

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

**PRISCILA FRANKEN DICK**  
Bacharel em Química

**SÍNTESE E ESTUDO FOTOFÍSICO DE MARCADORES MOLECULARES**  
**FLUORESCENTES PARA BICAMADAS LIPÍDICAS**

Prof. Dra. Leandra Franciscato Campo  
Orientadora

Porto Alegre, 2012

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

**PRISCILA FRANKEN DICK**  
Bacharel em Química

**SÍNTESE E ESTUDO FOTOFÍSICO DE MARCADORES MOLECULARES**  
**FLUORESCENTES PARA BICAMADAS LIPÍDICAS**

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

Prof. Dra. Leandra Franciscato Campo  
Orientadora

Porto Alegre, 2012

A presente dissertação foi realizada pela autora, com o auxílio do aluno de Iniciação Científica Felipe Lange Coelho, no período entre Agosto de 2010 e Agosto de 2012, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação da Professora Doutora Leandra Franciscato Campo.

A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**

**Orientadora:**

  
Prof.ª. Dra. Leandra Franciscato Campo  
Instituto de Química  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Comissão Examinadora:**

  
Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca  
Instituto de Química  
Universidade Federal do Rio Grande

  
Prof. Dr. Valter Stefani  
Instituto de Química  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

  
Prof. Dr. Aloir Antonio Merlo  
Instituto de Química  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

“O que não dá prazer não dá proveito. Em  
resumo, senhor, estude apenas o que lhe  
agradar.”

William Shakespeare

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de uma forma ou outra tornaram este momento possível, em especial aos familiares.

Agradeço aos amigos, aos colegas de laboratório, aos professores, em especial à Professora Leandra Campo, ao Instituto de Química, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao CNPq.

A todos,o meu MUITO OBRIGADA.

## TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. Síntese de benzazóis lipofílicos fluorescentes para estudos em membranas modelo.  
XXIII Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. Publicado no livro de resumos.
2. Dick, P. F. ; Stefani, V.; Rodembusch, F.S.; da Silveira, N. P.; Micheletto, Y. M. S.; Campo, L. F. *Lipophilic Fluorescent Dye Evaluated as Probe for Phosphatidylcholine Liposome*. In: Third French Brazilian Meeting on Polymers - FBPOL2011, 2011, Florianópolis. Book of Abstracts, 2011.

## RESUMO

Este trabalho apresenta a síntese, caracterização e estudo fotofísico de novos heterociclos benzazólicos fluorescentes com potencial aplicação como sondas de ambientes lipídicos. Para isso, foram sintetizados três corantes que contêm em sua estrutura cadeias alquílicas de oito, doze e dezoito átomos de carbono ligados a um núcleo benzazólico que é o responsável pela fluorescência destes compostos. O corante que possui a cadeia alquílica de dezoito carbonos apresenta-se ainda na forma de um sal de amônio quaternário, com o objetivo de tornar a sua estrutura mais anfifílica do que os seus análogos neutros de oito e doze carbonos, e com isso, promover a interação entre meios que apresentam polaridade diferente como, por exemplo, água e membrana.

A obtenção dos derivados contendo oito e doze carbonos foi realizada a partir da reação de substituição nucleofílica entre o heterociclo 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol e os respectivos iodoalcanos em presença de uma base, com rendimentos na faixa de 45%. O derivado com dezoito carbonos foi obtido em duas etapas, sendo a primeira a reação entre o 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol e a epiclorigrina para formar o intermediário 2-(5'(N-3-cloro-2-hidroxipropilamina)-2'-hidroxifenil)benzoxazol. A reação deste intermediário com a *N,N*-dimetiloctadecilamina levou a formação do corante na forma de sal de amônio quaternário com 68% de rendimento. Os corantes foram caracterizados por Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono, Análise Elementar e ponto de fusão, além da caracterização fotofísica.

O estudo fotofísico do sistema fosfatidilcolina/corante mostrou que os corantes sofrem a influência do meio lipídico, bem como a afinidade do corante quaternizado pelo sistema lipídico diferencia-se dos corantes neutros. Além disso, os corantes com cadeias alquílicas de oito e doze átomos de carbono se mostraram sondas mais eficientes para meios apolares ou polares apróticos e são liberados para o meio com o aumento da diluição do sistema. Já o corante com cadeia alquílica de dezoito átomos de carbono apresentou maior afinidade com o ambiente hidrofílico do sistema lipídico, ficando incorporado na bicamada lipídica, mesmo com o aumento da diluição.

Palavras-chave: ESIPT, Lipossoma, Fosfatidilcolina, Benzoxazol.

## ABSTRACT

This work presents the synthesis, characterization and photophysical study of new fluorescent benzazólicos heterocycles with potential application as probes of lipid environments. For this, three dyes were synthesized containing alkyl chains in the structure of eight, twelve and eighteen carbon atoms attached to a core benzazólico which is responsible for the fluorescence of these compounds. The dye that has the alkyl chain of eighteen carbons still presents as a quaternary ammonium salt, with the goal of making its structure more amphiphilic than their neutral analogues of eight and twelve carbons, and thereby promote the interaction means that present different polarity, for example, water and membrane.

The obtaining of derivatives containing eight twelve carbons was made from the nucleophilic substitution reaction between the heterocycle 2-(5'-amino-2'-hydroxyphenyl) benzoxazole and its iodoalcanos in the presence of a base, with yields around 45%. The derivative eighteen carbons was obtained in two steps, the first being the reaction between 2-(5'-amino-2'-hydroxyphenyl) benzoxazole and epichlorohydrin to form the intermediate 2-(5'(*N*-3-chloro-2-hydroxypropylamine)-2'-hydroxyphenyl) benzoxazole. The reaction of this intermediate with *N,N*-dimetiloctadecilamina led to the formation of the desired compound quaternised 68% yield. The compounds were characterized by infrared, nuclear magnetic resonance of hydrogen and carbon, elemental analysis and melting point, besides the characterization photophysics.

The photophysical study of the phosphatidylcholine/dye system showed that the dyes suffer the influence of the lipid and affinity of the dye quaternized by the system differs from dyes that show no load. In addition, the neutral dyes with alkyl chains content eight and twelve carbon atoms, proved most interesting probes for apolar media or polar aprotic media and are released into the medium with increasing dilution of the system. Already the derivative with eighteen carbon atoms and having quaternary nitrogen showed higher affinity for hydrophilic environment lipid system, becoming incorporated into the lipid bilayer, even with increased dilution.

Key-word: ESIPT, Liposome, Phosphatidilcholine, Benzoxazole .

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVEATURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	5
3.1. FOTOFÍSICA.....	5
3.1.1. Luminescência e Fotoluminescência.....	5
3.1.2. Espectros de Absorção e Emissão.....	5
3.1.3. Efeito do Solvente na Fotofísica.....	7
3.1.4. Transferência Protônica Intramolecular no Estado Eletrônico Excitado - ESIPT.....	8
3.1.5. Efeito do Solvente na ESIPT.....	9
3.2. HETEROCICLOS BENZAZÓLICOS.....	10
3.3. LIPOSSOMAS.....	11
3.3.1. Estruturação dos Lipossomas.....	12
3.4. ETOSSOMAS.....	13
4. EXPERIMENTAL.....	15
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.2. SÍNTESE DOS CORANTES FLUORESCENTES.....	15
4.2.1. Síntese do 2-(5'-Amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol ( <b>3</b> ).....	16
4.2.2. Síntese do 2-(5'-( <i>N</i> -3-Cloro-2-hidroxiopropilamino)-2'-hidroxifenil)benzoxazol ( <b>4</b> ).....	17
4.2.3. Síntese do <i>N</i> -(3-((3-(Benzoxazol-2-il)-4-hidroxifenilamino)-2-hidroxiopropil)- <i>N,N</i> -dimetil-1-octadecanoamônio ( <b>5</b> )).....	17
4.2.4. Síntese do 2-(5'- <i>N</i> -Octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol ( <b>6</b> ).....	18
4.2.5. Síntese do 2-(5'- <i>N</i> -Dodecilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol ( <b>7</b> ).....	19
4.3. PURIFICAÇÃO DA LECITINA DE SOJA.....	20
4.4. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	20
4.5. PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO OS CORANTES <b>5-7</b> .....	21
4.6. PREPARAÇÃO DE ETOSSOMAS CONTENDO OS CORANTES <b>5-7</b> .....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS CORANTES FLUORESCENTES.....	23

5.1.1. Purificação da Fosfatidilcolina.....	36
5.2. ESTUDO FOTOFÍSICO.....	37
5.2.1. Influência da polaridade do solvente na fotofísica dos corantes <b>5-7</b> .....	37
5.2.2. Estudo fotofísico dos corantes <b>5-7</b> em lipossomas de fosfatidilcolina.....	45
5.2.3. Avaliação do efeito de filtro interno na fotofísica dos corantes <b>5-7</b> em etossomas de fosfatidilcolina.....	49
5.2.4. Medidas fotofísicas dos corantes <b>5-7</b> inseridos em etossomas de fosfatidilcolina.....	52
5.2.5. Polaridade do sistema corante-bicamada fosfolipídica em etossomas de fosfatidilcolina.....	56
5.2.6. Localização dos corantes fluorescentes em bicamadas fosfolipídicas dos etossomas.....	57
5.2.7. Microscopia Óptica e Confocal.....	60
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8. ANEXOS	

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da preparação de vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV). (Adaptado de www.avantilipids.com).....	2
<b>Figura 2.</b> Estrutura do (a) 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol e da (b) fosfatidilcolina isolada da lecitina de soja. ....	3
<b>Figura 3.</b> Esquema hipotético de níveis de energia mostrando os processos de absorção e de fluorescência e os correspondentes espectros. <sup>17</sup> .....	7
<b>Figura 4.</b> Deslocamento batocrômico e hipsocrômico do estado fundamental e excitado.....	8
<b>Figura 5.</b> Representação do fotociclo ES IPT.....	9
<b>Figura 6.</b> Possíveis geometrias da forma enol em solução.....	10
<b>Figura 7.</b> Estrutura dos compostos benzazólicos.....	11
<b>Figura 8.</b> Representação de possíveis formas de moléculas anfifílicas relacionadas com a simetria estrutural e respectivas fases mais prováveis de estruturas coloidais. <sup>26</sup> .....	13
<b>Figura 9.</b> Estrutura genérica das estruturas de uma serina, colina e inositol.....	13
<b>Figura 10.</b> Ação do etanol sobre a bicamada lipídica.....	14
<b>Figura 11.</b> Esquema de síntese dos compostos <b>3-7</b> .....	16
<b>Figura 12.</b> Foto da suspensão de lipossoma de fosfatidilcolina obtida da lecitina de soja.....	21
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do precursor ( <b>4</b> ).....	23
<b>Figura 14.</b> Expansão da região dos hidrogênios alifáticos do espectro apresentado na Figura 13.....	24
<b>Figura 15.</b> Espectro RMN de APT (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do precursor ( <b>4</b> ).....	25
<b>Figura 16.</b> HMQC do corante <b>4</b> em CDCl <sub>3</sub> .....	26
<b>Figura 17.</b> Expansão da região alifática do HMQC para o corante <b>4</b> em CDCl <sub>3</sub> .....	27
<b>Figura 18.</b> Expansão da região aromática do HMQC para o corante <b>4</b> em CDCl <sub>3</sub> .....	28
<b>Figura 19.</b> Espectro no infravermelho do corante <b>5</b> .....	29
<b>Figura 20.</b> Espectro no infravermelho da <i>N,N</i> -dimetiloctadecilamina.....	29
<b>Figura 21.</b> Espectro no infravermelho do cloreto de <i>N,N,N</i> -trimetiloctadecilamínio.....	30
<b>Figura 22.</b> Espectro RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do corante ( <b>5</b> ).....	31
<b>Figura 23.</b> Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H para a região dos hidrogênios alifáticos do corante <b>5</b> .....	31
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN de APT (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do corante <b>5</b> .....	32
<b>Figura 25.</b> Espectro no Infravermelho para o corante <b>6</b> .....	33
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do corante <b>6</b> .....	34
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN APT (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do corante <b>6</b> .....	35
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da lecitina de soja. ....	36
<b>Figura 29.</b> Espectros de absorção e emissão do corante <b>5</b> em diferentes solventes na concentração de	

10 <sup>-6</sup> mol/L.....	38
<b>Figura 30.</b> Espectros de absorção e emissão do corante <b>5</b> em diferentes solventes na concentração de 10 <sup>-5</sup> mol/L.....	38
<b>Figura 31.</b> Espectros de absorção e emissão do corante <b>5</b> em diferentes solventes na concentração de 10 <sup>-4</sup> mol/L.....	39
<b>Figura 32.</b> Espectros de absorção na região do UV-Vis e emissão de fluorescência do corante <b>6</b> em diferentes solventes na concentração de 10 <sup>-6</sup> mol/L.....	40
<b>Figura 33.</b> Espectros de absorção na região do UV-Vis e emissão de fluorescência do corante <b>6</b> em diferentes solventes na concentração de 10 <sup>-5</sup> mol/L.....	41
<b>Figura 34.</b> Espectros de absorção na região do UV-Vis e emissão de fluorescência do corante <b>6</b> em diferentes solventes na concentração de 10 <sup>-4</sup> mol/L.....	41
<b>Figura 35.</b> Espectros de absorção e emissão do corante <b>7</b> em diferentes solventes na concentração de 10 <sup>-6</sup> mol/L.....	42
<b>Figura 36.</b> Espectros de absorção e emissão do corante <b>7</b> em diferentes solventes na concentração de 10 <sup>-5</sup> mol/L.....	43
<b>Figura 37.</b> Espectros de absorção e emissão do corante <b>7</b> em diferentes solventes na concentração de 10 <sup>-4</sup> mol/L.....	44
<b>Figura 38.</b> Espectro no UV-Vis para os corantes <b>5-7</b> em solução de lipossoma.....	46
<b>Figura 39.</b> Espectros emissão do corante <b>5</b> em etanol, clorofórmio, 1,4-dioxano e em solução de lipossoma na concentração de 10 <sup>-5</sup> mol/L.....	47
<b>Figura 40.</b> Espectros emissão do corante <b>6</b> 1,4-dioxano, etanol e em solução de lipossoma na concentração de 10 <sup>-5</sup> mol/L.....	47
<b>Figura 41.</b> Espectros emissão do corante <b>7</b> em 1,4-dioxano, etanol e em solução de lipossoma na concentração de 10 <sup>-5</sup> mol/L.....	48
<b>Figura 42.</b> Ilustração de uma cubeta convencional quadrada (a); cubeta triangular (b) e cubeta com inclinação de 45°(c).....	50
<b>Figura 43.</b> Espectro de fluorescência normalizado para uma amostra de petróleo cru. Curva sólida em um recipiente de superfície frontal. Curva sublinhada em cubeta quadrada (ângulo de 90°).....	50
<b>Figura 44.</b> Espectro de fluorescência para o corante <b>5</b> em cubeta quadrada e triangular nas concentrações de 10 <sup>-4</sup> mol /L (esq.) e 10 <sup>-5</sup> mol/L (dir.).....	51
<b>Figura 45.</b> Espectro de fluorescência para o corante <b>6</b> em cubeta quadrada e triangular nas concentrações de 10 <sup>-4</sup> mol /L (esq.) e 10 <sup>-5</sup> mol/L (dir.).....	51
<b>Figura 46.</b> Espectro de fluorescência para o corante <b>7</b> em cubeta quadrada e triangular nas concentrações de 10 <sup>-4</sup> mol /L (esq.) e 10 <sup>-5</sup> mol/L (dir.).....	52
<b>Figura 47.</b> Espectros emissão do corante <b>5</b> em etanol, clorofórmio, 1,4-dioxano e em soluções de etossoma na concentração de 10 <sup>-5</sup> mol/L.....	54
<b>Figura 48.</b> Espectros de emissão do corante <b>6</b> em etanol, 1,4-dioxano e em soluções de etossoma nas concentrações de 10 <sup>-5</sup> mol/L e 10 <sup>-6</sup> mol/L.....	54

<b>Figura 49.</b> Espectros emissão do corante <b>7</b> em 1,4-dioxano e em soluções de etossoma nas concentrações de $10^{-5}$ mol/L e $10^{-6}$ mol/L.....	55
<b>Figura 50.</b> Razão entre as intensidades de fluorescência na troca protônica TP, ou seja, ES IPT, e a banda enol para os corantes <b>5</b> , <b>6</b> e <b>7</b> como função do índice de polaridade empírica ET(30) para os solventes, onde ET(30): 1,4-dioxano = 36,0; Acetato de Etila = 38,5; MeCN = 46,0 e Etanol = 51,9...	56
<b>Figura 51.</b> Espectro de emissão de fluorescência dos corantes <b>5-7</b> com concentração de $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/L em solução de concentração variável de fosfolipídio.....	58
<b>Figura 52.</b> (a) Variação da intensidade de fluorescência ESIP do corante <b>6</b> versus concentração de PC. (b) Curva $1/F$ versus $1/[PC]$ , onde F é a intensidade de fluorescência.....	59
<b>Figura 53.</b> Microscopia óptica dos corantes em meios lipídicos. (a) e (b) corantes em soluções de lipossoma de fosfatidilcolina, (c) corante em soluções de lipossoma de fosfatidilcolina depois de filtrado com filtro de 0,45 mm e (d) corante em soluções de etossomas de fosfatidilcolina.....	60
<b>Figura 54.</b> Microscopia confocal do corante <b>6</b> em lipossomas de fosfatidilcolina (a) sem a excitação por laser e (b) com a excitação de um laser de 422 nm.....	61

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados fotofísicos de absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência nos diferentes solventes para o corante <b>5</b> .....	37
<b>Tabela 2.</b> Dados fotofísicos de absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência nos diferentes solventes para o corante <b>6</b> .....	40
<b>Tabela 3.</b> Dados relevantes da absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência nos diferentes solventes para o corante <b>7</b> .....	43
<b>Tabela 4.</b> Máximos de absorção e emissão para os corantes <b>5, 6 e 7</b> em solução de lipossoma.....	46
<b>Tabela 5.</b> Máximos de absorção e emissão para os corantes <b>5, 6 e 7</b> em solução de etossoma, bem como para o branco.....	53

## LISTA DE ABREVEATURAS

Abs	Absorção
APT	<i>Attached Proton Test</i>
$\varepsilon$	Absortividade Molar
$\lambda$	Comprimento de onda
E <sub>II</sub>	Confômero enol-cis aberto
E <sub>III</sub>	Confômero enol- <i>trans</i>
E <sub>IV</sub>	Confômero enol- <i>trans</i> aberto
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
$\Delta\lambda_{ST}$	Deslocamento de Stokes
$\delta$	Deslocamento químico
*	Estado eletrônico excitado
S <sub>0</sub>	Estado eletrônico fundamental
S <sub>1</sub>	Primeiro Estado eletrônico excitado
K	Forma ceto
K*	Forma ceto excitada
E	Forma enol
E*	Forma enol excitada
°C	Graus Celcius
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
mL	10 <sup>-3</sup> Litros
ppm	Partes por milhão
q	Quadrupletto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
ESIPT	<i>Excited State Intramolecular Proton-Transfer</i>
t	Tripletto
UV-Vis	Ultravioleta-visível

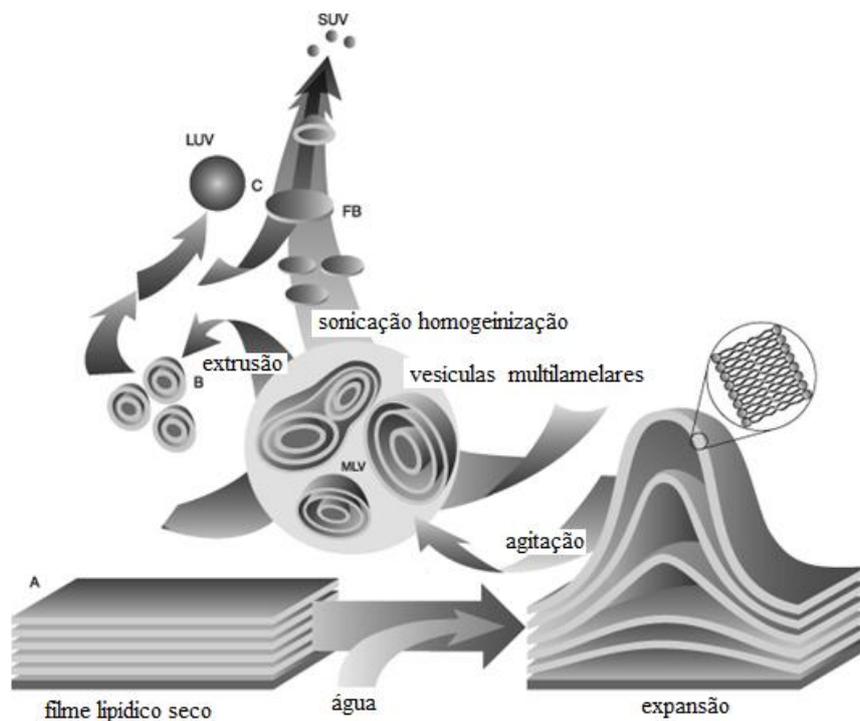
## 1. INTRODUÇÃO

Uma das estruturas de maior importância nas células são as membranas de fosfolipídios, que formam os limites entre os diferentes compartimentos celulares com o meio externo constituindo a membrana celular. Além de atuarem como limitadores ou barreiras, as membranas plasmáticas também participam de funções especializadas como o metabolismo, a sinalização e o reconhecimento celular.<sup>1</sup>

Neste contexto, um dos maiores dilemas em membranologia é entender as razões por trás da diversidade lipídica, ou seja, porque uma membrana contém centenas de espécies lipídicas quando somente uma pequena quantidade seria suficiente para promover a barreira hidrofóbica, carga superficial e fluidez na membrana. Isto evidencia que as membranas não existem sob a forma de uma mistura homogênea de lipídios, proteínas e sacarídeos, mas sim, sob a forma de uma mistura complexa e heterogênea dos mesmos.<sup>2</sup>

Diferentes tipos de modelos membranares compostos de fosfolipídios têm sido utilizados na investigação de membranas celulares. Estes modelos estão divididos em dois tipos: (i) sistemas planares, originados de fosfolipídios na interface ar-água formando uma monocamada em que a combinação de duas monocamadas dá origem a uma bicamada e (ii) sistemas vesiculares, cujos tamanhos variam similarmente aos sistemas biológicos. Quando formadas por mais de uma bicamada, as vesículas são chamadas de vesículas multilamelares (*Multilamellar Vesicles* - MLV), enquanto que quando originadas de uma única bicamada, são chamadas de vesículas unilamelares (*Unilamellar Vesicles* - ULV). O tamanho das vesículas pode variar entre 100 nm e 1 µm, sendo que vesículas unilamelares pequenas (*Small Unilamellar Vesicles* - SUV) estão abaixo de 100 nm, as vesículas unilamelares grandes (*Large Unilamellar Vesicles* - LUV) têm tamanho entre 100 nm e 1 µm e as vesículas gigantes (*Gigants Unilamellar Vesicles* - GUV) possuem tamanhos em torno de 1 µm.<sup>3</sup>

A Figura 1 exemplifica o mecanismo de formação destas vesículas. A letra A representa a fase de preparação para a hidratação que consiste em dissolver o lipídio em um solvente orgânico e por evaporação obter um filme; a letra B representa a fase de hidratação do filme lipídico levando a formação das MLVs que, por etapas de extrusão e sonicação representados pela letra C levam a separação das vesículas por tamanho (LUV e SUV).



**Figura 1.** Representação esquemática da preparação de vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV). (Adaptado de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)).

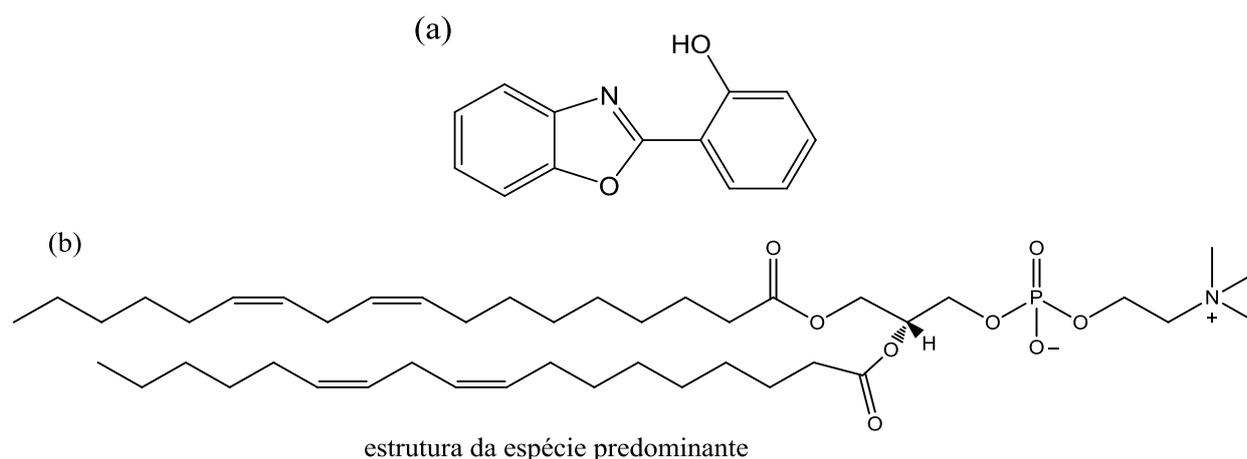
Os modelos membranares de fosfolipídios são chamados de lipossomas quando constituídos por fosfolipídios e água. Uma das variações destes sistemas são os chamados etossomas, que assim se denominam por apresentarem um determinado volume de etanol combinado com a água que pode chegar até 40 %. A principal diferença dos etossomas frente aos lipossomas é a sua maior fluidez, a qual é atribuída à presença do etanol. A maior fluidez dos etossomas faz com que estes sistemas venham sendo bastante utilizados, por exemplo, como carreadores de fármacos em tratamentos dérmicos.

A utilização de moléculas orgânicas fluorescentes como sondas na investigação de mudanças dinâmicas e estruturais em bicamadas lipídicas é uma técnica já bem conhecida<sup>4,5</sup> e o emprego da espectroscopia de fluorescência tem sido a ferramenta mais utilizada para a elucidação e caracterização destes processos.<sup>6-8</sup>

Desde que Weller relatou pela primeira vez o fenômeno da transferência protônica intramolecular no estado excitado (*excited-state intramolecular proton transfer* – ESIPT),<sup>9</sup> este processo continua a receber atenção até os dias de hoje<sup>10-12</sup> e inúmeras aplicações têm

sido desenvolvidas em áreas importantes, inclusive como sondas fluorescentes de membrana. Compostos como os derivados de 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol (Figura 2) apresentam características fotofísicas bastante interessantes devido ao processo de ESIPT, como por exemplo, intensa emissão de fluorescência com um grande deslocamento de Stokes, que é definido como a diferença entre os comprimentos de onda dos máximos de emissão e de absorção das moléculas.

Levando em conta que compostos que apresentam fluorescência têm sido utilizados para detectar componentes particulares de complexos biomoleculares como, por exemplo, as células vivas, este trabalho propôs a síntese de moléculas fluorescentes da família dos heterociclos benzazólicos que possuem a capacidade de se inserir em um ambiente lipídico, como é o das células vivas e, desta forma, também possam ser utilizadas como marcadores moleculares fluorescentes para células. Para tanto, deve-se verificar se estas moléculas primeiramente são capazes de se inserir em sistemas membranares modelo e se sua fluorescência será detectada neste meio. Por este motivo, neste trabalho realizou-se a síntese de benzoxazóis modificados com cadeias alquílicas de oito e doze carbonos, bem como um benzoxazol na forma de um sal de amônio quaternário anfifílico. Estas moléculas sintetizadas foram introduzidas em soluções de lipossomas (vesículas lipídicas) de lecitina de soja - que consiste em uma mistura de fosfolipídios com a predominância da fosfatidilcolina (Figura 2, estrutura (b) - e um estudo fotofísico foi realizado para avaliar a potencialidade das novas moléculas como sondas de sistemas lipídicos.



**Figura 2.** Estrutura do (a) 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol e da (b) fosfatidilcolina isolada da lecitina de soja.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

Sintetizar corantes da família dos heterociclos benzazólicos com características lipofílicas, bem como caracterizar o comportamento fotofísico dos mesmos em solventes orgânicos, em lipossomas e etossomas de lecitina de soja.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar, purificar e caracterizar alquil-benzoxazóis com cadeias alquílicas não-ramificadas de oito, doze e dezoito carbonos;
- Caracterizar o comportamento fotofísico dos alquil-benzoxazóis em diferentes solventes orgânicos;
- Preparar lipossomas e etossomas de lecitina de soja;
- Preparar lipossomas e etossomas contendo os alquil-benzoxazóis;
- Caracterizar o comportamento fotofísico dos sistemas lipossoma/alquil-benzoxazol e etossomo/alquil-benzoxazol.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. FOTOFÍSICA

##### 3.1.1. Luminescência e Fotoluminescência

O termo luminescência foi introduzido em 1888 pelo físico alemão Eilhardt Wiedemann, para designar todos os fenômenos de emissão de luz que não sofressem um aumento de temperatura (ao contrário da incandescência que é o termo utilizado para denominar o fenômeno de emissão de luz por um corpo quente).<sup>13-14</sup> Luminescência é o nome dado ao fenômeno relacionado à capacidade que algumas substâncias apresentam em converter certos tipos de energia em emissão de radiação eletromagnética. A luminescência pode ser observada para todas as fases da matéria, seja gasosa, líquida ou sólida, para ambos compostos orgânicos e inorgânicos. A radiação eletromagnética emitida por um material luminescente pode ocorrer nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho.

O nome luminescência é utilizado como uma generalização do fenômeno. Há vários tipos de luminescência que diferem entre si pela energia utilizada para a excitação como, por exemplo a eletroluminescência é provocada por uma voltagem elétrica, a catodoluminescência por um feixe de elétrons de alta energia, a quimiluminescência pela energia de uma reação química, a termoluminescência pela estimulação térmica e a fotoluminescência pela absorção de fótons.

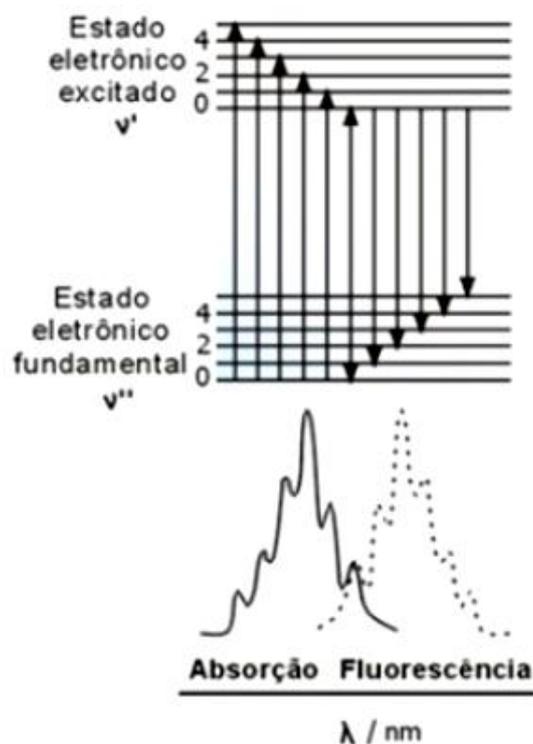
A fotoluminescência inclui tanto a fluorescência como fosforescência. A fluorescência difere da fosforescência, no fato de que as suas transições eletrônicas não envolvem a mudança de spin eletrônico. Como consequência, a fluorescência tem tempo de vida mais curto ( $\sim 10^{-9}$ s) após cessar a fonte de energia. Em contraste, uma mudança de spin eletrônico, acompanha as emissões fosforescentes, a qual faz a radiação poder durar por um tempo facilmente detectável após o término da fonte de irradiação, frequentemente milisegundos até alguns segundos.<sup>15</sup>

##### 3.1.2. Espectros de Absorção e de Emissão

Em condições normais, as moléculas estão no estado vibracional de menor energia do estado eletrônico fundamental. A absorção de um fóton de radiação irá excitar as moléculas para um estado eletrônico de maior energia, e para os diversos níveis vibracionais e

rotacionais deste estado eletrônico. Desta forma, um espectro de absorção será composto por um conjunto de bandas associadas às diversas transições vibracionais e rotacionais associadas aos dois estado eletrônicos envolvidos na transição eletrônica.<sup>13-14</sup> A lei de Lambert-Beer permite uma análise quantitativa a partir dos espectros de absorção de UV-Vis. A lei de Lambert-Beer pode ser expressa matematicamente pela relação:  $A = \epsilon bc$ , onde  $A$  é a absorvância,  $\epsilon$  é o coeficiente de absorvância molar,  $b$  é o caminho óptico e  $c$  a concentração da amostra, expressa em Molar.<sup>15</sup> A partir desta equação, tem-se que a intensidade de uma banda de absorção deveria sempre aumentar com a concentração da amostra, mas não necessariamente de modo linear. No caso de soluções concentradas, o desvio da linearidade pode ser grande e se diz que a lei de Lambert-Beer deixou de ser obedecida, isto é, a absorvância não é direta e linearmente proporcional com a concentração.<sup>16</sup>

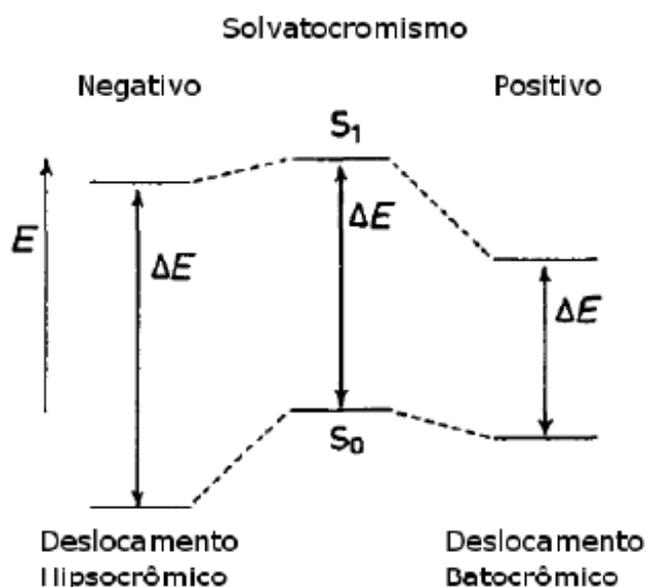
Da mesma forma que a absorção, um espectro de emissão poderá ter uma relaxação vibracional que corresponde às transições do estado vibracional de menor energia do primeiro estado eletrônico excitado para os vários estados vibracionais do estado eletrônico fundamental. Neste caso, haverá uma relaxação vibracional em direção a valores menores de energia (maiores comprimentos de onda). Do ponto de vista puramente qualitativo, a existência de uma forte sobreposição entre os espectros de absorção e de fluorescência, isto é, um pequeno valor para o deslocamento de Stokes, exige que não ocorra uma grande alteração de geometria molecular entre os dois estado envolvidos (Figura 3). Conseqüentemente, este é um dado experimental que permite avaliar alterações de geometria com o processo de excitação eletrônica. Nos casos em que esta alteração é pequena, os dois espectros se sobrepõem e se obtém espectros que são imagens especulares. Esta condição é atingida por muitos hidrocarbonetos aromáticos condensados, que são moléculas com alguma rigidez e que, por isto, não sofrem grandes alterações de geometria com a excitação.<sup>15</sup>



**Figura 3.** Esquema hipotético de níveis de energia mostrando os processos de absorção e de fluorescência e os correspondentes espectros.<sup>17</sup>

### 3.1.3. Efeito do Solvente na Fotofísica

De um modo geral, haverá variação na posição, intensidade e formato da banda de absorção e de emissão de um determinado composto quando em presença de um solvente. Esta mudança reflete a interação do soluto-solvente que modifica a diferença de energia entre o estado fundamental e o excitado. O estudo do deslocamento da posição do comprimento de onda e da variação da intensidade da banda de absorção com o solvente pode ser usado como informação para determinar o tipo de transição que está ocorrendo.<sup>14,17</sup> O efeito do solvente no espectro de uma dada molécula é o quanto se verifica destas mudanças na interação soluto-solvente após a excitação. Estas mudanças podem envolver diversos fatores, tais como a dispersão, polarização, forças eletrostáticas e interações de transferência de carga. A interação soluto-solvente aumenta com o aumento da polaridade do solvente, dependendo do quanto o estado fundamental ou o estado excitado é mais fortemente estabilizado, resultando num deslocamento batocrômico ou hipsocrômico. Isto é referenciado como um solvatocromismo positivo ou negativo, respectivamente (Figura 4). Assim, se o estado excitado é mais polar do que o estado fundamental ou vice-versa, o solvatocromismo poderá ser observado.<sup>18</sup>



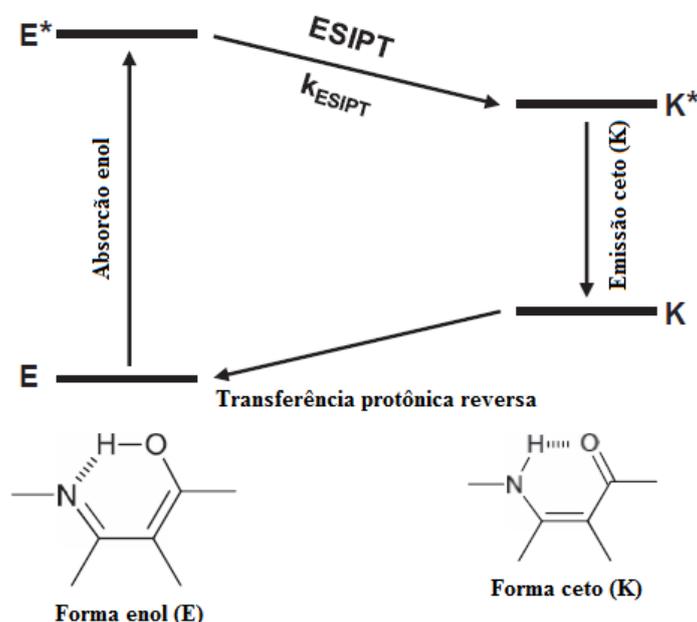
**Figura 4.** Deslocamento batocrômico e hipsocrômico do estado fundamental e excitado.<sup>17</sup>

#### 3.1.4. Transferência Protônica Intramolecular no Estado Eletrônico Excitado - ESIPT

O mecanismo de transferência protônica intra ou intermolecular é considerada como sendo o mais importante e fundamental processo na química e na biologia, assim como as reações ácido-base e as reações enzimáticas. Dependendo do respectivo sistema, vários tipos de reações de transferência de próton ocorrem no estado fundamental ou excitado. Dentre elas, a transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado (ESIPT) tem recebido particular atenção dos pontos de vista teórico e experimental, pois (i) possibilita uma grande separação entre os máximos de absorção e emissão (grande deslocamento de Stokes) minimizando processos de auto-absorção, (ii) são rápidos ( $\sim 10^{-12}$  s) e (iii) são capazes de ocorrer mesmo em estruturas rígidas e temperaturas baixas.<sup>18</sup> Desde que a primeira observação da ESIPT foi relatada por Weller<sup>9</sup> na metade do século passado, um grande número de moléculas que exibem a ESIPT tem sido desenvolvidas e investigadas, incluindo derivados da benzofenona,<sup>19</sup> flavonas,<sup>20</sup> entre outras.

Uma ligação hidrogênio intramolecular, como a encontrada em moléculas que apresentam o mecanismo de ESIPT, proporciona uma rigidez considerável para a estrutura química molecular.<sup>21,22</sup> Assim, o processo ESIPT requer uma ligação hidrogênio intramolecular entre um doador de próton (-OH,  $\text{NH}_2$ ) e um aceptor de próton (-C=O, -N=) próximos um ao outro na molécula. Em um estado fundamental ESIPT típico, as moléculas

existem exclusivamente na forma enol (E) que é melhor estabilizada pela ligação intramolecular de hidrogênio. Com a fotoexcitação, ocorre uma redistribuição eletrônica de cargas, causando um aumento da acidez do grupo doador de próton e um aumento da basicidade do grupo aceptor. Como resultado, ocorre a transferência do próton da forma enol excitada ( $E^*$ ) para a forma ceto excitada ( $K^*$ ). Após o decaimento radiativo (emissão de fluorescência) ocorre uma transferência protônica reversa para a forma enol no estado fundamental E (Figura 5). A diferença entre a absorção (E) e emissão (K) das espécies moleculares exclui a auto-absorção e resulta em um grande deslocamento de Stokes.<sup>17</sup>

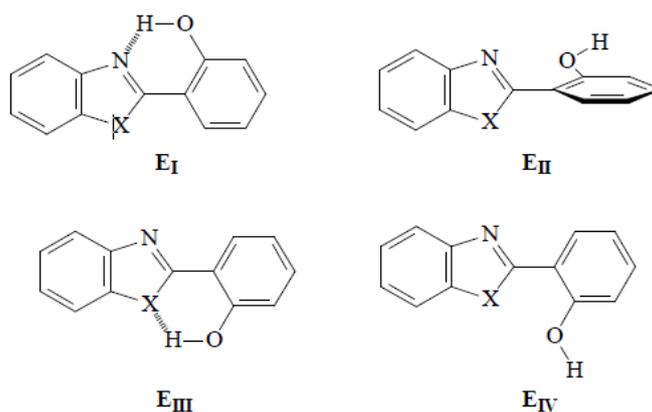


**Figura 5.** Representação do ciclo fotoquímico de ESIPT.

### 3.1.5. Efeito do Solvente na ESIPT

O mecanismo de ESIPT é extremamente dependente da polaridade do solvente e muitos estudos experimentais e teóricos têm sido realizados para melhor compreender a influência da polaridade do solvente nas diferentes geometrias estabilizadas em solução.<sup>21,22</sup> Em solventes próticos e/ou polares, existe uma competição entre a transferência do próton intramolecular e intermolecular com o solvente, enfraquecendo a ligação hidrogênio intramolecular, possibilitando a estabilização do confôrmero enol-cis aberto ( $E_{II}$ ), originário da ruptura da ligação hidrogênio entre a hidroxila fenólica e o nitrogênio da posição 3, seguido de uma rotação de  $180^\circ$  do grupo 2'-hidroxifenila sob a ligação  $C_2-C_1'$  (Figura 6). Em

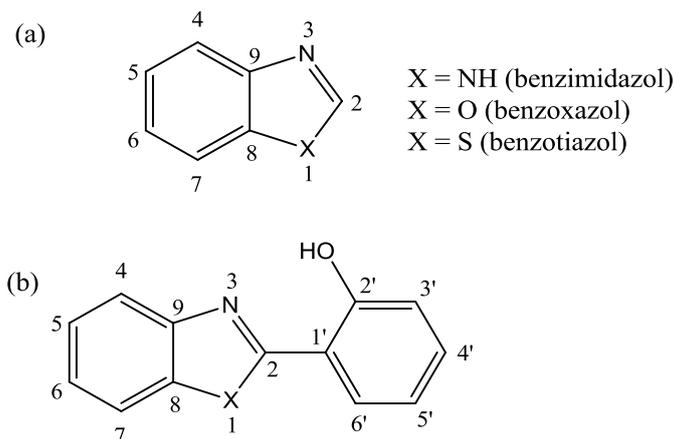
solventes apolares e/ou pouco polares, confôrmeros do tipo enol-*trans* (E<sub>III</sub>) e enol-*trans* aberto (E<sub>IV</sub>) podem ser estabilizados. Todos os confôrmeros (E<sub>II</sub>-E<sub>IV</sub>) que apresentam relaxação normal podem competir com o confôrmero enol-*cis* responsável pelo mecanismo ESIPT, apresentando em muitos casos uma dupla emissão de fluorescência em um mesmo solvente.<sup>21</sup>



**Figura 6.** Possíveis geometrias da forma enol em solução.

### 3.2. HETEROCICLOS BENZAZÓLICOS

Heterociclos benzazólicos são compostos que possuem em sua estrutura um anel azólico condensado a um anel benzênico. O anel azólico caracteriza-se por apresentar dois heteroátomos na posição 1 e 3 de um anel de cinco membros, sendo que um deles é sempre o átomo de nitrogênio  $sp^2$  na posição 3. A variação do heteroátomo na posição 1 produz diferentes derivados, aos quais chamamos benzoxazol quando  $X = O$ , benzimidazol, quando  $X = N$  e benzotiazol quando  $X = S$  (Figura 7a). A presença de um grupamento fenila na posição 2 do anel azólico e uma hidroxila em posição orto a esta ligação, proporciona a formação de heterociclos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazólicos, conforme pode ser visto na figura abaixo (Figura 7b). Estes heterociclos caracterizam-se por apresentarem propriedades fotofísicas no que diz respeito a intensa emissão de fluorescência com um grande deslocamento de Stokes devido ao mecanismo ESIPT.<sup>21</sup>



**Figura 7.** Estrutura dos compostos benzazólicos, onde X = O, S ou NH.

O método sintético mais utilizado para a obtenção destes heterociclos consiste na condensação bimolecular entre anilinas *o*-substituídas com um ácido carboxílico, éster, nitrila, cloreto de acila, amida ou aldeído.<sup>21</sup> O mecanismo de condensação inicia-se pelo ataque nucleofílico do grupo amina ao carbono carbonílico do ácido, com a formação de um intermediário anilida. Em seguida ocorre o fechamento do anel com a perda de uma molécula de água para formar os correspondentes benzoxazol, benzimidazol e benzotiazol.<sup>21</sup> Um agente ciclizante bastante empregado nestas reações de ciclização é o ácido polifosfórico, que também se presta para reações de acilação, alquilação, reações catalizadas por ácido e na síntese de heterociclos contendo nitrogênio.<sup>21</sup>

### 3.3. LIPOSSOMAS

Lipossomas ou vesículas de fosfolípidios são partículas coloidais auto-organizadas que ocorrem naturalmente, mas podem também ser sintetizadas. Há 40 anos, Alec Bangham com sua observação pioneira de que fosfolípidios em solução aquosa podem formar estruturas fechadas em bicamadas permitiu que a pesquisa sobre lipossomas percorresse um longo caminho convertendo-se de simples objetos de pesquisa biofísica em carreadores terapêuticos para numerosas aplicações clínicas.<sup>23</sup>

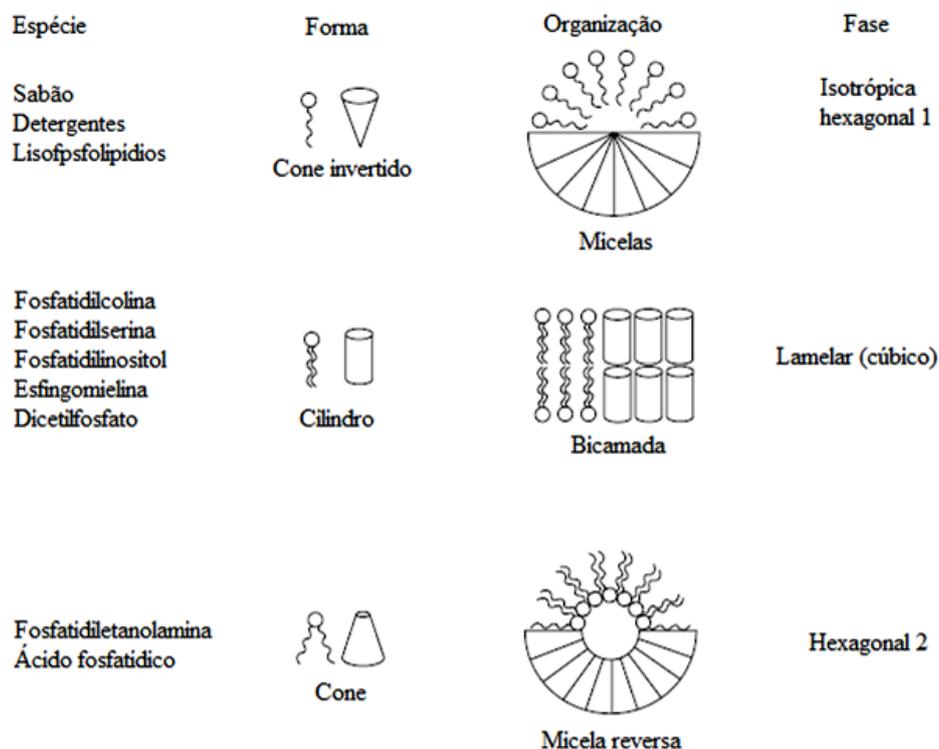
Lipossomas são vesículas microscópicas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas e separadas por um meio aquoso. Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam retidas no compartimento aquoso e as lipofílicas adsorvidas no interior da membrana. Estas vesículas são constituídas

basicamente por fosfolipídios (podendo ser de natureza sintética ou natural) e esteróis. Os lipídios mais utilizados nas formulações de lipossomas são as fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, fosfatidilglicerol e esfingomielinas, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas são as mais empregadas em estudos de formulações de lipossomas, pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou de concentração de sal no meio.<sup>23</sup> Na evolução do seu emprego como carreadores de fármacos, algumas alterações foram feitas na estrutura básica dos lipossomas, possibilitando maior aplicação terapêutica. Eles também foram classificados quanto às características de interação com sistemas biológicos.<sup>24</sup>

### 3.3.1. Estruturação dos Lipossomas

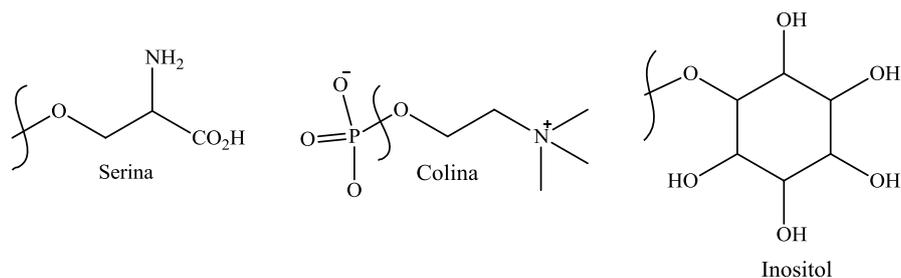
De forma geral, as moléculas podem ser divididas em polares ou apolares considerando sua simetria e distribuição das nuvens eletrônicas. Algumas moléculas, porém, são constituídas de uma região polar e uma região apolar na mesma estrutura, ligadas de forma covalente e são chamadas de moléculas anfifílicas. Devido a esta característica, apresentam a propriedade de auto-organização produzindo diferentes estruturas quando em solução aquosa. No processo de auto-associação, a orientação destas moléculas obedece ao estado de menor energia termodinâmica: as regiões polares em contato com o meio polar (água) e as regiões apolares com o meio apolar (cadeias hidrocarbônicas). A representação de uma molécula anfifílica numa configuração de círculo (parte polar) com cauda (parte apolar), com distintas organizações estruturais<sup>25,26</sup> pode ser vista na Figura 8.

Com relação aos lipídios, aqueles que apresentam uma forma geométrica cônica tendem a formar micelas, que são estruturas cujas cadeias hidrocarbônicas dos lipídios ficam protegidas do meio aquoso (no qual não são solúveis) e as cabeças hidrofílicas, polares, são expostas na superfície, voltadas para o meio aquoso. Já os lipídios com forma geométrica cilíndrica, tendem a formar bicamadas lipídicas. Estas bicamadas formadas, cujas cadeias hidrocarbônicas se estendem para dentro das duas superfícies, separando dois compartimentos aquosos, formam uma base interna hidrocarbonada, e as cabeças hidrofílicas se voltam para fora, estendendo-se para as fases aquosas. Evitando ainda o contato da região hidrofóbica com a água, as bicamadas podem se fechar sobre si mesmas formando estruturas vesiculares, também chamadas de lipossomas.<sup>25,26</sup>



**Figura 8.** Representação das possíveis formas para moléculas anfífilas relacionadas com a simetria estrutural e as respectivas fases mais prováveis de estruturas coloidais.<sup>26</sup>

Na Figura 9 estão representadas as estruturas genéricas de algumas destas moléculas anfífilas.

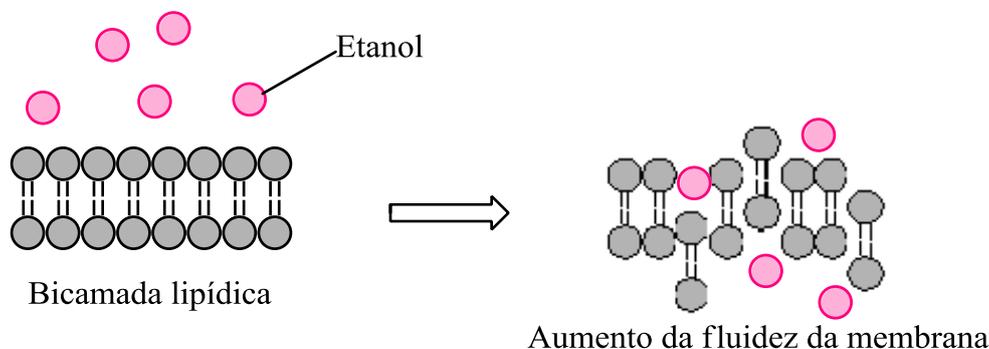


**Figura 9.** Representação genérica das estruturas de uma serina, colina e inositol.

### 3.4. ETOSSOMAS

Os etossomas são uma derivação dos lipossomas, em que se utiliza uma elevada concentração de álcool para a preparação dos mesmos (tipicamente de 20 a 40%). Desta forma, etossomas são vesículas etanólicas de fosfolípidios que são utilizadas, sobretudo, para

a administração transdérmica de drogas. Os etossomas têm maior razão de penetração através da pele quando comparados aos lipossomas. O incremento da permeação dos etossomas é atribuído ao etanol, que aumenta a fluidez da membrana lipídica resultando em um incremento da permeabilidade dos etossomas na pele.<sup>27</sup>



**Figura 10.** Ação do etanol sobre a bicamada lipídica.

O etanol é conhecido como um eficiente potencializador da permeabilidade e tem sido adicionado em sistemas vesiculares para preparar nanovesículas elásticas.<sup>28</sup> Muitas pesquisas indicam que os etossomas possuem uma boa estabilidade de armazenamento devido ao fato de que o etanol proporciona uma carga superficial negativa líquida, evitando assim a agregação das vesículas, devido à repulsão eletrostática.<sup>28-30</sup>

Tipicamente, etossomas podem conter fosfolipídios com diferentes estruturas químicas como a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina, o fosfatidilglicerol, o fosfatidilinositol, polietilenoglicol, entre outros. A literatura referencia dois métodos para a preparação dos etossomas: o método frio e o método quente. No método a frio o fosfolipídio, um fármaco ou outra molécula de interesse são dissolvidos em etanol em um recipiente fechado a temperatura ambiente e sob agitação vigorosa. Propilenoglicol ou outro polioliol é adicionado durante a agitação e a mistura é aquecida em banho-maria até 30°C. Água, também aquecida a 30°C é adicionada ao recipiente fechado e a mistura é agitada por 5 min. Já no método de preparação a quente, o fosfolipídio é disperso em água por aquecimento em banho-maria a 40°C até a obtenção de uma solução coloidal. Em outro recipiente, etanol e propilenoglicol são misturados e aquecidos a 40°C. Quando ambas misturas estão na temperatura de 40°C, a fase orgânica é adicionada sobre a aquosa. O fármaco é dissolvido na água ou no etanol dependendo de suas propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas.<sup>29</sup> Nestes dois métodos de preparação o tamanho da vesícula pode ser diminuído usando os métodos de sonicação ou extrusão.<sup>28-30</sup>

## 4. EXPERIMENTAL

### 4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental desta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Novos Materiais Orgânicos do Instituto de Química da UFRGS.

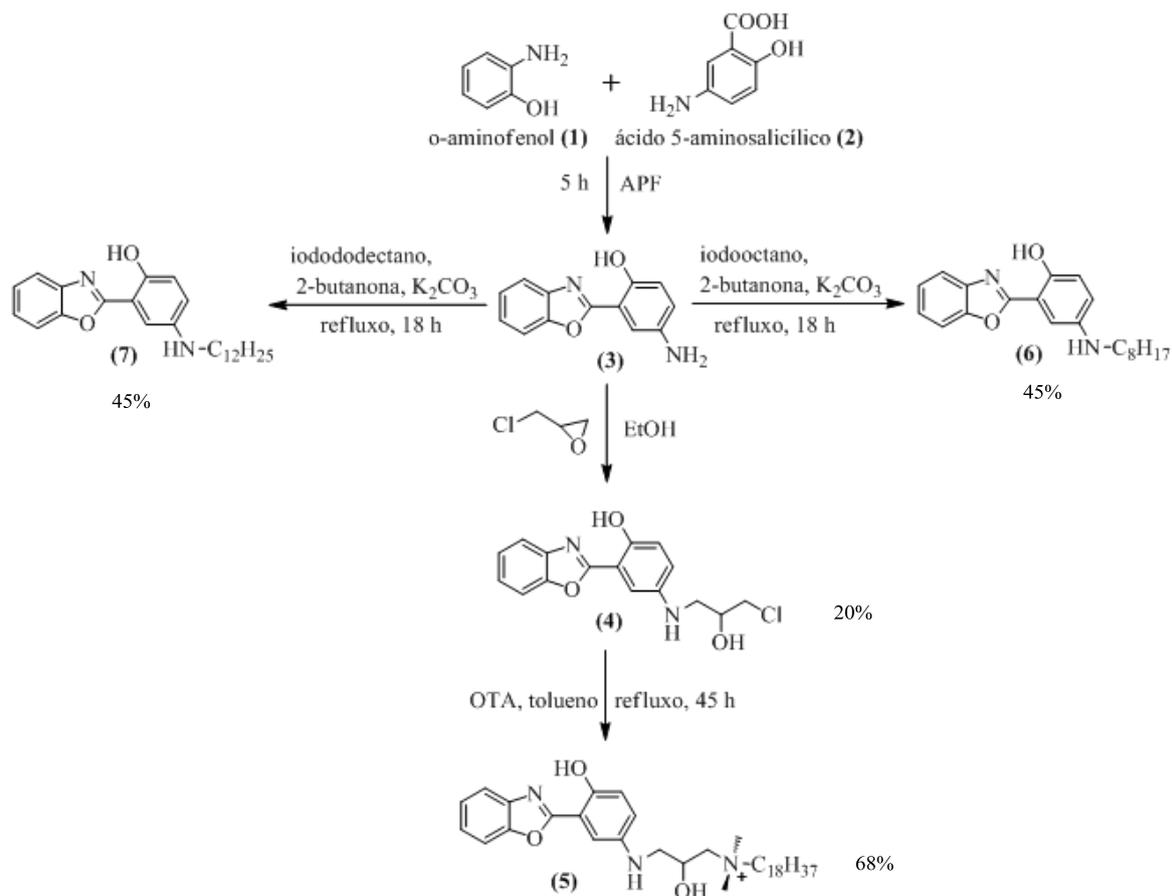
Os reagentes e solventes utilizados foram os seguintes: ácido 5-aminosalicílico 95% (Aldrich), 2-aminofenol (Aldrich), iodooctano (Aldrich), iodododecano (Aldrich) e *N,N*-dimetiloctadecilamina 89% (Aldrich), epíclorodrina (Alclor), ácido polifosfórico P.A. (Vetec), 1,4-dioxano P.A. (Vetec), etanol P.A. (Merck), diclorometano P.A. (Synth), acetonitrila P.A. (Synth), 2-butanona (Vetec).

As análises elementares foram realizadas em um equipamento Perkin Elmer modelo 2400. As medidas de espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas em um equipamento Shimadzu Prestige 21 em pastilha de KBr ou no modo de Reflectância Total Atenuada (ATR). As medidas de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis foram obtidas à temperatura ambiente utilizando em espectrofotômetro Shimadzu UV 2450. Para as medidas de espectroscopia de emissão de fluorescência foi utilizado um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos utilizando os máximos de absorção como comprimento de onda de excitação. As medidas de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram realizadas em aparelhos Varian Inova e Varian VNMRs, sendo que os espectros de  $^1\text{H}$  foram obtidos a 300 MHz e os de  $^{13}\text{C}$ , a 75,4 MHz, em tubos de 5 cm de diâmetro. As imagens dos lipossomas e etossomas foram obtidas através da microscopia confocal em um equipamento Olympus FV1000 no centro de microscopia desta Universidade, e a microscopia óptica em um microscópio de epifluorescência Olympus BX41.

### 4.2. SÍNTESE DOS CORANTES FLUORESCENTES

A metodologia sintética utilizada para a obtenção dos corantes **3-7** está apresentada na Figura 11. A primeira etapa que leva a síntese do precursor **3** parte da reação de condensação bimolecular entre o ácido 5-aminosalicílico (**2**) e o *o*-aminofenol (**1**) em ácido polifosfórico (APF) e 4 horas de reação a uma temperatura de 180°C. Depois de resfriada, a solução é vertida em gelo e depois de filtrado, o sólido é neutralizado com uma solução de bicarbonato

de sódio 10%. O produto neutralizado é seco em estufa e purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel em clorofórmio ou diclorometano como solvente.



**Figura 11.** Esquema de síntese dos compostos 3-7.

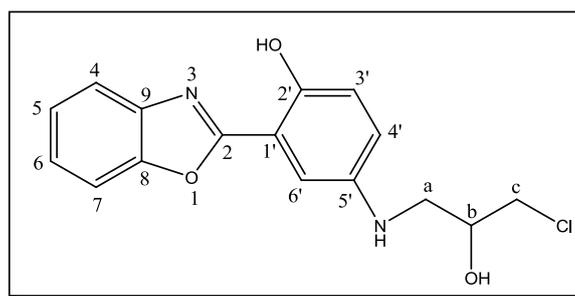
#### 4.2.1. Síntese do 2-(5'-Amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (3)

A obtenção do 2-(5'-amino-hidroxifenil)benzoxazol (3) seguiu a metodologia descrita na literatura,<sup>22</sup> onde uma mistura equimolar de *o*-aminofenol (1) (2 g; 18,4 mol) e ácido 5-aminosalicílico (2) (2,82 g) em ácido polifosfórico (10ml) foi aquecida sob agitação à temperatura de 180°C por 5 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada. Depois de resfriada, a mistura foi vertida em gelo picado (400 g) e o precipitado obtido foi filtrado, neutralizado com solução de NaHCO<sub>3</sub> 10%, lavado com água e seco a temperatura ambiente. O produto obtido (3) foi purificado em coluna de sílica-gel com diclorometano como eluente. Ponto de fusão: 174-175°C; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3407 ( $\nu_{\text{as}}$  NH<sub>2</sub>);

3330 ( $\nu_s$  NH<sub>2</sub>); 1630 e 1545 ( $\nu_{\text{arom}}$  C=C); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz,  $\delta$  em ppm): 10,94 (s, 1H, OH); 7,83-6,74 (m, 7H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>6'</sub>); 3,54 (s, largo, 2H, NH<sub>2</sub>).

#### 4.2.2. Síntese do 2-(5'-(*N*-3-Cloro-2-hidroxiopropilamino)-2'-hidroxifenil) benzoxazol (4)

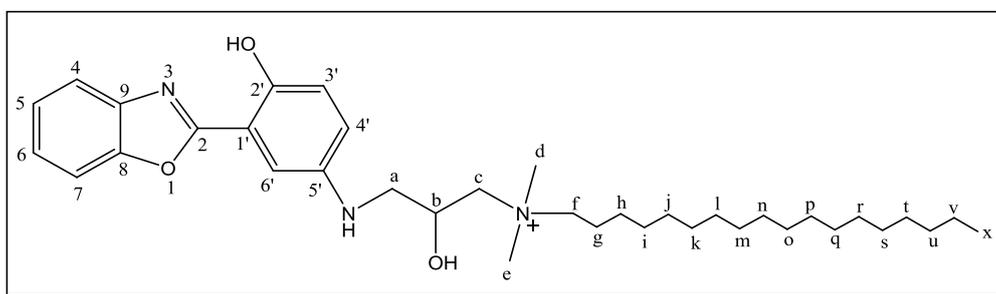
A síntese de **4** foi baseada na literatura,<sup>31</sup> porém utilizando-se o 2-(5'-amino-hidroxifenil)benzoxazol para realizar a reação de substituição nucleofílica no grupo amino. Uma solução etanólica de **3** (0,29 g, 1,29 mmol) foi adicionada através de funil de adição sobre 0,477 g (5,16 mmol) de epícloridrina a 45°C. A mistura foi mantida sob agitação e refluxo por 24 horas. O produto obtido foi purificado por cromatografia em sílica gel utilizando-se CHCl<sub>3</sub> e acetona (1:1) como mistura eluente. O produto de interesse obtido após o processo de purificação apresentou-se sob a forma de um sólido alaranjado com 20% de rendimento.



Ponto de fusão: 117-120°C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3322 ( $\nu$  NH); 2904; 1622 e 1587 ( $\nu_{\text{arom}}$  C=C). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz,  $\delta$  em ppm): 11 (s, 1H, OH); 7,2 - 6,2 (m, 7H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>6'</sub>), 4,21-4,09 (m, 1H, H<sub>b</sub>), 3,75 (dd,  $J = 4.5\text{Hz}$  e  $4.8\text{Hz}$ , 1H, H<sub>c</sub>), 3,70 (dd,  $J = 6,0$ ;  $5,7$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 3,42 (dd,  $J = 3,9$  1H, H<sub>a</sub>), 3,27 (dd,  $J = 7,8$  1H H<sub>a</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz,  $\delta$  em ppm): 47,8 (C<sub>c</sub>); 48,1 (C<sub>a</sub>); 69,9 (C<sub>b</sub>); 109,8 (C<sub>7</sub>); 110,3 (C<sub>1'</sub>); 110,6 (C<sub>6'</sub>); 118,9 (C<sub>4'</sub>); 119,2 (C<sub>3'</sub>); 121,2 (C<sub>4</sub>); 124,9 (C<sub>6</sub>); 125,3 (C<sub>5</sub>); 140,2 (C<sub>5'</sub>); 140,7 (C<sub>9</sub>); 149,1 (C<sub>2'</sub>); 152,0 (C<sub>8</sub>); 162,9 (C<sub>2</sub>).

#### 4.2.3. Síntese do *N*-(3-((3-(Benzoxazol-2-il)-4-hidroxifenilamino)-2-hidroxiopropil)-*N,N*-dimetil-1-octadecanoamônio) (5)

A síntese de obtenção de **5** foi baseada na literatura,<sup>32</sup> levando-se em conta a diferença quando ao composto orgânico utilizado (**4**). Uma mistura do composto **4** (0,29 g, 0,94 mmol) e *N,N*-dimetil-octadecilamina (OTA) (0,16 g, 0,54 mmol) em tolueno foi agitada lentamente sob banho de gelo. A seguir, a mistura foi aquecida à temperatura de refluxo durante 45 h. Após este período, o solvente foi removido em evaporador rotatório. O produto, uma cera de coloração marrom-escuro, foi lavado com hexano para remoção de pequenas quantidades de material de partida (OTA). O desenvolvimento da reação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD) e o rendimento encontrado foi de 68%.

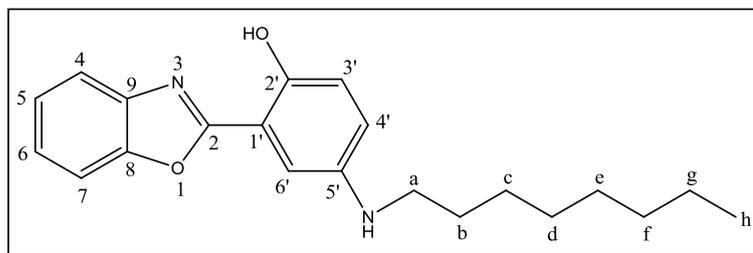


Ponto de fusão: Decompõe acima de 200°C. Análise elementar calculada: C: 70,39; H: 9,19; N: 6,84. Encontrada: C: 71,12; H: 9,83; N: 6,12. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2916 ( $\nu_{\text{as}}$  C-H), 2849 ( $\nu_{\text{s}}$  C-H), >3000 ( $\nu$  O-H), 1636 ( $\nu$  C=C). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz,  $\delta$  em ppm): 10,74 (s, 1H, OH), 7,6 - 6,9 (m, 7H,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$ ,  $\text{H}_{3'}$ ,  $\text{H}_{4'}$ ,  $\text{H}_{6'}$ ), 4,6 (m, 1H,  $\text{H}_b$ ) 4,0-3,5 (m, 4H,  $\text{H}_a$ ,  $\text{H}_c$ ), 3,5-3,0 (m, 8H,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_d$ ,  $\text{H}_f$ ), 1,70-2,50 (m, 4H,  $\text{H}_g$ ,  $\text{H}_v$ ), 1,10 (m, 28H,  $\text{H}_h$ - $\text{H}_u$ ), 0,78 (t, 3H,  $\text{H}_x$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  em ppm): 13,9 ( $\text{C}_x$ ); 22,5 ( $\text{C}_v$ ); 26,9 ( $\text{C}_g$ ); 27,2 ( $\text{C}_h$ ); 28,8-29,5 (10C,  $\text{C}_s$ ,  $\text{C}_r$ ,  $\text{C}_q$ ,  $\text{C}_p$ ,  $\text{C}_o$ ,  $\text{C}_n$ ,  $\text{C}_m$ ,  $\text{C}_l$ ,  $\text{C}_k$ ,  $\text{C}_j$ ); 109,8 ( $\text{C}_7$ ); 110,3 ( $\text{C}_{1'}$ ); 110,6 ( $\text{C}_{6'}$ ); 118,1 ( $\text{C}_{4'}$ ); 119,2 ( $\text{C}_{3'}$ ); 121,2 ( $\text{C}_4$ ); 124,9 ( $\text{C}_6$ ); 125,38 ( $\text{C}_5$ ); 140,2 ( $\text{C}_{5'}$ ); 140,7 ( $\text{C}_9$ ); 149,1 ( $\text{C}_2$ ); 152,0 ( $\text{C}_8$ ); 162,9 ( $\text{C}_2$ ).

#### 4.2.4. Síntese do 2-(5'-*N*-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**6**)

A síntese do composto **6** foi adaptada da literatura.<sup>33,34</sup> Em um balão de fundo redondo foram adicionados **3** (0,61 g, 2,65 mmol), iodoctano (1,27 g, 5,3 mmol), carbonato de potássio (0,36 g, 2,65 mmol) e 2-butanona suficiente para solubilização de **3**. A mistura foi mantida em refluxo por 18 horas e a reação acompanha por CCD.<sup>16-18</sup> Após este período,

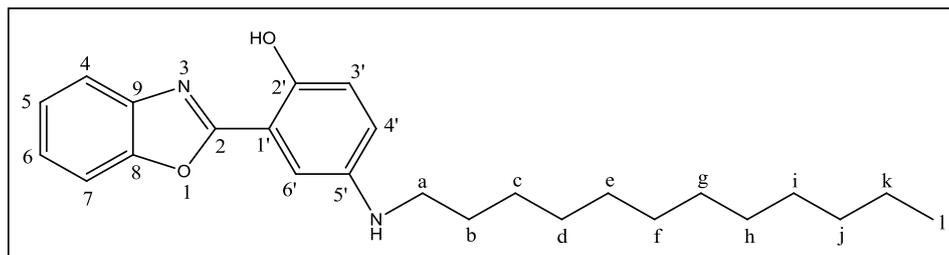
obteve-se um líquido oleoso de coloração amarela que foi purificado por cromatografia em sílica gel, utilizando clorofórmio como eluente. O produto purificado foi um sólido cristalino amarelo-escuro com rendimento de 45%.



Ponto de fusão: 92-94°C. Análise elementar calculada: C: 74,25; H: 7,96; N: 7,90. Encontrada: C: 74,55; H: 7,69; N: 8,28. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3390 ( $\nu$  NH), 2930 ( $\nu_{\text{as}}$  C-H), 2840 ( $\nu_{\text{s}}$  C-H). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz,  $\delta$  em ppm): 11 (s, 1H, OH); 7,2 - 6,2 (m, 7H,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$ ,  $\text{H}_3'$ ,  $\text{H}_4'$ ,  $\text{H}_6'$ ); 3,0 (t, 2H,  $\text{H}_a$ ), 1,6 (m, 2H,  $\text{H}_b$ ), 1,2 (m, 10H,  $\text{H}_c$ - $\text{H}_g$ ), 0,8 (t, 3H,  $\text{H}_h$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  em ppm): 14,0 ( $\text{C}_h$ ); 22,6 ( $\text{C}_g$ ); 27,13 ( $\text{C}_c$ ); 29,0 ( $\text{C}_e$  ou  $\text{C}_d$ ); 29,3 ( $\text{C}_e$  ou  $\text{C}_d$ ); 29,5 ( $\text{C}_b$  ou  $\text{C}_f$ ); 31,7 ( $\text{C}_b$  ou  $\text{C}_f$ ); 44,9 ( $\text{C}_a$ ); 109,8 ( $\text{C}_7$ ); 110,3 ( $\text{C}_{1'}$ ); 110,6 ( $\text{C}_6'$ ); 118,1 ( $\text{C}_4'$ ); 119,2 ( $\text{C}_3'$ ); 121,2 ( $\text{C}_4$ ); 124,9 ( $\text{C}_6$ ); 125,38 ( $\text{C}_5$ ); 140,2 ( $\text{C}_5'$ ); 140,7 ( $\text{C}_9$ ); 149,1 ( $\text{C}_2'$ ); 152,0 ( $\text{C}_8$ ); 162,9 ( $\text{C}_2$ ).

#### 4.2.5. Síntese do 2-(5'-N-Dodecilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**7**)

A síntese do composto **7** foi adaptada da literatura.<sup>33,34</sup> Em um balão de fundo redondo foram adicionados **3** (0,51 g, 2,21 mmol), iodododecano (0,98 g, 3,32 mmol), carbonato de potássio (0,30 g, 2,21 mmol) e 2-butanona suficiente para a solubilização de **3**. A mistura foi mantida em refluxo por 18 h e a reação foi acompanhada por CCD. Após este período, obteve-se um líquido oleoso de coloração amarela que foi purificado por cromatografia em sílica gel, utilizando clorofórmio como eluente e obtendo-se um sólido alaranjado com 45% de rendimento.



Ponto de fusão: 96-98°C. Análise elementar calculada: C: 85,11; H: 7,97; N: 7,37. Encontrada: C: 76,44; H: 8,63; N: 7,11. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3390 ( $\nu$  NH), 2915 ( $\nu_{\text{as}}$ C-H), 2850 ( $\nu_{\text{s}}$ C-H). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz,  $\delta$  em ppm): 11 (s, 1H, OH); 7,2 - 6,2 (m, 7H,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$ ,  $\text{H}_{3'}$ ,  $\text{H}_{4'}$ ,  $\text{H}_{6'}$ ); 3,2 (t, 2H,  $\text{H}_a$ ), 1,6 (m, 2H,  $\text{H}_b$ ), 1,2 (m, 18H,  $\text{H}_c$ - $\text{H}_k$ ), 0,8 (t, 3H,  $\text{H}_l$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  em ppm): 14,4 ( $\text{C}_l$ ); 22,9 ( $\text{C}_k$ ); 26,2 ( $\text{C}_c$ ); 29,4-30,0 ( $\text{C}_d$ - $\text{C}_i$ ); 32,2 ( $\text{C}_b$  ou  $\text{C}_j$ ); 33,8 ( $\text{C}_b$  ou  $\text{C}_j$ ); 52,2 ( $\text{C}_a$ ); 109,8 ( $\text{C}_7$ ); 110,4 ( $\text{C}_{1'}$ ); 110,6 ( $\text{C}_{6'}$ ); 118,1 ( $\text{C}_{4'}$ ); 119,2 ( $\text{C}_{3'}$ ); 121,2 ( $\text{C}_4$ ); 124,9 ( $\text{C}_6$ ); 125,3 ( $\text{C}_5$ ); 140,2 ( $\text{C}_{5'}$ ); 140,7 ( $\text{C}_9$ ); 149,1 ( $\text{C}_{2'}$ ); 152,0 ( $\text{C}_8$ ); 162,9 ( $\text{C}_2$ ).

#### 4.3. PURIFICAÇÃO DA LECITINA DE SOJA

Lecitina de soja (7,0 g) - cedida pelo laboratório da Professora Nádyá Pesce da Silveira do IQ-UFRGS - foram purificadas por cromatografia em sílica gel (70-230 nm) utilizando como mistura de eluente água:metanol:clorofórmio em uma razão de 0,4:2,5:6,5, respectivamente, conforme descrito na literatura.<sup>35-36</sup> O grau de pureza foi determinado por RMN de  $^1\text{H}$ .

#### 4.4. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Fosfatidilcolina purificada (60, mg) foram dissolvidos em 10mL de clorofórmio e acrescidos de 200  $\mu\text{L}$  de água destilada para a formação de duas fases imiscíveis. A suspensão foi deixada no ultrassom por 4 minutos formando uma emulsão onde os fosfolípidios se estruturam na forma de micelas reversas com núcleo aquoso no solvente orgânico. O sistema foi concentrado pela evaporação do solvente orgânico em evaporador rotatório. Para a hidratação do filme lipídico, 10 mL de água foram adicionados sob agitação, ocorrendo a formação dos lipossomas. O processo de hidratação lipídica tem por objetivo a obtenção de

vesículas com múltiplas bicamadas e foi descrito pela primeira vez por Bangham.<sup>37,38</sup> Um bom indicativo da formação dos lipossomas é a formação de uma solução leitosa, como a que pode ser vista na Figura 12.



**Figura 12.** Foto da suspensão de lipossoma de fosfatidilcolina obtida da lecitina de soja.

#### 4.5. PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO OS CORANTES 5-7

A preparação dos lipossomas contendo os corantes **5-7** foi feita como segue: em um balão monotubulado foram adicionados 60 mg de fosfatidilcolina purificada juntamente com 9 mL de clorofórmio e 1 mL de uma solução de corante em clorofórmio (1 mg/mL). Sobre este sistema, 200  $\mu$ L de água foram acrescentados para a obtenção dos lipossomas em fase reversa. A mistura foi submetida à sonicação por 4 minutos e o solvente orgânico foi evaporado obtendo-se um organogel. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de água para a hidratação do filme lipídico. Este procedimento foi feito para os três corantes **5-7**, de forma a obter-se uma concentração final de corante de  $10^{-4}$  mol/L. A partir desta solução de  $10^{-4}$  mol/L foram feitas diluições em água, para obtenção de concentrações de  $10^{-5}$  mol/L e  $10^{-6}$  mol/L.

#### 4.6. PREPARAÇÃO DE ETOSSOMAS CONTENDO OS CORANTES 5-7

Os etossomas contendo os corantes **5-7** foram preparados como segue: em um balão monotubulado foram adicionados 60 mg de fosfatidilcolina purificada juntamente com 10 mL de clorofórmio e 200  $\mu$ L de água. O sistema foi sonicado por 4 minutos e a fase orgânica

evaporada. Posteriormente, 9 mL de água foram adicionados ao organogel para a hidratação do filme lipídico e 1 mL de uma solução do corante em etanol do corante foi adicionada ao organogel (1 mg corante/mL) obtendo-se uma concentração final de  $10^{-4}$  mol/L para cada corante. Destas soluções-mãe foram feitas duas diluições, obtendo-se concentrações finais de  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  mol/L para cada corante. Sendo assim, para cada corante foram preparadas soluções de etossoma com concentração de corante de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  mol/L.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS CORANTES FLUORESCENTES

A síntese de **4** se dá via reação de abertura de anel epóxido em etanol. Nesta reação, o carbono menos substituído da epícloridrina, que reage com nucleófilos, é atacado pelos pares de elétrons do nitrogênio do grupo amina do composto **3**, provocando a abertura do anel epóxido e a formação do produto desejado.

No espectro de absorção na região do infravermelho dos compostos **3** e **4** foi possível observar o desaparecimento das bandas de estiramento simétrico e assimétrico do grupo amina em  $3407\text{ cm}^{-1}$  e  $3330\text{ cm}^{-1}$  de **3** em detrimento do aparecimento do estiramento  $\text{-NH}$  em  $3322\text{ cm}^{-1}$  de **4** corrobora com a elucidação da estrutura. A identificação dos sinais teve como base dados da literatura.<sup>39</sup> A confirmação da estrutura de **4** se deu também por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , visto na Figura 13, pode-se observar os deslocamentos referentes aos sete hidrogênios aromáticos entre 7,7 ppm e 6,7 ppm, e entre 4,5 ppm e 3,5 ppm os hidrogênios alifáticos da molécula.

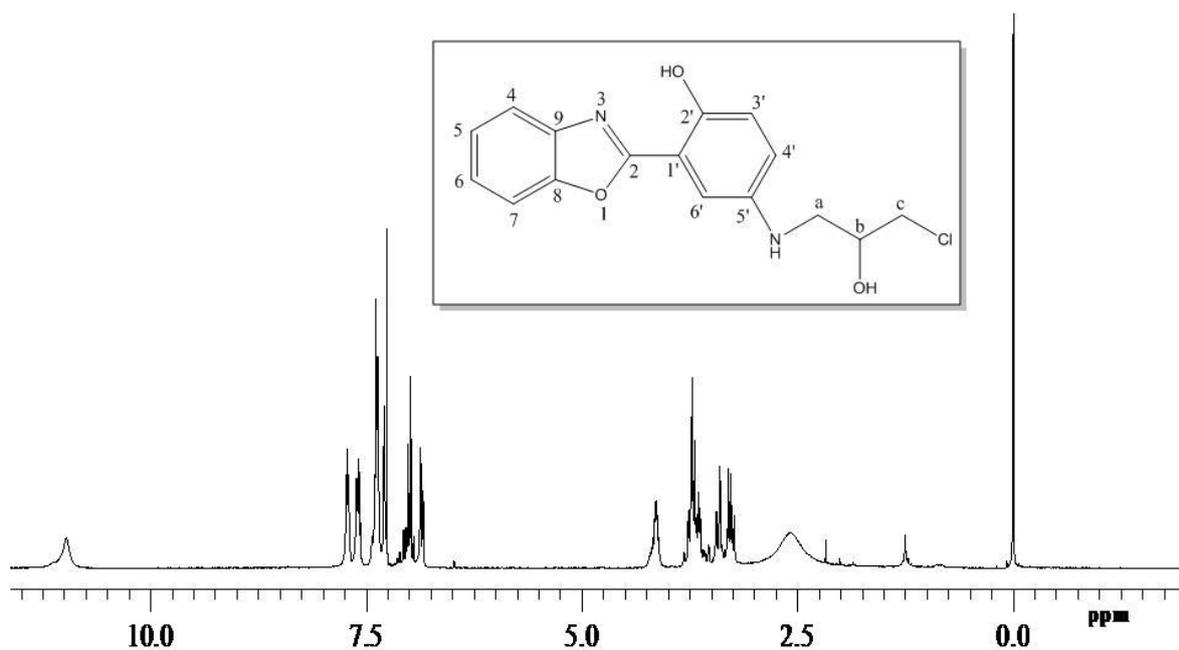
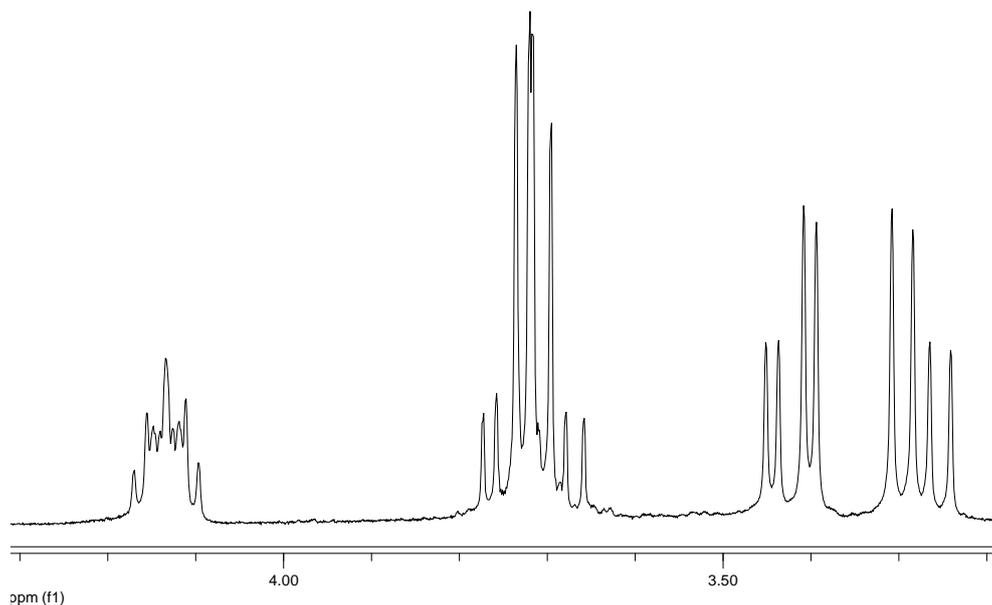


Figura 13. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do precursor (**4**).

O padrão observado para os sinais dos hidrogênios aromáticos é semelhante para todos os corantes. Todos eles apresentam um sistema ABCD representado pelos hidrogênios H<sub>4</sub>-H<sub>7</sub>, o sistema AB compreendendo os hidrogênios H<sub>3</sub>' e H<sub>4</sub>', e o hidrogênio H<sub>6</sub>' na forma de um dubleto com constante de acoplamento *meta*. Estes hidrogênios aparecem entre 7,6 ppm e 6,9 ppm. Um hidrogênio fenólico normalmente aparece na região entre 7-4 ppm, dependendo do solvente, da temperatura e da concentração. Quando uma ligação hidrogênio intramolecular é formada, este hidrogênio é desblindado e move-se pra frequências mais altas, como é o caso dos corantes **4-7** que podem são observados em torno de 11 ppm.

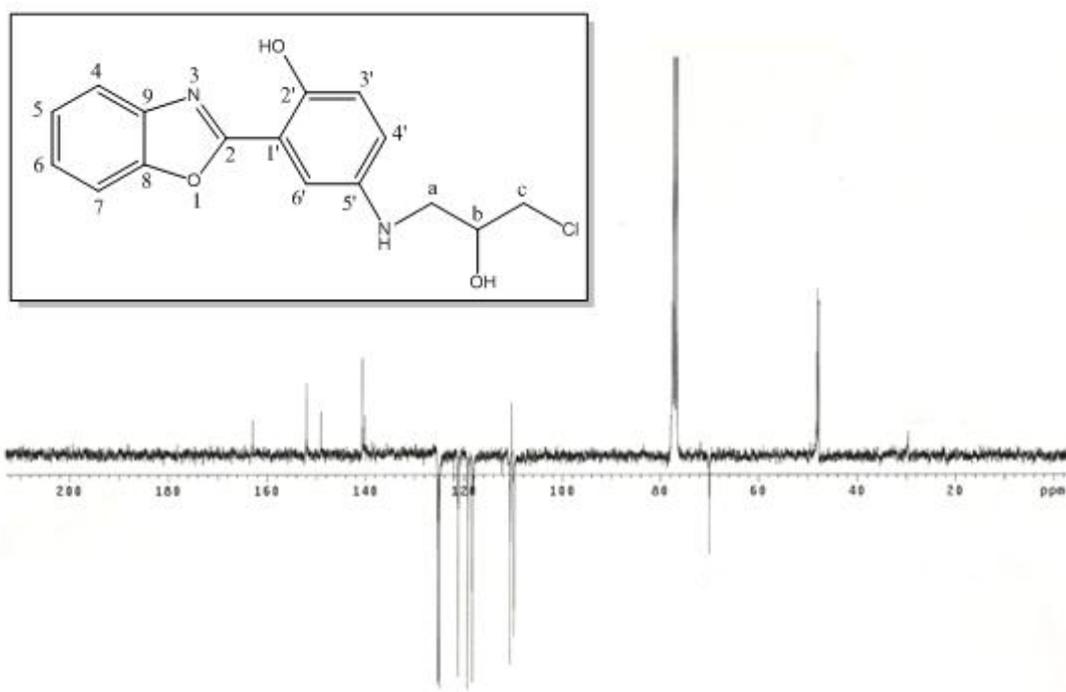
Expandindo a região dos hidrogênios alifáticos de **4** (Figura 13), pode-se observar um multiplete entre 4,25 e 4,0 ppm corresponde ao hidrogênio carbinólico H<sub>b</sub>, os 2 hidrogênios H<sub>c</sub> aparecem entre 3,8 ppm e 3,62 ppm pois são mais desblindados devido ao efeito retirador do cloro, os 2 hidrogênios H<sub>a</sub> aparecem entre 3,5 e 3,2 ppm. Estes dois conjuntos de hidrogênios (H<sub>a</sub> e H<sub>c</sub>) deveriam aparecer como dois dubletes, cada qual correspondente a um dos conjuntos. Entretanto, aparecem desbobrados como dois duplos dubletes devido ao fato de os dois serem hidrogênios diastereotópicos, uma vez que a substituição de um dos hidrogênios gera um centro assimétrico.



**Figura 14.** Expansão da região dos hidrogênios alifáticos do espectro apresentado na Figura 13.

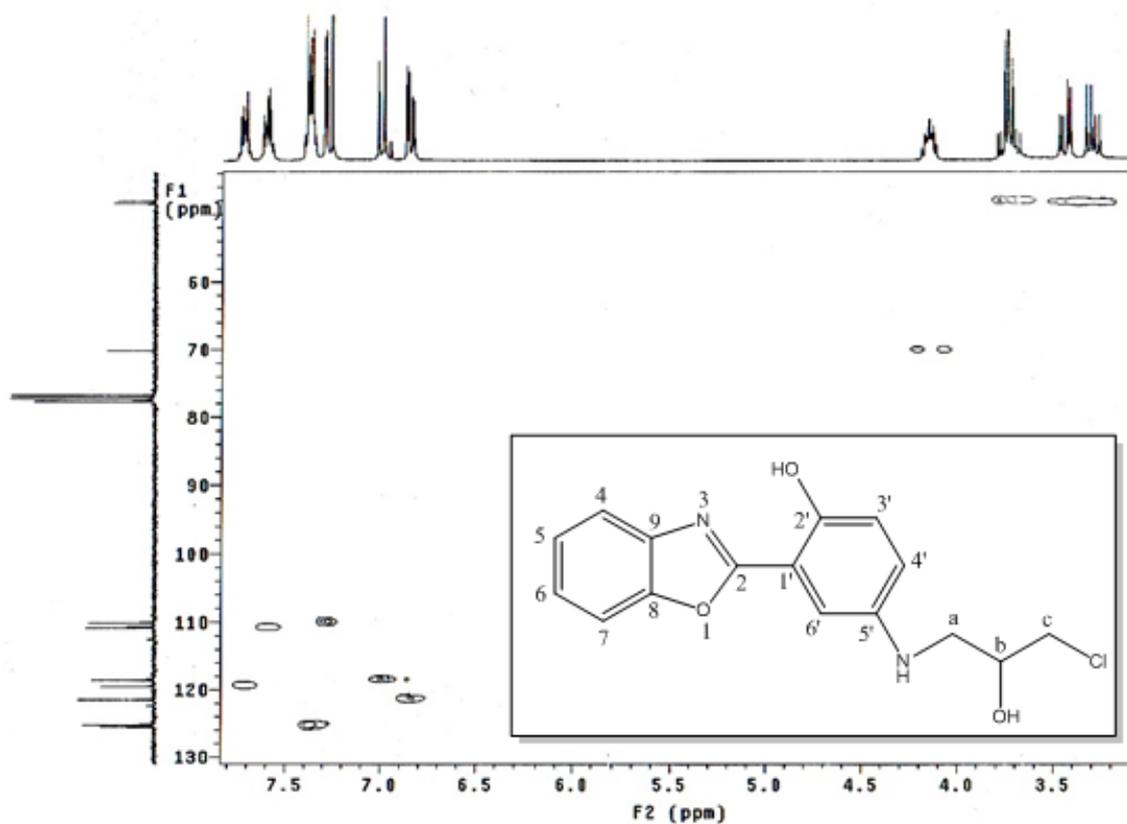
Quanto ao espectro de <sup>13</sup>C APT de **4** (Figura 15), foi possível identificar os três carbonos alifáticos entre 40 e 70 ppm (C<sub>a</sub> ~ 48 ppm, C<sub>b</sub> ~ 70 ppm e C<sub>c</sub> ~47 ppm), e todos os sete carbonos aromáticos entre 100 ppm e 160 ppm (C<sub>2</sub>- C<sub>9</sub>, C<sub>1</sub>'- C<sub>6</sub>'). O carbono terciário C<sub>7</sub> é

observado em aproximadamente 109 ppm, o carbono quaternário C<sub>1'</sub> é observado em 110 ppm e o C<sub>6'</sub>, também próximo à 110 ppm, porém um pouco mais desblindado. Os carbonos C<sub>4'</sub> e C<sub>3'</sub> saem, respectivamente em 118 ppm e 119 ppm, com o C<sub>3'</sub> um pouco mais desblindado devido ao efeito da hidroxila. Os carbonos terciários C<sub>6</sub> e C<sub>5</sub>, bastante parecidos quimicamente, aparecem aproximadamente em 124 e 125 ppm, respectivamente. O carbono quaternário C<sub>5'</sub> é visto em torno de 140 ppm, bastante semelhante quimicamente ao carbono quaternário C<sub>9</sub>, que aparece um pouco mais desblindado, também em torno de 140 ppm. Em torno de 150 ppm podem ser vistos o carbono C<sub>2'</sub> e o carbono C<sub>8</sub>, este último mais desblindado que o primeiro. Por fim, pode-se observar em aproximadamente 163 ppm o carbono quaternário C<sub>2</sub>.



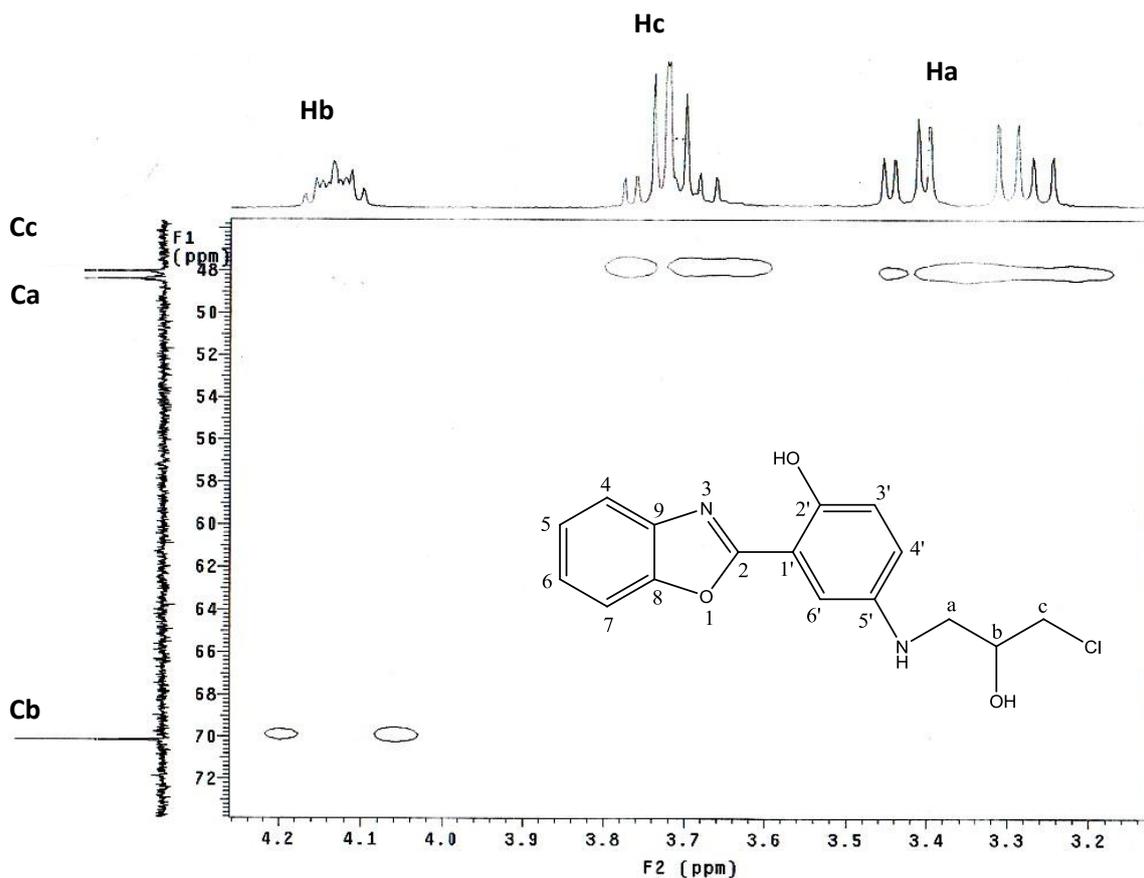
**Figura 15.** Espectro RMN de APT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do precursor (4).

O corante **4** teve o assinalamento completo de seus hidrogênios e carbonos com o auxílio da técnica heteronuclear de HMQC (Figuras 16-18).



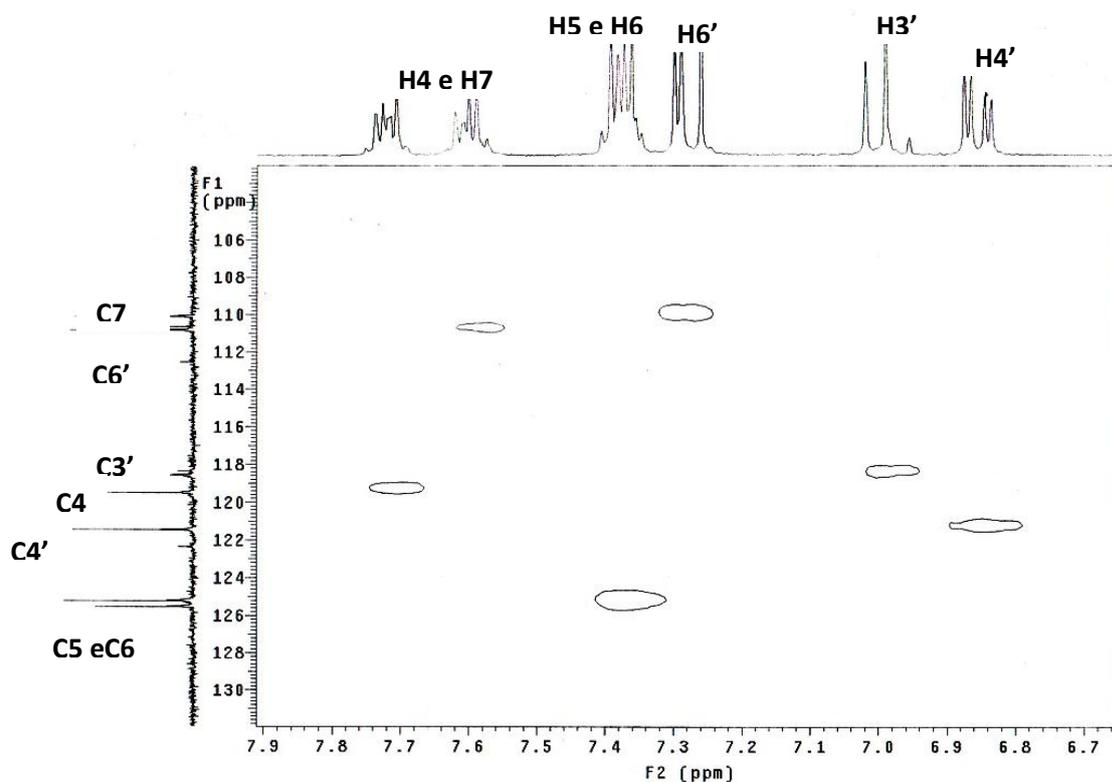
**Figura 16.** HMQC do corante **4** em  $\text{CDCl}_3$ .

Esta análise confirmou que os hidrogênios que aparecem entre 3,5 ppm e 3,0 ppm estão relacionados ao carbono ligado ao nitrogênio, bem como que os dois hidrogênios que aparecem entre 4,0 ppm e 3,5 ppm são aqueles ligados ao carbono ligado ao cloro. E por fim, que o multiplete em torno de 4 ppm está ligado ao carbono carbinólico que aparece em frequência maior que os demais carbonos.



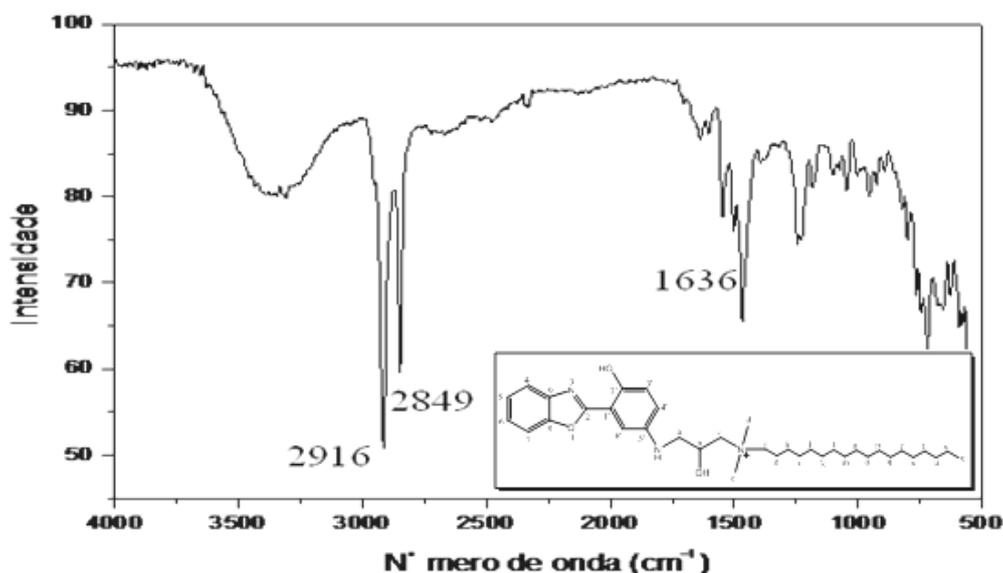
**Figura 17.** Expansão da região alifática do HMQC para o corante **4** em  $\text{CDCl}_3$ .

O primeiro carbono terciário aromático,  $\text{C}_7$  em torno de 110 ppm está relacionado ao hidrogênio  $\text{H}_7$  que aparece em torno de 7,3 ppm. O carbono  $\text{C}_4$ , por ser mais desblindado devido ao efeito do nitrogênio, está em torno de 120 ppm e se relaciona ao hidrogênio  $\text{H}_4$  em torno de 7,7 ppm. Os carbonos 5 e 6 assemelham-se quimicamente e saem bastante próximos, em torno de 126 ppm, assim como os hidrogênio  $\text{H}_5$  e  $\text{H}_6$ , correlacionados a estes carbonos, aparecem sobrepostos em torno de 7,4 ppm. O carbono  $\text{C}_6'$ , em torno de 110 ppm está relacionado ao hidrogênio  $\text{H}_6'$ , em aproximadamente 7,6 ppm. Os dois acoplamentos  $\text{H}_4'$  (orto e meta) ficam bastante claros no espectro pela visualização dos dois dubletes entre 6,8-6,9 ppm e que se relacionam com o carbono  $\text{C}_4'$  em torno de 121 ppm. Ainda pode-se observar o dublete em torno de 7,0 ppm, referente ao  $\text{H}_3'$ . Este hidrogênio está relacionado ao carbono  $\text{C}_3'$  que é visto em torno de 118 ppm.



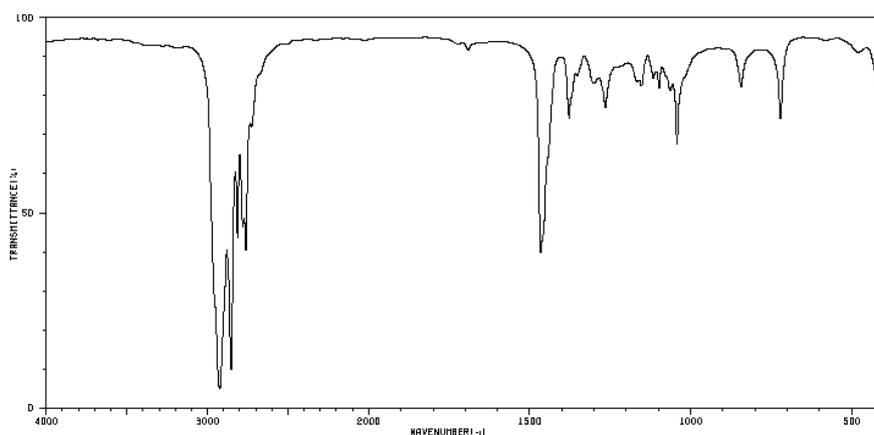
**Figura 18.** Expansão da região aromática do HMQC para o corante **4** em  $\text{CDCl}_3$ .

A confirmação da formação do sal de amônio (**5**) se deu primeiramente por infravermelho<sup>39</sup> (Figura 19). Para este corante, observou-se o sinal do estiramento do grupo hidroxila em torno de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , os estiramentos dos grupos metilênicos  $-\text{CH}_2$  simétrico e assimétrico em  $2916\text{ cm}^{-1}$  e  $2849\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, bem como o estiramento  $-\text{C}-\text{N}$  em  $1460\text{ cm}^{-1}$ .

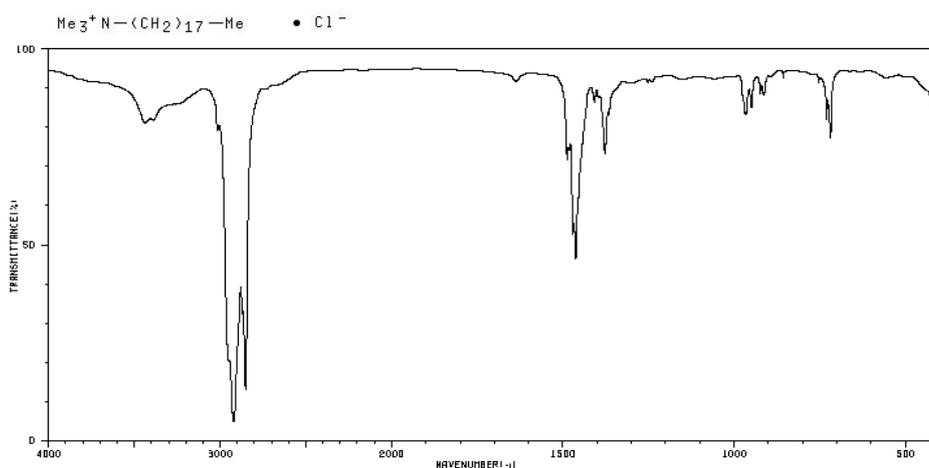


**Figura 19.** Espectro no infravermelho do corante **5**.

Uma vez que pelo espectro no infravermelho desta molécula não se tinha a certeza de que o nitrogênio estava quaternizado, resolveu-se fazer uma análise comparativa entre o espectro de **5**, a amina de partida - a *N,N*-dimetiloctadecilamina - e o seu respectivo sal. Conforme pode-se observar na Figuras 19 e 20, os espectros no IV da *N,N*-dimetiloctadecilamina e do seu respectivo sal de amônio diferenciam-se principalmente na região vibracional dos estiramentos dos grupos metila e metilênico. Através desta análise foi possível confirmar que a *N,N*-dimetiloctadecilamina foi quaternizada pelo corante **4** tendo em vista a semelhança do espectro de **5** com o espectro da Figura 21.

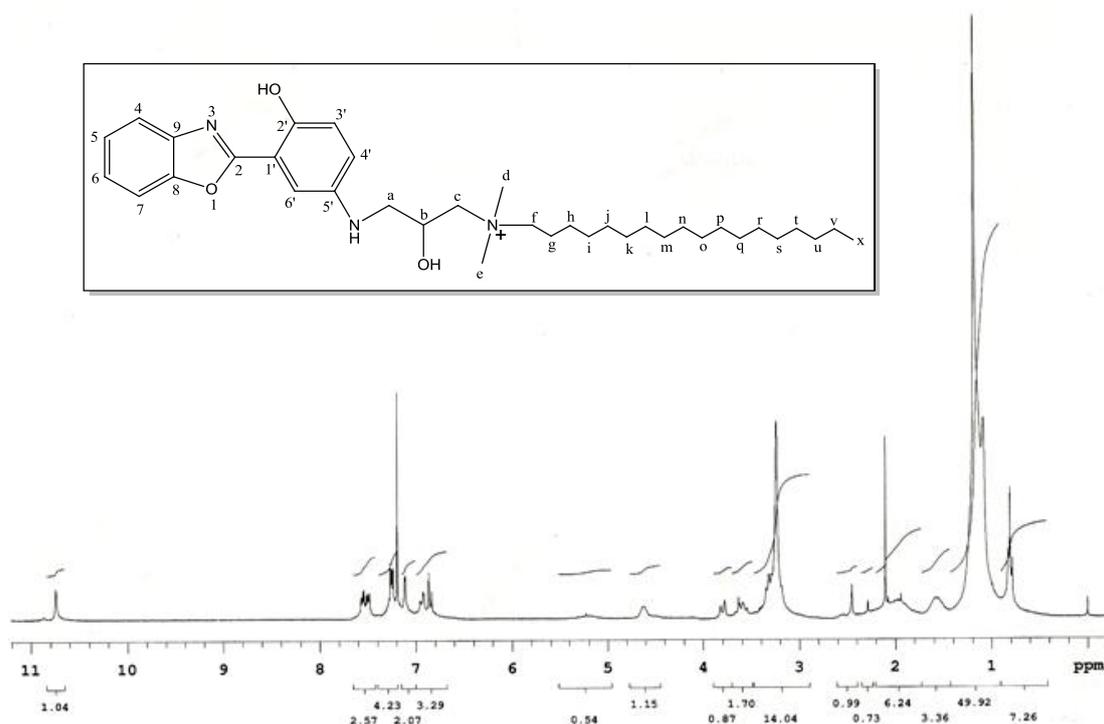


**Figura 20.** Espectro no infravermelho da *N,N*-dimetiloctadecilamina. Fonte: SDDBS - *Spectral Database for Organic Compounds*.

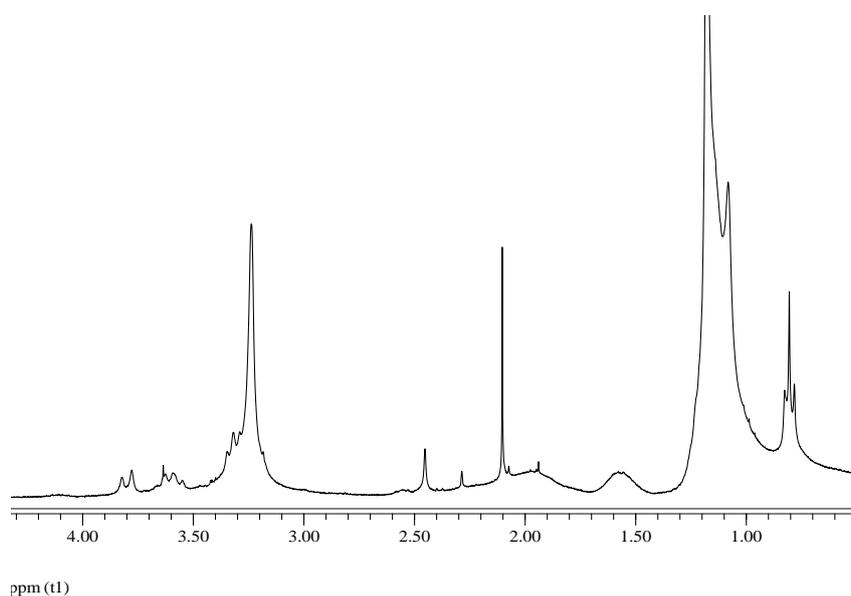


**Figura 21.** Espectro no infravermelho do cloreto de *N,N,N*-trimetiloctadecilamínio. Fonte: SDBS - *Spectral Database for Organic Compounds*.

Além da caracterização por IV, a confirmação da estrutura de **5** foi feita por RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 22 e 23) e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 24). No RMN de  $^1\text{H}$  pode-se observar o sinal do hidrogênio fenólico em 10,74 ppm e os sete hidrogênios aromáticos entre 6,83 ppm e 7,57 ppm, conforme explicação dada para o corante **4**. Na região dos hidrogênio alifáticos, até ~ 4,2 ppm, observa-se os demais hidrogênios da molécula, conforme pode ser visto na expansão abaixo. Os seis hidrogênio metílicos ligados ao nitrogênio quaternário, assim como os dois hidrogênio ( $\text{H}_d$ ,  $\text{H}_e$ ,  $\text{H}_f$ ), aparecem no multiplete entre 3,5 ppm e 3,0 ppm, com integração para oito hidrogênios. Os dois hidrogênios identificados como  $\text{H}_g$ , assim como os dois hidrogênios de  $\text{H}_v$  saem praticamente juntos, devido à similaridade de seus ambientes químicos, entre ~1,8 ppm e 2,5 ppm. Os 28 hidrogênios da alquílica ( $\text{H}_h$ - $\text{H}_u$ ) podem ser identificados através do sinal bastante intenso em torno de 1 ppm. Já os três hidrogênios da metila terminal, saem em torno de 0,6 ppm. Os hidrogênios correspondentes à porção já identificada anteriormente para o corante **4** ( $\text{R-CH}_2\text{-COH-CH}_2\text{-R}$ ) podem ser novamente observados entre 3,5 e 4,0 ppm ( $\text{H}_a$ - $\text{H}_c$ ).



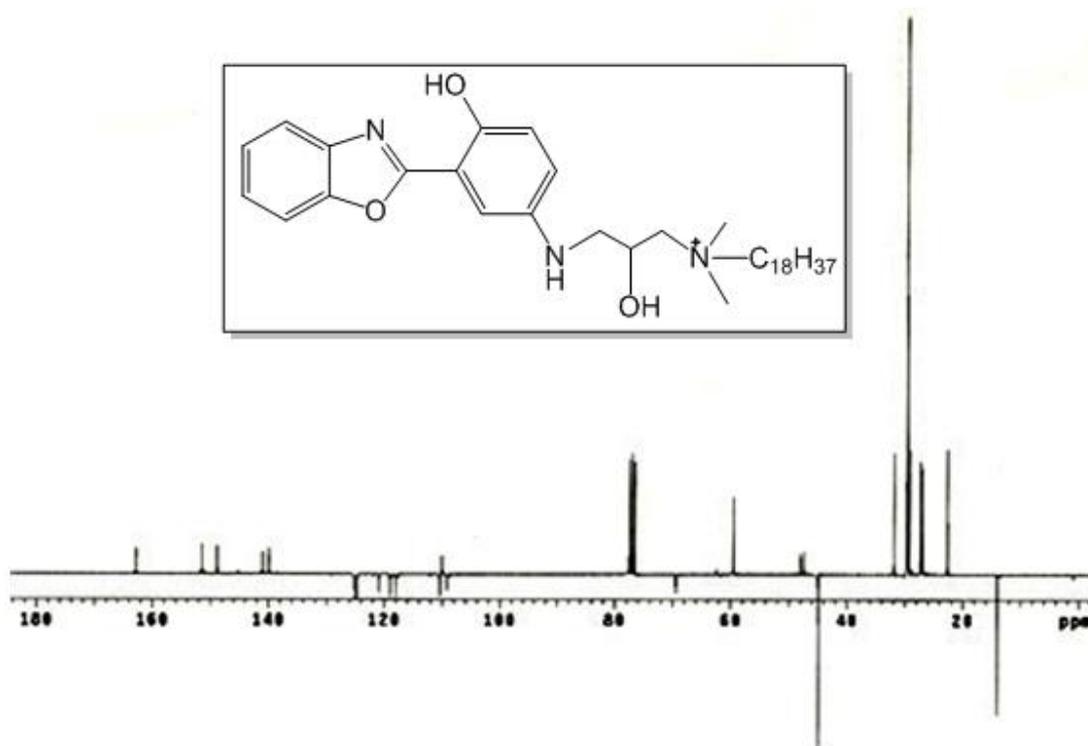
**Figura 22.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do corante **5**.



**Figura 23.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a região dos hidrogênios alifáticos do corante **5**.

A identificação de todos os carbonos da molécula foi possível através da técnica de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APT), corroborando para a confirmação da estrutura. No espectro abaixo pode-se observar que os carbonos alifáticos aparecem entre 14 ppm e 70 ppm ( $\text{C}_x\text{-C}_a$ ), com o carbono primário a, mais blindado, aparecendo em torno de 14 ppm, o carbono secundário y,

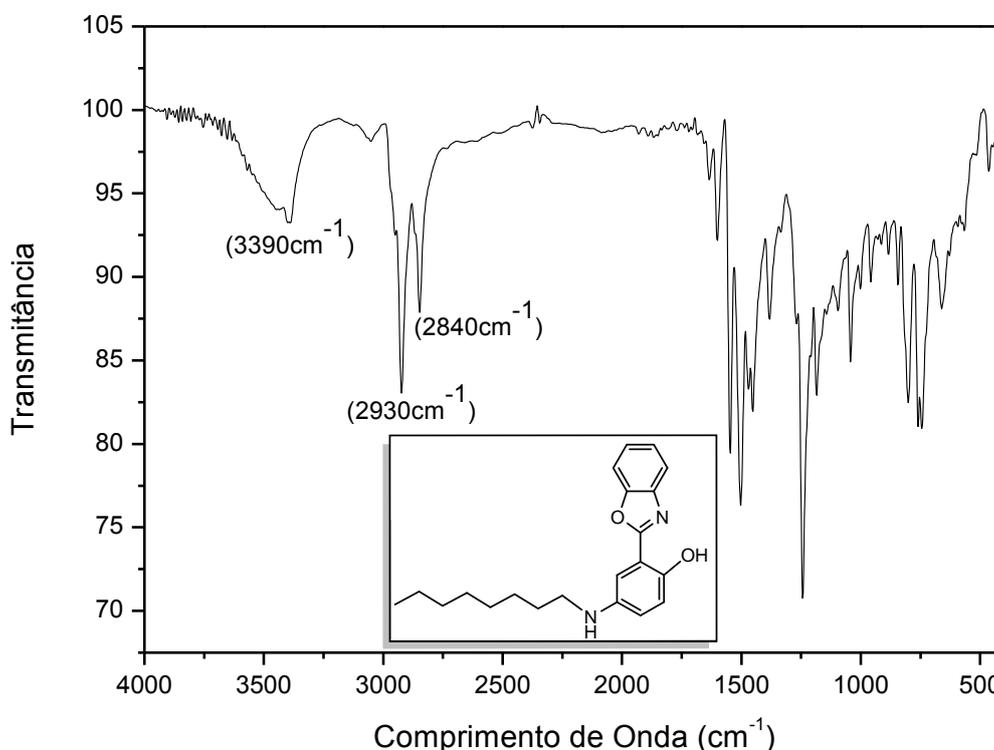
pouco desblindado, aparecendo em torno de 27 ppm, dois outros carbonos secundários, um pouco mais desblindados C<sub>g</sub> e C<sub>h</sub>, aparecem entre 28 e 29 ppm. Os outros 10 carbonos secundários e quimicamente semelhantes (C<sub>s</sub>-C<sub>j</sub>) aparecem entre 28 ppm e 29 ppm. Por fim, os carbonos aromáticos aparecem entre 110 ppm e 163 ppm (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub> e C<sub>1</sub>'-C<sub>6</sub>'). O carbono terciário C<sub>7</sub> é observado em aproximadamente 109 ppm, o carbono quaternário C<sub>1</sub>' é observado em 110 ppm e o C<sub>6</sub>', também próximo à 110 ppm, porém um pouco mais desblindado. Os carbonos C<sub>4</sub>' e C<sub>3</sub>' saem, respectivamente em 118 ppm e 119 ppm, com o C<sub>3</sub>' um pouco mais desblindado devido ao efeito da hidroxila. Os carbonos terciários C<sub>6</sub> e C<sub>5</sub>, bastante parecidos quimicamente, aparecem aproximadamente em 124 e 125 ppm, respectivamente. O carbono quaternário C<sub>5</sub>' é visto em torno de 140 ppm, bastante semelhante quimicamente ao carbono quaternário C<sub>9</sub>, que aparece um pouco mais desblindado, também em torno de 140 ppm. Em torno de 150 ppm podem ser vistos o carbono C<sub>2</sub>' e o carbono C<sub>8</sub>, este último mais desblindado que o primeiro. Por fim, pode-se observar em aproximadamente 163 ppm o carbono quaternário C<sub>2</sub>.



**Figura 24.** Espectro de RMN de APT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do corante **5**.

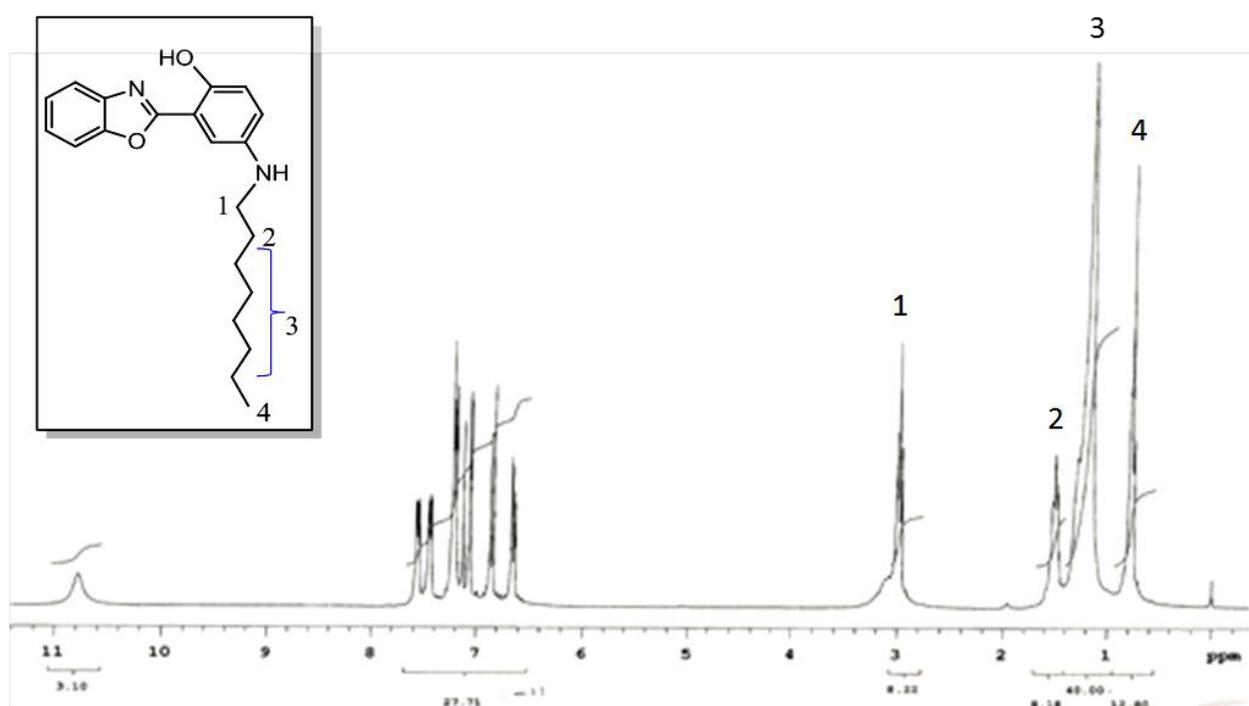
A reação de substituição entre a amina aromática **3** o iodoctano para formar o 2-(5'-*N*-octilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (**6**) foi confirmada por IV<sup>39</sup> (Figura 25), através do

qual pode-se observar a presença dos estiramentos  $\text{-NH}$  em  $3390\text{ cm}^{-1}$  e  $\text{-CH}_2$  em  $2930\text{ cm}^{-1}$  e  $2840\text{ cm}^{-1}$ , como se esperava para esta estrutura.



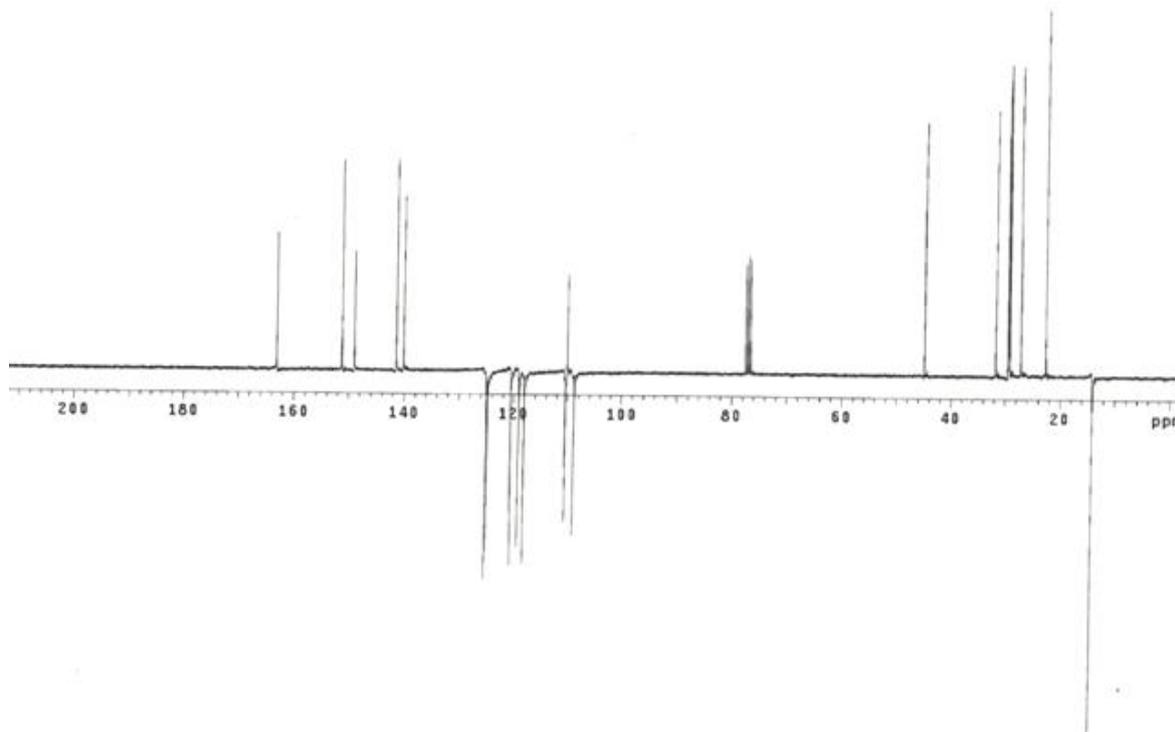
**Figura 25.** Espectro no Infravermelho para o corante **6**.

Pelo RMN de  $^1\text{H}$  pode-se observar o mesmo sistema aromático, já mencionado anteriormente para os corantes **4** e **5**, com os sete hidrogênios compreendidos entre 6,8 ppm e 7,8 ppm e o hidrogênio fenólico em 11 ppm. Como a diferenças entre os corantes se dá na região alifática de suas estruturas, abaixo pode ser vista a identificação destes hidrogênios. Assinalado com o 4 e com integração para três hidrogênios, pode-se observar os hidrogênios metílicos da molécula, já em torno de 1 ppm, com integração para dez hidrogênios quimicamente semelhantes, os hidrogênios da cadeia alquílica. Identificados com o número 2 e integração pra dois hidrogênios, pode-se observar o sinal dos hidrogênios que sofrem um fraco efeito de desblindagem causado pelo grupo amino e pelos anéis aromáticos. Por fim, em torno de 3 ppm observa-se o sinal referente aos dois hidrogênios do carbono ligado ao grupo amino, que saem bastante desblindados (Figura 26).



**Figura 26.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do corante **6**.

Todos os carbonos da molécula puderam ser identificados pelo RMN de  $^{13}\text{C}$  APT, onde os carbonos alifáticos aparecem entre 14 ppm e 110 ppm (Figura 27). O carbono primário  $\text{C}_h$ , aparece em 14,04 ppm, os carbonos secundários  $\text{C}_g$ - $\text{C}_f$  ou  $\text{b}$ , entre 27 ppm e 29, 49 ppm. O carbono  $\underline{\text{a}}$ ,  $\text{C}_a$ , um pouco mais desblindado devido ao efeito do grupo amino, aparece em torno de 110 ppm. Por fim, os carbonos aromáticos, que aparecem após 110 ppm ( $\text{C}_2$ - $\text{C}_9$  e  $\text{C}_1'$ - $\text{C}_6'$ ), de forma análoga ao que foi descrito para os corantes **4** e **5**. Ou seja, o carbono terciário  $\text{C}_7$  é observado em aproximadamente 109 ppm, o carbono quaternário  $\text{C}_1'$  é observado em 110 ppm e o  $\text{C}_6'$ , também próximo à 110 ppm, porém um pouco mais desblindado. Os carbonos  $\text{C}_4'$  e  $\text{C}_3'$ , saem, respectivamente em 118 ppm e 119 ppm, com o  $\text{C}_3'$ , um pouco mais desblindado devido ao efeito da hidroxila. Os carbonos terciários  $\text{C}_6$  e  $\text{C}_5$ , bastante parecidos quimicamente, aparecem aproximadamente em 124 e 125 ppm, respectivamente. O carbono quaternário  $\text{C}_5'$  é visto em torno de 140 ppm, bastante semelhante quimicamente ao carbono quaternário  $\text{C}_9$ , que aparece um pouco mais desblindado, também em torno de 140 ppm. Em torno de 150 ppm podem ser vistos o carbono  $\text{C}_2'$  e o carbono  $\text{C}_8$ , este último mais desblindado que o primeiro. Por fim, pode-se observar em aproximadamente 163 ppm o carbono quaternário  $\text{C}_2$ .



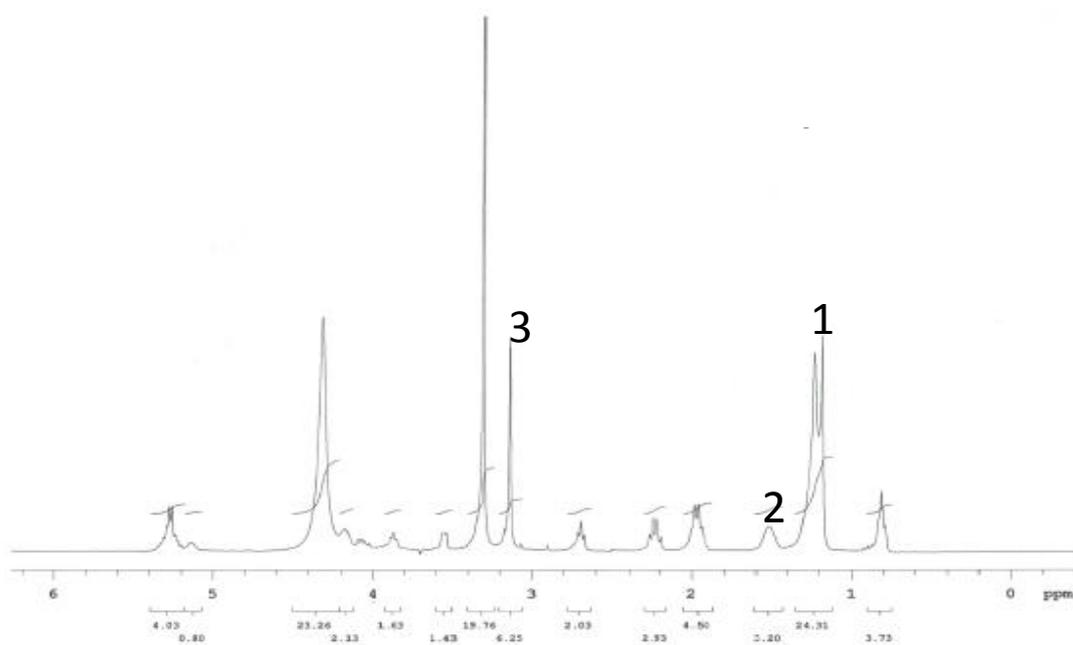
**Figura 27.** Espectro de RMN APT ( 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do corante **6**.

Como os corantes **6** e **7** se diferem apenas pelo tamanho da cadeia alquílica, o mecanismo de formação do 2-(5'-*N*-dodecilamino-2'-hidroxifenil)benzoxazol **7**, assim como o do corante **6**, é via reação de substituição nucleofílica. A caracterização do corante **7** é bastante semelhante à do corante **6** a vista que a diferença entre os dois corantes está no tamanho da cadeia alquílica ligada ao grupo 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol. Desta forma, no espectro no infravermelho se observa a banda de estiramento  $\text{-NH}$  em  $3390\text{ cm}^{-1}$  e as bandas de estiramento  $\text{-CH}_2$  simétrico e assimétrico em  $3850\text{ cm}^{-1}$  e  $3915\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Pelo RMN de  $^1\text{H}$  observa-se os 7 hidrogênios aromáticos entre 6,8 ppm e 7,8 ppm; os três hidrogênios metílicos aparecem em torno de 0,8 ppm, os 18 hidrogênios metilênicos aparecem no sinal alargado em torno de 1,2 ppm. Os dois hidrogênios ligados ao carbono vizinho ao carbono ligado ao nitrogênio tem deslocamento químico de  $\sim 1,6$  ppm enquanto que os dois hidrogênios ligados ao carbono vizinho ao grupo  $\text{NH}$ , têm deslocamento químico de 3,2 ppm.

Os resultados obtidos com o RMN de  $^{13}\text{C}$  corroboram para a confirmação da estrutura e são análogos aos descritos para o corante **6**. Todos os espectros podem ser vistos nos anexos.

### 5.1.1. Purificação da Fosfatidilcolina

A lecitina de soja é uma mistura de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol e ácidos graxos. A cromatografia em coluna é utilizada para isolar a fosfatidilcolina. O líquido incolor resultante do processo de purificação da fosfatidilcolina por cromatografia em coluna foi evaporado à pressão reduzida para eliminação dos solventes. O gel branco resultante da evaporação do solvente foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$ . No espectro da Figura 28 observam-se três sinais que dão informações quanto à eficiência da purificação. São eles: o sinal 1 em torno de 1,2 ppm, o sinal 2 em torno de 1,6 ppm e o sinal 3 em torno de 3,2 ppm. Os sinais 1 e 2 são referentes aos hidrogênios dos metilenos das cadeias dos ácidos graxos, enquanto que o sinal 3 é referente aos hidrogênios das metilas da porção colina.<sup>35</sup> Conforme a literatura,<sup>35-38</sup> o grau de pureza da fosfatidilcolina é dado através da razão entre a soma das integrações dos sinais 1 e 2 pela integração do sinal 3, ou seja, pela quantidade de hidrogênios pertencentes aos ácidos graxos, pelos hidrogênios pertencentes a colina. A razão encontrada para no procedimento de purificação foi de 4,4. Este valor, segundo a literatura, está próximo a uma fosfatidilcolina purificada padrão Solae do Brasil.<sup>35</sup>



**Figura 28.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da lecitina de soja purificada.

## 5.2. ESTUDO FOTOFÍSICO

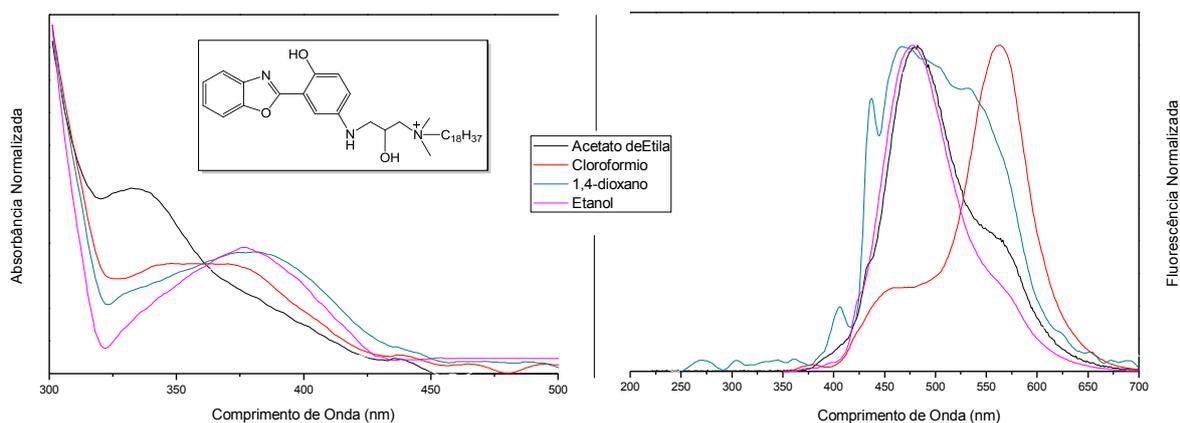
### 5.2.1. Influência da polaridade do solvente na fotofísica dos corantes **5-7**

Antes de iniciar o estudo fotofísico dos corantes em lipossomas, foi realizado o estudo fotofísico deles em solventes orgânicos de diferentes polaridades a partir de soluções dos corantes **5-7** em diferentes solventes em concentrações variando de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  Molar. O comprimento de onda do máximo de absorção ( $\lambda_{máx}^{abs}$ ) e o comprimento de onda do máximo de emissão ( $\lambda_{máx}^{em}$ ) foram medidos através das espectroscopias de absorção na região do UV-Vis e emissão de fluorescência, respectivamente. Tanto o deslocamento de Stokes ( $\Delta\lambda_{ST}$ ) como o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{máx}$ ) também foram calculados. Para estes corantes, o coeficiente de extinção molar encontrado situa-se entre 2,0 e  $7,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , referente a transições do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Os dados fotofísicos dos corantes **5-7** nos diferentes solventes foram colocados nas Tabelas 1-3.

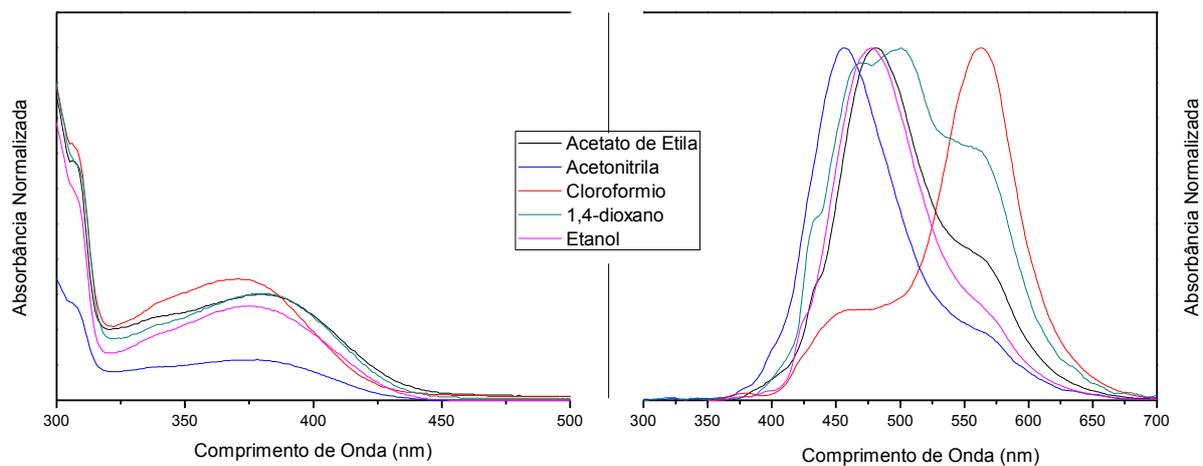
**Tabela 1.** Dados fotofísicos de absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência nos diferentes solventes para o corante **5**. Todos os comprimentos de onda, além dos deslocamentos de Stokes estão apresentados em nanômetros (nm).

Solvente	Conc.(Molar)	$\lambda_{max}^{abs}$	$\lambda_{em}^{enol}$	$\lambda_{em}^{ESIPT}$	$\Delta\lambda_{ST}$ Enol	$\Delta\lambda_{ST}$ ESIPT
EtOH	$10^{-4}$	375	477	565	102	190
	$10^{-5}$	375	477	567	102	192
	$10^{-6}$	375	477	560	102	185
CHCl <sub>3</sub>	$10^{-4}$	372	458	563	86	191
	$10^{-5}$	373	458	563	85	190
	$10^{-6}$	371	458	563	87	192
AcOEt	$10^{-4}$	383	480	561	97	178
	$10^{-5}$	384	479	564	95	180
	$10^{-6}$	384	481	562	97	178
Diox	$10^{-4}$	384	423	515	39	131
	$10^{-5}$	380	469	558	89	178
	$10^{-6}$	379	467	532	88	153
MeCN	$10^{-4}$	379	468	561	89	182
	$10^{-5}$	379	456	560	77	181
	$10^{-6}$	-	-	-	-	-

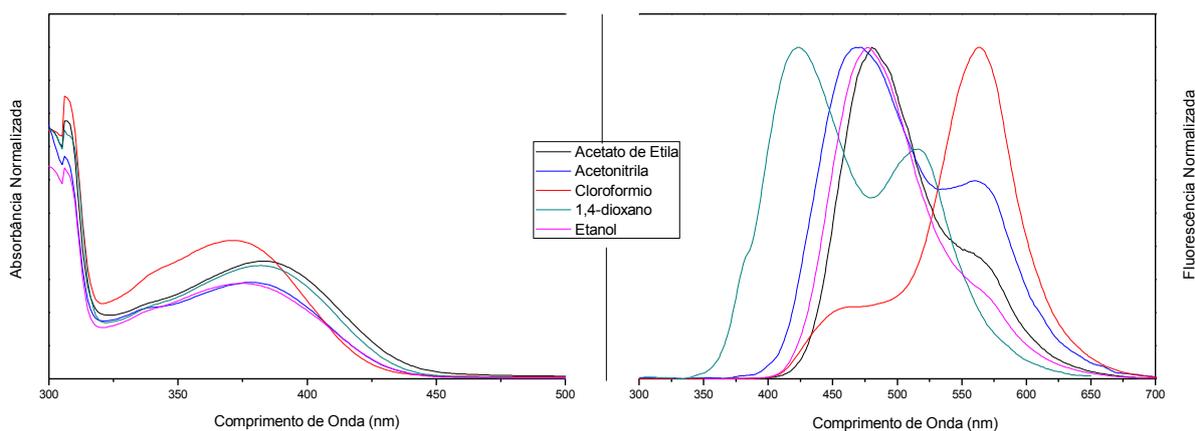
Os espectros de absorção e de emissão de fluorescência do corante **5** estão nas Figuras 29-30. Os valores dos coeficientes de extinção molar para este corante ficaram na faixa entre  $2\text{-}7\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , referente a transições do tipo  $\pi\rightarrow\pi^*$ . Para o corante **5**, a polaridade do solvente bem como a concentração da solução tem pouca influência sobre os valores dos máximos de absorção.



**Figura 29.** Espectros de absorção e emissão do corante **5** em diferentes solventes [ $10^{-6}$  mol/L].



**Figura 30.** Espectros de absorção e emissão do corante **5** em diferentes solventes [ $10^{-5}$  mol/L].



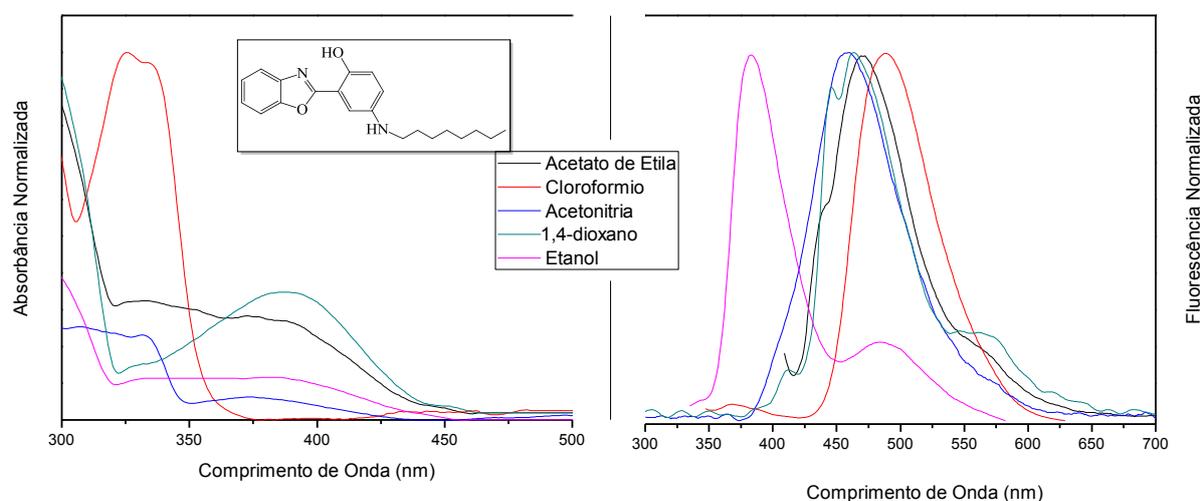
**Figura 31.** Espectros de absorção e emissão do corante **5** em diferentes solventes [ $10^{-4}$  mol/L].

A variação dos solventes polares apróticos bem como a concentração, provocou variações de até 20 nm nos valores dos máximos de emissão de fluorescência, onde os maiores valores encontrados foram para o 1,4-dioxano (solvente menos polar) e os menores valores, para a acetonitrila, que neste caso é o mais polar, acarretando em um maior deslocamento de Stokes da banda enol para o 1-4-dioxano e um menor deslocamento de Stokes enol para a acetonitrila. Para os demais solventes polares apróticos, os valores dos máximos de emissão enol foram próximos. É interessante notar que apesar destas variações nos valores dos máximos de emissão, os deslocamentos de Stokes para a banda ESIPT nestes solventes, foram próximos e na ordem de 180 nm. Nos casos extremos de maior e menor polaridade (etanol e clorofórmio), a variação da concentração não alterou os valores dos máximos de emissão de fluorescência e o deslocamento de Stokes da banda enol quando em etanol foi de 102 nm e de 85 nm em clorofórmio. Para estes dois solventes o deslocamento de Stokes da banda ESIPT foi de 190 nm. Disto resulta que solventes de menor polaridade favorecem a ocorrência da ESIPT.

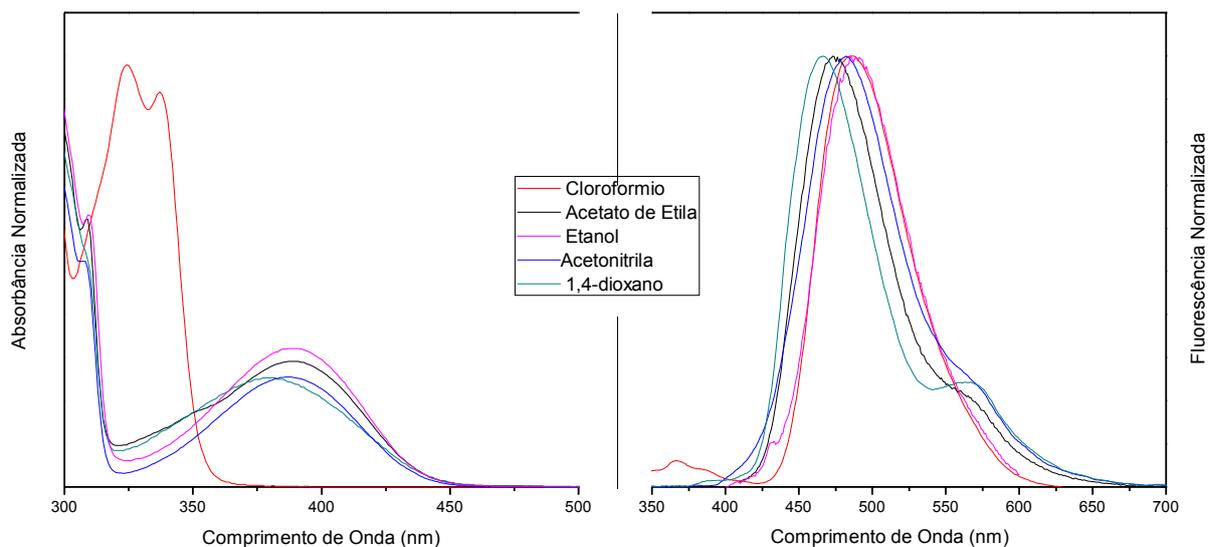
Os espectros de Uv-Vis e de emissão de fluorescência do corante **6**, assim como a tabela que relaciona os valores encontrados são mostrados nas Figuras 32-34 e os dados compilados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Dados fotofísicos de absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência nos diferentes solventes para o corante **6**. Todos os comprimentos de onda, além dos deslocamentos de Stokes estão apresentados em nanômetros (nm).

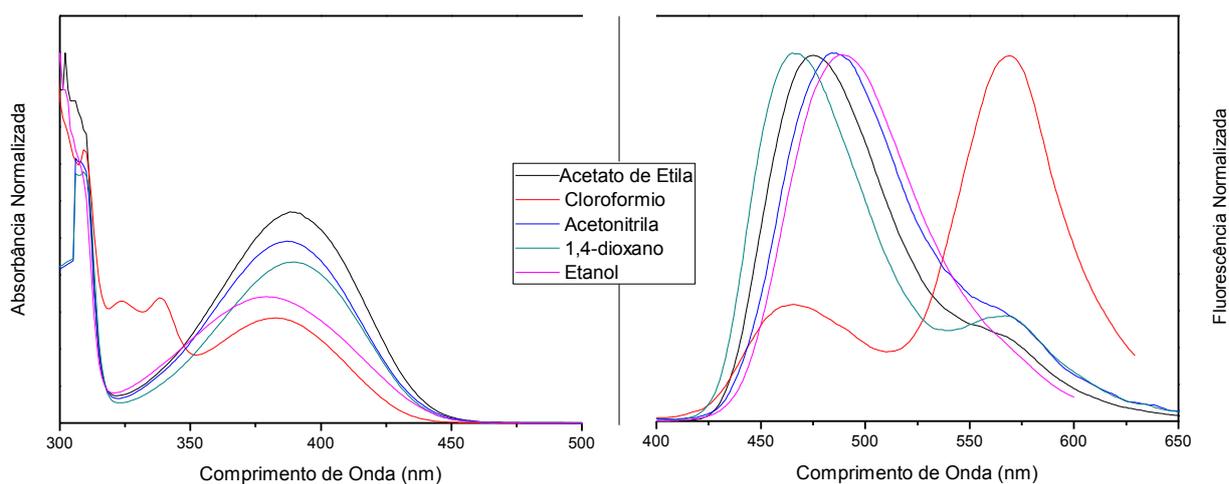
Solvente	Conc.(Molar)	$\lambda_{\max}^{abs}$	$\lambda_{em}^{enol}$	$\lambda_{em}^{ESIPT}$	$\Delta\lambda_{ST}Enol$	$\Delta\lambda_{ST}ESIPT$
EtOH	$10^{-4}$	380	488	-	108	-
	$10^{-5}$	380	488	-	108	-
	$10^{-6}$	382	486	-	104	-
CHCl <sub>3</sub>	$10^{-4}$	383	465	568	82	185
	$10^{-5}$	335	487	-	152	-
	$10^{-6}$	338	487	-	149	-
AcOEt	$10^{-4}$	390	474	563	84	173
	$10^{-5}$	390	474	565	84	175
	$10^{-6}$	390	469	565	79	175
Diox	$10^{-4}$	389	466	565	77	176
	$10^{-5}$	389	466	565	77	176
	$10^{-6}$	389	463	566	74	177
MeCN	$10^{-4}$	387	484	564	97	177
	$10^{-5}$	387	481	566	94	179
	$10^{-6}$	377	457	-	80	-



**Figura 32.** Espectros de absorção na região do UV-Vis e emissão de fluorescência do corante **6** em diferentes solventes na concentração de  $10^{-6}$  mol/L.



**Figura 33.** Espectros de absorção na região do UV-Vis e emissão de fluorescência do corante **6** em diferentes solventes na concentração de  $10^{-5}$  mol/L.

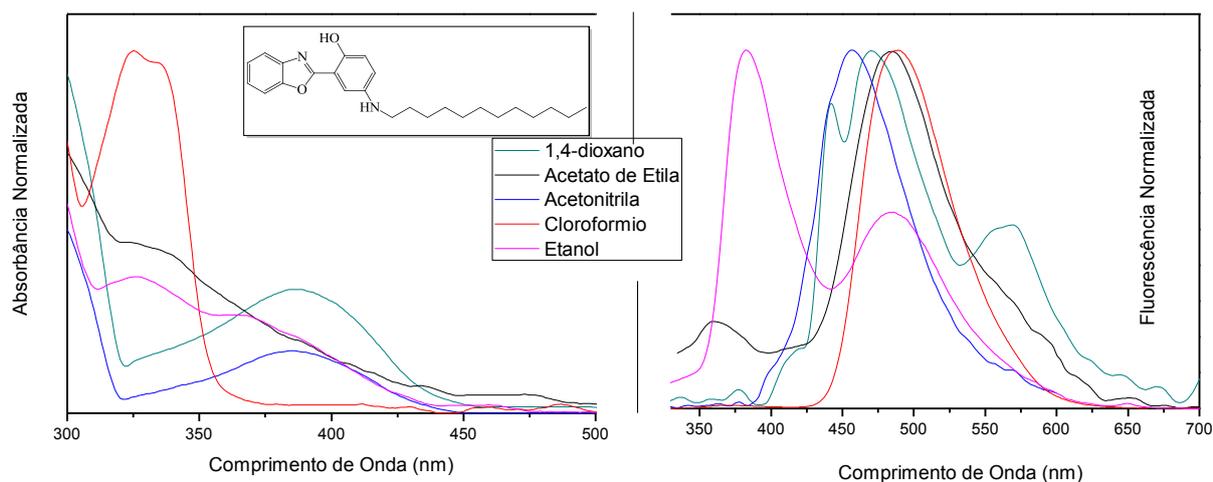


**Figura 34.** Espectros de absorção na região do UV-Vis e emissão de fluorescência do corante **6** em diferentes solventes na concentração de  $10^{-4}$  mol/L.

É possível observar através dos dados da Tabela 2 e das Figuras 32-34, que a variação do solvente, bem como da concentração, têm pouca influência sobre o valor do comprimento de onda do máximo de absorção para o corante **6** (a exceção do solvente clorofórmio nas concentrações de  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  mol/L, onde o corante apresentou um deslocamento hipsocrômico dos máximos de absorção). Quanto aos espectros de emissão, observa-se um comportamento similar para todos os solventes polares apróticos, com deslocamentos de Stokes na ordem de 170 nm para a banda ESIPT. Uma maior diferença entre as curvas se dá no caso do etanol e do clorofórmio. Para estes dois solventes, se observa não só a influência da polaridade, como

também da concentração sobre os deslocamentos das bandas de emissão de fluorescência. Na solução mais concentrada ( $10^{-4}$  mol/L) tem-se uma intensa emissão da forma enol para o etanol e uma intensa emissão ESIPT quando em clorofórmio, confirmando que um solvente polar aprótico favorece a ocorrência da ESIPT. É interessante notar que quando o corante se encontra na concentração de  $10^{-5}$  mol/L, tanto em etanol quanto em clorofórmio, a emissão de fluorescência é mesma e que para as soluções mais diluídas, o comportamento das bandas de emissão é o contrário daquele observado para a concentração de  $10^{-4}$  mol/L, ou seja, em etanol o corante apresenta somente banda ESIPT e em clorofórmio há a ocorrência de dupla emissão de fluorescência.

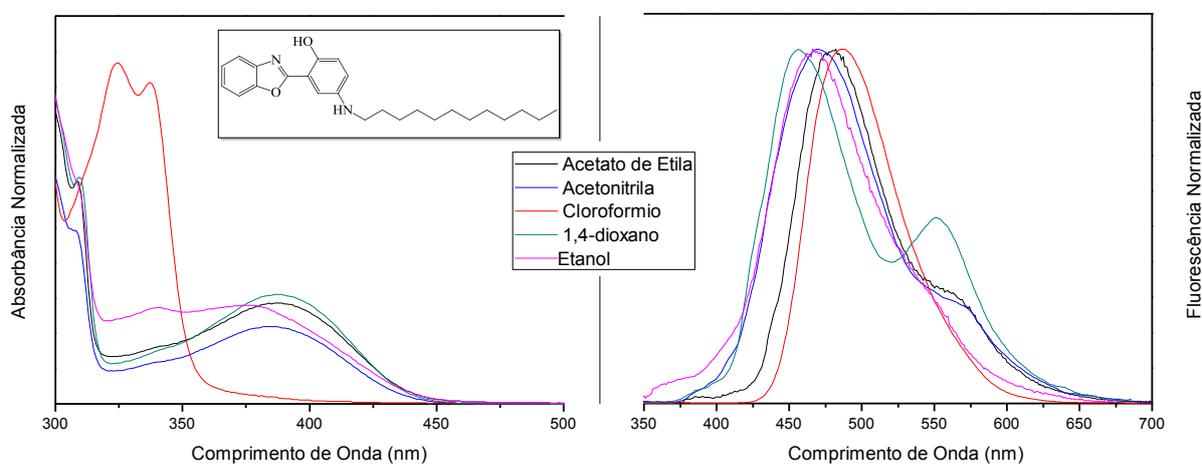
Os espectros de absorção e emissão do corante **7**, nos solventes relacionados, encontram-se nas Figuras 35-37. O valor do coeficiente de extinção molar para esta sonda está na faixa entre  $1-6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , referente a transições do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ .



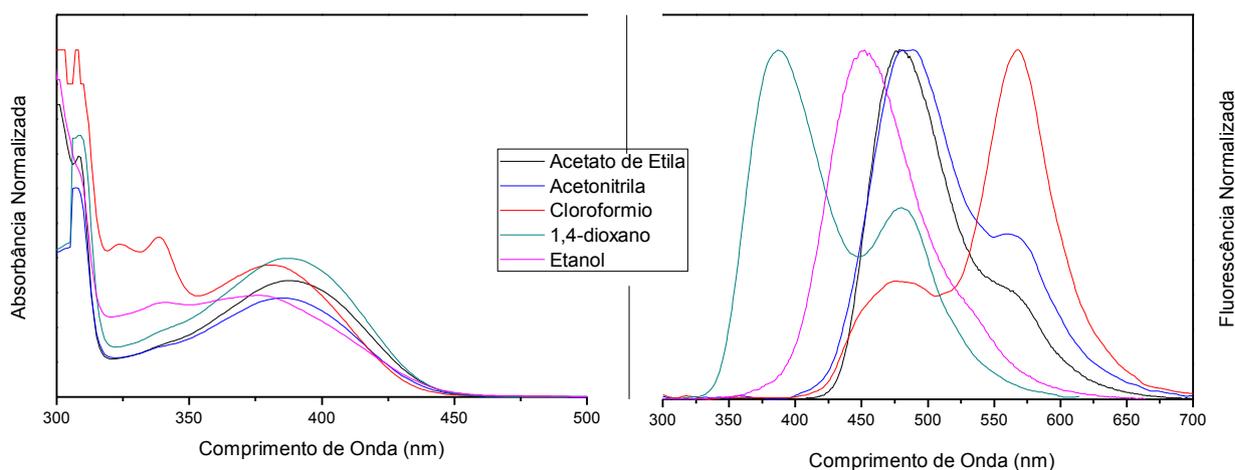
**Figura 35.** Espectros de absorção e emissão do corante **7** em diferentes solventes na concentração de  $10^{-6}$  mol/L.

**Tabela 3.** Dados fotofísicos de absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência nos diferentes solventes para o corante **7**. Todos os comprimentos de onda, além dos deslocamentos de Stokes estão apresentados em nanômetros (nm).

Solvente	Conc. (Molar)	$\lambda_{\max}^{abs}$	$\lambda_{em}^{enol}$	$\lambda_{em}^{ESIPT}$	$(\Delta\lambda_{ST})_{enol}$	$(\Delta\lambda_{ST})_{ESIPT}$
EtOH	$10^{-4}$	375	470	-	95	-
	$10^{-5}$	378	486	-	111	-
	$10^{-6}$	378	486	-	111	-
CHCl <sub>3</sub>	$10^{-4}$	381	476	568	95	187
	$10^{-5}$	337	487	-	150	-
	$10^{-6}$	335	487	-	152	-
AcOEt	$10^{-4}$	388	479	559	91	171
	$10^{-5}$	388	479	559	91	171
	$10^{-6}$	388	485	-	97	-
Diox	$10^{-4}$	387	473	-	86	-
	$10^{-5}$	389	455	552	66	163
	$10^{-6}$	388	486	565	98	177
MeCN	$10^{-4}$	384	459	563	101	179
	$10^{-5}$	385	470	566	85	181
	$10^{-6}$	387	459	-	72	-



**Figura 36.** Espectros de absorção e emissão do corante **7** em diferentes solventes na concentração de  $10^{-5}$  mol/L.



**Figura 37.** Espectros de absorção e emissão do corante **7** em diferentes solventes na concentração de  $10^{-4}$  mol/L.

Com base na Tabela 3 e nas Figuras 36-38, observa-se que no que se refere à absorção, a polaridade do solvente, bem como a concentração das soluções, têm pouca influência sobre o valor do máximo de absorção (valores mais baixos encontrados para o etanol). Quanto aos espectros de emissão de fluorescência, observa-se que para os solventes polares apróticos, os valores dos máximos variam em torno de 5 nm tanto para a banda enol quanto para a banda ESIPT e apresentam deslocamentos de Stokes em torno de 85 nm e 170 nm para estas mesmas bandas, respectivamente. Quando em etanol, o corante apresentou maiores deslocamentos de Stokes, tanto para a banda enol, como para a banda ESIPT. Já no caso em que o solvente exibe baixa polaridade e é aprótico, como o clorofórmio, a ocorrência da ESIPT só foi observada na concentração mais elevada, indicando que em baixas concentrações o solvente tinha pouco acesso à molécula.

Algumas conclusões parciais sobre o comportamento fotofísico dos corantes **5-7** em diferentes solventes são importantes apontar:

- (a) uma vez que as moléculas apresentam o mesmo fluoróforo, os valores dos seus máximos de absorção e emissão de fluorescência são bastante próximos, com pequenas variações relacionadas, provavelmente, à interação dos mesmos com o solvente;
- (b) as sondas apresentaram dupla emissão de fluorescência dependente do solvente e da concentração;

(c) quando as sondas apresentaram dupla emissão, foram observados dois valores para os deslocamentos de Stokes, sendo o de menor valor devido à banda enol e o de maior valor atribuído à banda ESIPT;

(d) com exceção do clorofórmio, todos os demais solventes são capazes de fazer ligação hidrogênio com o fluoróforo, de forma que a ocorrência ou não da ESIPT pode se relacionar à interação com o solvente. Já o clorofórmio não possui esta característica e a ocorrência da banda ESIPT deveria ser observada em todos os corantes. Entretanto, para os corantes **6** e **7** este fenômeno só foi observado quando a concentração do corante era de  $10^{-4}$  mol/L. Nas concentrações mais baixas do corante, que também apresentaram menor valor de máximo de absorção, a banda ESIPT não foi observada.

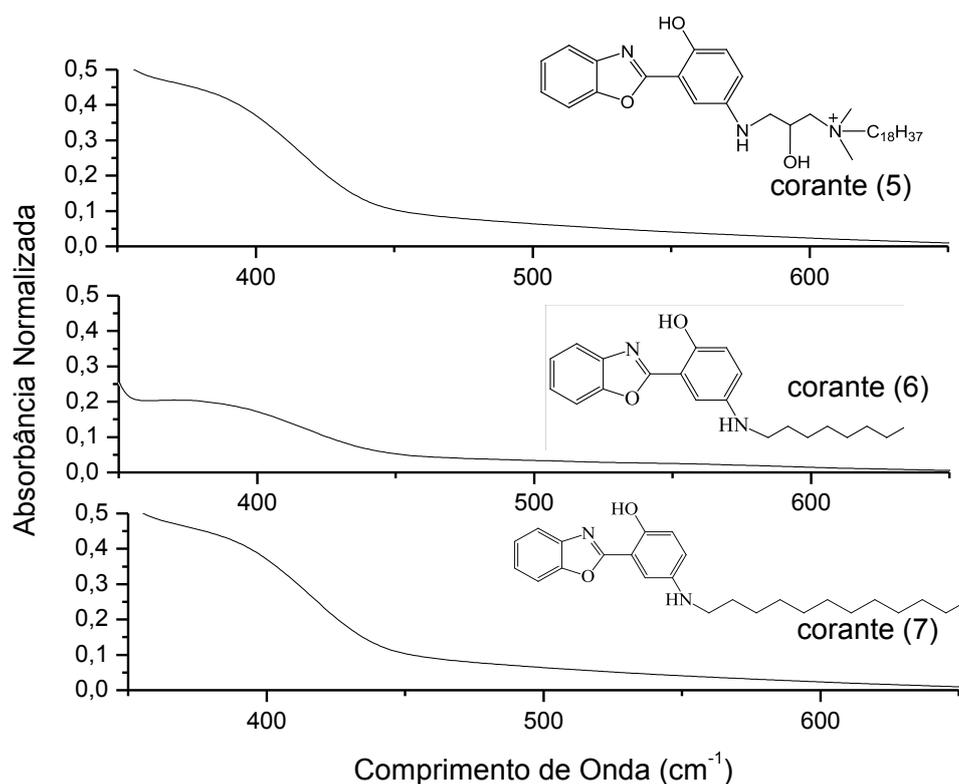
### 5.2.2. Estudo fotofísico dos corantes **5-7** em lipossomas de fosfatidilcolina

Visando estudar a capacidade de inserção dos corantes no meio lipídico através de medidas fotofísicas, foram utilizadas soluções dos corantes em lipossomas nas concentrações de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  mol/L, preparadas conforme descrito anteriormente.

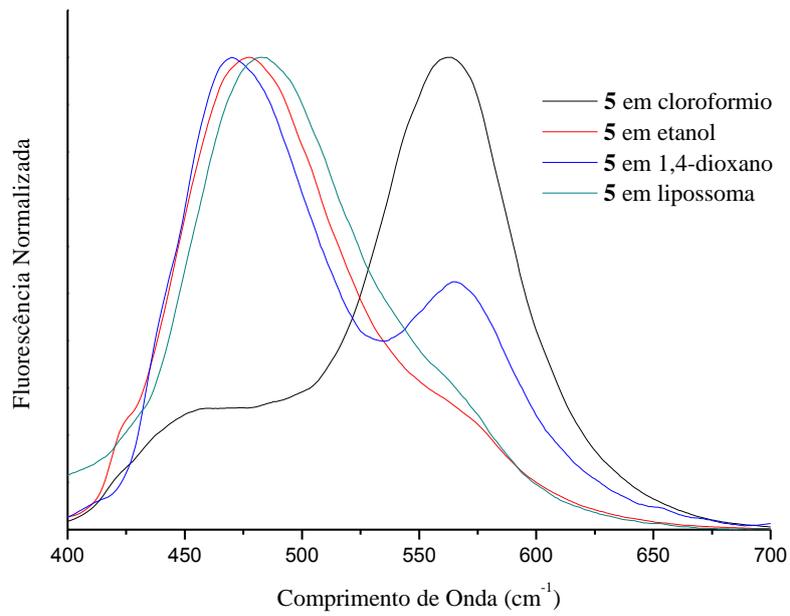
As medidas de absorvância foram feitas utilizando-se esfera integradora, com linha de base feita com sulfato de bário. A esfera integradora é um dispositivo adicional colocado em um compartimento do espectrofotômetro, tendo a função de detectar a distribuição difusa da luz. A esfera integradora é usada em medições de transmitância de amostras transparentes e de refletância de amostras opacas (como é o caso dos lipossomas). A parede interna da esfera é provida de uma pintura branca altamente refletiva (pastilha de sulfato de bário). O sulfato de bário é uma referência internacional, com 99,8% de refletância.<sup>40,41</sup> Os espectros mencionados, assim como a tabela que relaciona os valores encontrados para estudo fotofísico dos corantes em lipossoma, podem ser vistos abaixo.

**Tabela 4.** Máximos de absorção e emissão para os corantes **5**, **6** e **7** em solução de lipossoma. Todos os comprimentos de onda, além dos deslocamentos de Stokes estão apresentados em nanômetros (nm).

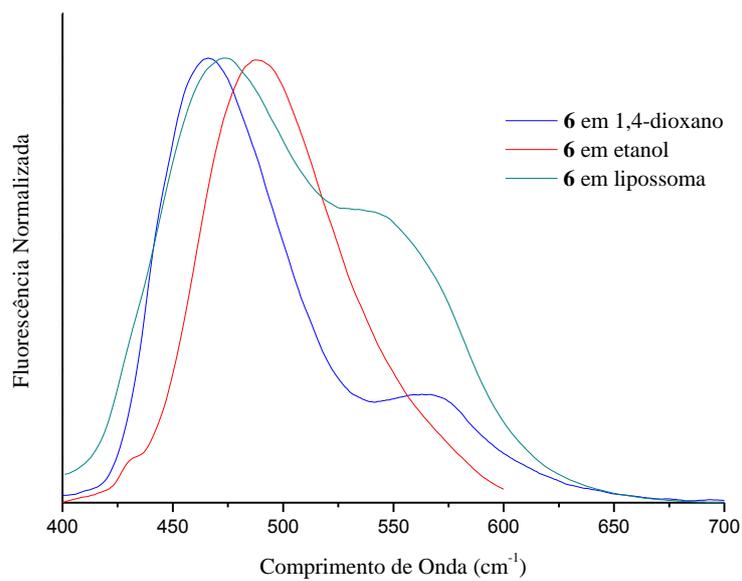
Corante	Conc. (Molar)	$\lambda_{\max}^{abs}$	$\lambda_1^{em}$	$\lambda_2^{em}$	$\Delta\lambda_1^{ST}$	$\Delta\lambda_2^{ST}$
<b>5</b>	$10^{-4}$	381	479	561	98	180
	$10^{-5}$	381	483	560	102	179
	$10^{-6}$	381	477	563	96	182
<b>6</b>	$10^{-4}$	383	467	555	84	172
	$10^{-5}$	383	472	543	89	160
	$10^{-6}$	383	477	559	94	176
<b>7</b>	$10^{-4}$	380	470	547	90	167
	$10^{-5}$	380	477	544	97	164
	$10^{-6}$	380	470	545	90	165



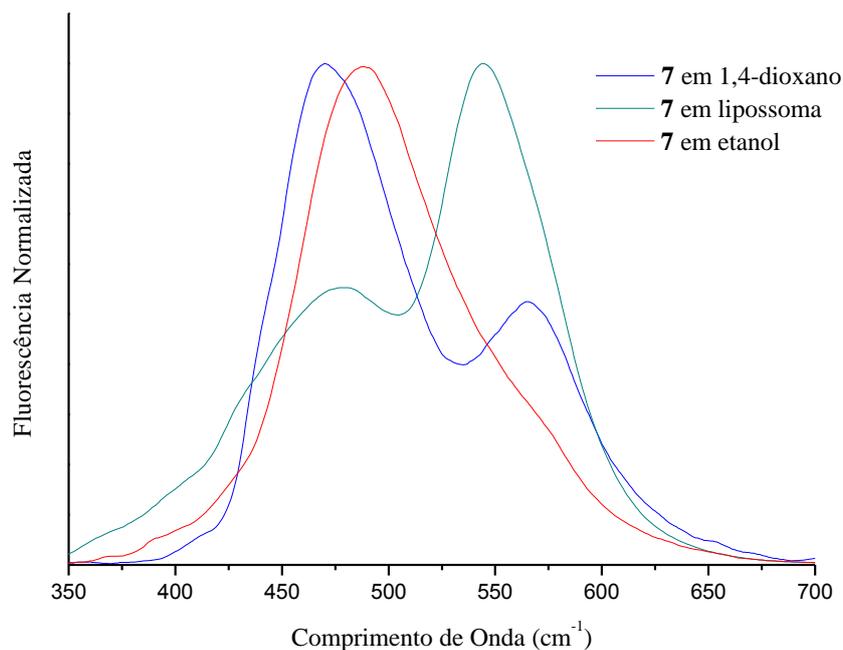
**Figura 38.** Espectro no UV-Vis para os corantes **5-7** em solução de lipossoma.



**Figura 39.** Espectros emissão do corante **5** em etanol, cloroformio, 1,4-dioxano e em solução de lipossoma na concentração de  $10^{-5}$  mol/L.



**Figura 40.** Espectros emissão do corante **6** 1,4-dioxano, etanol e em solução de lipossoma na concentração de  $10^{-5}$  mol/L.



**Figura 41.** Espectros emissão do corante **7** em 1,4-dioxano, etanol e em solução de lipossoma na concentração de  $10^{-5}$  mol/L.

As medidas de absorção da região do UV-Vis realizadas para os corantes **5-7**, apresentaram mesmo perfil de gráfico para todas as concentrações ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  mol/L) para os três corantes, conforme pode ser visto na Figura 38.

O corante **5** quando em solução de lipossoma tem comportamento similar (perfil do gráfico) ao ambiente etanólico, com a banda enol mais intensa que a banda ESIPT. Já o corante **6** quando em lipossoma, possui perfil semelhante ao do corante quando em 1,4-dioxano, com a banda enol mais intensa que a banda ESIPT. Entretanto, o corante **7**, apesar de também ter seu perfil mais semelhante ao 1,4-dioxano, apresenta a banda ESIPT mais intensa que a banda enol, o contrário do que foi observado para o corante **6**. De forma que podemos concluir que os corante **5** e **6** estão inseridos em um ambiente aquoso da bicamada lipídica, uma vez que o grupo  $-OH$ , envolvido no processo ESIPT deve estar envolvido em ligações de hidrogênio com a água solvente. No que se refere ao corante **7**, este deve ser mais facilmente inserido no ambiente lipídico da bicamada, ocorrendo menor solvatação pelo solvente e, conseqüentemente, maior ocorrência do processo ESIPT.

Conclusões preliminares:

(a) Os três corantes em lipossoma não apresentaram alteração de valores de máximos de emissão de fluorescência nem inversão das intensidades das bandas quando diluídos ( $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  mol/L). Isto nos indica que eles estão incorporados em seus ambientes e não são liberadas para o solvente, podendo ser utilizados como sondas para diagnóstico de imagem, conforme também pode ser observado na literatura.<sup>42,43</sup>

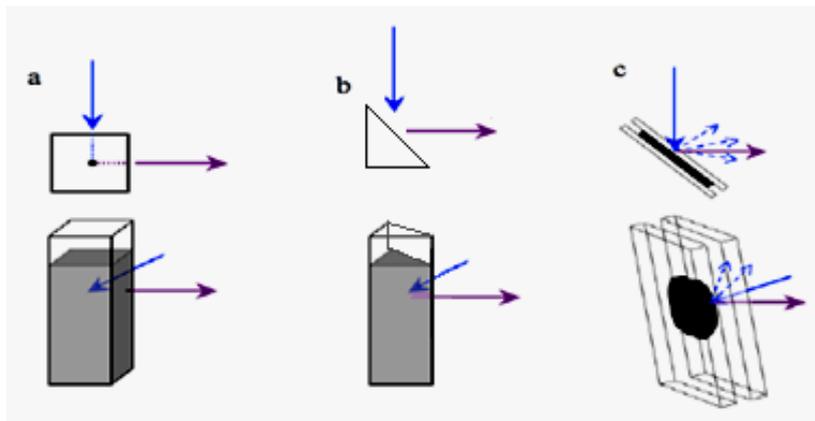
(b) Observando-se os corantes de **5** a **7**, ou seja as Figuras 40 à 42, percebe-se que ocorre um aumento da intensidade da banda ESIPT (**5** quase não tem ESIPT, somente banda enol; **6** apresenta ESIPT pouco intensa e o corante **7** apresenta uma banda ESIPT mais intensa), indicando que o corante **7** está mais inserido na bicamada lipídica.

### 5.2.3. Avaliação do efeito de filtro interno na fotofísica dos corantes **5-7** em etossomas de fosfatidilcolina

Tendo em vista que as soluções de etossomas apresentaram-se turvas, antes de iniciar o estudo fotofísico dos corantes **5-7** nestas soluções fez-se um estudo da influência da turbidez sobre as medidas fotofísicas. Isto porque fluidos que não são translúcidos, geralmente possuem um alto coeficiente de absorção no visível, fenômeno conhecido como “efeito de filtro interno”, o que significa que a luz não pode penetrar profundamente na amostra a menos que a concentração seja reduzida. A diluição não só modifica o “efeito de filtro interno”, mas também as propriedades espectroscópicas da amostra devido à mudança da concentração dos componentes (seja por diluição ou precipitação).<sup>44</sup> É muito comum a utilização de cubetas triangulares para medidas de fluorescência quando as soluções a serem medidas não são translúcidas, como é o caso das soluções de etossomas. O objetivo de utilizar uma cubeta triangular é diminuir o efeito de filtro interno, auto-absorção e re-emissão.<sup>45</sup>

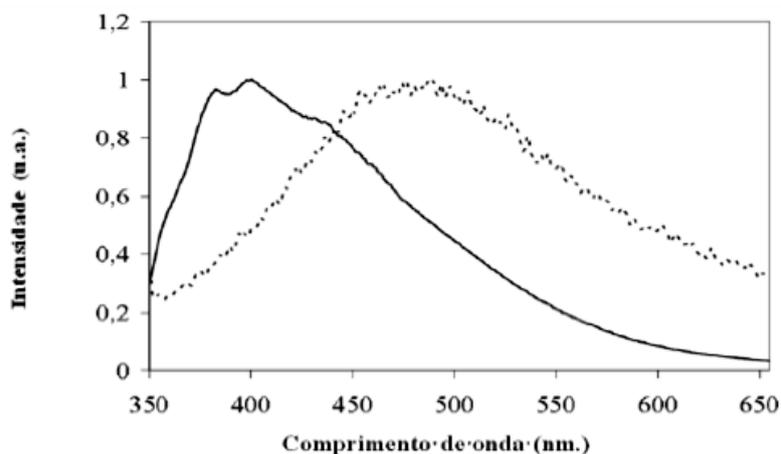
A Figura 42 (a) mostra o recipiente convencional de fluorescência (cubeta quadrada de 1cm x 1cm). O ponto ótimo de excitação se encontra no ponto médio da cubeta e a radiação incidente (excitação) deve atravessar, desta forma, 0,5 cm de amostra, chegar com suficiente intensidade e provocar uma excitação eficaz das moléculas, com a finalidade de obter uma emissão suficientemente intensa para ser registrada. Da mesma forma, a radiação emitida pelas moléculas no estado excitado deve atravessar novamente 0,5 cm de dissolução altamente absorvente até chegar ao detector, com uma possível alteração pelos processos de auto-absorção.

Os casos (b) e (c) apresentam as duas configurações típicas de recipientes triangulares, que são utilizadas para minimizar os problemas da falta de excitação ou auto-absorção. Este tipo de configuração permite uma excitação direta, já que a radiação incidente atinge diretamente o ponto médio da cubeta sem a necessidade de passar através da solução com perda conseqüente de intensidade.



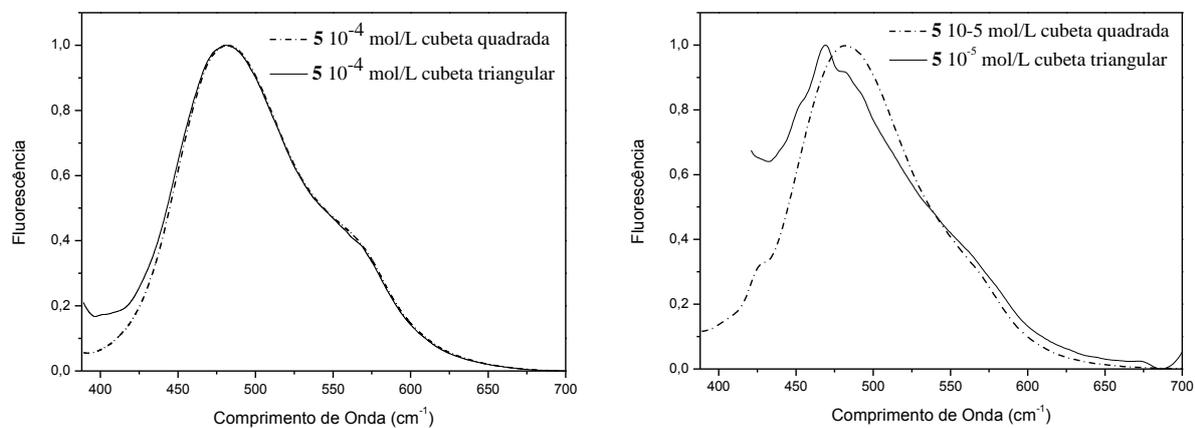
**Figura 42.** Ilustração de uma cubeta convencional quadrada (a); cubeta triangular (b) e cubeta com inclinação de 45°(c).<sup>45</sup>

Um exemplo da diferença que pode ser encontrada para um meio turvo utilizando-se cubeta quadrada ou triangular, pode ser visto na Figura 43. Segundo Pantoja,<sup>44</sup> o deslocamento observado para o máximo de emissão de fluorescência se deve ao efeito de auto-absorção da amostra.

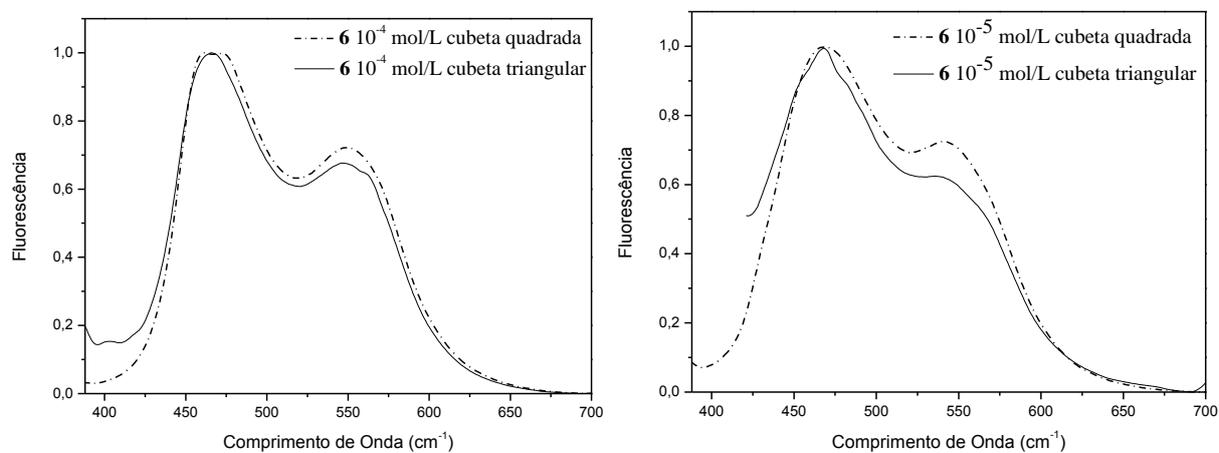


**Figura 43.** Espectro de fluorescência normalizado para uma amostra de petróleo cru. Curva sólida em um recipiente de superfície frontal. Curva sublinhada em cubeta quadrada (ângulo de 90°).<sup>44</sup>

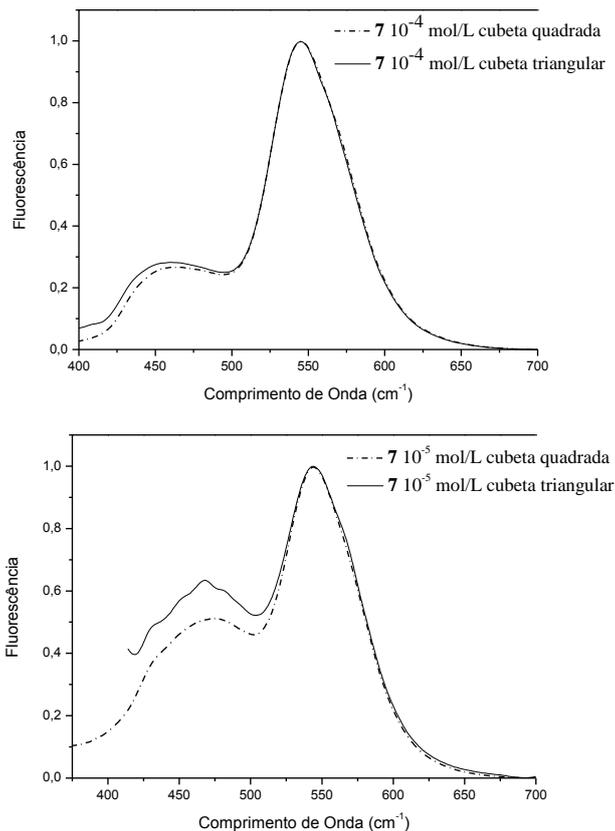
Desta forma, foram realizadas medida dos corantes **5-7**, nas concentrações de  $10^{-4}$  mol/L e  $10^{-5}$  mol/L em uma cubeta quadrada e em uma cubeta triangular. Os espectros obtidos podem ser vistos nas Figuras 44-46.



**Figura 44.** Espectro de fluorescência para o corante **5** em cubeta quadrada (---) e triangular (—) nas concentrações de  $10^{-4}$  mol /L (esq.) e  $10^{-5}$  mol/L (dir.).



**Figura 45.** Espectro de fluorescência para o corante **6** em cubeta quadrada (---) e triangular (—) nas concentrações de  $10^{-4}$  mol /L (esq.) e  $10^{-5}$  mol/L (dir.).



**Figura 46.** Espectro de fluorescência para o corante **7** em cubeta quadrada (---) e triangular (—) nas concentrações de  $10^{-4}$  mol /L (esq.) e  $10^{-5}$  mol/L (dir.).

É possível observar pelos espectros acima relacionados, que os valores dos máximos de emissão de fluorescência foram os mesmos tanto para a cubeta quadrada quanto para a cubeta triangular. E o menor sinal-ruído também foi observado para a cubeta triangular. Ou seja, o sistema etossômico mesmo sendo turvo não causou problemas de auto-absorção, “efeito de filtro interno” ou de re-emissão. Sendo assim, as demais análises em meio lipídico foram todas realizadas utilizando-se cubeta quadrada.

#### 5.2.4. Medidas fotofísicas dos corantes **5-7** inseridos em etossomas de fosfatidilcolina

Estudo semelhante ao realizado para os lipossomas foi feito para os corantes em etossoma. Visando estudar a capacidade de inserção dos corantes no meio lipídico através de medidas fotofísicas, foram utilizadas soluções dos corantes em etossomas nas concentrações de  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  mol/L, preparadas conforme descrito no item 5.9.

Para fins de comparação, também foram feitas medidas fotofísicas de soluções de etossoma sem a presença dos corantes (branco), nas mesmas concentrações utilizadas acima. Estas soluções apresentaram uma emissão de fluorescência com máximo em 435 nm.

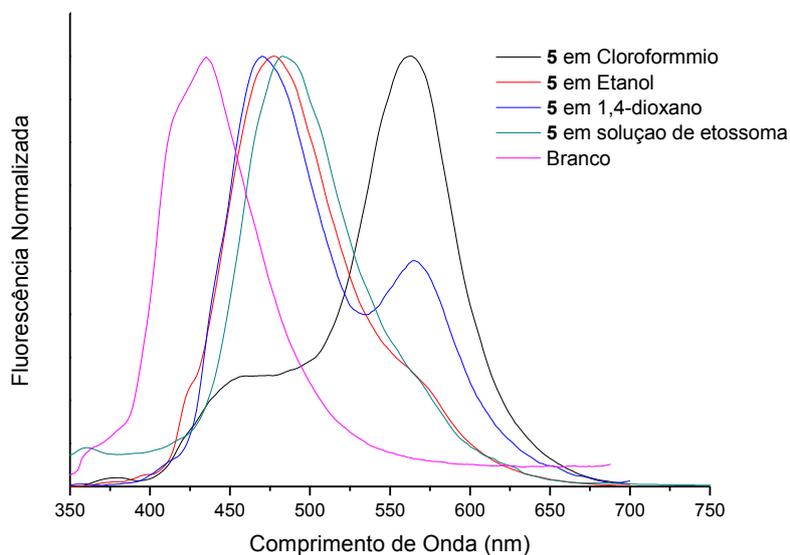
**Tabela 5.** Máximos de absorção e emissão para os corantes **5**, **6** e **7** em solução de etossoma, bem como para o branco. Todos os comprimentos de onda, além dos deslocamentos de Stokes estão apresentados em nanômetros (nm).

Corante	Conc. (Molar)	$\lambda_{\max}^{abs}$	$\lambda_1^{em}$	$\lambda_2^{em}$	$\Delta\lambda_1^{ST}$	$\Delta\lambda_2^{ST}$
<b>5</b>	$10^{-5}$	391	484	565	93	174
	$10^{-6}$	390	483	565	93	173
<b>6</b>	$10^{-5}$	416	475	590	59	174
	$10^{-6}$	392	478	579	86	187
<b>7</b>	$10^{-5}$	379	484	544	105	165
	$10^{-6}$	379	481	541	102	162
Branco	$10^{-5}$	-	435	-	-	-
	$10^{-6}$	350	435	-	85	-

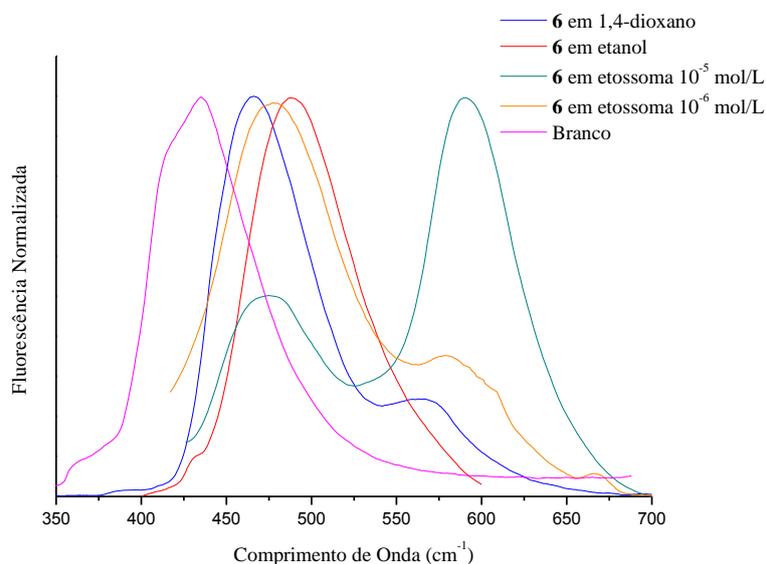
Nas Figuras 47-49, faz-se uma comparação entre os corantes em etanol, clorofórmio, 1,4-dioxano e no meio etossômico. Foi possível observar que os valores dos máximos de emissão de fluorescência dos corantes foram influenciados pela presença do sistema etossômico. Os corantes **6** e **7** apresentaram dupla emissão de fluorescência (bandas enol e ESIPT) e o corante **5** apresentou um predomínio da banda enol quando em presença dos etossomas. O aumento da concentração dos corantes **6** e **7** favoreceu a ocorrência da banda ESIPT. Já para o caso do corante **5**, que é catiônico, a concentração não teve influência sobre as intensidades das bandas enol e ESIPT, sendo a banda enol predominante independente da concentração do corante.

Quando a ESIPT é predominante no ambiente lipídico, isto nos indica que os corantes estão em um meio hidrofóbico da bicamada lipídica, conforme foi também observado na literatura.<sup>43</sup> Desta forma, os corantes **6** e **7** estão em um ambiente hidrofóbico da bicamada, ao passo que o corante **5** está em um ambiente hidrofílico. Haja vista que a principal diferença entre o corante **5** e os corantes **6** e **7** é a presença de um nitrogênio quaternário, além de uma cadeia alquílica mais longa, pode-se concluir que o corante **5** situa-se em ambientes mais

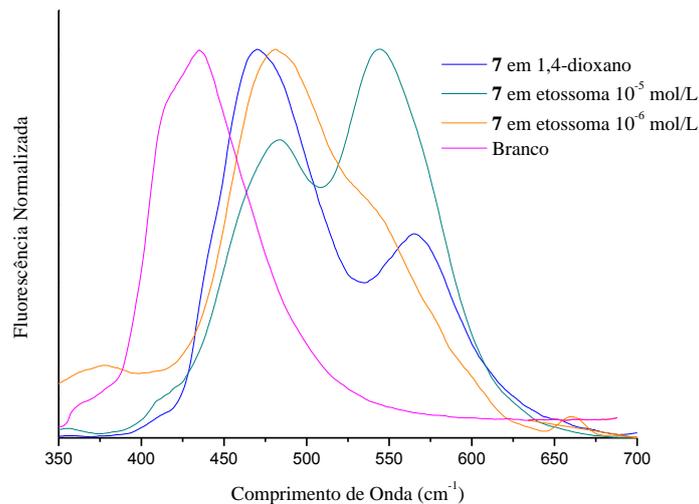
polares ou hidrofílicos da membrana enquanto que os corantes **6** e **7** são marcadores da região hidrofóbica da membrana. Estas diferenças podem estar associadas ao fato de **5** assemelha-se estruturalmente a fosfatidilcolina por apresentar um nitrogênio quaternário e uma cadeia alquílica de dezoito carbonos.



**Figura 47.** Espectros emissão do corante **5** em etanol, clorofórmio, 1,4-dioxano e em soluções de etossoma na concentração de  $10^{-5}$  mol/L.



**Figura 48.** Espectros de emissão do corante **6** em etanol, 1,4-dioxano e em soluções de etossoma nas concentrações de  $10^{-5}$  mol/L e  $10^{-6}$  mol/L .



**Figura 49.** Espectros emissão do corante **7** em 1,4-dioxano e em soluções de etossoma nas concentrações de  $10^{-5}$  mol/L e  $10^{-6}$  mol/L .

Conclusões preliminares:

(a) O corante **5** quando em ambiente etossômico não teve os valores de seus máximos de emissão de fluorescência alterados nem sofreu inversão nas intensidades das bandas enol e ESIPT. Ou seja, se manteve constante com a diluição, indicando que pode ser utilizada como sonda para diagnóstico em sistemas etossômicos.

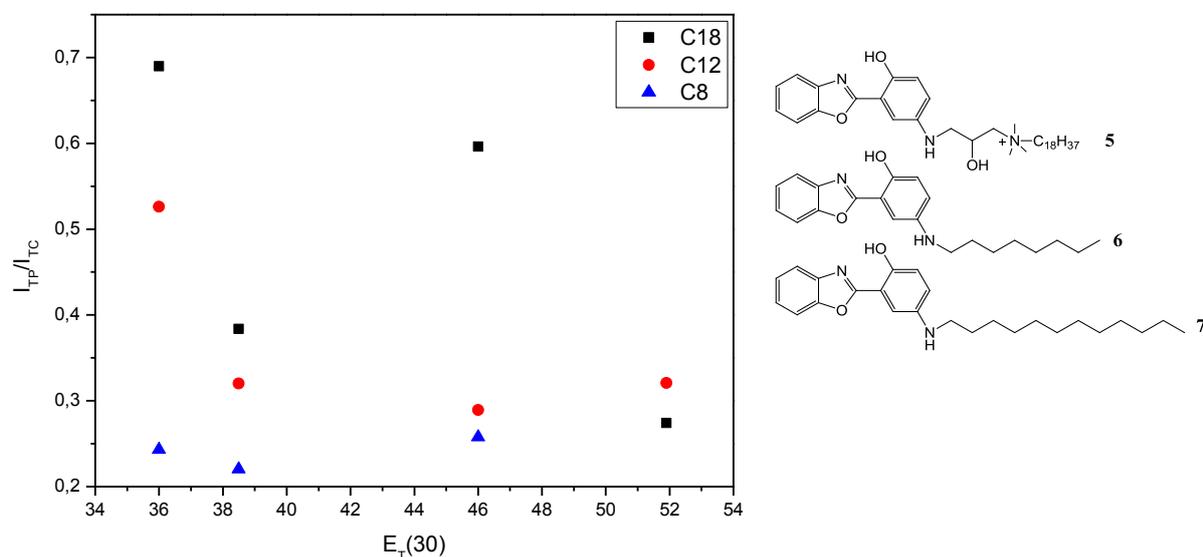
(b) Os corantes **6** e **7**, quando em etossoma, tiveram suas características alteradas pela diluição. Não no que se refere aos valores dos máximos de emissão de fluorescência, mas sim no que se refere às intensidades das bandas enol e ESIPT. O corante **6** quando na concentração de  $10^{-5}$  mol/L apresenta a banda ESIPT mais intensa que a banda enol, ou seja, se encontra no ambiente lipídico. Já quando diluído em  $10^{-6}$  mol/L, é a banda enol a mais intensa. Neste caso, o corante difundiu para a porção aquosa do sistema, ou seja, com a diluição o corante é liberado para o meio e quando este efeito ocorre, o corante pode ser usado como sonda para a terapêutica.<sup>42,43</sup>

(c) Uma outra forma de analisar estes sistemas, é levando-se em conta que quando a solução é mais concentrada, as vesículas formadas (os etossomas) podem estar colapsando umas com as outras, de forma que o corante só tem interação com a região lipídica da bicamada (não consegue interagir com o meio solvente). Disto resultaria banda ESIPT mais intensa. Já em uma situação oposta, ou seja, em um ambiente mais diluído, este “empacotamento” das vesículas é mais difícil de ocorrer, e o corante tem uma maior movimentação dentro do

sistema, podendo difundir para a porção aquosa, resultando uma maior intensidade da banda enol.

### 5.2.5. Polaridade do sistema corante-bicamada fosfolipídica em etossomas de fosfatidilcolina

O objetivo desta análise foi estimar a localização dos diferentes corantes quando inseridos em uma solução de etossoma, através da comparação das intensidades de fluorescência dos corantes em meio etossômico, com os valores de polaridade empírica dos solventes utilizados ( $E_T(30)$ ).<sup>46</sup> Esta associação foi possível uma vez que os corantes apresentam duas bandas de emissão de fluorescência em função do meio, a banda ESIPT (maior  $\lambda$ ) e a banda enol (menor  $\lambda$ ). Foram feitas medidas fotofísicas de fluorescência dos três corantes nos seguintes solventes: 1,4-dioxano, acetato de etila, acetonitrila e etanol. Para avaliação dos resultados, foi construído um gráfico que relaciona a razão entre as intensidades de fluorescência,  $I_{ESIPT}/I_{enol}$ , (em que  $I_{ESIPT}$  é a intensidade da banda ESIPT e  $I_{enol}$  é a intensidade da emissão enol de fluorescência) e os valores de polaridade empírica dos solventes  $E_T(30)$ .<sup>47</sup>



**Figura 50.** Razão entre as intensidades de fluorescência na troca protônica TP, ou seja, ESIPT, e a banda enol para os corantes **5**, **6** e **7** como função do índice de polaridade empírica  $E_T(30)$  para os solventes, onde  $E_T(30)$ : 1,4-dioxano = 36,0; Acetato de Etila = 38,5; MeCN = 46,0 e Etanol = 51,9.

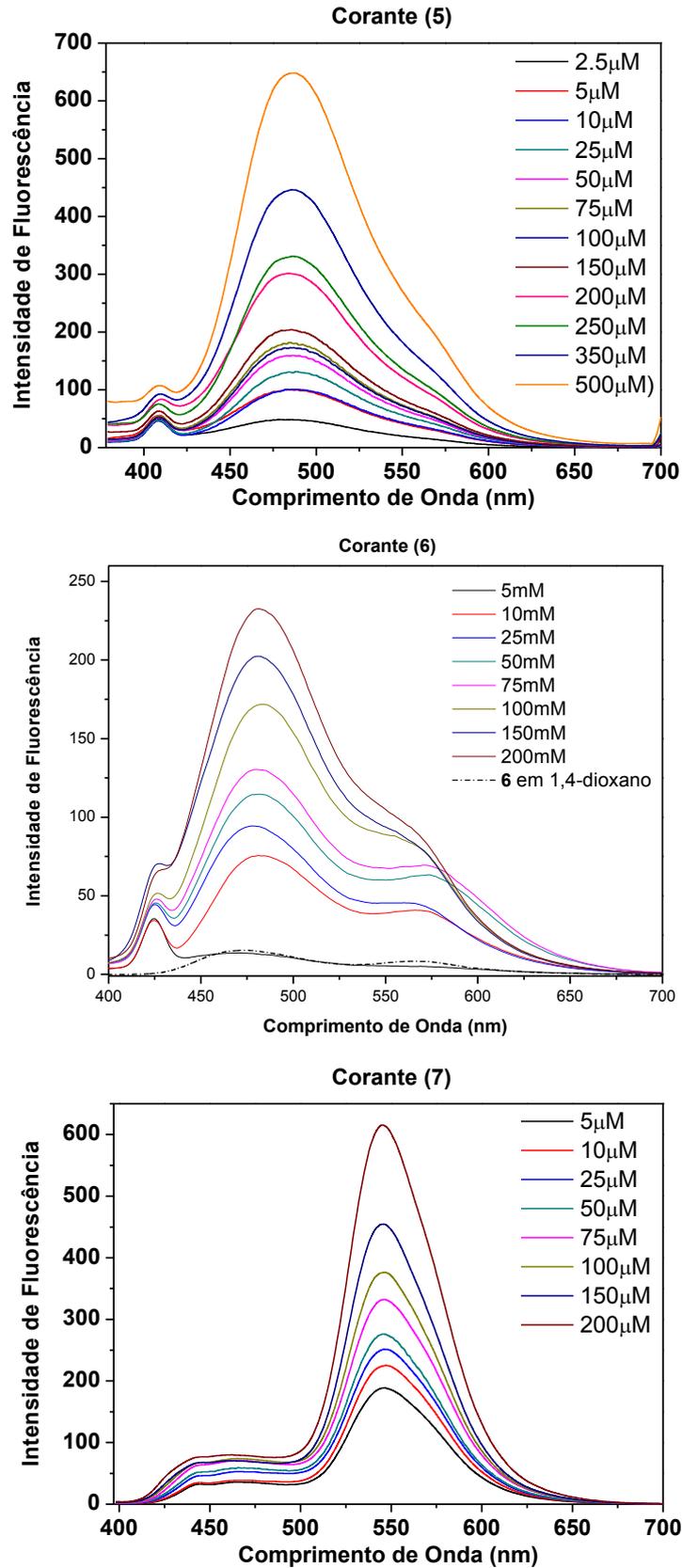
Nota: O corante **6** não apresentou dupla fluorescência em etanol. Nesta figura, C18 representa o corante **5**, C8, o corante **6** e C12 representa o corante **7**.

Quando em solução de etossoma, a razão encontrada entre as intensidades para os corantes **5-7** foram de 0,25; 1,89 e 0,86, respectivamente. A comparação destes valores com os observados em solventes (Figura 30) indica que para o corante **5** as moléculas do fluoróforo estão solubilizadas em um ambiente polar prótico semelhante ao do etanol. Já para o corante **7**, o fluoróforo está em um ambiente polar aprótico. No caso do corante **6**, cuja razão é maior que 1, uma comparação com os solventes relacionados seria arriscada, entretanto é possível que o fluoróforo esteja situado em um ambiente apolar. Estes resultados estão de acordo com o que foi observado e descrito anteriormente em 5.2.4.

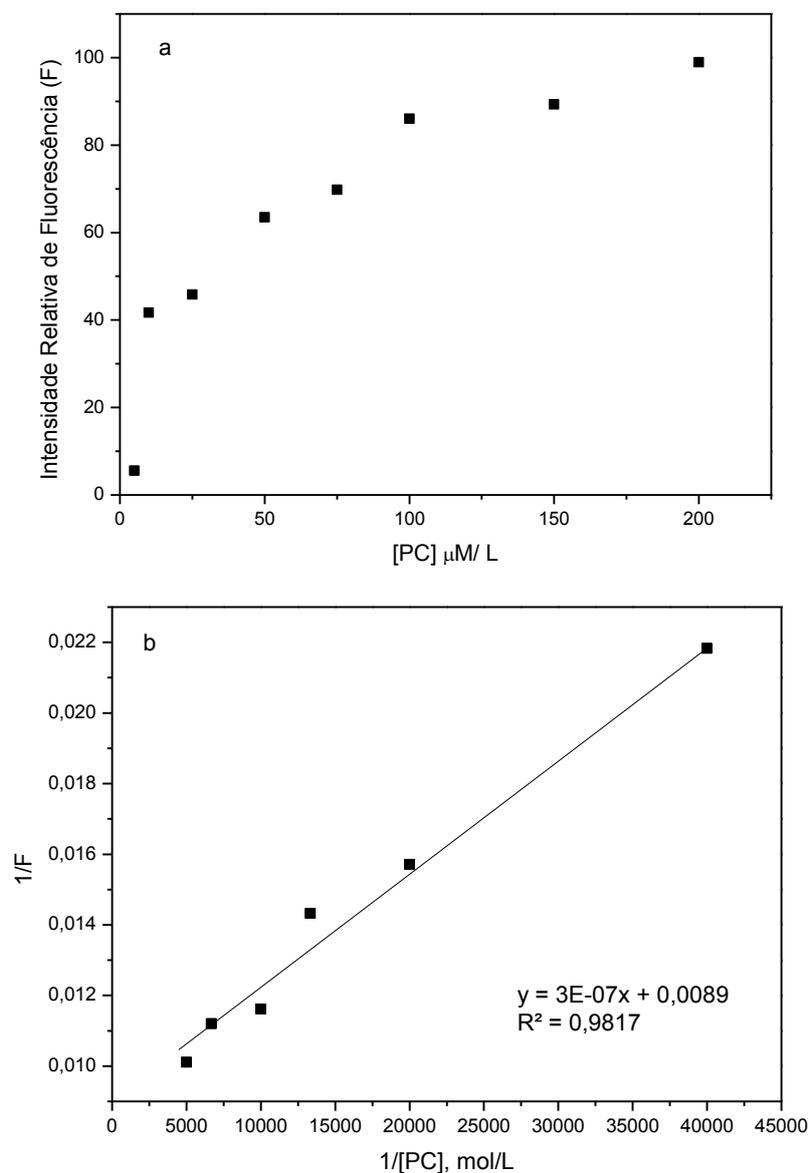
#### 5.2.6. Localização dos corantes fluorescentes em bicamadas fosfolipídicas dos etossomas

Conforme definição de Tavares,<sup>48</sup> o coeficiente de partição de uma substância química é a razão entre as concentrações que se estabelece nas condições de equilíbrio, quando dissolvidas em um sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa, e está associado a uma mudança de energia livre provocada pela substância sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema.

Um método utilizado para a determinação do coeficiente de partição em sistemas membranares que utilizam compostos fluorescentes consiste no aumento da concentração de lipídio<sup>45,48</sup> - fosfatidilcolina neste caso - (PC) sobre uma solução de corante de concentração fixa. A determinação do coeficiente de partição é feita pela extrapolação da curva do gráfico  $1/F \times 1/[PC]$ .<sup>46,49</sup> Para tanto, preparou-se soluções dos três corantes **5-7** com concentração fixa de  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol/L e variou-se a concentração de lipídio na solução. Os espectros foram obtidos na temperatura de 25°C estão representados na Figura 51.



**Figura 51.** Espectro de emissão de fluorescência dos corantes 5-7 com concentração de  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol/L em solução de concentração variável de fosfolípido.



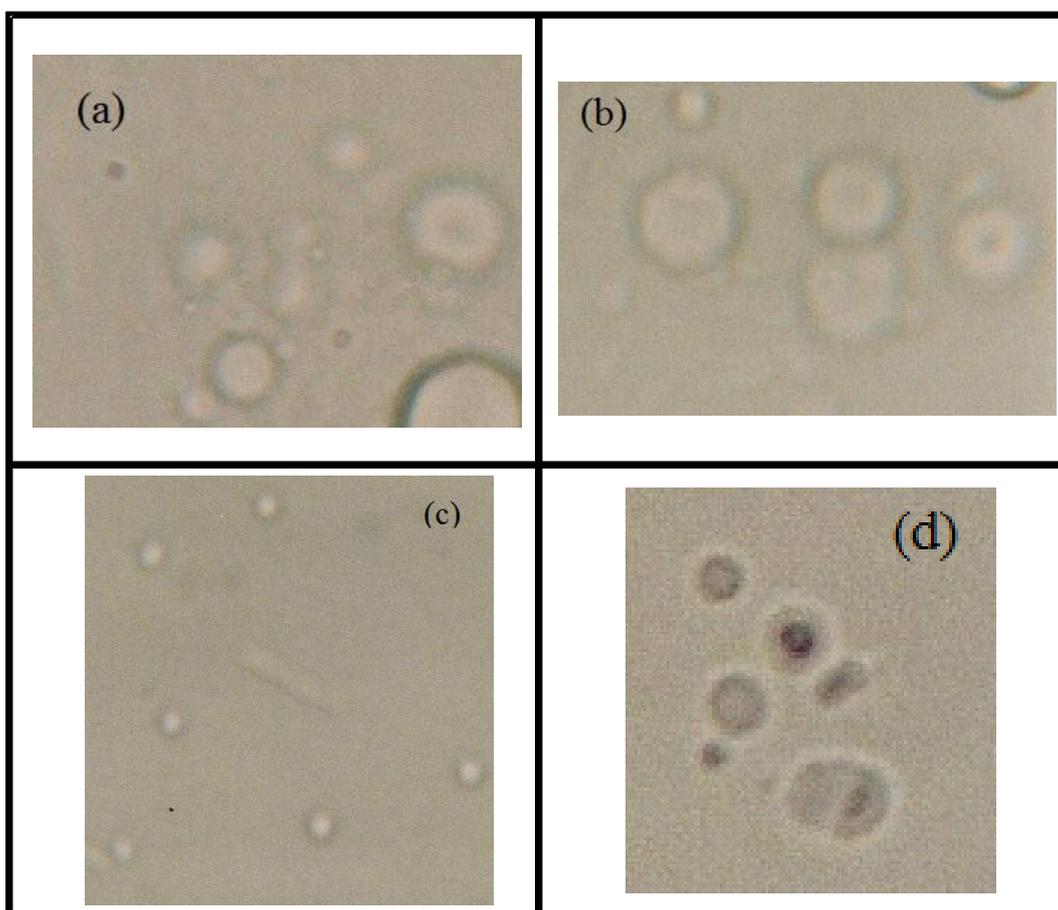
**Figura 52.** (a) Variação da intensidade de fluorescência ESIP do corante **6** versus concentração de PC. (b) Curva  $1/F$  versus  $1/[PC]$ , onde  $F$  é a intensidade de fluorescência.

Foi possível observar uma tendência à saturação bem como um aumento de intensidade da fluorescência normal e do tautômero ES IPT com o aumento da concentração de lipídio para as três sondas. A partir da regressão linear do gráfico da Figura 52(b), obteve-se um coeficiente de partição de  $1,1 \cdot 10^5$ , onde a fosfatidilcolina existe em uma fase gel, com movimentos mais limitados.<sup>50-52</sup> O mesmo procedimento foi realizado para os corantes **5** e **7**, obtendo-se resultados similares, cujos valores para os coeficientes de partição foram de  $1,75 \cdot 10^4$  e  $1,0 \cdot 10^5$ , respectivamente. Os resultados observados mostraram que a

hidrofobicidade da sonda é o fator determinante sobre o coeficiente de partição entre o meio aquoso e a camada lipídica. Como o corante **5** apresentou o menor valor para o coeficiente de partição, corrobora com o fato de a sua estrutura ser mais hidrofílica.

### 5.2.7. Microscopia Óptica e Confocal

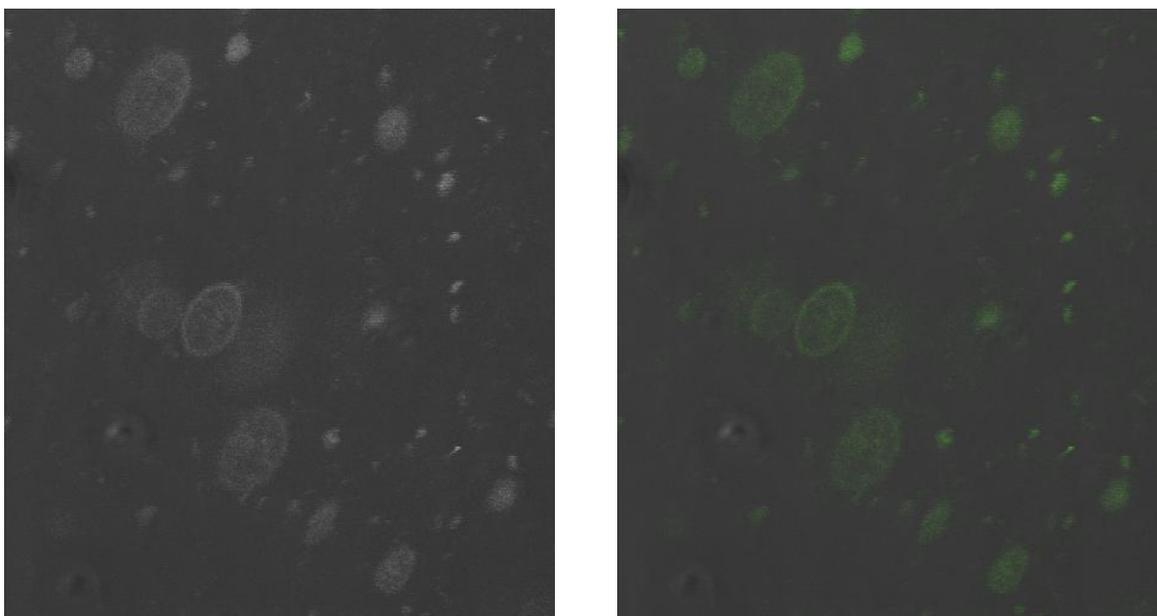
Foram feitas imagens por microscopia óptica com aumento de 400 vezes dos corantes em soluções de lipossomas de fosfatidilcolina. As imagens foram feitas com as soluções filtradas (filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ ) e também sem serem filtradas. As fotografias podem ser vistas na Figura 53.



**Figura 53.** Microscopia óptica dos corantes em meios lipídicos. (a) e (b) corantes em soluções de lipossoma de fosfatidilcolina, (c) corante em soluções de lipossoma de fosfatidilcolina depois de filtrado com filtro de 0,45 mm e (d) corante em soluções de etossomas de fosfatidilcolina.

O que se observa nestas imagens é a formação de estruturas fechadas circulares, conforme o que era esperado para tanto para os etossomas como para os lipossomas. Pode-se observar também pela imagem (c), que é possível se obter lipossomas de um determinado tamanho específico, pela utilização de filtros. O controle do tamanho de lipossomas ou etossomas é particularmente interessante quando se deseja fazer específicos, como se deseja a penetração dos mesmos na pele ou em outro tecido, como no caso da utilização destes sistemas como carreadores de fármacos.

Além da microscopia óptica tradicional, obtivemos imagens dos lipossomas através da microscopia confocal. As imagens da Figura 54 foram obtidas pela observação de uma lâmina de vidro contendo uma solução do corante **6** inserido em lipossomas de fosfatidilcolina sem a excitação por laser (imagem a) e com a excitação de um laser de 422 nm (imagem b).



**Figura 54.** Microscopia confocal do corante **6** em lipossomas de fosfatidilcolina (a) sem a excitação por laser e (b) com a excitação de um laser de 422 nm.

## 6. CONCLUSÕES

Foram sintetizadas três novos corantes fluorescentes com características lipofílicas e suas estruturas foram confirmadas através das espectroscopias de absorção na região do infravermelho, de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , bem como as espectroscopias de absorção na região do Ultravioleta-Visível e de emissão de Fluorescência.

As medidas espectroscópicas de absorção na região do UV-Vis e de emissão de fluorescência para estas sondas nos solventes estudados revelaram que estes apresentam absorção máxima entre 375 nm e 390 nm e emissão nas regiões de 400 nm e 500 nm. Os corantes apresentaram coeficiente de extinção molar na ordem  $10^3$ , indicando que as transições eletrônicas que ocorrem para estes corantes são do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

Através do estudo fotofísico dos corantes sintetizados em cinco solventes (clorofórmio, acetato de etila, acetonitrila, etanol e 1,4-dioxano), foi possível observar que: (a) o tamanho da cadeia carbônica teve pouca influência nos valores dos máximos de absorção e de emissão de fluorescência; (b) as sondas apresentaram dupla emissão de fluorescência dependente do solvente e da concentração; (c) quando as sondas apresentaram dupla emissão, foram observados dois valores para o deslocamento de Stokes, sendo o de menor valor devido à banda enol e o de maior valor atribuído à banda ESIPT.

Quando em solução de lipossoma, os três corantes não apresentaram alteração nos valores dos máximos de emissão de fluorescência nem inversão das intensidades das bandas, quando diluídos ( $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  mol/L). Isto indica que eles estão incorporados em seus ambientes, não são liberadas para o solvente, podendo ser utilizados como sondas para diagnóstico de imagem.

Quando em meio etossômico, os corantes **6** e **7** mostraram-se marcadores mais interessantes para a região hidrofóbica da membrana estando o **6** solubilizado em um meio apolar e o **7** em um meio polar aprótico. Levando em conta que a única diferença entre os dois corantes é o número de carbonos da porção alifática (diferença de quatro carbonos) existe uma diferença muito tênue de polaridade entre os dois corantes e esperava-se que o corante **7** interagisse melhor com o meio apolar que o corante **6**. Enquanto que a sonda **5** se mostrou mais eficaz para ambientes hidrofílicos, solubilizadas em um meio polar prótico.

O corante **5** quando em ambiente etossômico não teve os valores de seus máximos de emissão de fluorescência alterados nem sofreu inversão nas intensidades das bandas enol e

ESIPT. Ou seja, se manteve constante com a diluição, indicando que pode ser utilizada como sonda para diagnóstico em sistemas etossômicos.

Os corantes **6** e **7**, quando em etossoma, tiveram suas características alteradas pela diluição. Não no que se refere aos valores dos máximos de emissão de fluorescência, mas sim nas intensidades das bandas enol e ESIPT. O corante **6** quando na concentração de  $10^{-5}$  mol/L apresenta a banda ESIPT mais intensa que a banda enol, ou seja, se encontra no ambiente lipídico. Já quando diluído à  $10^{-6}$  mol/L, é a banda enol que é mais intensa. Neste caso, o corante difundiu para a porção aquosa do sistema, ou seja, com a diluição o corante é liberado para o meio. Quando este efeito ocorre, o corante pode ser usado como sonda para a terapêutica.

O coeficiente de partição dos corantes em meio lipídico foi determinado pela relação entre as intensidades das bandas enol e ESIPT e os resultados obtidos foram de  $1,75 \cdot 10^5$ ,  $1,1 \cdot 10^5$  e  $1,0 \cdot 10^5$  para **5**, **6** e **7**, respectivamente, onde a fosfatidilcolina existe na fase gel.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stöckl, M.T.; Herrmann, A. *BBA - Biomembranes*, **2010**, 1798, 1444-1456.
2. Stillwell, W.; Janski, L.J.; Zerouga, M.; Dumaul, A.C. *Chem. Phys. Lipids*, **2000**, 104, 113-132.
3. Lin, C.-M.; Li, C.-S.; Sheng, Y.-Y.; Wu, D.T.; Tsao, H.-K. *Langmuir*, 2012, 28, 689-700.
4. Dennison, S.M.; Guharay, J.; Sengupta, P. K. *Spectrochim. Acta A*, **1999**, 55, 1127-1132.
5. Klymchenko, A.S.; Mély, Y.; Demchenko, A.P.; Duportail, G. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1665, 6-19.
6. Paul, B.K.; Guchhait, N. *J. Phys. Chem. B*, **2010**. 114, 12528-12540.
7. Moyano, F.; Biasutti, M.A.; Silber, J.J.; Correa, N.M. *J. Phys. Chem. B*, **2006**. 110, 11838-11846.
8. Esquembre, R.; Ferrer, M.L.; Gutiérrez, M.C.; Mallavia, R.; Mateo, C.R. *J. Phys. Chem. B*, **2007**. 111, 3665-3673.
9. Weller, A. *Z. Elektrochem.*, **1956**, 60, 1144-1147.
10. Lins, G.O.W.; Campo, L.F.; Rodembusch, F.S.; Stefani, V. *Dyes Pigments*, **2010**. 84, 114-120.
11. dos Santos, R.C.; Faleiro, N.V.S.; Campo, L.F.; Corbellini, V.A.; Rodembusch, F.S.; Stefani, V. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52, 3048-3053.
12. Iglesias, R.S.; Campo, L.F.; Rodembusch, F.S.; Stefani, V. *Int. J. Quantum Chem.*, **2008**, 108, 2334-2339.
13. Kuplich, M.D. *Síntese de novos heterociclos benzazólicos fluorescentes e sua incorporação em matrizes de celulose*. Dissertação De Mestrado, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2007.
14. Lakowicz, J.R. (Editor). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer; 3a edição, 2006.
15. Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. *Principles of Instrumental Analysis*, Brooks Cole; 6a Edição, **2006**.
16. Owen, T. *Fundamentals of Modern UV-Visible Spectroscopy: A Primer*, Hewlett-Packard, **1996**.
17. (a) Suppan, P.J. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **1990**, 50, 293-330. (b) LeRosen, A.L.; Reid, C.E. *J. Chem. Phys.*, **1952**, 20, 233-235. (c) Suppan, P. *J. Mol. Spectroscopy* **1969**, 30, 17-28.

18. Kwon, J.E.; Park, S.Y. *Adv. Mater.*, **2011**, *23*, 3615-3642.
19. Lamola, A.A.; Sharp, L.J. *J. Phys. Chem.*, **1966**, *70*, 2634-2638.
20. Chou, P.-T.; Chen, Y.-C.; Yu, W.-S.; Cheng, Y.-M. *Chem. Phys. Lett.*, **2001**, *340*, 89-97.
21. Campo, L.F. *Síntese, caracterização e aplicações de 2-[5'-(N-vinileno)-2'-hidroxifenil]benzazolas: compostos fluorescentes via transferência protônica fotoinduzida*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **1999**.
22. Rodembusch, F.S. *Síntese, caracterização e estudo fotofísico de heterociclos fluorescentes por ESIPT e suas aplicações na preparação de novos materiais*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2005**.
23. Batista, C.M.; de Carvalho, C.M.B.; Magalhães, N.S.S. *Braz. J. Pharm. Sci.*, **2007**, *43*, 167-179.
24. Torchilin, V.P. *Nat. Rev. Drug Disc.*, **2005**, *4*, 145-160.
25. Mertins, O. *Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2008**.
26. Lasic, D.D. *Trends Biotechnol.*, **1998**, *16*, 307-321.
27. Upadhyay, N.; Mandal, S.; Bhatia, L.; Shailesh, S.; Chauhan, P. *Rec. Res. Sci. Technol.*, **2011**, *3*, 19-24.
28. Verma, P.; Pathak, K. *Nanomedicine* **2012**, *8*, 489-496.
29. Dubey, V.; Mishra, D.; Jain, N.K. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2007**, *67*, 398-405.
30. Dubey, V.; Mishra, D.; Dutta, T.; Nahar, M.; Saraf, D.K.; Jain, N.K. *J. Control Release* **2007**, *123*, 148-154.
31. Liu, Y.-N.; Shu, W.-G.; Zeng, D.-M.; Huang, K.-L. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, **2000**, *10*, 691-694.
32. Singh, C.B.; Kavala, V.; Samal, A.K.; Patel, B.K. *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, *32*, 1369-1377.
33. Raimundo, J.-M.; Blanchard, P.; Gallego-Planas, N.; Mercier, N.; Ledoux-Rak, I.; Hierle, R.; Roncali, J. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 205-218.
34. Fang, J.; Whitaker, C.; Weslowski, B.; Chen, M.-S.; Naciri, J.; Shashidhar, R. *J. Mater. Chem.*, **2001**, *11*, 2992-2995.
35. Mertins, O.; Sebben, M.; Schneider, P.H.; Pohlmann, A.R.; da Silveira, N.P. *Química Nova*, **2008**, *31*, 1856-1859.

36. Ponpipom, M.M.; Bugianesi, R.L. *J. Lipid Res.*, **1980**, *21*, 136-139.
37. Esteves, F.A. *Lipossomas como modelos biomembranares. Correlação entre coeficientes de partição (lipossoma/água e octanol) e a actividade de compostos farmacologicamente activos*. Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal. Dissertação de Mestrado, **2011**.
38. Mertins, O. *Desenvolvimento e caracterização de nanovesículas lipossômicas compósitas de fosfatidilcolina da lecitina de soja e quitosana*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Dissertação de Mestrado, **2004**.
39. Stuart, B.H. (Editor). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Wiley, 1a Edição, **2004**.
40. Kelkar, S.S.; Reineke, T.M. *Bioconjugate Chem.*, **2011**, *22*, 1879-1903.
41. Castro, A.P.A.S.; Labaki, L.C.; Caram, R.; Basso, A.; Castro, M.R.F. *Ambiente Construído*, **2003**, *3*, 69-76.
42. Scheuer, W.; van Dam, G.M.; Dobosz, M.; Schwaiger, M.; Ntziachristos, V. *Sci. Transl. Med.*, **2012**, *4*, P. 134 134ps11.
43. Choyke, P.L.; Kobayashi, H. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Elect.*, **2012**, *18*, 1140-1146.
44. Pantoja, P.A. *Caracterização do petróleo por técnicas espectroscópicas e sua utilização na avaliação e desenvolvimento de métodos de inferência em processo de refino*. Tese de Doutorado, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, **2010**.
45. Cossiello, R.D.F. *Eletroluminescência e morfologia de blendas poliméricas: copolímeros iônicos de SAA e blendas com MEH-PPV*. Tese de Doutorado, Unicamp, Campinas SP, **2007**.
46. Chaudhuri, S.; Basu, K.; Sengupta, B.; Banerjee, A.; Sengupta, P.K. *Luminescence*, **2008**, *23*, 397-403.
47. Smith, M.B.; March, J. (Editores). *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5a Edição, Wiley-Interscience, **2001**.
48. Tavares, L.C. *Química Nova*, **2004**, *27*, 631-639.
49. Huang, Z.; Haugland, R.P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1991**, *181*, 166-171.
50. Sujatha, J.; Mishra, A.K. *Langmuir*, **1998**, *14*, 2256-2262.
51. Mavis, R.D.; Vagelos, P.R. *J. Biol. Chem.*, **1972**, *247*, 652-659.
52. Papahadjopoulos, D.; Jacobson, K.; Nir, S.; Isac, I. *BBA – Biomembranes* **1973**, *311*, 330-348.

## **8. ANEXOS**

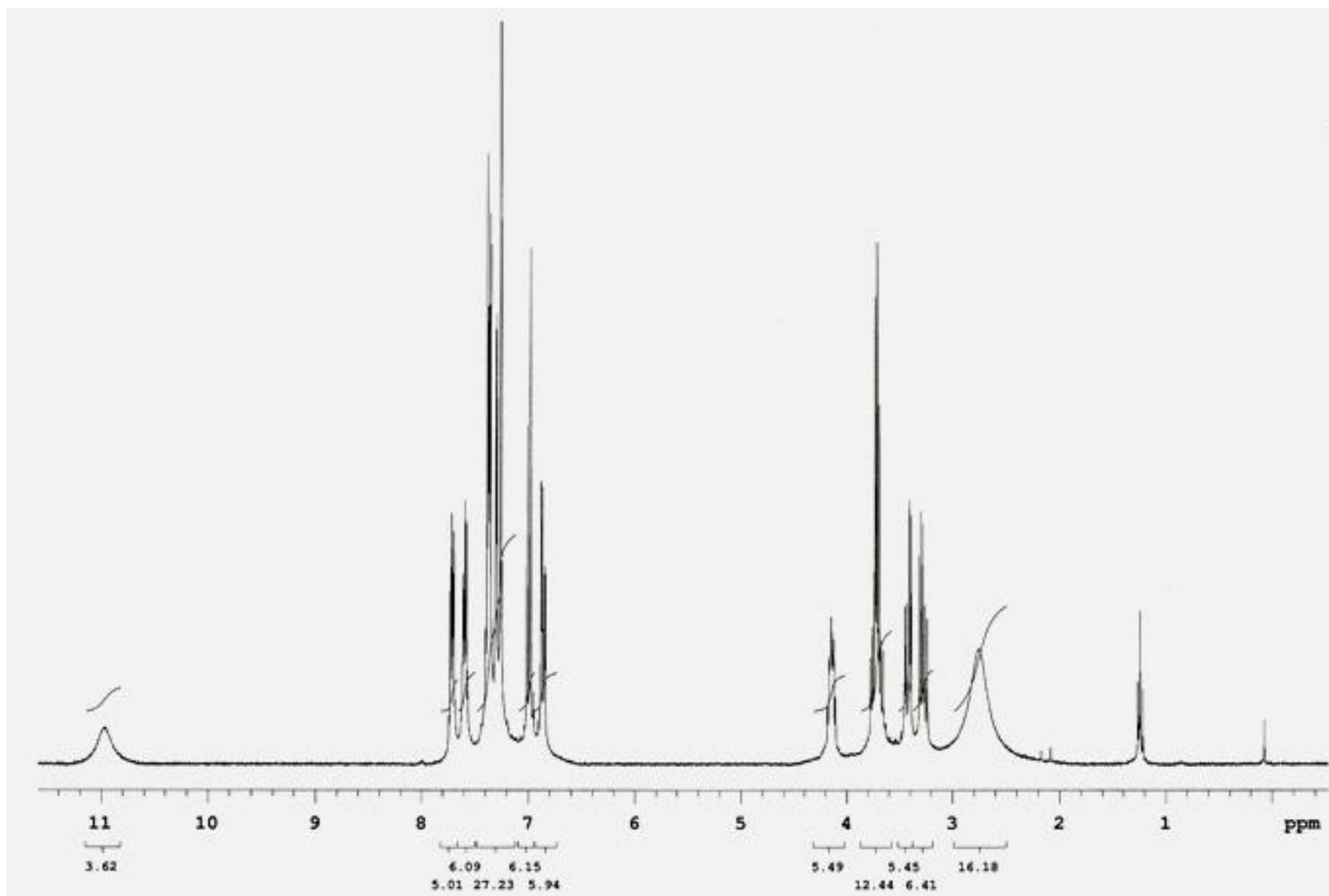


Figura A1: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do precursor **4**.

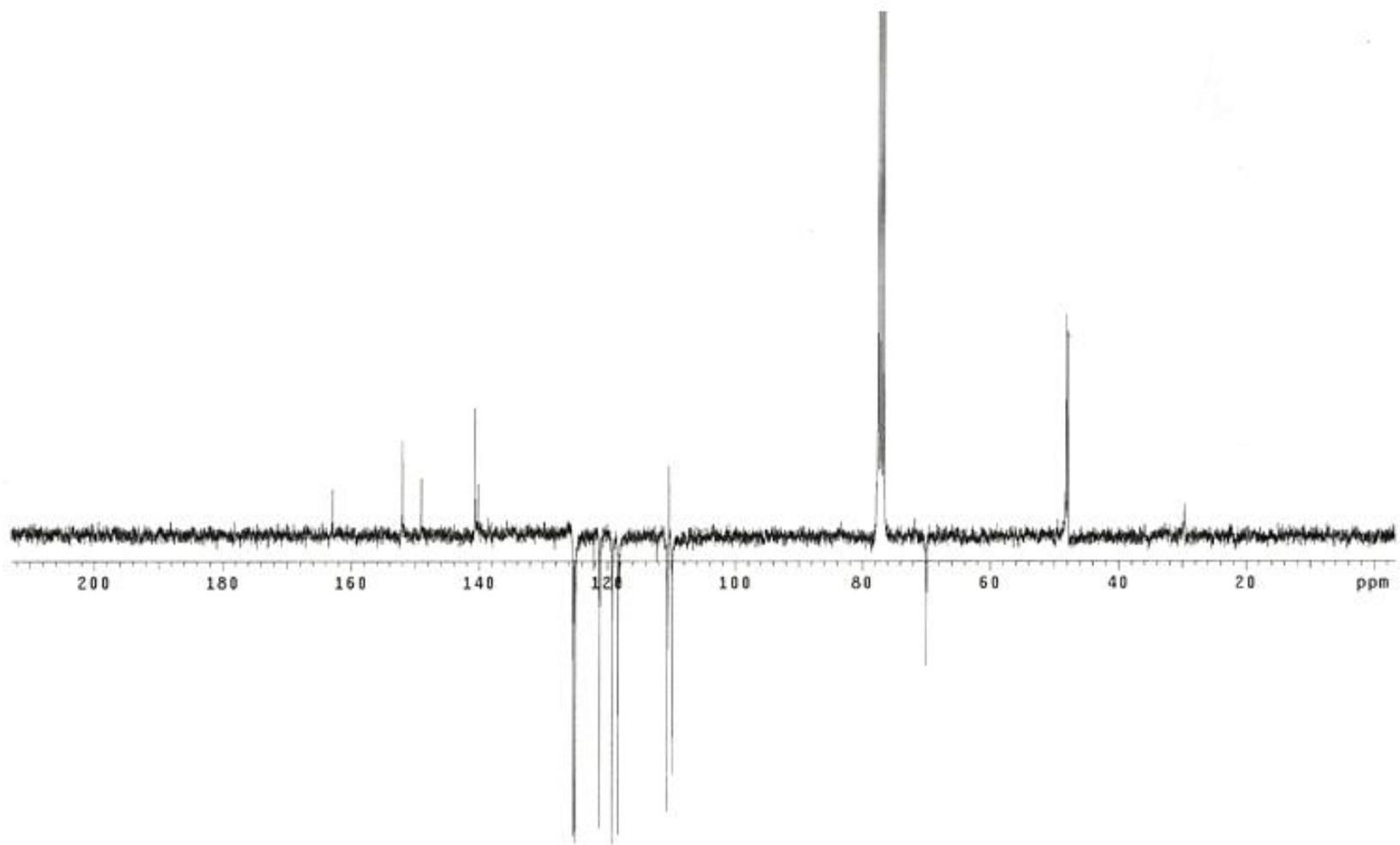


Figura A2: Espectro RMN de APT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do precursor **4**.

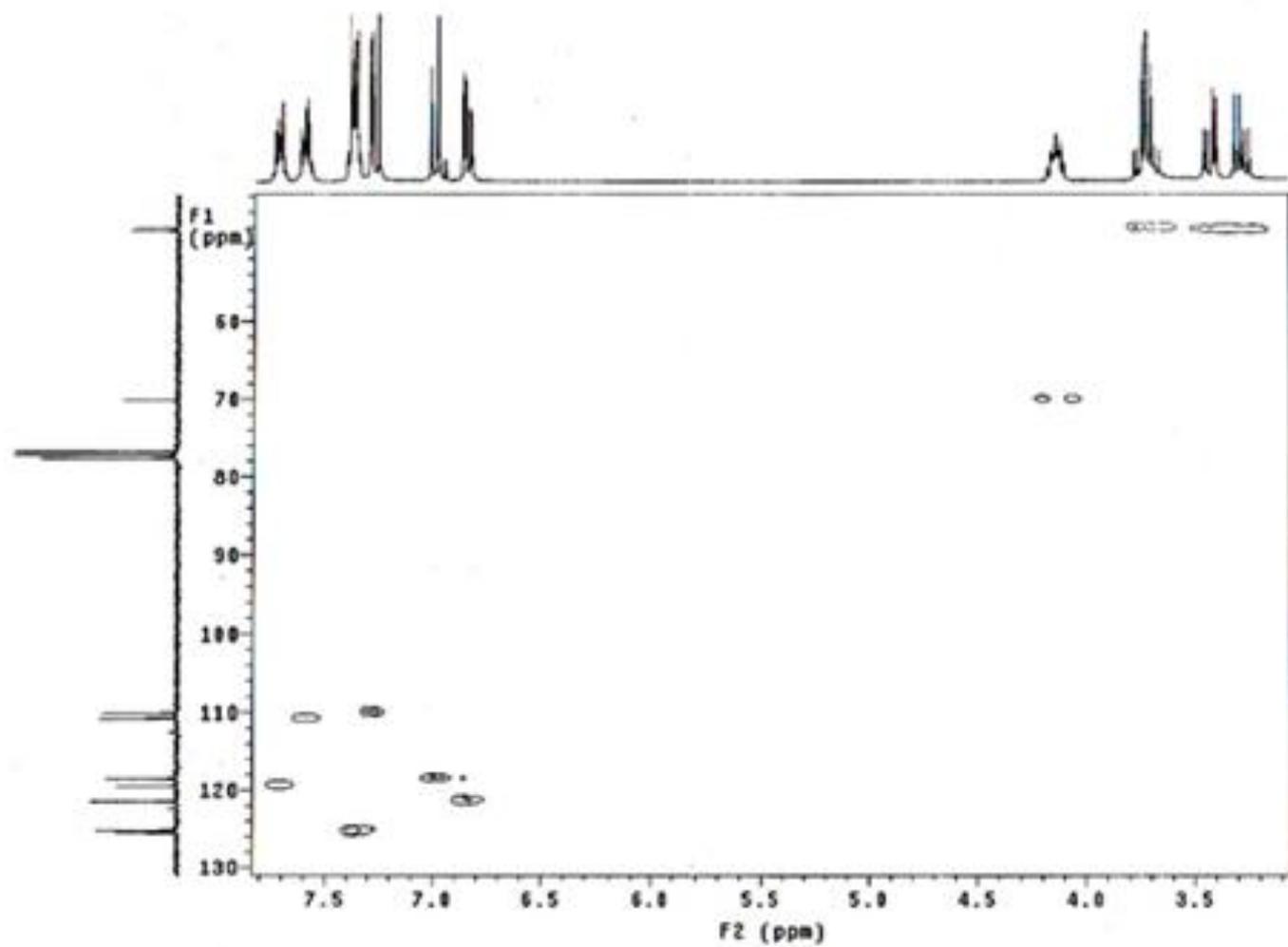


Figura A3. Espectro HMQC completo do corante 4 em CDCl<sub>3</sub>.

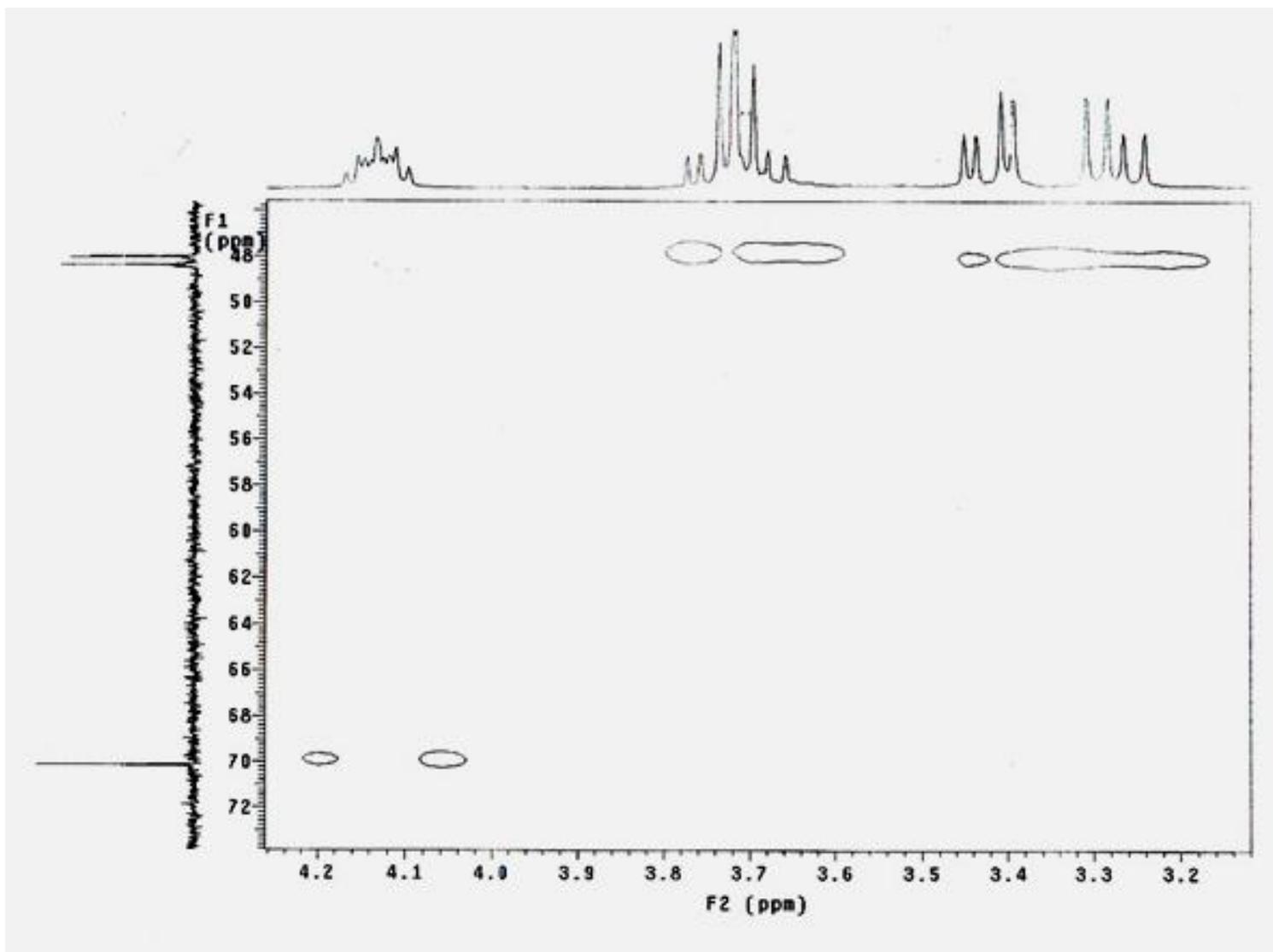


Figura A4. Espectro HMQC, expansão alifática, para o corante 4 em CDCl<sub>3</sub>.

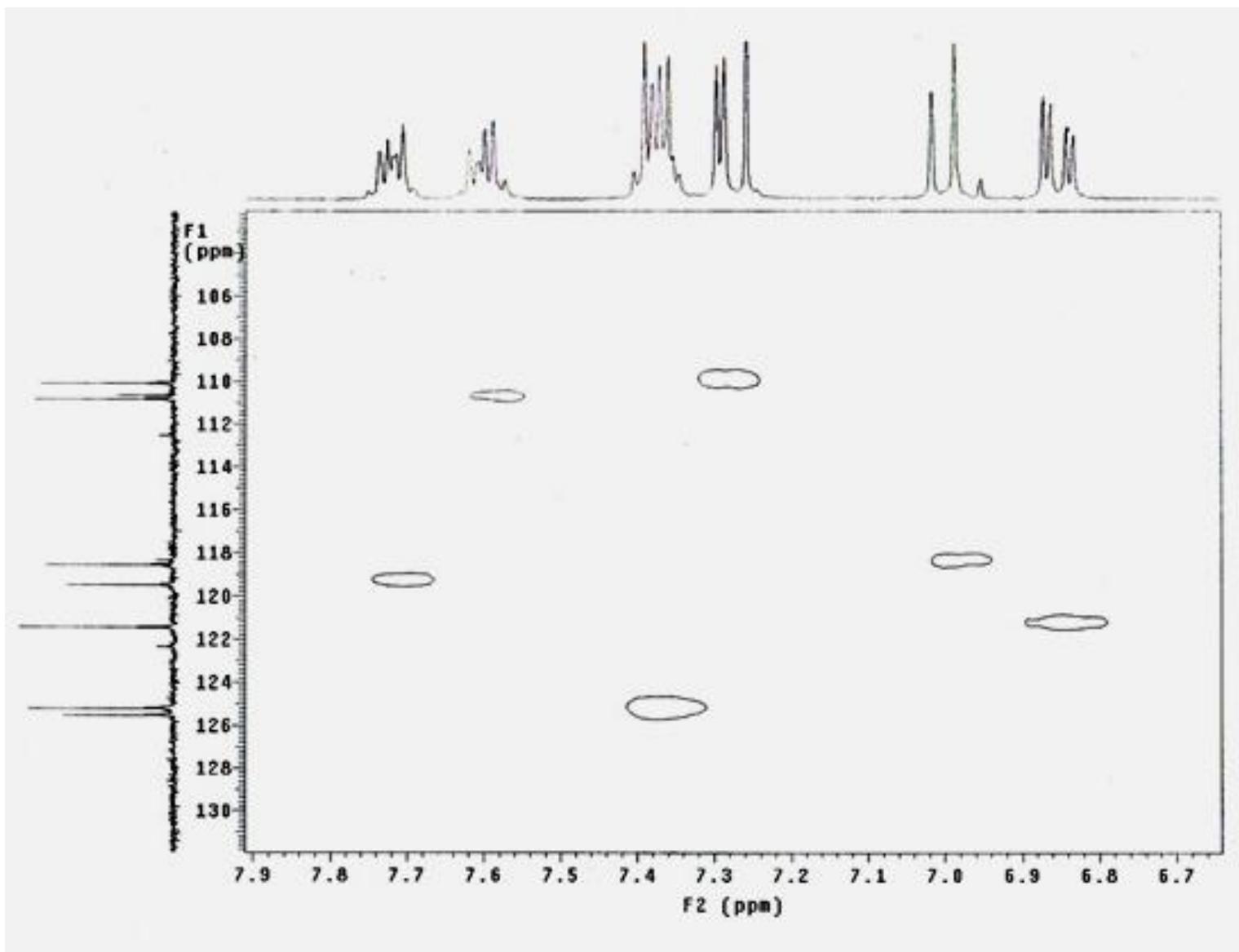


Figura A5. Espectro HMQC, expansão aromática para o corante 4 em CDCl<sub>3</sub>.

## Varian Resolutions Pro

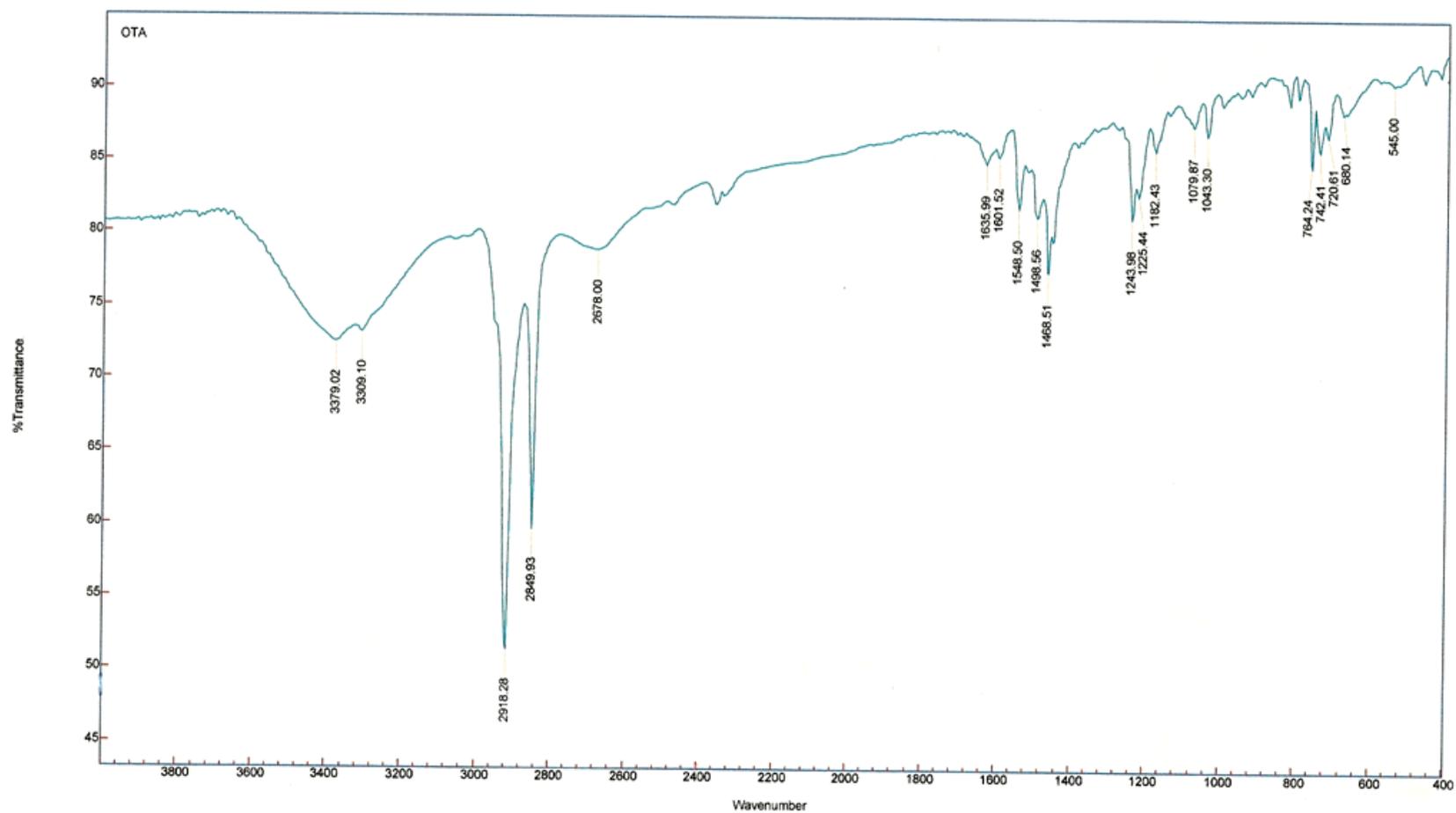


Figura A6: Espectro no infravermelho para o corante **5** em KBr.

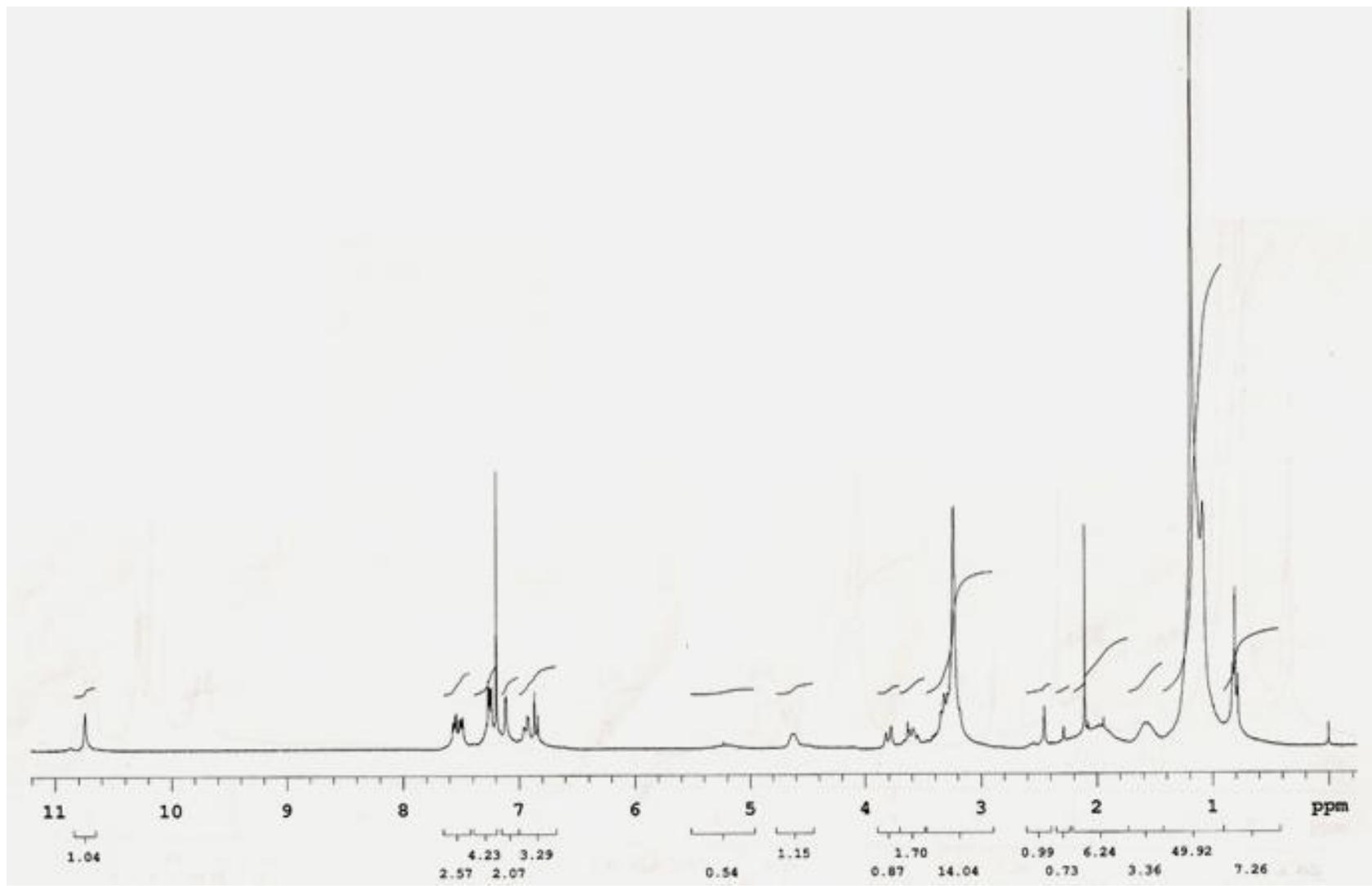


Figura A7: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do corante 5.

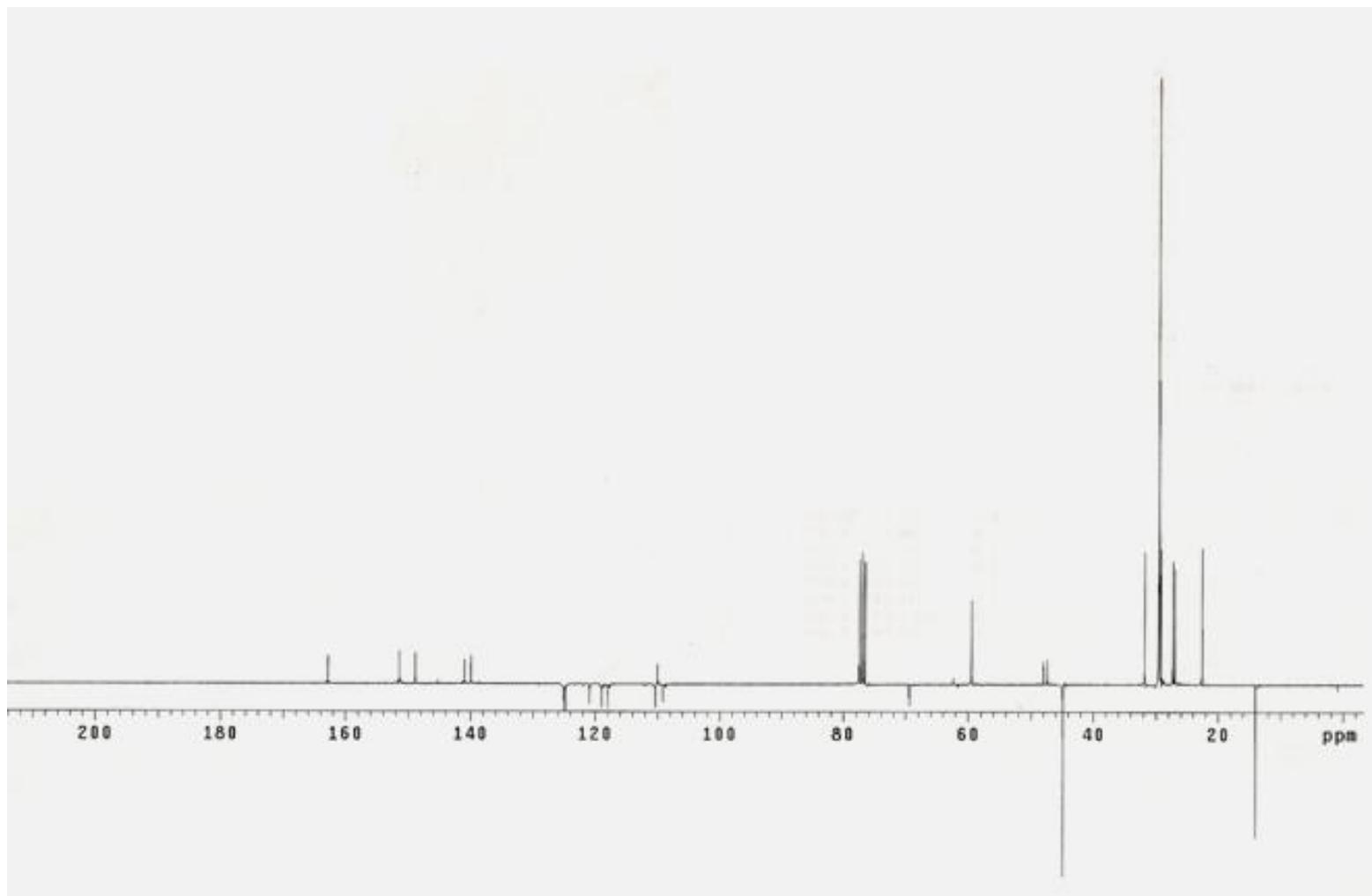


Figura A8: Espectro RMN de APT (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do precursor **5**.

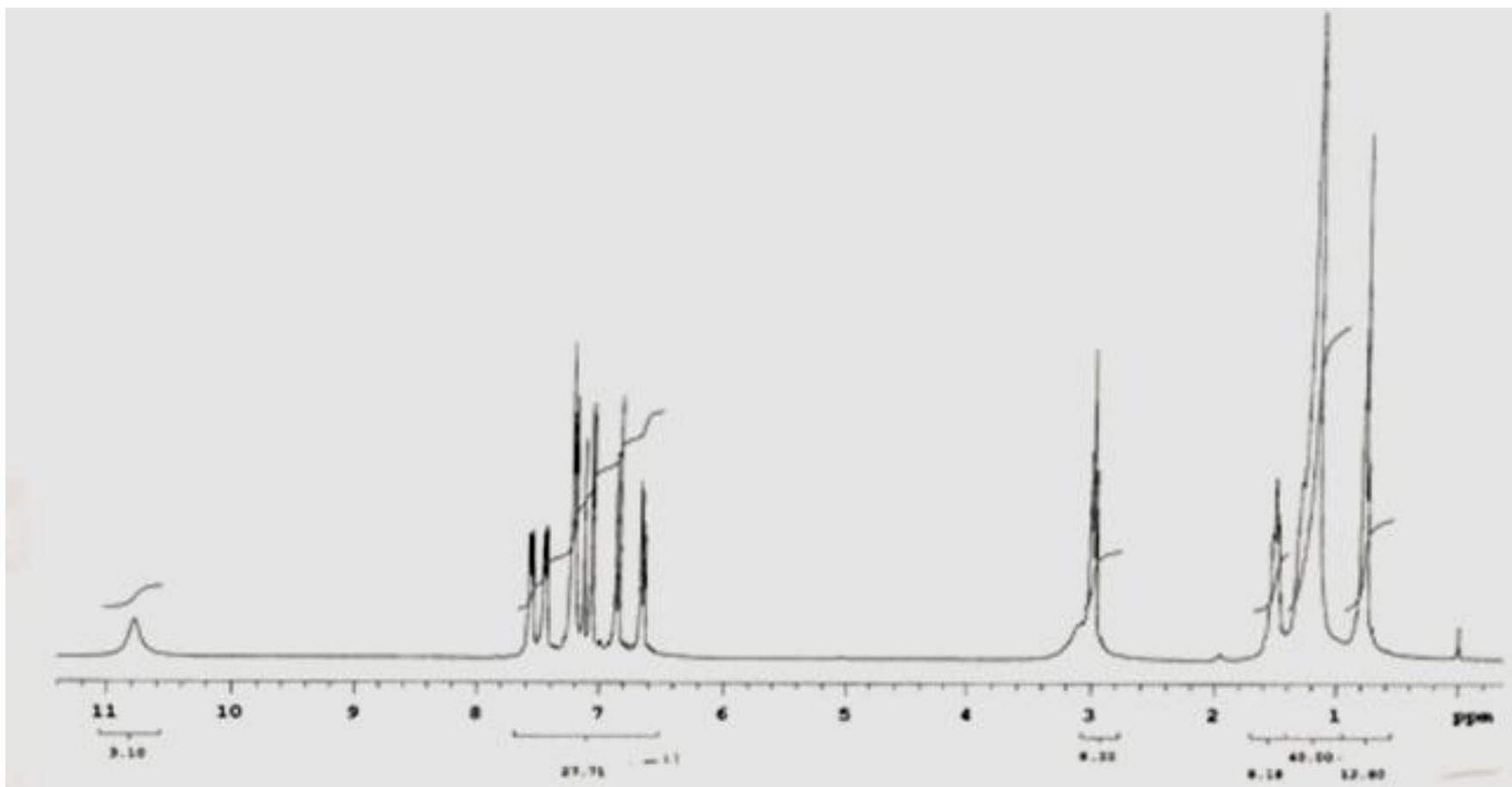


Figura A9: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do corante 6.

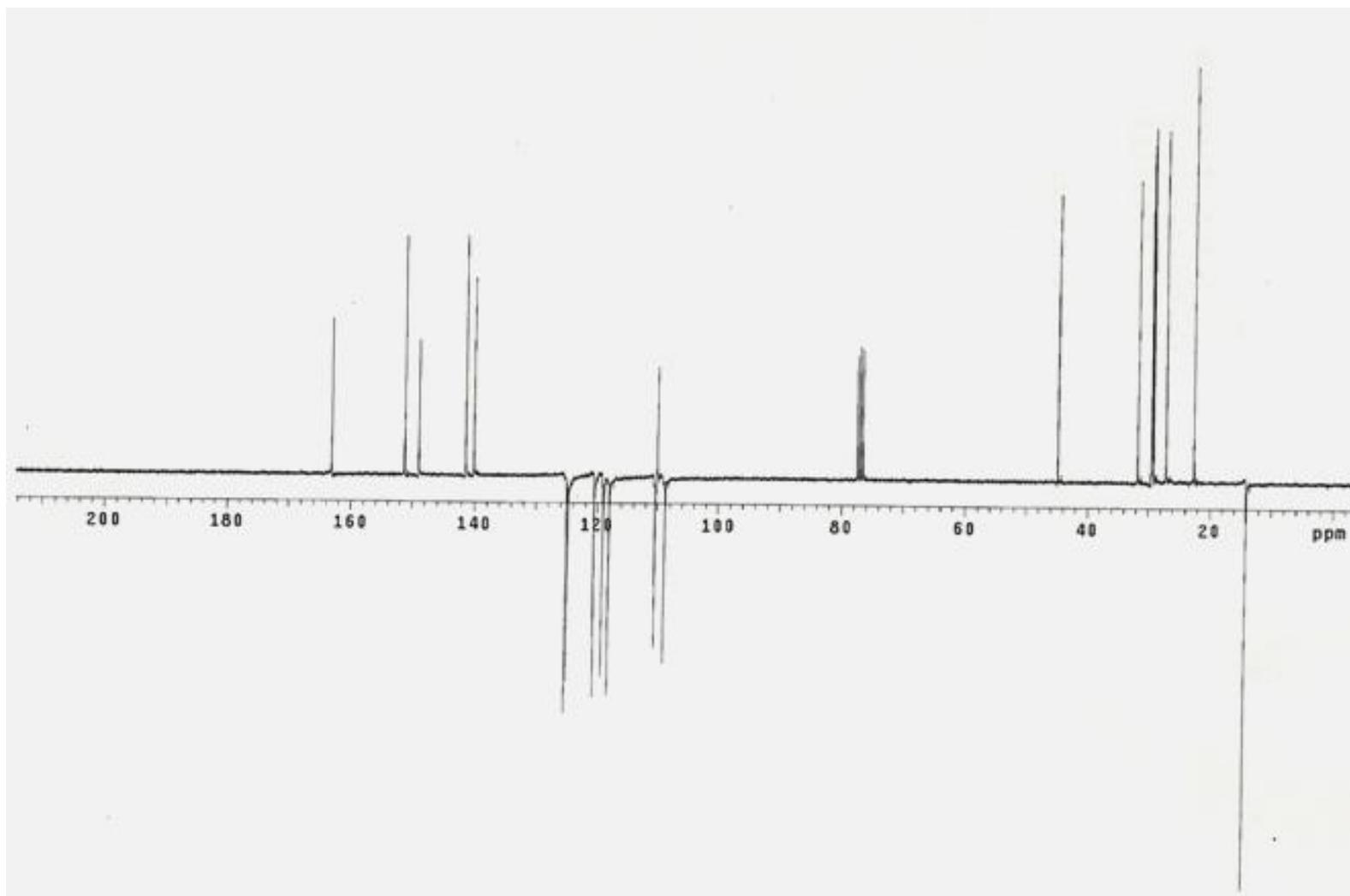


Figura A10: Espectro RMN de APT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do precursor **6**.

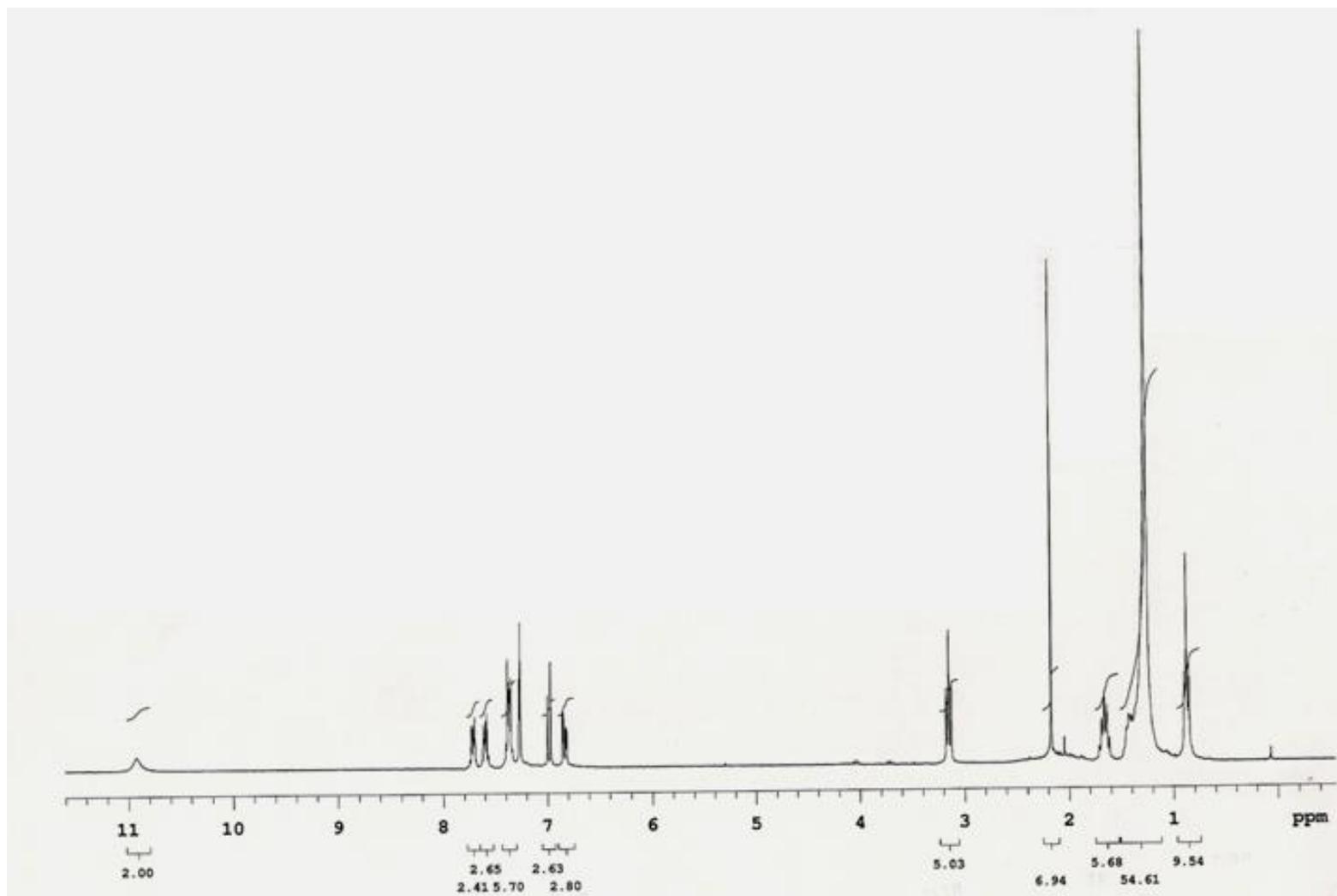


Figura A11: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do corante 7.

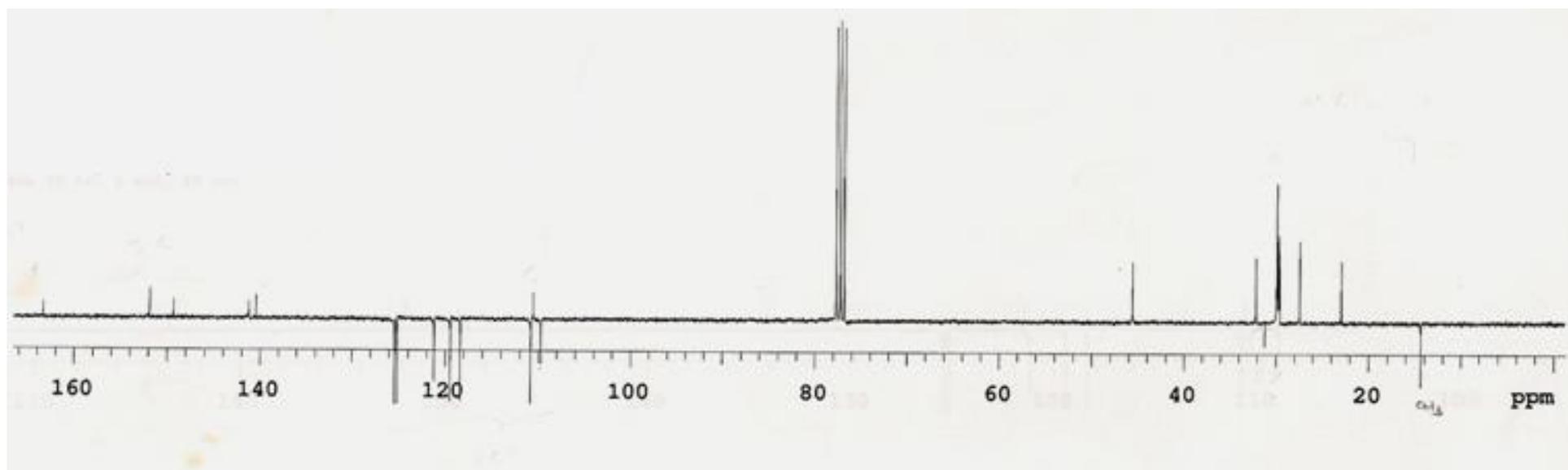


Figura A12: Espectro RMN de APT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do precursor 7.