforos que apresentam uma intensa emissão de fluorescência na região do UV-Vis. Mais especificamente, derivados do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol fazem uma troca protônica entre o oxigênio e o nitrogênio azólico e por isso, fluorescem através de um mecanismo conhecido como ESIPT (*Excited State Intramolecular Proton-Transfer*).

Este trabalho visa a síntese e o estudo do comportamento ESIPT de novas sondas em lipossomas lipídicos, para isso, foram sintetizados compostos lipofílicos fluorescentes a partir do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol. Através da reação deste benzoxazol com o iodo-octano, o ácido esteárico e o ácido oléico obteve-se, respectivamente, um *N*-alquilbenzoxazol com C8:0 e duas amidas graxas com C18:0 e C18:1. Os rendimentos das reações foram de 35% para o composto **5**, 50% para os compostos **7-8**, e 80% para o composto **3**. As estruturas dos compostos foram confirmadas por RMN de ^1H e ^{13}C , FTIR e CHN. Com relação às características fotofísicas, as duas amidas graxas apresentaram fluorescência da região do verde e a amina secundária na região do laranja.

Com as duas amidas graxas (C18:0 e C18:1) e a amina (C8:0) foram feitas soluções aquosas de lipossomas com a L- α -fosfatidilcolina (PC), o 1,2-dipalmitoil-glicero-3-fosfolina (DPPC) e o *cis*-1,2-dioleoil-glicero-3-fosfolina (DOPC). Através da caracterização das soluções lipídicas pelas espectroscopias de absorção e de emissão, concluiu-se que a sonda C8:0 não é suficientemente lipofílica para se inserir no ambiente apolar dos lipossomas, ao passo que as sondas C18:1 e C18:0 foram completamente inseridas nesta porção da estrutura supramolecular de que são feitos os lipossomas.

Palavras-chave: ESIPT, Benzoxazol, sondas lipofílicas, fluorescência.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol.	3
Figura 2: Diagrama de Jablonsky (LACOWICZ, 2006).	4
Figura 3: Mecanismo de ESIPT de 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol.	5
Figura 4: Interação de fosfolipídeos (LEHNINGER, 2006).	6
Figura 5: Tipos de estruturas lipídicas	6
Figura 6: Mecanismo de síntese do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol.	10
Figura 7: Corantes e lipídeos utilizados para a obtenção de membranas sintéticas.	11
Figura 8: Mecanismo proposto para a síntese do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (5).	12
Figura 9: Espectro de Infravermelho do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (5).	13
Figura 10: Espectro de ¹ H-RMN (300MHz, CDCl ₃) do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7).	14
Figura 11: Mecanismo proposto para a síntese do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7) e adaptado de (SHEIKH, 2010).	16
Figura 12: Espectro de Infravermelho do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7). ...	19
Figura 13: Espectro de ¹ H-RMN (300MHz, CF ₃ CO ₂ D) do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7).	20
Figura 14: Mecanismo proposto para a síntese do cloreto do ácido esteárico e do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol.	22
Figura 15: Espectro de Infravermelho do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (8).	24
Figura 16: Espectro de ¹ H-RMN (300MHz, CDCl ₃) do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (8).	25
Figura 17: Fosfolipídeos utilizados para a preparação das soluções de lipossomas: (a) L-fosfatidilcolina (PC), (b) cis-1,2-dioleoil-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC) e (c) 1,2-dipalmitoil-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC)	26
Figura 18: Espectros de absorção no Uv-Vis do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (5) em solventes orgânicos (etanol e clorofórmio) e em lipossomas de PC, DPPC e DOPC.	27
Figura 19: Espectro de emissão de fluorescência do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (5) em solventes orgânicos (etanol e clorofórmio) e em lipossomas de PC, DPPC e DOPC.	28
Figura 20: Espectro de absorção no Uv-Vis do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7) em solventes orgânicos (etanol e clorofórmio) e em lipossomas de PC, DPPC e DOPC.	29
Figura 21: Espectro de Emissão de Fluorescência do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7) em solventes orgânicos (etanol e clorofórmio) e em lipossomas de PC, DPPC e DOPC.	30
Figura 22: Espectro de Absorção no UV-Vis do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (8) em solventes orgânicos (etanol e clorofórmio) e em lipossomas de PC, DPPC e DOPC.	31
Figura 23: Espectro de Emissão de Fluorescência do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (8) em solventes orgânicos (etanol e clorofórmio) e em lipossomas de PC, DPPC e DOPC.	32

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Síntese do precursor 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol.....	9
Esquema 2: Síntese do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol.....	11
Esquema 3: Síntese do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7) via DCC/DMAP.....	15
Esquema 4: Síntese do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7) via APF.....	17
Esquema 5: Síntese do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7) via EDCl.....	18
Esquema 6: Síntese do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7) via cloreto do ácido graxo 6.....	21
Esquema 7: Síntese do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (8) via DCC/DMAP.....	23

ABREVIATURAS

^1H -RMN Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

^{13}C -RMN Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

ATF-d Ácido Trifluoracético Deuterado

APF Ácido Polifosfórico

CDCl_3 Clorofórmio Deuterado

$\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ Ácido Trifluoracético Deuterado

CHN Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio

cm Centímetro

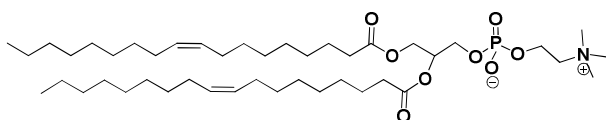
d Dubleto

DCC N,N-Dicicloexilcarbodiimida

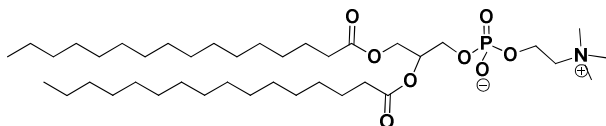
DCU N,N-diclohexil ureia

DMAP Dimetilaminopiridina

DOPC



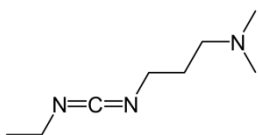
DPPC



E Forma Enol no Estado Fundamental

E* Forma Enol no Estado Excitado

EDCI *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida hidrocloreto



ESIPT Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado

FTIR Infravermelho com Transformada de Fourier

IC Conversão Interna

ISC Cruzamento Inter-sistemas

K Forma Ceto no Estado Fundamental

K* Forma Ceto no Estado Excitado

KBr Brometo de Potássio

m Multiplete

MHz Hertz ($\times 10^6$)

ppm Parte por Milhão

S₀ Estado Fundamental Singlete

S₁ Primeiro Estado Excitado Singlete

S₂ Segundo Estado Excitado Singlete

T₁ Primeiro Estado Excitado Tripleto

Uv-Vis Ultravioleta-Visível

λ_{em} Comprimento de Onda de Emissão

λ_{abs} Comprimento de Onda de Absorção

ν_s Estiramento Simétrico

ν_{ass} Estiramento Anti-simétrico

SUMÁRIO

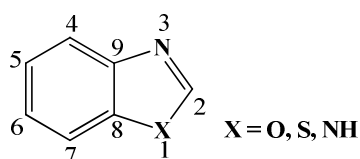
1. INTRODUÇÃO	1
1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
1.1 2-(5'-AMINO-2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL.....	3
1.2 FLUORESCÊNCIA	3
1.3 TRANSFERÊNCIA PROTÔNICA INTRAMOLECULAR NO ESTADO EXCITADO (ESIPT)	4
1.4 LIPÍDEOS E ESTRUTURAS LIPÍDICAS.....	5
2. OBJETIVO.....	8
2.1. OBJETIVO GERAL	8
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
3.1. SÍNTESE DO 2-(5'-AMINO-2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL (3)	9
3.2 SÍNTESE DOS BENZOXAZÓIS LIPOFÍLICOS	10
3.2.1 Síntese do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (5).....	11
3.2.2 Síntese do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7).....	14
3.2.2.1 DCC como reagente de acoplamento	14
3.2.2.3 EDCI como reagente de acoplamento	17
3.2.2.4 A partir do cloreto de ácido.....	20
3.2.3 Síntese do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (8)	22
3.3 OBTENÇÃO DOS LIPOSSOMAS LIPÍDICOS.....	25
3.4 ESTUDO FOTOFÍSICO	26
3.4.1 Fotofísica do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (5).....	26
3.4.3 Fotofísica do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (8).....	30
4. CONCLUSÕES.....	33
5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	34
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.2 SÍNTESE DO 2-(5'-AMINO-2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL (3)	34
5.3 SÍNTESE DO 2-(5'-OCTILAMINO-2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL (5).....	35
5.4 SÍNTESE DO 2-(5'-ESTEARAMIDA-2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL (7)	36
5.4.1 DCC como reagente de acoplamento	36
5.4.2 APF como reagente	36

5.4.3 EDCI como reagente de acoplamento	37
5.4.4 Utilizando Cloreto de Tionila.....	37
5.5 SÍNTESE DO 2-(5'-OLEAMIDA-2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL (8).....	37
5.6 OBTENÇÃO DOS LIPOSSOMAS LIPÍDICOS	38
6. REFERÊNCIAS	40
7. APÊNDICE	42

1. INTRODUÇÃO

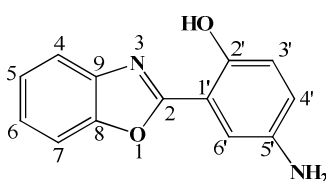
Os compostos benzazólicos (Figura A) representam uma importante classe de fluoróforos que apresentam uma intensa emissão de fluorescência na região do UV-Vis. De acordo com o átomo substituinte na posição 1, que pode ser O, S ou N, classificam em benzoxazóis, benzotiazóis e benzimidazóis, respectivamente.

Figura A: Família dos Benzazóis.



Sua estrutura, como ilustrado na Figura A, compreende um anel fenólico condensado a um anel azólico. Essa classe de compostos possui na posição 2, uma posição suscetível a substituição. Quando substituído por um anel fenólico contendo um grupamento amino, esse, da origem aos derivados 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (Figura 2). Esse derivados realizam uma troca protônica entre o oxigênio e o nitrogênio azólico e por isso, fluorescem através de um mecanismo conhecido como ESIPT (*Excited State Intramolecular Proton-Transfer*).

Figura B: Descrição estrutural do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol.



Além de realizarem ESIPT, o grupamento amino presente na molécula, confere reatividade à ela e possibilita a obtenção de novas estruturas por meio de reações através da amina. Assim, são facilmente obtidos compostos lipofílicos a partir de substituição nucleofílica ou adição à carbonila, por exemplo.

A síntese de compostos fluorescentes que apresentem lipofilicidade permite, além do estudo acerca da fotofísica desses novos compostos, a compreensão de como os benzoxazóis se comportam quando inseridos em membranas sintéticas construídas a partir de lipídeos. Paralelamente, se variarmos o tamanho da cadeia alquílica, que confere maior ou menor lipofilicidade à estrutura e também adicionarmos cadeias com

insaturações, podemos analisar a influencia desses dois fatores na interação membrana-sonda.

O principal motivo para esse estudo é que sabendo se os novos benzoxazóis interagem com as membranas sintéticas e se interagem, a forma como o fazem, podemos extrapolar a aplicação para sistemas vivos, onde o fluoróforo atue como marcador celular permitindo o imageamento.

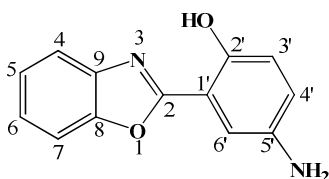
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 2-(5'-AMINO-2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL

Os compostos benzazólicos são uma classe importante de fluoróforos, tendo, em diversas áreas, inúmeras aplicações, tais como materiais poliméricos, dispositivos ópticos, sondas entre outros. O 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil) benzoxazol (Fig. 1) possui um anel benzólico condensado a um anel azólico contendo um oxigênio e um nitrogênio nas posições 1 e 3, e é substituído por um grupamento fenila com uma hidroxila em posição *orto* e um grupo amino na posição *meta*. Tal estrutura permite que haja troca protônica entre o oxigênio e o nitrogênio azólico fazendo com que o composto apresente propriedades fotofísicas interessantes como intensa emissão de fluorescência e um grande deslocamento de Stokes devido a um mecanismo conhecido como ESIPT (*Excited State Intramolecular Proton Transfer*).

Com todas essas características físicas e químicas, o 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol é um excelente precursor para a síntese de sondas de membrana, pois o grupamento amino tem alta reatividade, podendo ser substituído por ligantes de interesse ao trabalho, no caso cadeias lipofílicas. Por outro lado, a alta intensidade de emissão de fluorescência e o grande deslocamento de Stokes fazem com que os resultados obtidos a partir do estudo fotofísico sejam úteis e relevantes para a elucidação da estrutura das novas sondas em membranas sintéticas.

Figura 1: Estrutura do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol.

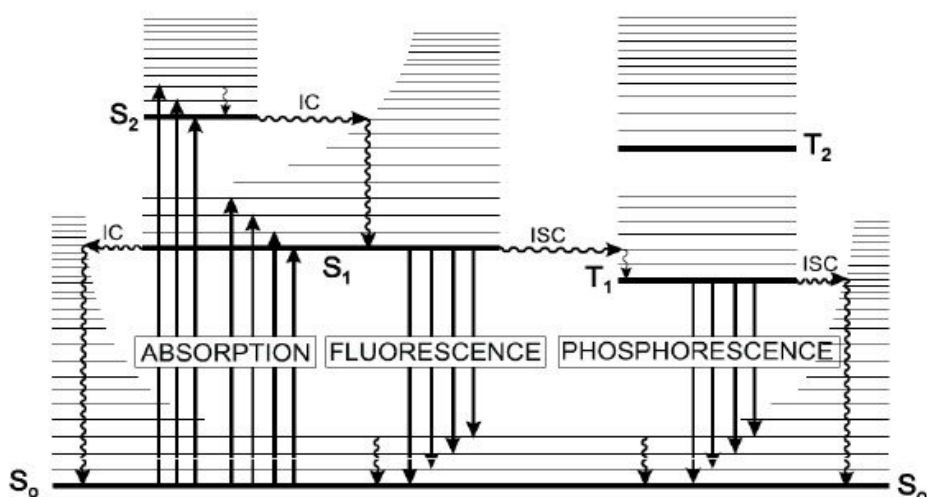


2.2 FLUORESCÊNCIA

O espectro eletromagnético apresenta radiações com comprimento de onda desde as ondas de radio até os raios cósmicos, sendo que cada comprimento de onda está relacionado com uma determinada energia (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ, VYVYAN, 2010). Quando essa radiação entra em contato com a matéria podem ocorrer diversos processos: reflexão, espalhamento e o processo de interesse, a absorção (OWEN, 2000). Ao absorver a radiação, a molécula passa a um estado excitado, que

pode ser eletrônico, vibracional ou rotacional, de acordo com a energia proveniente da radiação absorvida e pode retornar ao fundamental através de diferentes mecanismos, dependendo de suas características estruturais, como ilustra o diagrama de Jablonsky (Figura 2).

Figura 2: Diagrama de Jablonsky (LACOWICZ, 2006).



Analisando de maneira mais detalhada o diagrama de Jablonsky, que ilustra os processos fotofísicos que ocorrem quando a matéria interage com a radiação, a molécula ao absorver um fóton, passa do estado fundamental (S_0) para o 1º ou 2º estado excitado singlete (S_1 ou S_2), onde pode decair ao S_0 emitindo fluorescência, relaxar vibracionalmente através de uma conversão interna (IC) ou passar para um estado excitado tripleto (T_1) através de uma conversão intersistema (ISC), posteriormente fosforescendo (LACOWICZ, 2006).

Os compostos estudados nesse trabalho, por apresentarem estrutura rígida e conjugação estendida, apresentam como processo de decaimento energético a fluorescência e o mecanismo pelo qual ela ocorre é chamado de ESIPT.

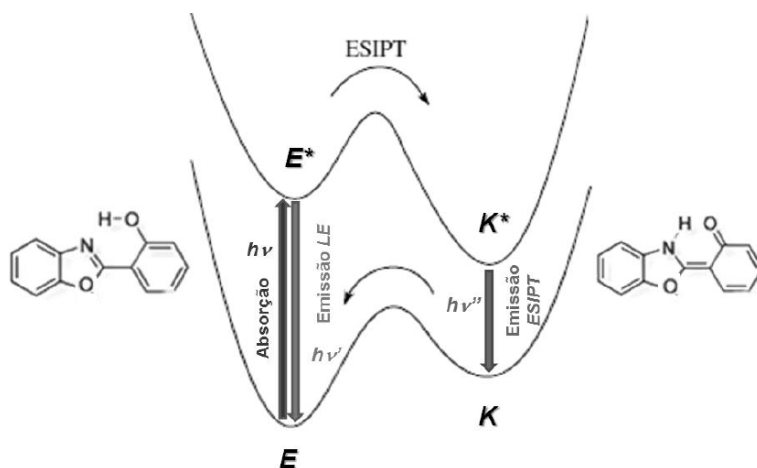
2.3 TRANSFERÊNCIA PROTÔNICA INTRAMOLECULAR NO ESTADO EXCITADO (ESIPT)

A transferência protônica intramolecular no estado excitado é uma fototautomerização no estado excitado (NISHIYA, 1986), que ocorre em heterociclos em que haja um grupo ácido doador e um grupo básico receptor, como é o caso dos 2-

(5'-amino-2'-hidroxifenil) benzoxazol, onde o doador do próton é o oxigênio fenólico e o receptor, o nitrogênio azólico.

O mecanismo inicia com a absorção de radiação Uv-Vis pelo composto na sua forma enol-*cis* fundamental (E), o qual passa ao estado enol excitado (E*), onde rapidamente converte-se ao tautomero ceto (K*) pela transferência do próton. No estado excitado, o hidrogênio é mais ácido e o nitrogênio mais básico, assim a forma mais estável é a ceto, os dois grupos (C=O e NH) também se encontram ligados por ligação de hidrogênio. Posteriormente, há o decaimento da forma ceto excitada (K*) para a forma ceto fundamental (K) e a emissão de fluorescência. No estado fundamental, o composto retorna à forma ceto e o ciclo fotofísico (Figura 3) é finalizado.

Figura 3: Mecanismo de ESIPT de 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol.



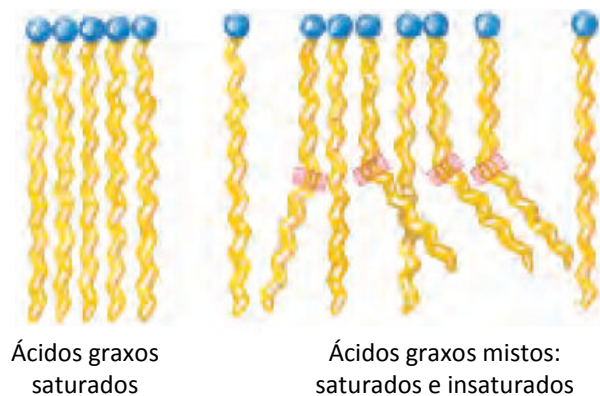
2.4 LIPÍDEOS E ESTRUTURAS LIPÍDICAS

Os lipídeos são uma classe de compostos que possuem uma grande diversidade química. Uma definição e também característica marcante é a sua insolubilidade em água. As suas funções biológicas são tão amplas quanto a sua diversidade química.

Fosfolipídeos são os elementos mais importantes na estruturação das membranas celulares. Outros lipídeos, mesmo em pequenas quantidades, exercem atividades essenciais como coenzimas, pigmentos para absorção de luz, sítios hidrofóbicos para proteínas, agentes emulsificantes no trato digestivo, hormônios e muitas outras. Ressalta-se também o seu papel de isolante térmico, crucial para a manutenção da vida de espécies em lugares com baixas temperaturas. Desequilíbrios no metabolismo destas moléculas podem levar a problemas clínicos como aterosclerose e obesidade.

Os lipídeos utilizados nesse trabalho são os fosfolipídeos. Apresentam na sua estrutura um grupo polar, composto por um grupo fosfato e geralmente por uma amina quaternária, e uma parte apolar, composta por cadeias alquílicas saturadas ou insaturadas. A parte apolar que rege a forma com que os fosfolipídeos interagem (Figura 4), a ausência ou a presença de insaturações nas cadeias alquílicas faz com que os agregados se estruturam de maneiras levemente diferentes, o que influencia na permeabilidade da membrana por eles gerada.

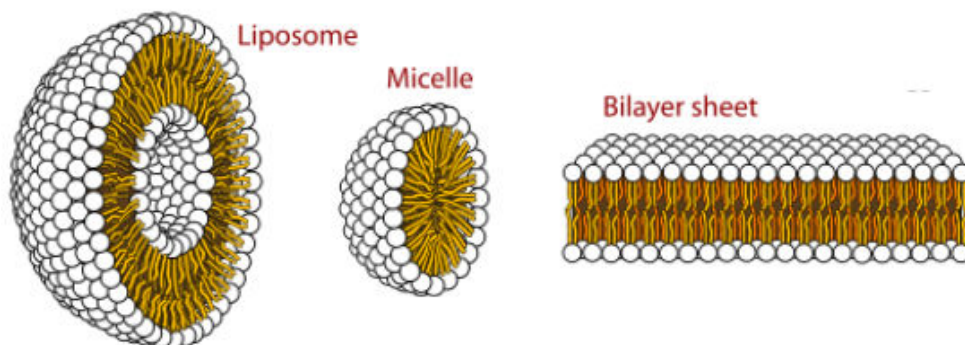
Figura 4: Interação de fosfolipídeos (LEHNINGER, 2006).



Devido às suas características estruturais mencionadas anteriormente, os lipídeos apresentam diferentes organizações, entre elas micelas, micelas reversas, lipossomas, bicamadas, entre outras. Abaixo estão ilustradas algumas delas.

Figura 5: Tipos de estruturas lipídicas

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Micelle>, acessado em 02/12/12)



Essas estruturas são formadas dependendo do meio em que se encontram e tem o objetivo de estabilizar o sistema como um todo. Por serem anfifílicas, se o meio é polar,

tendem a isolar a parte apolar do meio e se o meio é apolar, ocorre o inverso. A temperatura é outro fator importante na organização de moléculas anfifílicas em sistemas polares, tendo em vista que a temperatura pode inverter a polarização. (HOMBERG, JONSSON, 2002).

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Sintetizar corantes lipofílicos fluorescentes por ESIPT, bem como a realização do estudo do comportamento fotofísico dos mesmos quando inseridos em lipossomas lipídicos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Síntese do precursor fluorescente 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol;
- ii) Síntese dos novos corantes fluorescentes 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol, 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol e 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol;
- iii) Caracterização dos corantes sintetizados por técnicas espectroscópicas de ^1H e ^{13}C -RMN, FTIR e CHN;
- iv) Estudo fotofísico dos corantes sintetizados por absorção no Uv-Vis e emissão de fluorescência em solução;
- v) Obtenção de lipossomas lipídicos com cada um dos corantes sintetizados;
- vi) Estudo fotofísico dos lipossomas.

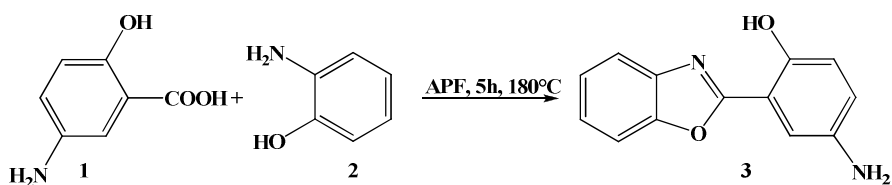
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SÍNTESE DO 2-(5'-AMINO-2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL (3)

O procedimento de síntese do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (3) foi realizado através de um reação de condensação entre ácido 5-aminosalicílico (1) e o o-aminofenol (2), utilizando ácido polifosfórico (APF) (HEIN, 1957) como solvente e catalisador ácido da reação (Esquema 1).

O mecanismo de atuação do APF (Figura 6) foi estudado (YING-HUNG SO, 1997) principalmente, através da técnica de ressonância magnética nuclear, através da qual os autores analisaram o comportamento do ácido junto a diversos reagentes em várias temperaturas, compreendendo, assim, o papel do ácido na síntese do benzoxazol.

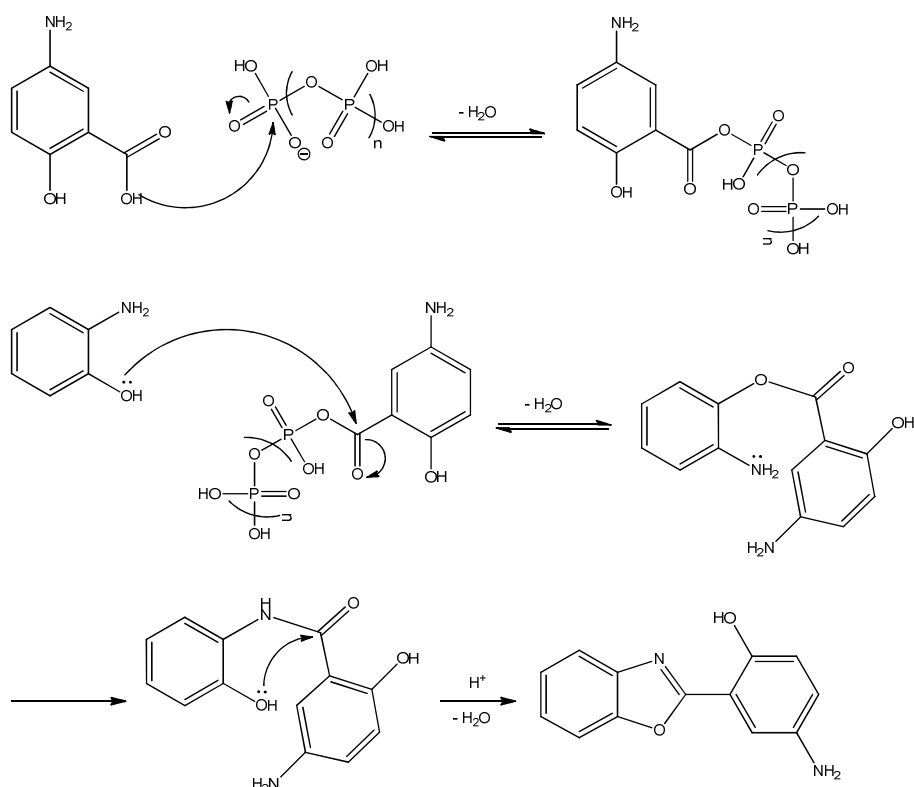
Esquema 1: Síntese do precursor 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol.



Por meio desse estudo, têm-se o conhecimento de que a primeira etapa reacional ocorre através da ligação entre o ácido 1 e o APF, formando um anidrido polifosfórico. Posteriormente, há o ataque nucleofílico do oxigênio do fenol ao carbono eletrofílico do anidrido dando origem a um éster, que converte-se a amida correspondente. A última etapa da reação é a ciclização e formação do anel azólico, pelo ataque do oxigênio ao carbono carbonílico gerando o anel e conseqüente desidratação para a formação da ligação dupla, esta etapa ocorre com o auxílio do APF que atua com agente desidratante.

Figura 6: Mecanismo de síntese do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol.

(YING-HUNG SO, 1997)



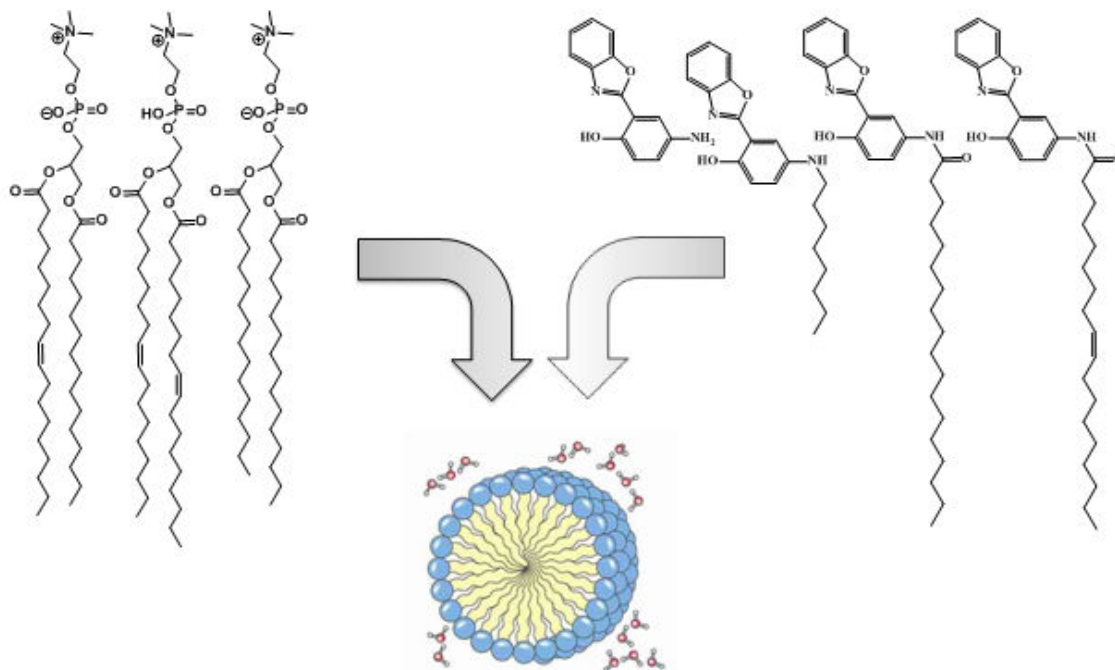
4.2 SÍNTESE DOS BENZOXAZÓIS LIPOFÍLICOS

A inserção de grupos lipofílicos na estrutura do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol tem como objetivo principal o estudo do comportamento destes em lipossomas obtidos a partir de diferentes lipídeos: o 1,2-dipalmitoil-glicero-3-fosfatidilcolina (C18:0); o 1,2-dioleoil-glicero-3-fosfatidilcolina (C18:2); e um misto L- α -fosfatidilcolina (C16:0-C18:1), como mostra a Figura 7.

Desse modo, foram escolhidos reagentes que dessem características lipofílicas ao 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol. Escolheu-se iodo-octano por possuir uma cadeia curta (comparativamente aos C18) e saturada (C8:0), o ácido esteárico por possuir uma cadeia longa e saturada (C18:0), e por fim o ácido oléico, que tem uma cadeia longa com uma insaturação (C18:1) (Fig. 7).

Com esses três novos corantes lipofílicos foi possível avaliar a influência do tamanho da cadeia do corante e também a influência da existência da insaturação na cadeia carbônica sobre as características fotofísicas.

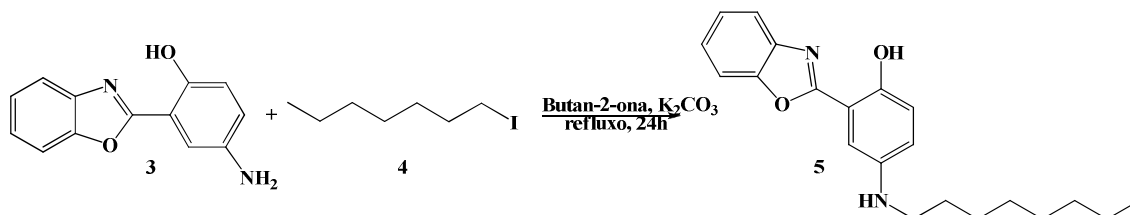
Figura 7: Corantes e lipídeos utilizados para a obtenção de membranas sintéticas.



4.2.1 Síntese do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (5)

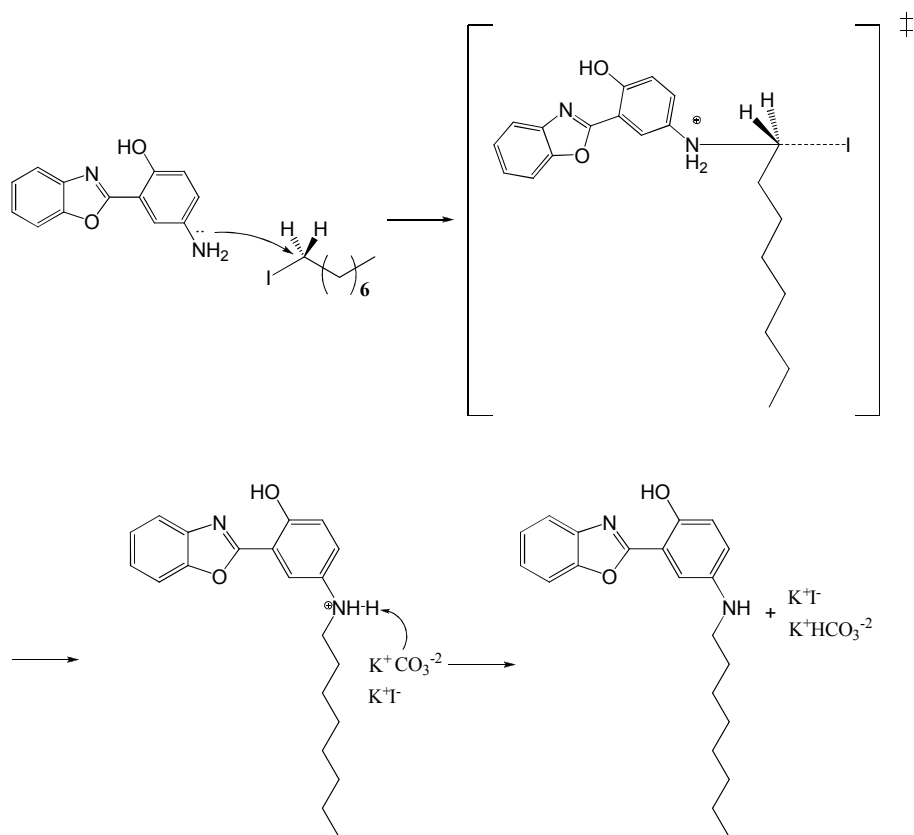
Para a síntese de **5**, realizou-se uma reação de substituição nucleofílica bimolecular através do grupo amino de **3** como nucleófilo e o iodo-octano (**4**) como substrato (FANG, 2001; RAIMUNDO, 2002) (Esquema 2). O solvente da reação foi a 2-butanona, que é inerte aos reagentes e com características ideais para reações do tipo S_N2 , além de ter um ponto de ebulição alto (80 °C) tendo em vista que a reação ocorre em refluxo. Foi adicionado K_2CO_3 sólido como base para a retirada do próton do grupo amino após o ataque nucleofílico sob o iodo-octano.

Esquema 2: Síntese do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol.



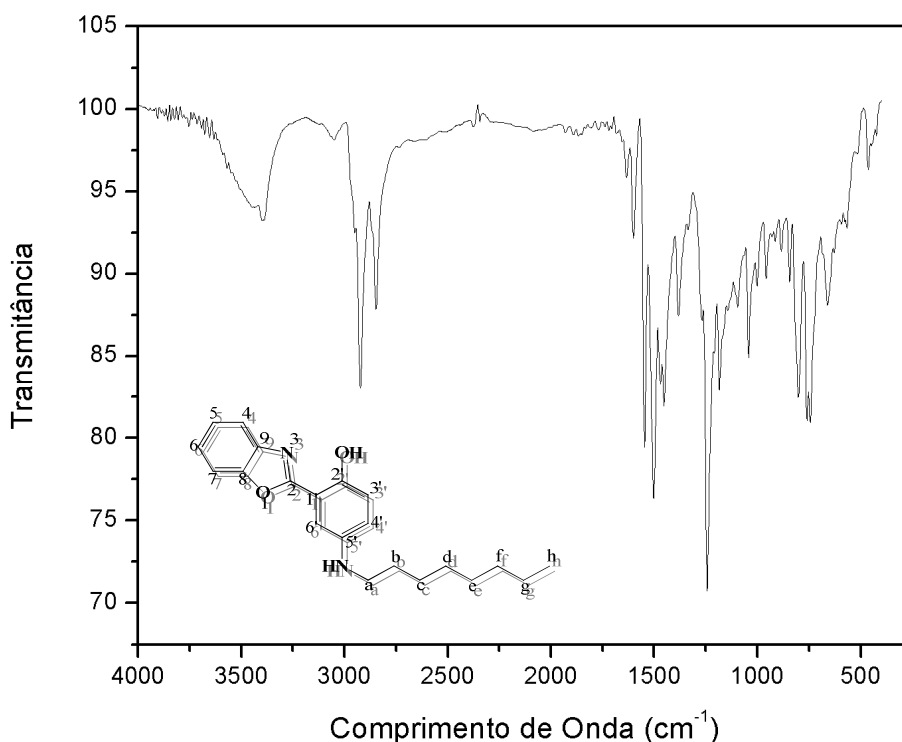
O nucleófilo (grupo amino do benzoxazol **5**) ataca o substrato como mostrado na Figura 8, gerando um estado de transição onde há a formação parcial de uma nova ligação nucleófilo-substrato e o rompimento parcial da ligação substrato-grupo de saída. Esse estado de transição leva a formação do produto final com a liberação do grupo de saída. A última etapa de reação é a remoção do hidrogênio ligado ao nitrogênio quaternário pela base, gerando assim, o produto final.

Figura 8: Mecanismo proposto para a síntese do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**5**).



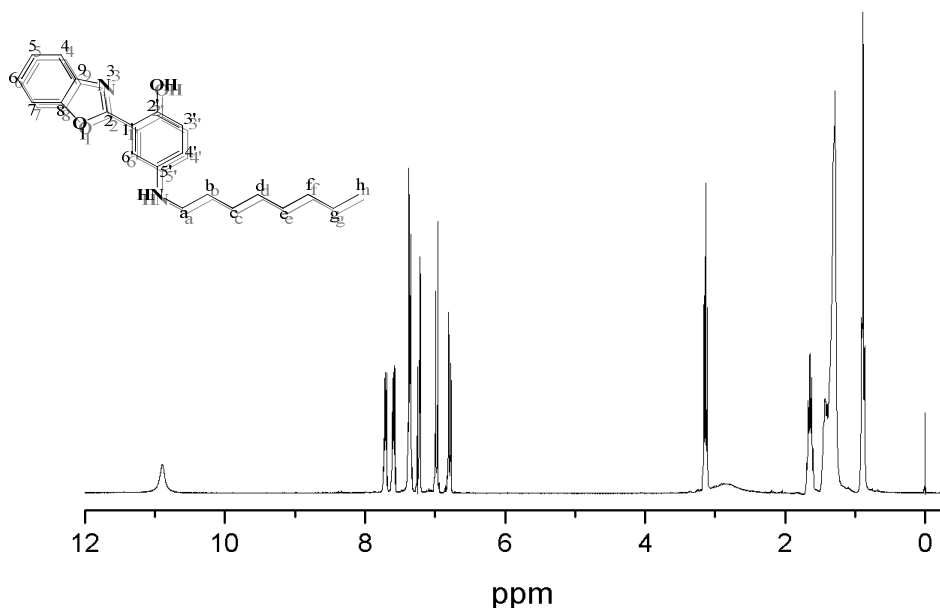
A Figura 9 apresenta o espectro de infravermelho do composto **5** em KBr. Na região acima de 3000 cm^{-1} podem ser observadas as bandas referentes aos estiramentos das ligações -OH e -NH . Apesar da sobreposição das bandas de estiramento da hidroxila e da amina secundária, podemos perceber que não há a existência das duas bandas de estiramento simétrico e assimétrico do grupo amino do composto de partida **5**, confirmando a substituição da cadeia alquílica. Na região abaixo de 3000 cm^{-1} , destacam-se, os estiramentos simétrico e assimétrico das ligações -C-H , em 2930 e 2840 cm^{-1} .

Figura 9: Espectro de Infravermelho do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (5).



A Figura 10 apresenta o espectro de ^1H -RMN do composto **5** em CDCl_3 . Observa-se na região de frequências altas, em 10,89 ppm o hidrogênio da hidroxila fenólica, na região dos aromáticos, os sete hidrogênios do anel benzólico e ao fenólico ligado a ele, entre 7,75 e 6,76 ppm. Na região de frequências mais baixas, identificamos todos os hidrogênios alifáticos e o hidrogênio do grupo amina. Considerando como carbono **a** (**Ca**) o carbono ligado diretamente ao nitrogênio e carbono **h** (**Ch**) o último carbono da cadeia alifática, observa-se em 3,14 ppm, o tripleto referente aos dois hidrogênios ligados ao **Ca**, em 2,84 ppm o singlete largo do hidrogênio da amina, em 1,64 ppm, o quintopletto referente aos hidrogênios ligados a **Cb**, em 1,34 ppm, todos os hidrogênios ligados aos carbonos internos da cadeia (**Cc-Cg**) e por fim, em 0,89 ppm, os hidrogênios metílicos ligados a **Ch**.

Figura 10: Espectro de ^1H -RMN (300MHz, CDCl_3) do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7).



4.2.2 Síntese do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7)

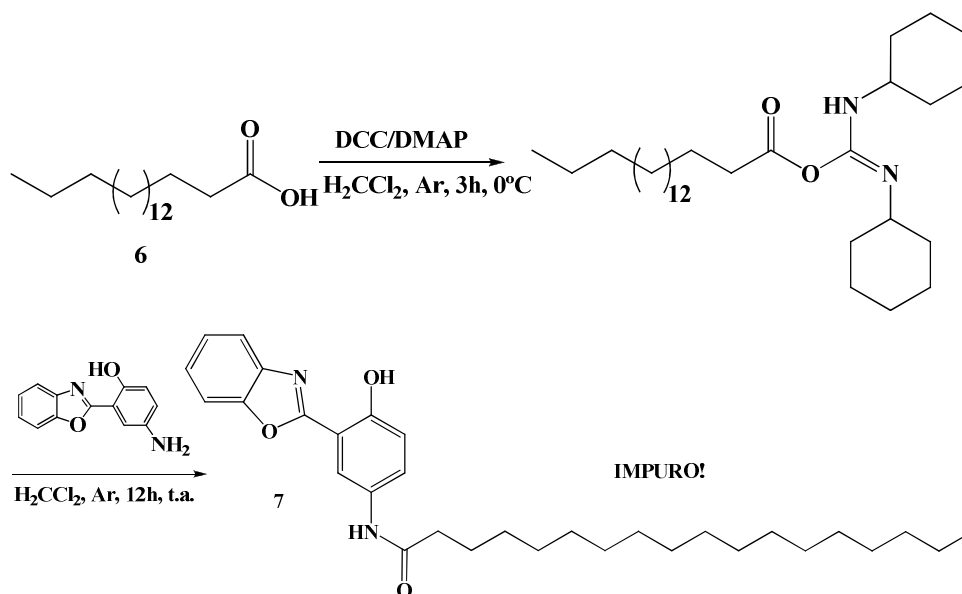
Foram realizados quatro procedimentos experimentais diferentes para a síntese do corante lipofílico 7, tendo em vista que, primeiramente, não se obteve o produto desejado ou não foi possível a sua purificação.

4.2.2.1 DCC como reagente de acoplamento

A primeira metodologia utilizada para a síntese do corante 7 foi através da reação de condensação entre 3 e o ácido esteárico (6) com o auxílio dos reagentes de acoplamento N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador básico (DERAEVE, 2011; MASU, 2006; IMABEPPU, 2006) (Esquema 3). A reação ocorre em duas etapas, a primeira delas é entre o ácido carboxílico e o reagente de acoplamento e tem a função de ativar o ácido. A segunda etapa é o ataque do grupo amino nucleofílico ao carbono carbonílico, gerando assim o produto desejado que precipita no meio reacional. Um dos subprodutos de reação é a N,N-diciclohexilureia (DCU), que apresenta problemas na sua remoção durante o processo de purificação por cromatografia em coluna, pois acaba eluindo praticamente junto a todas as outras espécies. Como a DCU não apresenta alta solubilidade em água, o procedimento de extração utilizando água torna-se ineficaz, assim como a utilização de qualquer outro solvente. Desse modo, confirma-se a síntese

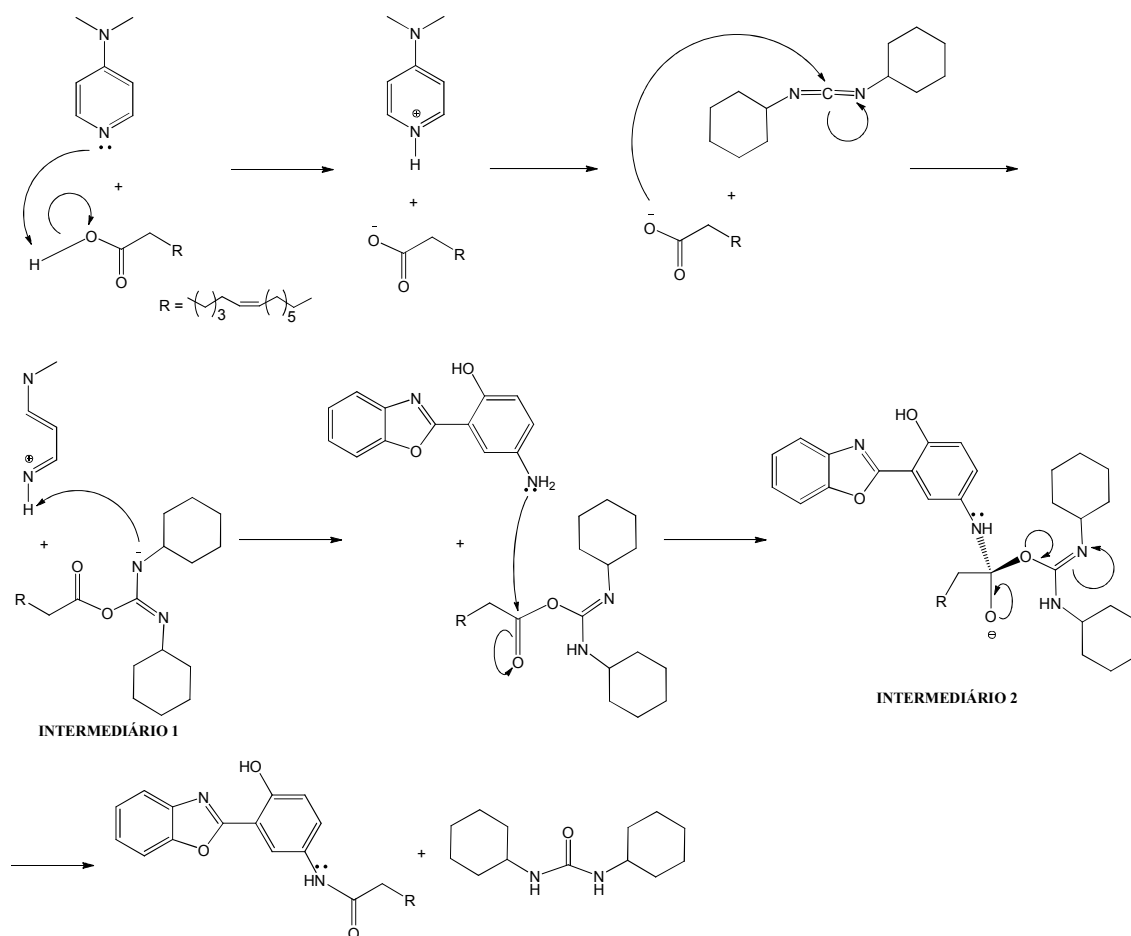
do produto 7, através de técnicas espectroscópicas, porém não se consegue obter o mesmo puro.

Esquema 3: Síntese do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7) via DCC/DMAP.



O mecanismo dessa reação não está completamente esclarecido (SHEIKH, 2010), sendo que na Figura 11 apresenta-se uma proposta. A reação inicia com o catalisador básico desprotonando o oxigênio da hidroxila. Posteriormente, há o ataque no carbono eletrofílico da carbodiimida, gerando o primeiro intermediário de reação que é protonado, regenerando o catalisador. Formado o éster reativo, a etapa seguinte ocorre junto ao 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil) benzoxazol, levando a formação do segundo intermediário, que após a movimentação dos elétrons e o abandono do grupo de saída (uréia) chega ao produto final 7.

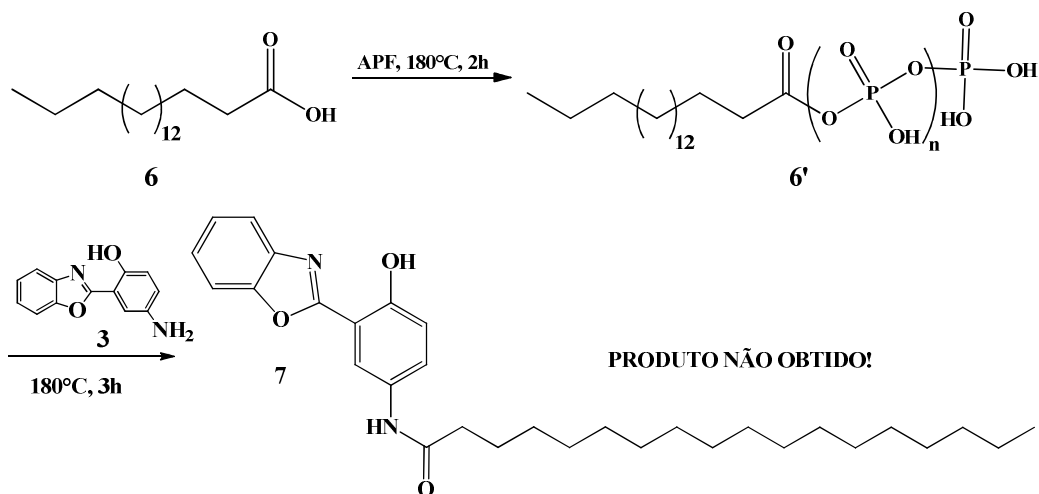
Figura 11: Mecanismo proposto para a síntese do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7) e adaptado de (SHEIKH, 2010).



4.2.2.2 Ácido Polifosfórico como reagente

Não obtido o produto puro com sucesso, buscou-se outras rotas sintéticas que não utilizassem reagentes de acoplamento. Uma delas foi utilizar o ácido polifosfórico (SNYDER, 1995), onde a primeira etapa envolve a formação de uma ligação amida. Dessa forma, esperava-se que houvesse a reação entre o ácido graxo **6** e o APF para a formação do anidrido fosfórico **6'**, como ilustrado no Esquema 4. E conseqüentemente, que o anidrido **6'** reagisse com a amina **3** formando o produto desejado. Porém, após a neutralização do meio, ao comparar a CCD do precipitado com o reagente de partida **3** constatou-se que este não havia reagido. É possível que o anidrido fosfórico não tenha sido formado, já que o ácido carboxílico em questão é bem menos reativo ou que o meio fortemente ácido tenha protonado o nitrogênio do grupo amino de **3** desativando-o.

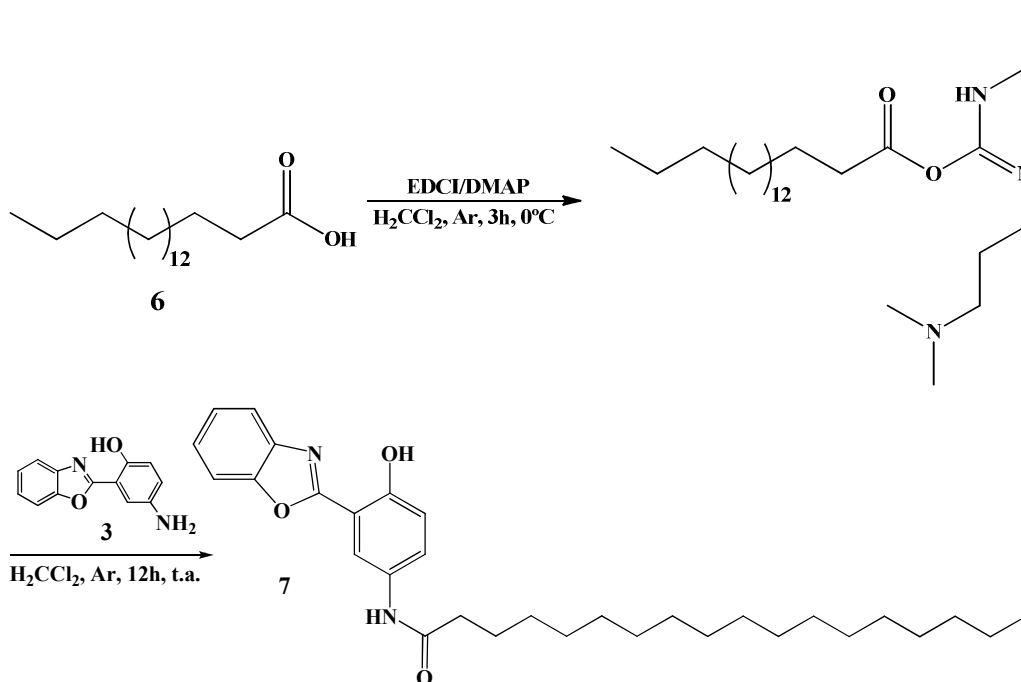
Esquema 4: Síntese do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7) via APF.



4.2.2.3 EDCI como reagente de acoplamento

Das duas metodologias utilizadas, a primeira obteve-se o produto contendo impurezas de difícil remoção e a segunda não se obteve sucesso. Assim, foram pesquisados reagentes de acoplamento que fossem facilmente removidos no processo de purificação e o reagente escolhido foi a *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDCI) (Esquema 5). Pois a uréia formada a partir da EDCI, ao final da reação, tem considerável solubilidade em água, ao contrário do produto. Portanto, ao término da reação, filtrou-se o bruto reacional, que contém o produto e a ureia e adiciona-se água, sob agitação. Todas as outras espécies, ou seja, precursor não reagido, DCC, DMAP, ácido esteárico, permanecem na solução filtrada. Dessa forma, toda a ureia é extraída pela água e o produto fica em suspensão necessitando apenas uma filtração para que esteja puro.

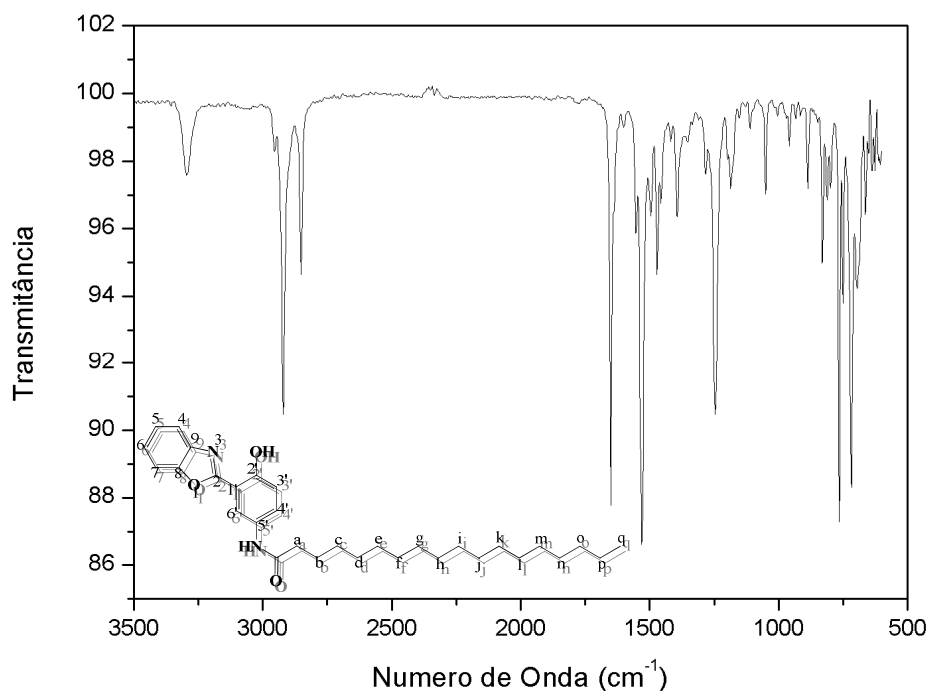
Esquema 5: Síntese do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7) via EDCI.



O mecanismo dessa reação é idêntico ao mecanismo descrito no item 2.3.2.1, a única diferença seria o reagente de acoplamento utilizado para a ativação do ácido carboxílico.

A Figura 12 apresenta o espectro de infravermelho do composto 7 em KBr. Nota-se a falta da banda de estiramento OH, possivelmente devido à interação do hidrogênio com o nitrogênio do anel azólico, por ligação de H, por outro lado, observa-se claramente a banda do estiramento NH, em 3295 cm^{-1} , que antes estava sobreposta, mostrando o desaparecimento da dupla banda de estiramento NH_2 . Na região abaixo de 3000 cm^{-1} , as principais bandas são referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação C-H, em 2930 e 2840 cm^{-1} , ao estiramento da carbonila, em 1648 cm^{-1} e em 1540 cm^{-1} ao estiramento de ligação C=C de aromático.

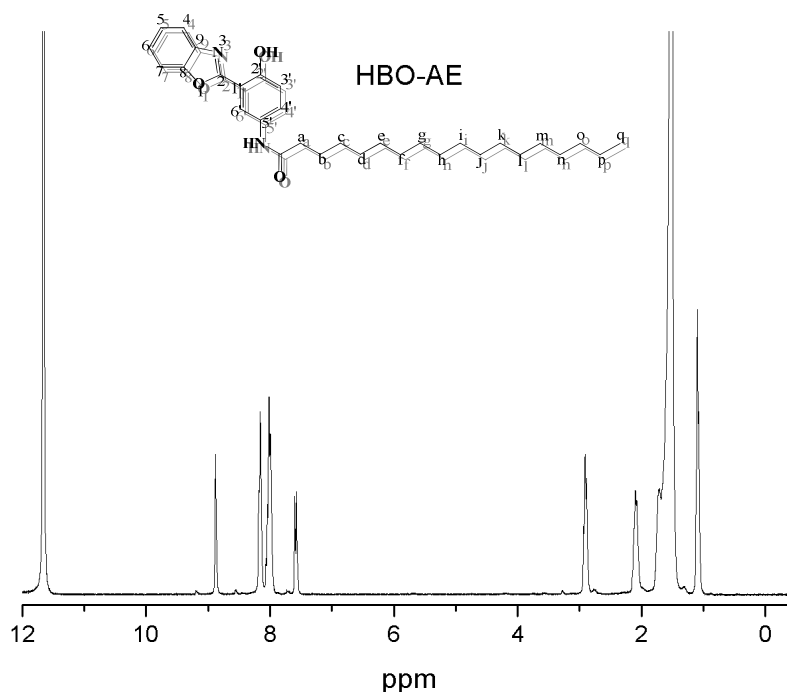
Figura 12: Espectro de Infravermelho do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7).



A Figura 13 apresenta o espectro de ^1H -RMN do composto **7** em ácido trifluoroacético deuterado. O fato da utilização desse solvente deve-se a baixa solubilidade do composto **7** na maioria dos solventes orgânicos. Realizou-se testes de solubilidade em clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, hexano, tetrahydrofurano, DMSO, entre outros e todos resultaram em solubilidade negativa. A utilização do ácido trifluoroacético deuterado para a análise faz com que a resolução dos picos seja muito inferior, de maneira não foi possível observar os desdobramentos dos sinais. Na região de frequências altas, em 11,89 ppm, há o sinal que refere-se ao hidrogênio da hidroxila, que sai junto ao do ácido trifluoroacético, e em 8,87 ppm o hidrogênio da amina. Na região dos aromáticos, há os sinais dos 7 hidrogênios do anel benzólico e ao fenólico ligado a ele, entre 8,57 e 7,56 ppm. Na região de frequências mais baixas, identificamos todos os hidrogênios alifáticos presentes no composto. Voltamos a considerar como carbono **a** (**Ca**), o carbono ligado diretamente à carbonila e carbono **q** (**Cq**) o último carbono da cadeia alquílica. O espectro assemelha-se muito ao anterior nessa região, tendo em vista que há somente o aumento da cadeia alquílica. Portanto, observa-se em 2,89 ppm, o tripleto referente aos dois hidrogênios ligados ao **Ca**, em 2,09 ppm, o quintopletto referente aos hidrogênios ligados a **Cb**, de 1,78 até 1,41 ppm, todos os

hidrogênios ligados aos carbonos internos da cadeia (**Cc-Cp**) e por fim, em 1,09 ppm, os hidrogênios metílicos ligados ao **Cq**.

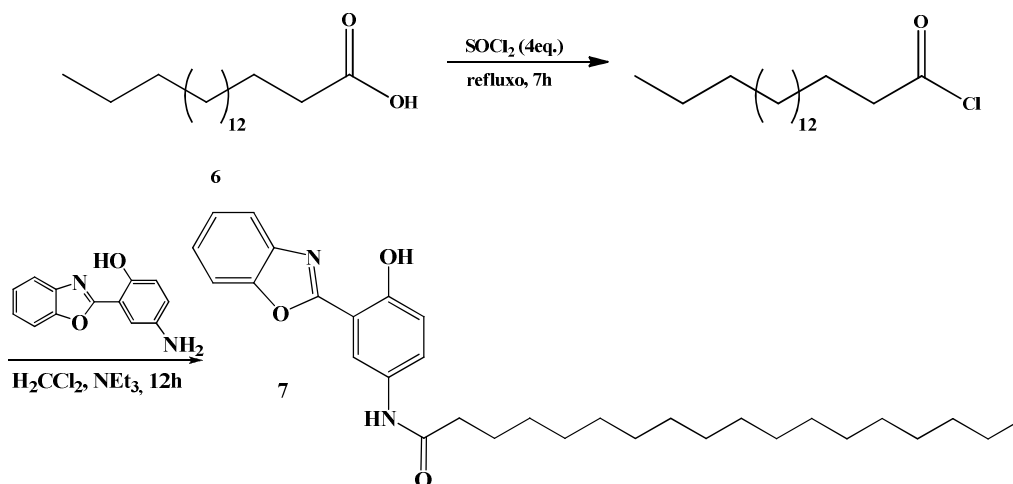
Figura 13: Espectro de ^1H -RMN (300MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$) do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**7**).



4.2.2.4 A partir do cloreto de ácido

Outra metodologia, testada paralelamente à do item acima e alternativa aos reagentes de acoplamento, foi transformar o ácido graxo em seu respectivo cloreto de ácido, utilizando cloreto de tionila (CLAWSON, 2009; SARI, 2011) e depois reagir com o 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**3**) (Esquema 6). A metodologia obteve sucesso; porém, foi obtido o produto com um rendimento menor (20% em comparação com 50% da metodologia com EDCI). Acredita-se que o fator limitante do rendimento foi a não conversão total do ácido graxo em cloreto de ácido, tendo em vista que a reatividade deste é menor do que ácidos carboxílicos de uma forma geral, o que pode ser inferido pelo maior tempo de reação para formar o cloreto (6-8 horas).

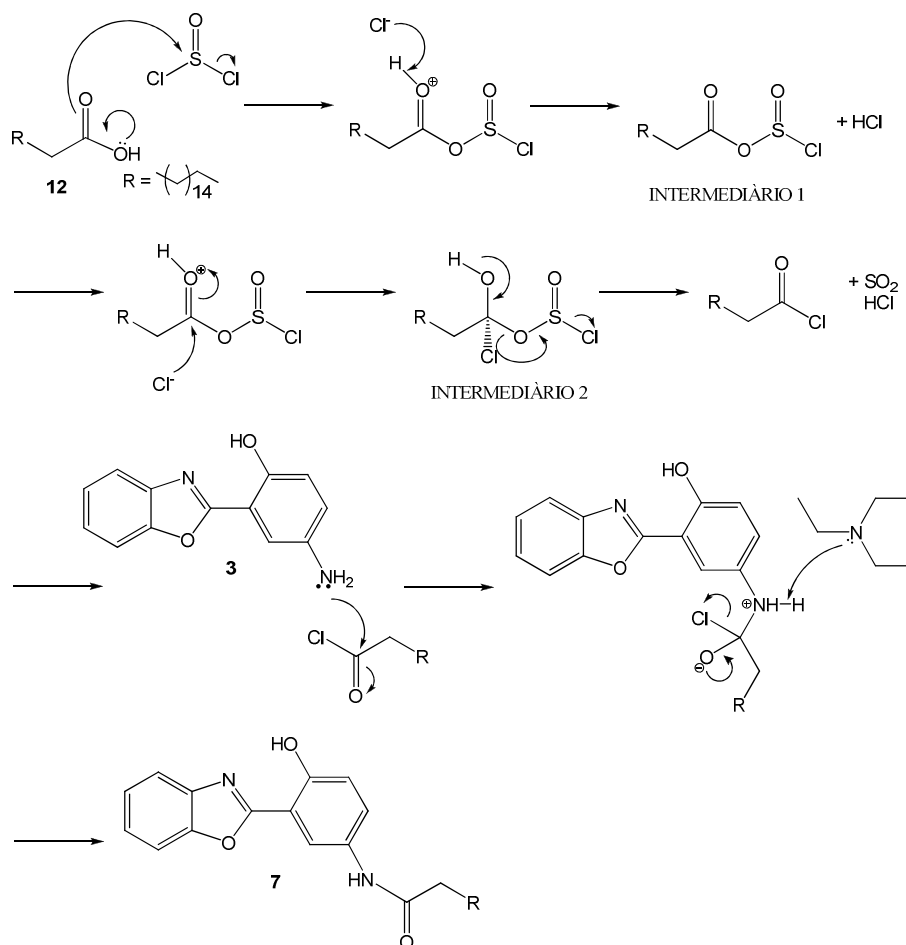
Esquema 6: Síntese do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (7) via cloreto do ácido graxo 6.



A descrição do mecanismo para a formação do composto 7 baseou-se na referência de Green (GREEN, 1967) e envolve duas etapas: a primeira em relação a síntese do cloreto de ácido e a segunda referente ao produto final (Figura 14). Na primeira parte, a reação inicia com o ataque da ligação dupla da carbonila no enxofre do cloreto de tionila, liberando Cl^- . O íon cloreto abstrai o próton do oxigênio positivo, originado a partir da movimentação eletrônica, gerando assim, o intermediário 1, instável e altamente eletrofílico, e HCl . O próprio ácido clorídrico formado na reação tem a função de gerar o cloreto de ácido, pois o par de elétrons do íon cloreto ataca o carbono carbonílico formando o intermediário tetraédrico 2 que rearranja para chegar ao cloreto de ácido, liberando SO_2 e HCl . A segunda parte compreende o ataque do par de elétrons do grupamento amino no carbono eletrofílico de cloreto de ácido, forma um intermediário tetraédrico que após rearranjo eletrônico e liberação do íon cloreto chega ao produto desejado. Nessa etapa, a função da trietilamina é remover o hidrogênio do grupamento amino de 3, retornando o nitrogênio a sua forma neutra.

O produto foi caracterizado pelas mesmas técnicas do item 2.3.2.3 e obteve-se os mesmos resultados.

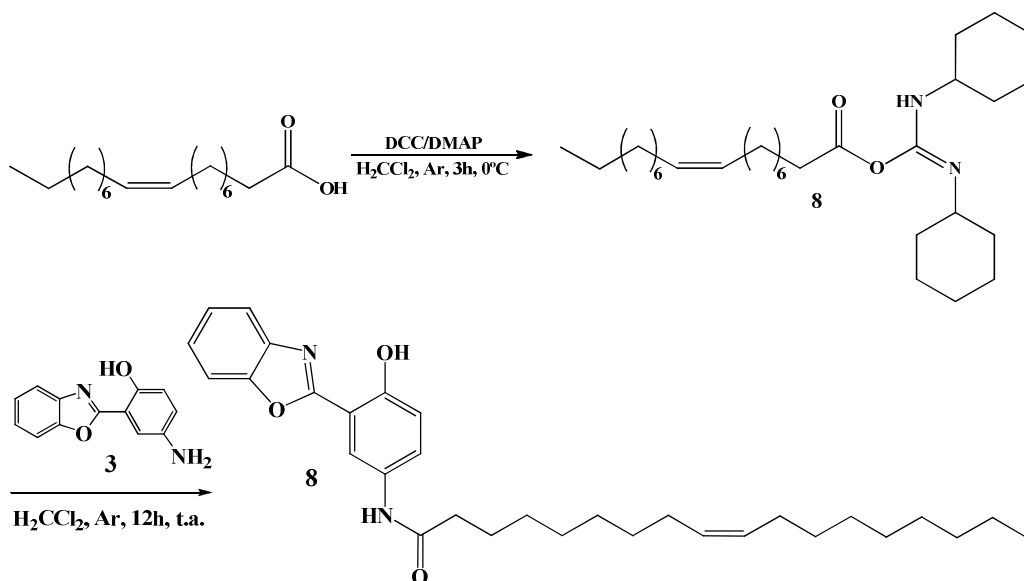
Figura 14: Mecanismo proposto para a síntese do cloreto do ácido esteárico e do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol.



4.2.3 Síntese do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**8**)

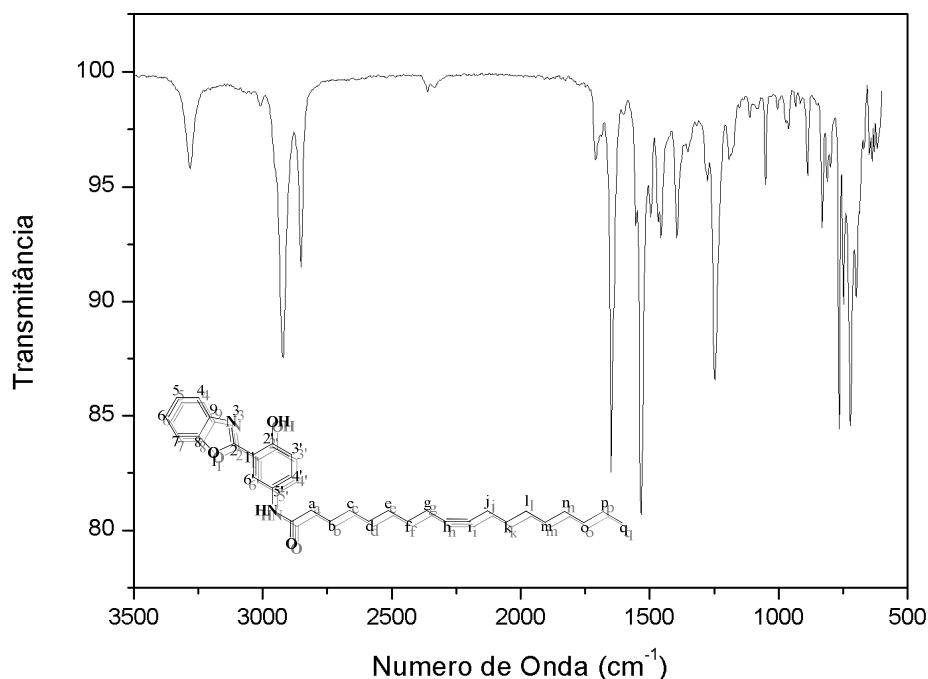
O procedimento de síntese do corante **8** foi idêntico ao utilizado no item 2.3.2.1, no qual o reagente de acoplamento e o catalisador básico foram DCC/DMAP e as mesmas condições foram empregadas (Esquema 7). A diferença entre eles é que o composto em questão não precipita no meio reacional, dessa forma ao término da reação realiza-se uma filtração para eliminar o excesso da ureia formada e através de cromatografia em coluna utilizando diclorometano como eluente obtém-se o produto puro. A eficiência ocorrida nesse caso, diferente do anterior, deve-se ao fato do composto **8** eluir mais rápido na coluna e também numa velocidade bem maior que a DCC residual ou a sua ureia, dessa forma não temos a contaminação do composto desejado. O mecanismo foi anteriormente discutido no item 2.3.2.1 e segue todas aquelas etapas.

Esquema 7: Síntese do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**8**) via DCC/DMAP.



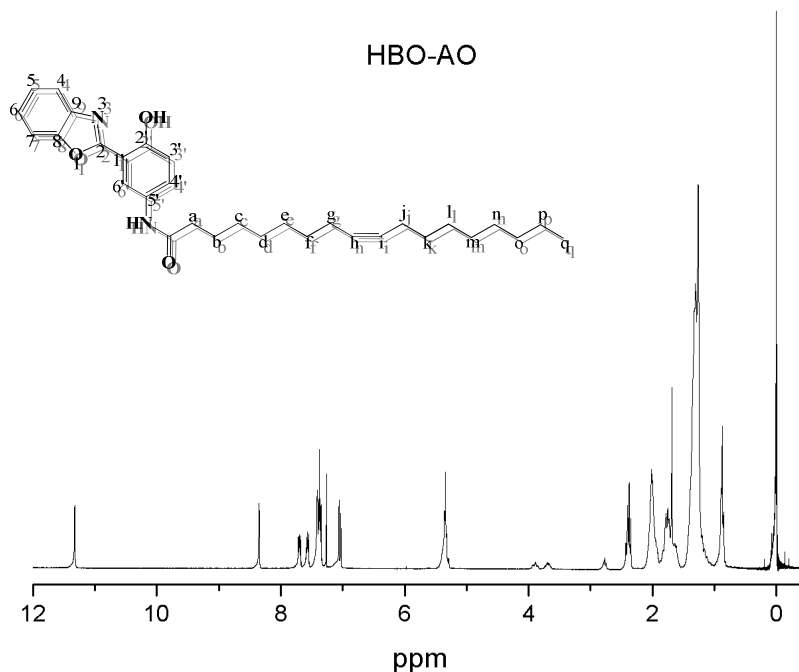
A Figura 15 apresenta o espectro de infravermelho do composto **8**, em KBr. Da mesma maneira que no anterior, verifica-se a falta da banda de estiramento OH, também devido à ligação de H entre o hidrogênio fenólico e o nitrogênio azólico, há também a presença da banda do estiramento NH, em 3295 cm^{-1} , de forma clara. Na região abaixo de 3000 cm^{-1} , o espectro não muda muito em relação ao do composto anterior. Observamos as mesmas bandas, começando pelos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação C-H, em 2930 e 2840 cm^{-1} , depois pelo estiramento da carbonila, em 1648 cm^{-1} e em 1540 cm^{-1} ao estiramento de ligação C=C de aromático. Em 1709 cm^{-1} , está presente a única banda que diferencia os dois compostos, que é devido a insaturação presente no composto **8**.

Figura 15: Espectro de Infravermelho do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (8).



A Figura 15 apresenta o espectro de ^1H -RMN do composto **8**, em CDCl_3 . Na região de frequências altas, o sinal do hidrogênio da hidroxila está presente em 11,31 ppm e o sinal do hidrogênio da amina em 8,35 ppm. Tanto o sinal do hidrogênio da amina no composto **7** quanto no composto **8**, estão presentes numa região de frequência mais altas do que em relação ao do composto **5**, esse fato deve-se a estarem ligados a um carbono eletrofílico, portanto deficiente em elétrons, fazendo com que saiam mais desblindados. Os sinais dos hidrogênios aromáticos estão presentes entre 7,73 e 7,02 ppm e os hidrogênios olefinicos em 5,34 ppm. Na região dos alifáticos, utilizando a definição anterior para a atribuição dos carbonos, observa-se, em 2,39 ppm, o tripleto referente aos dois hidrogênios ligados ao **Ca**, em 2,00 ppm, os hidrogênios vizinhos à olefina, ligados à **Ci** e **Cj**, em 1,76 ppm, os dois hidrogênios ligados a **Cb**, em 1,32 ppm, aqueles ligados do **Cc** até **Cg** e **Cl** até **Cp** e por fim, em 0,88 ppm, os hidrogênios metílicos ligados ao **Cq**.

Figura 16: Espectro de ^1H -RMN (300MHz, CDCl_3) do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**8**).

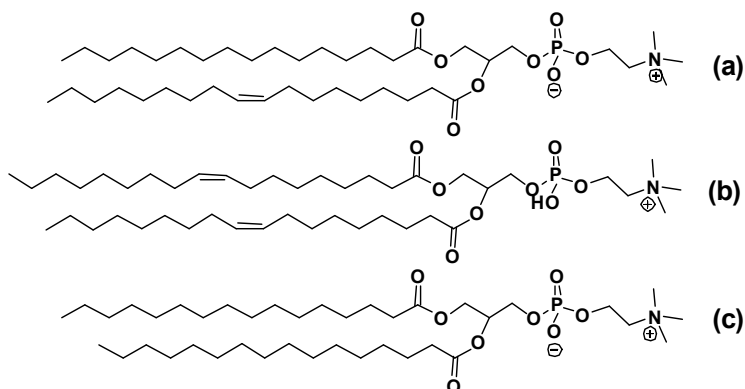


4.3 OBTENÇÃO DOS LIPOSSOMAS LIPÍDICOS

Compostos anfífilos apresentam diferentes formas de organização, como foi discutido no item 1.4, dependendo das condições em que esses sistema são gerados. Para esse trabalho, utilizou-se uma metodologia para a formação de lipossomas, onde primeiramente, se dissolveu os lipídeos junto ao corante e evaporou-se o solvente para que ficassem dispersos e desordenados. Posteriormente se adicionou água para gerar estruturas organizadas em que os grupos polares se encontrassem na camada exterior e a parte apolar no interior da estrutura. Foram utilizados três diferentes lipídeos: **(a)** L-fosfatidilcolina (PC, C16:0-C18:1), **(b)** 1,2-dipalmitoil-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC, C18:0) e **(c)** cis-1,2-di oleoil-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC, C18:1) (Figura 17).

As cadeias alquílicas desses lipídeos variam em relação à ausência (DPPC) e a presença de insaturações (PC e DOPC), e por meio do estudo fotofísico, buscou-se avaliar a forma como os corantes anfífilos **5**, **7** e **8** interagem em meios micro-heterogêneos como os lipossomas.

Figura 17: Fosfolípidos utilizados para a preparação das soluções de lipossomas: (a) L- fosfatidilcolina (PC), (b) cis-1,2-dioleoil-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC) e (c) 1,2-dipalmitoil-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC)



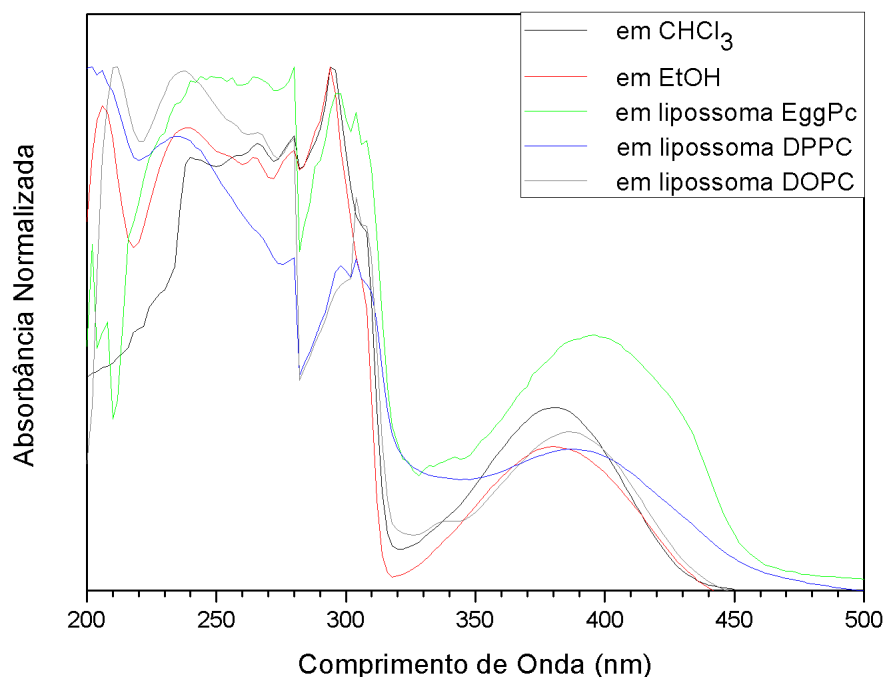
4.4 ESTUDO FOTOFÍSICO

O estudo fotofísico dos compostos **5**, **7** e **8** foi realizado em dois solventes (etanol e clorofórmio) e também em presença de soluções aquosas de fosfolípidos. As soluções utilizadas foram preparadas em concentrações entre 10^4 - 10^5 M.

3.4.1 Fotofísica do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**5**)

A Figura 18 mostra os espectros de absorção normalizados na região do Uv-Vis do composto **5**, a partir da análise dos espectros foi possível observar que o comprimento de onda dos máximos de absorção (λ_{abs}) não variou muito com a mudança da polaridade do solvente e que inseridos nos lipossomas, os deslocamentos dos λ_{abs} não são significativos, em torno de 380 nm, sendo o sistema com o PC tendo um leve deslocamento batocrômico.

Figura 18: Espectros de absorção no Uv-Vis do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**5**) em solventes orgânicos (etanol e clorofórmio) e em lipossomas de PC, DPPC e DOPC.



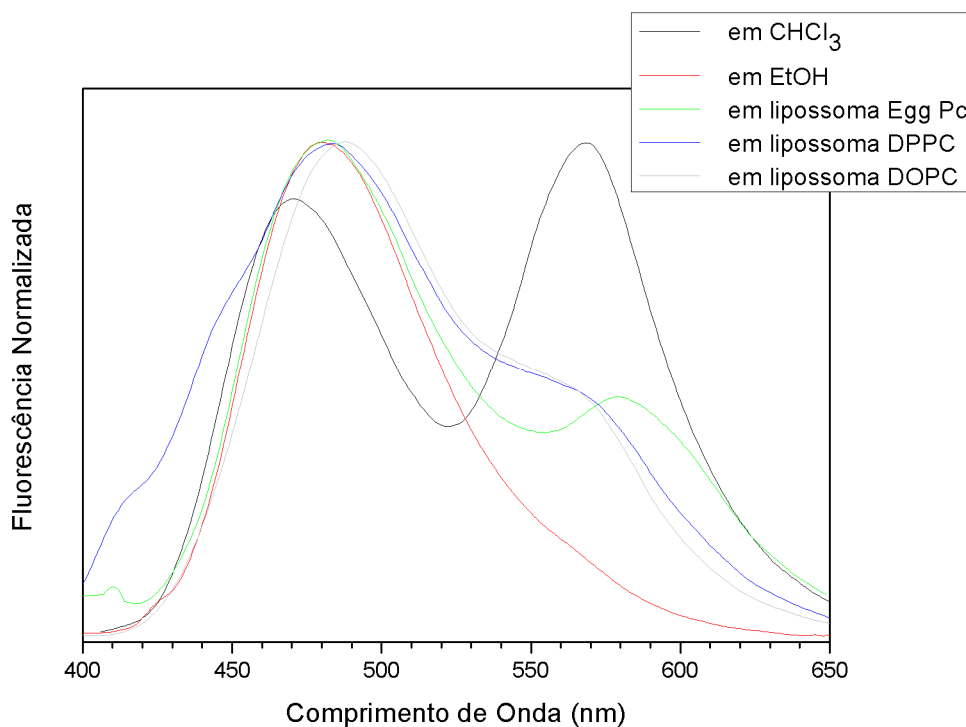
A análise dos espectros de emissão de fluorescência de **5** pode inferir a respeito da localização da sonda no sistema lipídico. O que se observou pela análise dos espectros da Figura 19 foi que a sonda **5** comporta-se como se estivesse acomodada na região polar do ambiente lipídico (meio aquoso), uma vez que a intensidade da banda de emissão da espécie enol é mais intensa do que a banda da espécie responsável pela banda ESIPT. Esta conclusão está baseada na comparação que se faz dos espectros de **5** em solventes orgânicos e nos lipossomas. O comportamento da sonda no solvente etanol simula o ambiente aquoso, assim como o solvente clorofórmio aproxima-se do ambiente apolar das cadeias carbônicas dos fosfolípídeos. Desta forma, pode-se notar que os espectros de emissão da sonda **5** nos lipossomas de PC, DPPC e DOPC assemelha-se ao espectro em etanol, além de ter um pequena contribuição da banda ESIPT.

Dessa forma, analisando as duas bandas, a normal (esquerda) e ESIPT (direita), nota-se que a intensidade da banda normal é maior que a intensidade da banda ESIPT, corroborando para o fato de que a sonda localiza-se em um meio polar, ou seja, ela está estruturada dentro do lipossoma de forma que a parte polar da sonda esteja exposta ao meio, assim, está disposta na camada mais externa do lipossoma (Figura 5). Fato

explicável pelo tamanho da cadeia que não é grande o suficiente para interagir de forma efetiva e gerar um lipossoma.

O comprimento de onda de emissão (λ_{em}) do composto em todos os sistemas fica em torno de 600 nm, indicando que a fluorescência é na região do laranja.

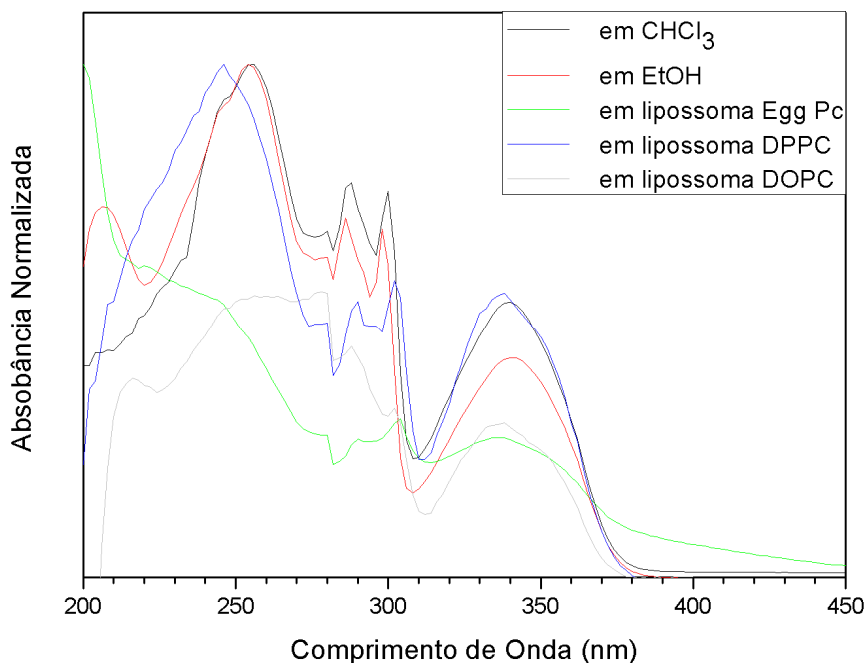
Figura 19: Espectro de emissão de fluorescência do 2-(5'-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**5**) em solventes orgânicos (etanol e clorofórmio) e em lipossomas de PC, DPPC e DOPC.



4.4.2 Fotofísica do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**7**)

A Figura 20 mostra o espectro de absorção normalizado na região do Uv-Vis do composto **7**, mais uma vez o fato de se variar o solvente ou o lipídeo em que o corante está inserido, não afetou de forma significativa o λ_{abs} do corante, de forma que todas as medidas de λ_{abs} ficaram bem próximas à 340 nm.

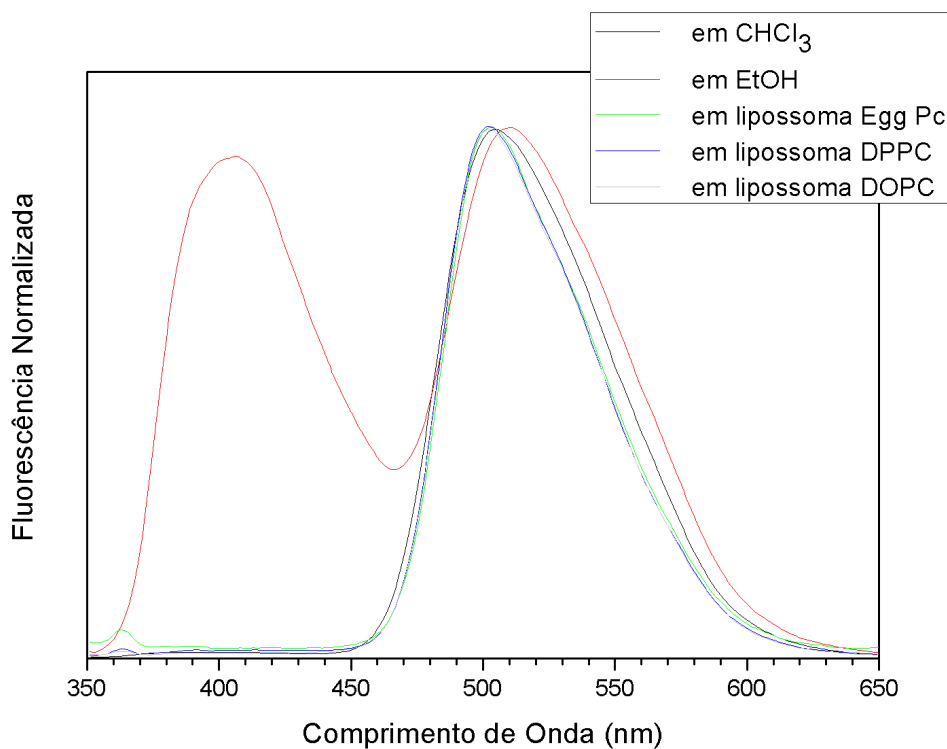
Figura 20: Espectro de absorção no Uv-Vis do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**7**) em solventes orgânicos (etanol e clorofórmio) e em lipossomas de PC, DPPC e DOPC.



A análise do espectro de emissão de fluorescência do corante **7** (Figura 21), mostra um comportamento totalmente inverso ao apresentado pelo corante anterior. Nota-se, como esperado, que utilizando etanol como solvente houvesse a banda normal no espectro pelas razões antes discutidas, porém para os demais meios há somente a banda ESIPT. Por meio desse resultado, evidencia-se que a parte polar do corante está toda inserida na parte interna das estruturas lipídicas formando assim um lipossoma (Figura 5). Bem como no corante **5**, o tamanho da cadeia que governa a organização, nesse caso também foi o responsável pelo resultado. O fato da cadeia ser grande faz com que a interação seja bem efetiva com o lipídeo, assim o sistema adota a conformação de menos energia, que é aquela em a parte hidrofóbica está totalmente isolado do meio, que é o caso dos lipossomas.

O comprimento de onda de emissão do corante é 500 nm, sendo assim fluoresce na região do verde.

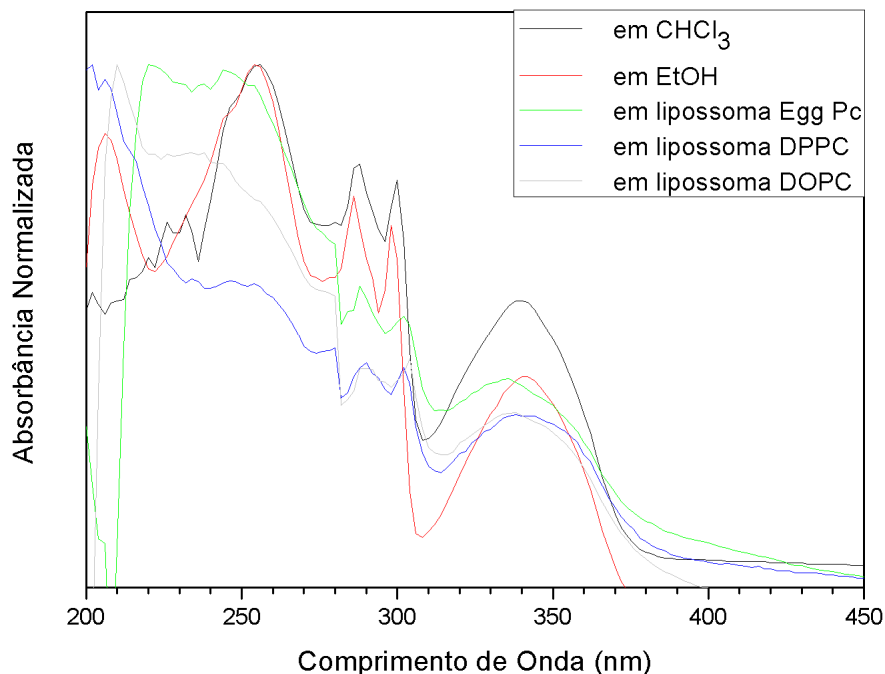
Figura 21: Espectro de Emissão de Fluorescência do 2-(5'-estearamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**7**) em solventes orgânicos (etanol e clorofórmio) e em lipossomas de PC, DPPC e DOPC.



4.4.3 Fotofísica do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**8**)

A Figura 22 mostra o espectro de absorção normalizado na região do UV-Vis do composto **8**, o comportamento observado com as variações de meio são muito semelhantes às apresentadas para o corante **7**, pois o fato de existir uma insaturação entre C9-C10 na cadeia alquílica do composto em questão, que ainda está bem longe do anel benzazólico, não é suficiente para deslocar o λ_{abs} do composto, esse também absorve radiação em 340 nm.

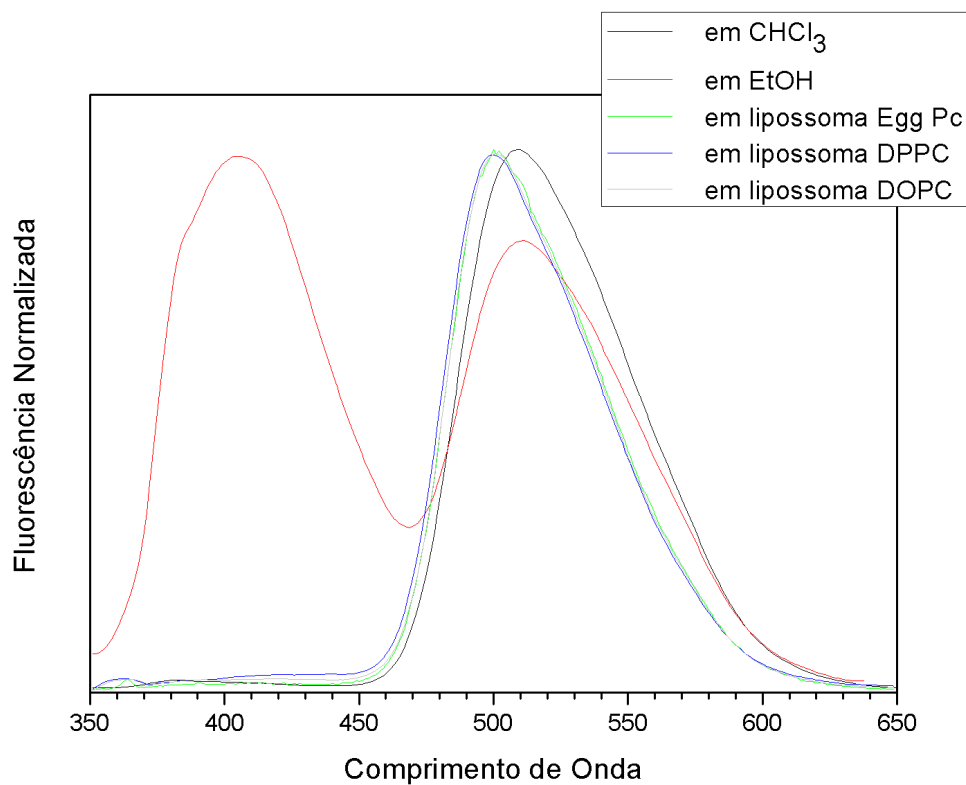
Figura 22: Espectro de Absorção no UV-Vis do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**8**) em solventes orgânicos (etanol e clorofórmio) e em lipossomas de PC, DPPC e DOPC.



Se formos comparar os espectros de emissão de fluorescência dos compostos **7** e **8**, veremos que são muito semelhantes, de tal forma que tudo o que foi discutido para o composto **7**, também se encaixa para o composto em questão.

O corante também forma lipossomas junto as lipídeos e emite fluorescência no verde, no mesmo comprimento de onda. A conclusão mais importante é acerca da presença da insaturação, que de acordo com os estudos realizados não influi de maneira tão significativa na estruturação. Não podemos avaliar através desse estudo o quanto de influência ela possui, porém, observamos que o tamanho da cadeia contribuiu de maneira mais significativa para a formação dos lipossomas.

Figura 23: Espectro de Emissão de Fluorescência do 2-(5'-oleamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**8**) em solventes orgânicos (etanol e clorofórmio) e em lipossomas de PC, DPPC e DOPC.



5. CONCLUSÕES

O precursor fluorescente, bem como, todos os três corantes lipofílicos fluorescentes propostos foram sintetizados com sucesso, tendo rendimentos de 80%, para o precursor, 35%, para o composto **3**, 50%, para o **5** e 50% para o **7**, e foram devidamente caracterizados através das técnicas de RMN-¹H, RMN-¹³C, Infravermelho e CHN.

O estudo fotofísico dos novos corantes mostraram que o precursor, bem como o composto **3** fluorescem na região do laranja, já que a adição da cadeia alquílica não desloca o comprimento de onda de emissão e os demais na região do verde, fato explicado pela adição do grupo carbonílico, que promove um deslocamento hipsocrômico.

Analisando as bandas normal e de ESIPT dos espectros de fluorescência dos compostos verificou-se que o composto **3** formou uma micela enquanto os compostos **5** e **7** houve a formação de lipossomas. Essas evidências devem-se ao fato de que a cadeia de oito carbonos do composto **3** não torna a estrutura lipofílica o suficiente para a formação do lipossoma. Ao contrário, os demais compostos mostraram que uma cadeia alquílica composta de 18 carbonos é suficiente para dar lipofilicidade à molécula.

Além disso, verificou-se que a presença da insaturação no composto **7** não melhora de forma significativa a interação com os lipídeos, possivelmente há mudanças na estrutura do lipossoma, porém o fato de existir ou não a insaturação fez com que essas estruturas fossem formadas.

6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram: Ácido 5-aminosalicílico, o-aminofenol, Iodoctano, Ácido Esteárico, N,N-diciclohexilcarbodiimida, 4-dimetilaminopiridina, N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreto, Cloreto de Tionila, Trietilamina, Ácido Oléico (Sigma-Adrich). Carbonato de potássio e Bicarbonato de sódio (Vetec). Sílica-gel 60 (Merck). Os solventes utilizados foram: Ácido Polifosfórico, 2-butanona, Hexano, Diclorometano, Água deionizada. Os lipídeos L- α -fosfatidilcolina (de ovo de galinha), 1,2-dipalmitoil-glicero-3-fosfatidilcolina, 1,2-dioleoil-glicero-3-fosfatidilcolina são da marca Avanti.

Todas as análises foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os equipamentos utilizados foram:

Ressonância Magnética Nuclear: as análises de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foram realizadas no espectrômetro Varian Inova. Os espectros de hidrogênio foram obtidos a 300 MHz e os de carbono a 75,5 MHz. Foram utilizados tubos de 5 mm de diâmetro interno. Os solventes utilizados foram CDCl_3 e $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$.

Absorção no infravermelho: Espectrômetro de Infravermelho (FTIR) Varian 640-IR, em pastilhas de KBr.

Absorção no UV-Vis em solução: Espectrômetro Shimadzu UV-2450.

Emissão de Fluorescência: Espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC. As análises foram feitas em solução utilizando os comprimentos de onda do máximo de absorção como comprimento de onda de excitação para as medidas de fluorescência.

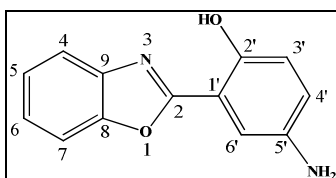
Análise Elementar de CHN: Perkin Elmer 2400.

Ultrassom: Thornton T14.

6.2 SÍNTESE DO 2-(5'-AMINO-2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL (3)

Em um balão monotubulado de fundo redondo, adicionou-se 3,56 g de ácido 5-aminosalicílico (**1**) (32,6 mmol) em 25 mL de ácido polifosfórico. A temperatura reacional foi elevada a 90°C, sob agitação, e depois que **1** solubilizou completamente adicionou-se 5 g de o-aminofenol (**2**) (32,6 mmol) e elevou-se a temperatura a 190°C, onde permaneceu, sob agitação, por 5 horas. Ao término da reação, deixou-se esfriar a temperatura ambiente e o bruto reacional foi vertido sob 900 mL de gelo picado/água,

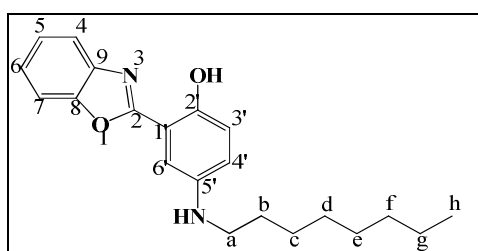
sob agitação. O bruto reacional ficou precipitando durante uma noite. Foi filtrado e neutralizado dando origem a um sólido de coloração verde-escuro. O sólido foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica-gel como fase estacionária e diclorometano como eluente. Foram obtidos 5,9 g (2,6 mmol, 80% rend.) do produto **3** (sólido amarelo-claro).



Ponto de Fusão: 174-175 °C. Análise elementar calculado para $C_{13}H_{10}N_2O_2$: C 69,02%; H 4,46%; N 12,38%. Encontrado: C 69,06%; H 4,56%; N 12,06%. \underline{IV} (KBr, cm^{-1}): 3410 (ν_{as} NH_2), 3330 (ν_s NH_2), 1630 e 1545 (ν_{arom} $C=C$). \underline{RMN} de 1H ($CDCl_3$, 300 MHz, δ em ppm): 10,94 (s, 1H, OH); 7,75-7,67 (m, 1H, $H_{3'}$); 7,63-7,55 (m, 1H, $H_{4'}$); 7,4-7,32 (m, 2H, H_5 - H_6); 7,24-7,19 (m, 1H, $H_{6'}$); 7,01-6,95 (m, 1H, H_7); 6,83-6,76 (m, 1H, H_6); 3,54 (s largo, 2H, NH_2).

6.3 SÍNTESE DO 2-(5'-OCTILAMINO-2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL (**5**)

Em um balão monotubulado de fundo redondo, adicionou-se 500 mg do precursor **3** (2,21 mmol) e 0,4 mL de iodooctano (**4**) (2,21 mmol, $d = 1,33$ g/mL) em 15 mL de 2-butanona. A reação permaneceu em refluxo, sob agitação, durante 24 horas. O solvente foi removido e adicionou-se hexano no bruto reacional, deixando-se agitar por alguns minutos, a parte solúvel foi removida e seca. A parte não solúvel foi descartada. O sólido obtido após secagem foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica-gel como fase estacionária e diclorometano como eluente. Foram obtidos 260 mg (0,77 mmol, 35% rend.) do produto **5** (sólido amarelo-escuro).



Análise elementar calculado para $C_{21}H_{26}N_2O_2$: C 74,52%; H 7,74%; N 8,28%. Encontrado: C 73,85%; H 7,57%; N 8,15%. **IV** (KBr, cm^{-1}): 3440 (v OH), 3400 (v NH), 2930 (v_{ass} C-H), 2840 (v_s C-H). RMN de 1H ($CDCl_3$, 300 MHz, δ em ppm): 10,89 (s, 1H, OH); 7,75-7,67 (m, 1H, $H_{3'}$); 7,63-7,55(m, 1H, $H_{4'}$); 7,4-7,32 (m, 2H, H_5, H_6); 7,24-7,19 (m, 1H, $H_{6'}$); 7,01-6,95 (m, 1H, H_7); 6,83-6,76 (m, 1H, H_6); 3,14 (t, 2H, H_a); 2,84 (s largo, 1H, NH); 1,64 (m, 3H, H_b); 1,34 (m, 8H, H_c-H_g); 0,89(t, 3H, H_h).

6.4 SÍNTESE DO 2-(5'-ESTEARAMIDA-2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL (7)

6.4.1 DCC como reagente de acoplamento

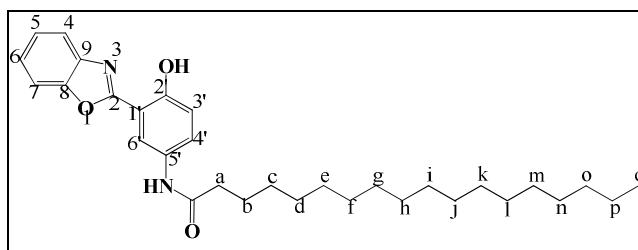
Em um balão bitubulado de fundo redondo, adicionou-se 0,5 g de ácido esteárico (**6**) (1,76 mmol), 0,44 g de N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (2,13 mmol) e 20 mg de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (quantidade catalítica) em 30 mL de diclorometano seco. A reação permaneceu a temperatura ambiente, sob agitação, em atmosfera de argônio durante 3 horas. Após, adicionou-se 400 mg do precursor **3** (1,76 mmol) e deixou-se a reação durante a noite. Filtrou-se, descartando-se o sólido e lavou-se a solução com o produto com água (4x50 mL) e com solução saturada de $NaHCO_3$ (4x50 mL). Purificou-se por cromatografia em coluna utilizando sílica-gel como fase estacionária e diclorometano como eluente. O produto final foi caracterizado por RMN- 1H e através da análise dos espectros, conclui-se que havia impurezas. Apesar de diferentes tentativas de purificação, nenhuma delas obteve sucesso.

6.4.2 APF como reagente

Em um balão monotubulado de fundo redondo, adicionou-se 0,63 g de ácido esteárico (2,21 mmol), 0,5 g do precursor **3** (2,21 mmol) e 15 mL de ácido polifosfórico. A reação permaneceu sob agitação, a $180^\circ C$, durante 5 horas. Após o término da reação, foi resfriada a temperatura ambiente e vertida em 500 mL de gelo picado/água, onde permaneceu precipitando durante a noite. Filtrou-se e neutralizou-se o sólido. Após a neutralização, analisou-se o bruto por cromatografia em camada delgada, onde foi constatado que não houve formação do produto.

6.4.3 EDCI como reagente de acoplamento

Em um balão bitubulado de fundo redondo, adicionou-se 0,63 g de ácido esteárico (**6**) (2,21 mmol), 0,43 g de *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDCI) (2,21 mmol) e 20 mg de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (quantidade catalítica) em 30 mL de diclorometano seco. A reação permaneceu a temperatura ambiente, sob agitação, em atmosfera de argônio durante 3 horas. Após, adicionou-se 500 mg do precursor **3** (2,21 mmol) e deixou-se a reação durante a noite. Filtrou-se e purificou-se o precipitado através de dissolução em água, o produto é insolúvel em água, porém as impurezas são solúveis. Dessa forma, adicionou-se água ao sólido e utilizando um ultrassom e macerando o produto, obteve-se uma suspensão do produto com as impurezas em solução. Após filtração, obteve-se 440 mg (0,89 mmol, 50% rend.) do produto **7** puro (sólido branco).



Análise elementar calculado para $C_{31}H_{44}N_2O_3$: C 75,57%; H 9,00%; N 5,59%. Encontrado: C 74,04%; H 8,67%; N 5,67%. \underline{IV} (KBr, cm^{-1}): 3295 (ν_{NH}), 2921 (ν_{ass} C-H), 2853 (ν_s C-H), 1648 (ν C=O), 1540 e 1470 (ν_{arom} C=C) e 1256 (ν C-N). \underline{RMN} de 1H (ATF-d, 300 MHz, δ em ppm): 11,66 (s, 1H, OH); 8,87 (s, 1H, NH), 8,21-8,10 (m, 2H, $H_{3'}$, $H_{4'}$); 8,07-7,92 (m, 4H, H_4 , H_5 , H_6 , H_7); 7,62-7,54 (m, 1H, $H_{6'}$); 2,89 (t, 2H, H_a), 2,09 (m, 2H, H_b), 1,78-1,41 (m, 28H, H_c - H_p), 1,09 (t, 2H, H_q).

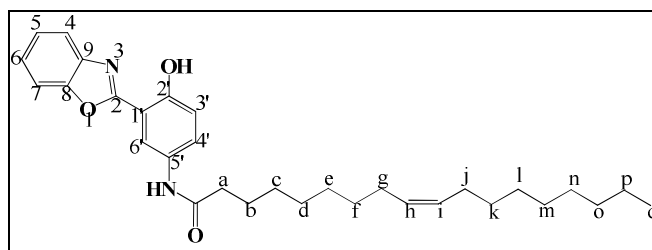
6.4.4 Utilizando Cloreto de Tionila

Em um balão monotubulado de fundo redondo, adicionou-se 0,5 g de ácido esteárico (1,76 mmol) e 0,5 mL de cloreto de tionila (6,85 mmol). A reação permaneceu, em agitação, sob refluxo por 6 horas. O excesso de cloreto de tionila foi eliminado abrindo o sistema e deixando evaporar, resultando em um óleo alaranjado. Adicionou-se uma solução de 0,4 g de **3** (1,76 mmol) e 200 μ L de NEt_3 em 20 mL de diclorometano e a reação prosseguiu durante a noite. O produto, que precipitou durante a reação foi filtrado. Obteve-se 175 mg (0,35 mmol, 20% rend.) do produto **7** puro.

A descrição espectroscópica foi descrita anteriormente no item 5.3.3.

6.5 SÍNTESE DO 2-(5'-OLEAMIDA-2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL (8)

Em um balão bitubulado de fundo redondo, adicionou-se 0,56 mL de ácido oleico (8) (1,76 mmol, $d = 0,893$), 0,44 g de N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (2,13 mmol) e 20 mg de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (quantidade catalítica) em 30 mL de diclorometano seco. A reação permaneceu a temperatura ambiente, sob agitação, em atmosfera de argônio durante 3 horas. Após, adicionou-se 400 mg do precursor 3 (1,76 mmol) e deixou-se a reação durante a noite. Filtrou-se, descartando-se o sólido e lavou-se a solução com o produto com água (4x50 mL). Purificou-se por cromatografia em coluna utilizando sílica-gel como fase estacionária e diclorometano como eluente. Foram obtidos 430 mg (0,88 mmol, 50% rend.) do produto 9 (sólido branco).



Análise elementar calculado para $C_{31}H_{42}N_2O_3$: C 75,88%; H 8,63%; N 5,71%. Encontrado: C 76,34%; H 9,33%; N 5,93%. \underline{IV} (KBr, cm^{-1}): 3281 (ν_{NH}), 2921 ($\nu_{ass\ C-H}$), 2853 ($\nu_s\ C-H$), 1709 ($\nu_{alif.\ C=C}$), 1648 ($\nu\ C=O$), 1531 e 1451 ($\nu_{arom\ C=C}$) e 1250 ($\nu\ C-N$). RMN de 1H ($CDCl_3$, 300 MHz, δ em ppm): 11,31 (s, 1H, OH); 8,35 (s, 1H, NH), 7,73-7,66 (m, 1H, $H_{3'}$); 7,60-7,53 (m, 1H, $H_{4'}$); 7,47-7,32 (m, 4H, H_4, H_5, H_6, H_7); 7,08-7,02 (m, 1H, $H_{6'}$); 5,34 (t, 2H, H_h, H_i); 2,39 (t, 2H, H_a); 2,00 (t, 2H, H_h, H_i); 1,76 (quintopletto, 2H, H_b); 1,32 (m, 25H, H_c-H_f e H_j-H_p) e 0,88 (t, 3H, H_q);

6.6 OBTENÇÃO DOS LIPOSSOMAS LIPÍDICOS

Foram obtidos três lipossomas diferentes, a partir de três lipídeos, o L- α -phosphatidylcholine (Egg, Chicken), o 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine e o 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (cis). Para isso, pesou-se, em um balão monotubulado, 50-60 mg de um dos lipídeos e adicionou-se a solução do corante em clorofórmio. Após a solubilização completa do lipídeo, evaporou-se o solvente para formar um filme do lipídeo nas paredes do balão e adicionou-se 4 mL de H_2O

deionizada. O balão permaneceu por 30 min no ultrassom para a formação dos lipossomas.

7. REFERÊNCIAS

Clawson, R.; Dacko, C. A.; Deavers, R. E.; Akhmedov, N. G.; Soderberg, B. Attempted synthesis of 3-hydroxy-2-octadecylindole. Proposed structural revision of previously prepared 3-hydroxy-2-octadecylindole and a propose structure of fistolusin. **Tetrahedron**, V. 65, p. 8786-8793, 2009.

Deraeve, D.; Dorobantu, I. M.; Rebbah, F.; Quéméner, F.; Constant, P.; Quémard, A.; Bernardes-Génisson, V.; Bernadou, J.; Pratviel, G. Chemical synthesis, biological evaluation na structure activity relationship analysis of azaisoindolinones, a novel class of direct enoyl-ACP reductase inhibitors as potencial antimycobacterial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, V. 19, p. 6225-6232, 2011.

Fang, J.; Whitaker, C.; Weslovsky, B.; Chen, M.; Naciri, J.; Shashidar, R. Synthesis and Photodimerization in self-assembled monolayers of 7-(8-trimethosysilyloctyloxy)coumarin. **Journal Materials Chemistry**, V. 11, p. 2992-2995, 2001.

Green, M.; Thorp, D. The mechanism of reaction of phosphorus pentachloride and thionyl chloride with carboxylic esters. **Journal Chemical Society**, V.7, 1067-1068, 1967.

Hein, D.; Alheim, R.; Leavitt, J. The use of polyphosphoric acid in synthesis of 2-aryl- and 2-alkyl substituted benzimidazoles, benzoxazoles and benzothiazoles. **Journal of the American Chemical Society**, V. 79, n.2, p. 427-429, 1957.

Homberg, K.; Jonsson, B. Surfactants and polymers in aqueous solution. 2nd Ed., USA, John Wiley and Sons, 2002.

Hung-So; Y.; Heeschen, J.; Mechanism of Polyphosphoric acid and Phosphorus Masu, H.; Okamoto, T.; Kato, T.; Katagiri, K.; Tominaga, M.; Goda, H.; Takayanagi, H.; Azumaya, I. Construction of macrocyclic structure using conformation properties of secondary and terciary aromatic amides. **Tetrahedron Letters**, V.47, p. 803-807, 2006.

Imabeppu, F.; Katagiri, K.; Masu, H.; Kato, T.; Tominaga, M.; Therrien, B.; Takayanagi, H.; Kaji, E.; Yamagushi, K.; Kageshika, H.; Azumaya, I. Calix[3]amides-bowl-shaped cyclic trimers toward building block for molecular recognition: self-colplementary dimeric structure in the crystal. **Tetrahedron Letters**, V. 47, p. 413-416, 2006.

Lacowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3th Ed., USA, Springer, 2006.

Lehninger, A. Principles of Biochemistry, 4^o Ed., USA, Sarvier, 2006.

Nishiya, T.; Yamauchi, S.; Hirota, N.; Baba M.; Hanazaki. I.; Fluorescence studies of te intramolecular hydrogen-bonded molecules o-hydroxyacetophenone and salicylamide and related molecules. **Journal Physical Chemistry**, V. 90, p. 5730-5735, 1986.

Owen, T., Fundamentals of UV-Visible Spectroscopy, 2nd Ed., USA, Agilent Technologies, 2000.

Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz G. S.; VyVyan, J. R. Introdução à Espectroscopia, Trad. 4^a Ed., BR, Centage Learning, 2010.

Pentoxide-Methanesulphonic Acid as Synthetic reagents for Benzoxazole Formation. **Journal of Organic Chemistry**, V. 62, p. 3552-3561 ,1997.

Raimundo, J.M.; Blanchard, P.; Gallego-Planas, N.; Mercier, N.; Ledoux-Rak, I.; Hierle, R.; Roncalli, J. Design and synthesis of Push-Pull Chromophores for Second Order Nonlinear Optics Derived from Rigidified Thiophene-Based π -Conjugating Spacers. **Journal of Organic Chemistry**, V. 67, p. 205-218, 2002.

Sari, A.; Eroglu, R.; Biçer, A.; Karaipleki, A. Synthesis and thermal energy storage properties of erythritol tetrastearate and erythritol tetrapalmitate. **Chemical Engineering Technology**, V.34, n. 1, p. 87-92, 2011.

Sheikh, C.; Takagi, S.; Yoshimura, T.; Morita, H.; Mechanistic studies of DCC/HOBt-mediated reaction of 3phenylpropionic acid with benzyl alcohol and studies on the reactivities of ‘active esters’ and a related derivatives with nucleophiles. **Tetrahedron**, V. 66, 7272-7278, 2010.

Snyder, H.; Elston, C. Polyphosphoric acid as a reagent in organic chemistry. **Journal of American Chemical Society**, V. 77, p. 364-366, 1995.

So, Y.; Heeschen, J. Mechanism of Polyphosphoric acid and Phosphorous pentoxide-Methanesulfonic acid as synthetic reagents for benzoxazole formation. **Journal of Organic Chemistry**, V.62, p. 3552-3561, 1997.

8. APÊNDICE

Figura A1: Espectro de ^1H -RMN (300MHz, CDCl_3) do composto **5**.

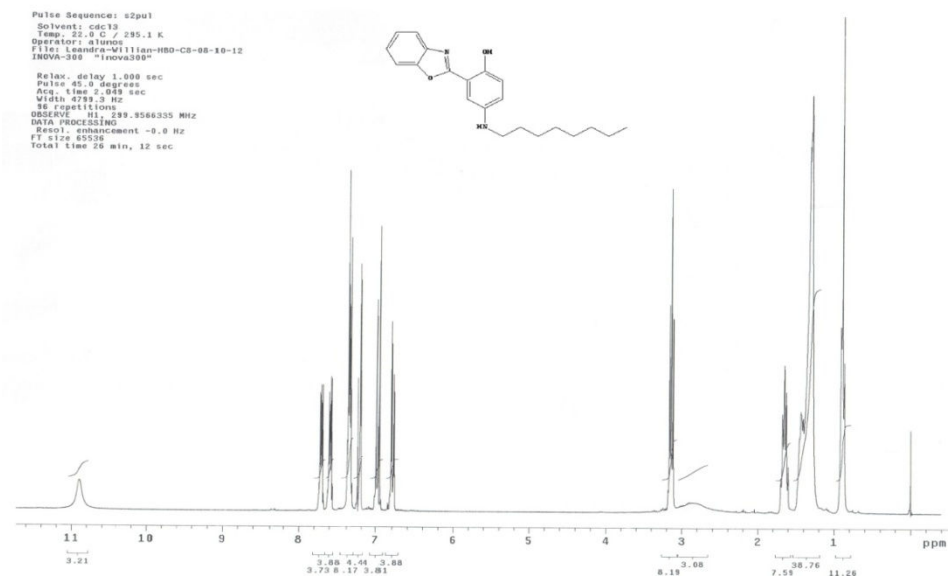


Figura A2: Espectro de ^{13}C -RMN (75MHz, CDCl_3) do composto **5**.

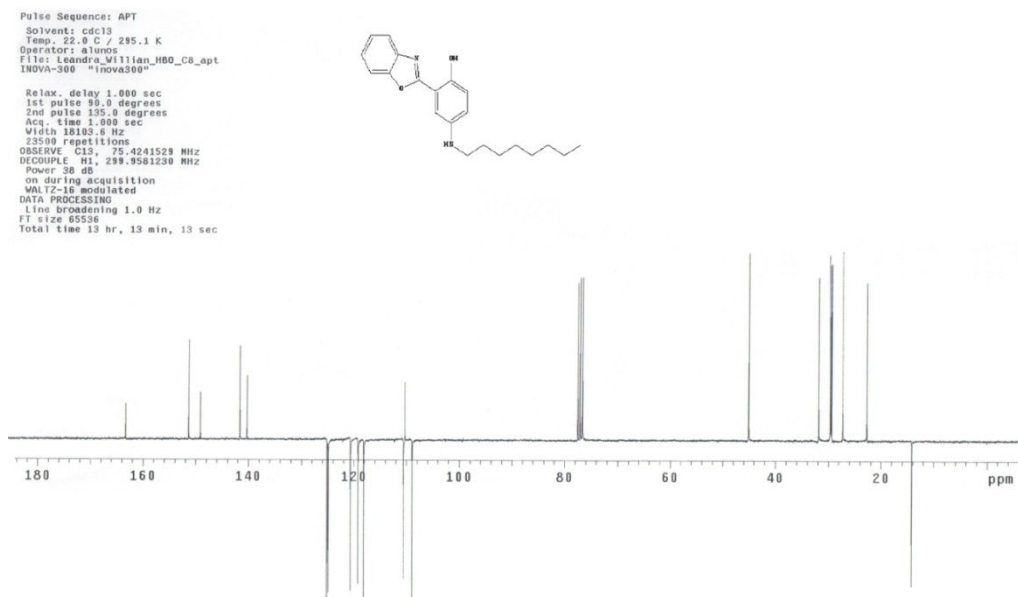


Figura A3: Espectro de ^1H -RMN (300MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$) do composto **7**.

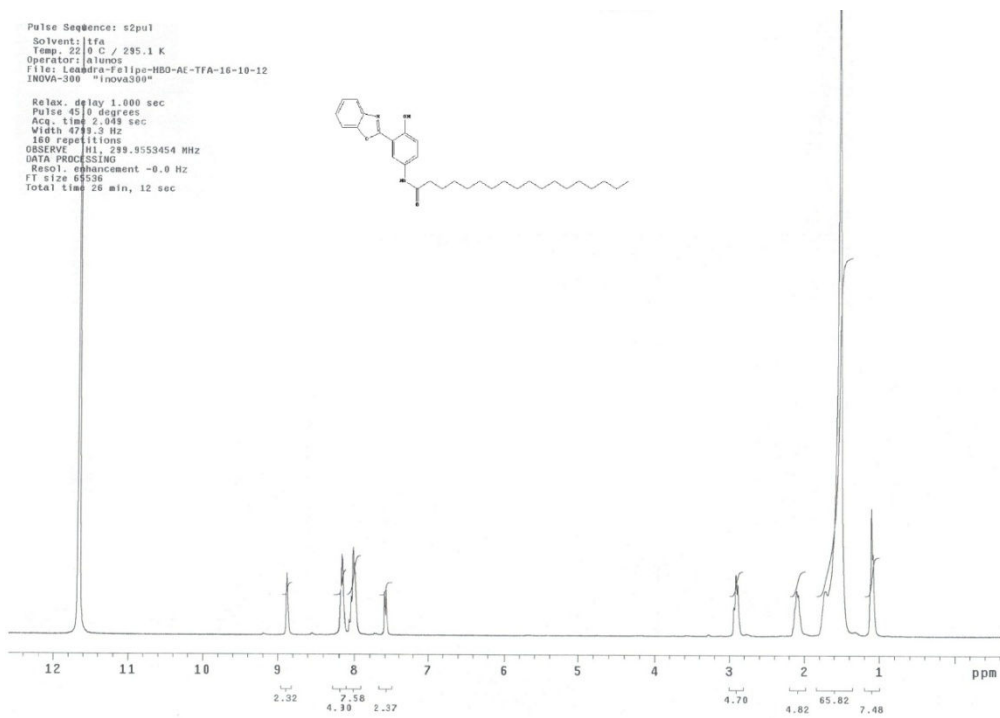


Figura A4: Espectro de ^{13}C -RMN (75MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$) do composto **7**.

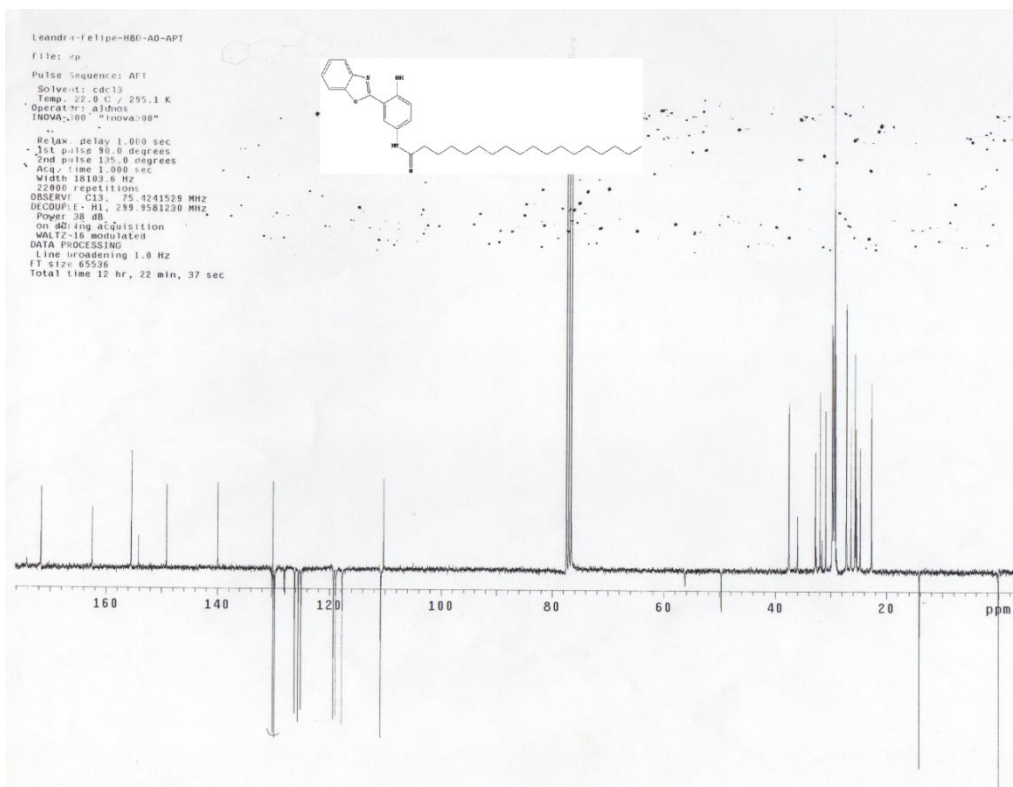


Figura A5: Espectro de ^1H -RMN (300MHz, CDCl_3) do composto **8**.

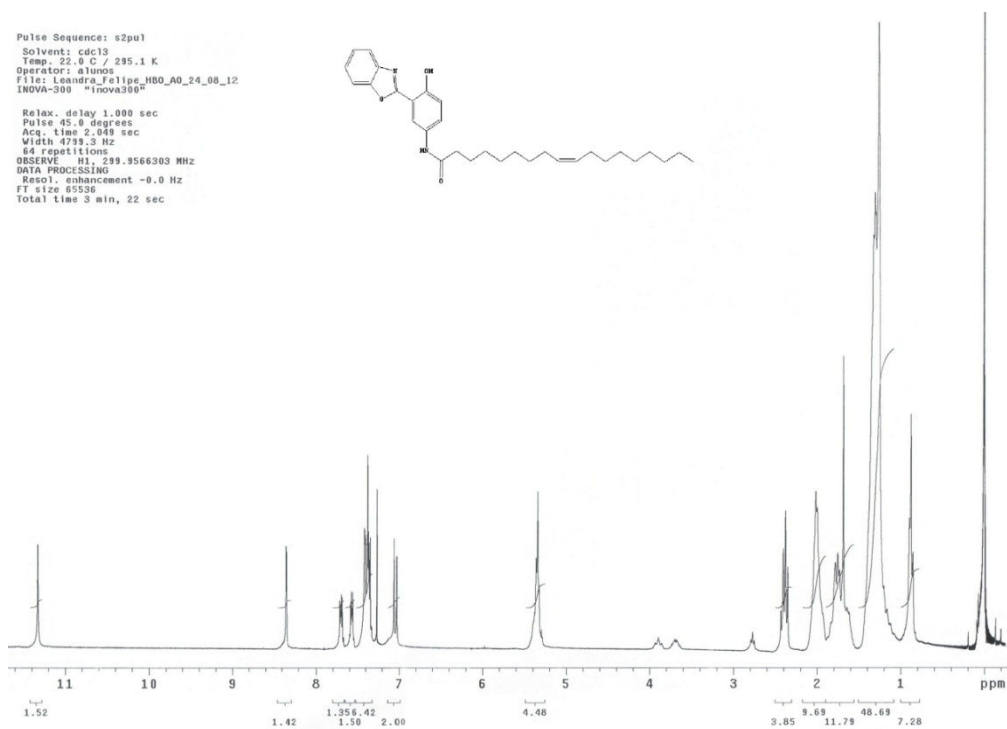


Figura A6: Espectro de ^{13}C -RMN (75MHz, CDCl_3) do composto **8**.

