



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Alberto de Andrade Reis Mota

**Benzotiadiazolas Fluorescentes Planejadas: Aplicações em
Biologia Molecular e Celular**

Orientador: Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto

Co-orientadores: Prof. Dr. Heibbe Cristhian Benedito de Oliveira

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Brasília – DF

1º/2015

Universidade de Brasília
Programa de pós-graduação em Química
Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica

**Benzotiadiazolas Fluorescentes Planejadas: Aplicações em
Biologia Molecular e Celular**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como pré-
requisito para obtenção do título de Doutor em Química

Aluno: Alberto de Andrade Reis Mota

Orientador: Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto

Co-orientadores: Prof. Dr. Heibbe Cristhian Benedito de Oliveira

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Brasília

2015

COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese de Doutorado do (a) aluno (a) **Alberto de Andrade Reis Mota**, matrícula nº **12/0178826**, intitulada ***“Benzotiadiazolas Fluorescentes Planejadas: Aplicações em Biologia Molecular e Celular”***, apresentada no (a) sala PADCT do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 14 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Antônio Luiz Braga
Membro Titular (UFSC)

Profa. Dra. Sônia Nair Bao
Membro Titular (IB / UnB)

Prof. Dr. Fabricio Machado Silva
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 14 de agosto de 2015.

Ao meu “vô” Mota ao qual sempre me
ensinou o caminho da inteligência e
dos livros e meu ao meu “vô” Zizinho
que ensinou que a preguiça não leva a
lugar nenhum.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido saúde, paz, sossego, alegria e muito amor durante toda a execução deste trabalho.

Agradeço muito toda minha família, que sempre me apoiou durante toda esta caminhada. A minha mãe Rita, por tanto carinho e compreensão e a meu pai George Alberto, pelo amor e apoio aos estudos sempre e também pelo “paitrocínio”, indispensável a execução deste trabalho. Aos meus irmãos Augusto e Giovanna, pelo carinho, paciência, sorrisos e vivências compartilhadas. A minha cachorra Mel que ficou bons dias de sol sem uma caminhada para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço as pessoas mais especiais do mundo para mim, o amor da minha vida Camila Tsuzaki e nossa chaveirinha mais linda desse mundo a Lara. Sem estas duas eu não conseguiria nunca ter trilhado este caminho. Obrigado meu bem por me ensinar tantas virtudes, me mostrar um amor mais que verdadeiro, e ainda me dar essa filhota tão linda de presente. Não sei como teria feito sem tanto amor, vocês duas são peças fundamentais ao meu ser e que nosso futuro seja sempre trilhado na luz que vivemos.

Agradeço a família Tsuzaki, por tanto carinho e momentos de felicidade, pelas várias comidas “japas”, e por me mostrarem como a tranquilidade e disciplina são virtudes tão essenciais. Mario, Elza, Fábio e Lucas, obrigado.

A todos do Laboratório, pessoas das quais me tornei tão próximo e as quais sempre foram discutidos inúmeros assuntos importantes para a criação desta Tese. Pedrão, Gi, Haline, Betinho, Mixaria, Sadol, Tainara, Ingrydi (que está começando), Julia, Pedrinho e Marina, vocês são pessoas que se tornaram meus irmãos e que com certeza sentirei muitas saudades. O laboratório é para mim uma família. Muito bom tudo que passei e me diverti neste lugar.

Como toda família, agradeço muito ao meu orientador e “pai” científico Brenno Amaro, que fez seu papel mais que direito. Ave professor, quantos momentos tive vontade te esganar, sair correndo, mandar um palavrão na sua sala, mas que quando passou e olhei para traz vi que era para meu crescimento. Obrigado mesmo e que eu passe muito do que você me ensinou para frente. Viva a ciência!!

Aos professores Heibbão, Wendinho e Cabra pelos momentos de risada na sala do Brenno, pela ajuda científica sem tamanho que estes caras me deram, todos monstros do conhecimento e também por passar momentos de tranquilidade quando preciso.

Ao professor José Raimundo, que convivi pouco devido à distância física (IQ-IB) mas que nos momentos de convivência sempre se mostrou disponível e comprometido me auxiliando à compreensão destes processos biológicos totalmente novos na minha cabeça, poucos foram os papos furados, mas muito bons e só sobre coisas boas.

A todos os funcionários do IQ que me ajudaram, aos professores que abriram os laboratórios para que pudesse realizar os experimentos necessários para este trabalho. A Chiquinha pelo sempre bom humor e pelos inúmeros abraços e “doces” cafés e aos funcionários terceirizados por manter nosso ambiente de trabalho tão limpo, com plantas tão bonitas.

Aos amigos da físico-química sem os quais inúmeros dados computacionais teriam demorado mil anos para serem entendidos. Thiago, Daniel, Davi, Sara, Gabi, Emília, Alanzinho, muito obrigado, vocês são muito fera e espero passar aí sempre pra tomar cafééé e “roubar” os últimos programas de computacional disponibilizados.

Enfim agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira participaram da minha formação e deste trabalho. Que as que eu esqueci não fiquem bravas.

E obrigado a quem está lendo até aqui. Todo este trabalho foi realizado com muito amor e carinho.

E viva a Ciência!!!

Resumo

Neste trabalho foram desenvolvidos novos compostos derivados do núcleo 2,1,3-benzotiadiazolas para aplicação em ensaios biológicos. No design destas moléculas, buscou-se a obtenção de fluoróforos que apresentassem uma alta performance em imageamento celular. Para tal foi utilizada a Química Computacional, sendo previstas as propriedades eletrônicas das moléculas. Foram obtidos cinco novos derivados de BTD com estruturas inéditas. A primeira formada pela ligação de dois núcleos BTD, a **BTDNHBT**D, demonstrou ser extremamente estável mesmo no estado excitado sendo estabilizado pelo processo de ICT. Esta foi utilizada como sonda no experimento de imageamento celular, mostrando uma alta permeabilidade a membrana celular e uma e uma seletividade ao citosol. A segunda molécula foi desenvolvida para mimetizar o design molecular de um ácido graxo, sendo assim uma sonda lipofílica fluorescente constituída pela BTD e o ácido oleico, a **BTD-AO**. Sua aplicação viabilizou estudos mecanísticos de internalização e dinâmica celular em diferentes temperaturas (4 °C e 37 °C). O terceiro composto foi outra sonda fluorescente lipofílica, porém derivada de um ácido graxo essencial, o ω 3-DHA. Os meios de captação deste composto pela célula são conhecidos mas ainda bastante debatidos. A nossa sonda chamada **BTD-DHA** trouxe assim, importantes informações sobre a captação e distribuição deste ácido graxo em células e em experimentos in vivo. O quarto composto foi a primeira sonda híbrida fluorescente derivada de uma BTD a ser sintetizada. Esta foi formada por uma combinação do núcleo cumarina ligado a uma BTD, chamada **BTD-LIP**. As propriedades fotofísicas deste composto nunca foram antes vistas, com deslocamentos de Stokes extremamente altos e uma forte emissão na faixa do vermelho em experimentos de bioimageamento. A última sonda sintetizada foi uma sonda específica de BTD-Ferroceno para imageamento das espécies reativas de oxigênio (ROS) em células viva. Este composto se baseou no forte efeito de quenching de fluorescência causada pelo ferroceno, que é decomposto na presença destas espécies em meio celular. A **BTD-ROS** como é chamada foi altamente sensível às ROS. Um tutorial para estudos fotofísicos de moléculas através da teoria de cálculos DFT é incluído no final desta tese.

Abstract

New fluorescent small-molecule 2,1,3-benzothiadiazole (BTD) derivatives were designed for applications in biological assays. These molecules were design of to obtain new fluorophores compounds with high performance in cell imaging. Computational chemistry was used to provide the electronic properties of these new compounds. There were obtained five new BTD derivatives with new structures. The first was formed by the linking of two BTD nucleus, **BTDNHBTD**, which shows a high stability even in the excited state, with is stabilized by ICT. This compound was utilized in bioimaging experiments, shows high plasmatic membrane permeability and is selective to the cytosol. The second molecule developed was analogous of a fatty acid, resulting in a lipophilic fluorescent probe BTD derivative, created by fusion of a BTD core and a fatty-acid derivative, **BTD-AO**. The mechanistic studies of cellular internalization dynamics at 4° and 37 °C was carried out which this compound. The third compound was another lipophilic fluorescent compound, however a derivative of an essential fatty acid, ω -3 DHA. The uptake pathways of this fatty-acid by the cell is known, but polemic. The new synthesized probe, named **BTD-DHA**, brought important information about cellular and in vivo distribution of this fatty acid. The fourth compound was a first hybrid fluorescent molecule BTD derivative with biological application. It was formed by a combination of a coumarin core linked with a BTD, named **BTD-LIP**. The photophysical properties of this compound has not yet been determined, with extremely large Stokes shift, and a bright red fluorescent emission in bioimaging experiments. The last probe developed was a specific ferrocene-BTD for fluorescence imaging of reactive oxygen species (ROS) in live cells. The strategy of this new BTD derivative was based on the strong quenching effect of ferroceno, which is decomposed in the presence species present inside the cells. **BTD-ROS**, as it is called, like the others, is cell membrane permeable and highly sensitive to low concentration of ROS. A tutorial for molecules photophysical studies by DFT theoretical calculations is included at the end of the thesis.

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Abreviaturas e Acrônimos.....	xii
Índice de tabelas	xiii
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Esquemas.....	xxviii
Introdução	1
Surgimento do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola o design de novos marcadores derivados deste núcleo e seu reconhecimento como marcador celular	2
Revisão bibliográfica.....	2
Química computacional.....	10
Desenvolvimento de Novos Fluoróforos.....	12
Objetivos	14
Gerais	14
Específicos	14
Capítulo 1	16
Design de uma sonda fluorescente com dois núcleos BTDs conjugados: a BTDNHBTB.....	17
Introdução.....	17
Resultados e discussão	18
A síntese da BTDNHBTB.....	18
Estrutura de raios-X	20
Análise conformacional por RMN.....	23
Estudos computacionais	35

Estudos Fotofísicos	45
Bioimageamento e análises biológicas	48
Conclusão	49
Capítulo 2	51
Sonda lipofílica fluorescente derivada do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola para imageamento celular	52
Introdução	52
Resultado e Discussão	60
Síntese e caracterização da nova sonda fluorescente derivada de um ácido graxo. A BTD-AO	60
Estudos fotofísicos	60
Estudos Computacionais	66
Imageamento e Dinâmica celular	72
Docking e Design Molecular do Marcador	79
Conclusões	88
Capítulo 3	90
Síntese de uma sonda lipofílica fluorescente derivada de um ácido graxo essencial: A BTD-DHA	91
Introdução	91
Resultados e discussão	94
Síntese de um derivado de ácido graxo poliinsaturado fluorescente- A BTD-DHA	94
Estudos fotofísicos	95
Estudos Computacionais	100
Imageamento e Dinâmica celular	105
Conclusão	117
Capítulo 4	119

Síntese da primeira sonda híbrida fluorescente derivada do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola: A BTD-LIP	120
Introdução.....	120
Resultados e discussão	125
Síntese do produto 4-(7-amino-4-metilcumarina)-7-(4-metoxi-feni)-(2,1,3)-benzotiadiazola	125
Estudos fotofísicos.....	126
Estudos Computacionais.....	128
Imageamento e Dinâmica celular.....	133
Capítulo 5.....	139
Design e síntese de uma nova sonda fluorescente sensível a espécies reativas de oxigênio em meio celular. A BTD-ROS	140
Introdução.....	140
Resultados e discussão	149
Síntese da nova sonda fluorescente 4-(7-amino-4-metilcumarina)-7-etinilferroceno-(2,1,3)-benzotiadiazola.....	149
Análise estrutural por RMN	151
Análise estrutural por raio-X.....	155
Estudos fotofísicos	157
Cálculos computacionais.....	163
Bioimageamento e análises biológicas.	167
Conclusão.....	170
Capítulo 6.....	172
Fotofísica teórica de sondas fluorescentes : um tutorial.....	173
Introdução.....	173
As funções de base.....	178
Um tutorial para a execução dos cálculos.....	181
Resultados e discussão	201

Conclusão e perspectiva	205
Considerações finais, conclusão e perspectivas	207
Parte Experimental.....	210
Equipamentos e procedimentos gerais.....	211
Ensaio Biológico.....	213
BTD-DHA e BTD-AO.	213
BTDNHBTD.....	215
BTD-LIP	Erro! Indicador não definido.
BTD-ROS	215
Síntese dos compostos.....	216
Docking molecular	223
Referências Bibliográficas	225

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

- BODIPY – boro dipirometeno
- DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol
- BTD – 2,1,3-benzotiadiazola
- OLED's – sistemas de diodos orgânicos emissores de luz
- LDs – gotas lipídicas
- CFABP – *cytoplasmic fatty acid binding proteins*
- FAT – *fatty acids translocases*
- FABP – *fatty acids binding proteins*
- FATP – *fatty acids transporter proteins*
- APT – *attached proton test*
- TMS – tetrametilsilano
- ICT – transferência de carga intranuclear
- TD-DFT – teoria do funcional de densidade dependente do tempo
- PCM – Modelo de polarização contínua
- CLSM – microscopia confocal de varredura a laser
- LGA – algoritmo genético de Lamarckian
- CID – *Collision-induced dissociation*
- RMSD – Root mean square deviation
- RMN — Ressonância Magnética Nuclear
- UV-Vis. — Espectroscopia de Ultravioleta-Visível
- CDCl₃ — Clorofórmio deuterado
- [d₆]DMSO — Dimetilsulfoxido deuterado
- ESI-MS — Espectroscopia de massas com ionização por electrospray
- NOESY — Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
- NOE — *Nuclear Overhauser Effect* (Efeito Nuclear Overhauser)
- B₀ — Campo magnético criado pelo magneto de um espectrômetro
- TMS — Tetrametilsilano
- λ Max — Comprimento de onda onde ocorre maior absorção atômica
- FIDs — *Fourier induction decay*

Índice de tabelas

Tabela 1. Dados obtidos por difração de raios-X e parâmetros refinados para a BTDNHBTD	21
Tabela 2. Dados de UV-Vis e emissão de fluorescência em diferentes solventes para a molécula BTDNHBTD . Todos os experimentos foram conduzidos com concentração de 10 μ M.....	46
Tabela 3. Dados de UV-Vis e emissão de fluorescência (em diferentes solventes) para a sonda BTD-AO . Todos os experimentos foram conduzidos em concentração de 10 μ M.....	62
Tabela 4. Resultados dos cálculos realizados para BTD-AO , no seu estado fundamenta e excitado obtido através de diferentes funcionais de correlação e troca (XC), e função de base 6-311+g(2d,p). As geometria utilizada para o cálculo da energia foi otimizada pelo método CAM-B3LYP combinada com a função de base 6-311G(d).	68
Tabela 5. Dados de UV-Vis e Emissão de fluorescência (em diferentes solventes) para a BTD-AO (concentração de 10 μ M)	96
Tabela 6. Resultados obitdos dos cálculos de “ <i>single point</i> ” realizados para ambas as conformações da molécula de BTD-DHA , no estado líquido e gasoso. Utilizou-se o funcional PBE1PBE com a função de base 6-311+g(2d,p). As geometrias utilizada para este cálculo foram obtidas através do funcional CAM-B3LYP e função de base 6-311G(d).	101
Tabela 7. Dados de UV-Vis e emissão de fluorescência (em diferentes solventes) para a sonda BTD-LIP . Todos os experimentos foram conduzidos em concentração de 10 μ M.....	126
Tabela 8. Resultados obitdos dos cálculos de “ <i>single point</i> ” realizados a molécula BTD-LIP , no estado líquido e gasoso. Utilizou-se o funcional PBE1PBE com a função de base 6-311+g(2d,p). As geometrias utilizada para este cálculo foram obtidas através do funcional CAM-B3LYP e função de base 6-311G(d).....	132
Tabela 9. Dados obtidos por difração dBTDe raios-X e parâmetros refinados para a BTD-ROS	156

Tabela 10. Dados de UV-Vis e emissão de fluorescência (em diferentes solventes) para a sonda BTD-AO . Todos os experimentos foram conduzidos em concentração de 10mM.....	158
Tabela 11: Tabela com os Funcionais de Correlação e troca utilizados no trabalho. ^{178,179}	183
Tabela 12. Resultados dos cálculos fotofísicos teóricos, das combinações de funcionais escolhidos com o conjunto de funções de base 6-311+G(2d,p) do marcador BTD-AO no estado fundamental e no excitado. Todas as moléculas foram pré-otimizadas em CAM-B3LYP/6-311G.....	202

Lista de Figuras

Figura 1. Exemplos de núcleos fluorescentes que podem ser utilizados para criação de novos compostos.....	3
Figura 2. O núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD).....	6
Figura 3. Estrutura molecular dos primeiros derivados de BTD utilizados como marcadores celulares.....	7
Figura 4. Estruturas moleculares dos derivados de BTD derivados do núcleo β -lapachona. Figura adaptada da referência 26.....	9
Figura 5. Estruturas dos primeiros derivados de BTD no qual foram realizados estudos teóricos de BTD-Br e BTD-H. Acima, orbitais moleculares (HOMO e LUMO) obtidos em B3LYP/6-311+G(2d,p)/LANL2DZ. Adaptado da referência 14.	11
Figura 6. Núcleo fluorescente híbrido derivado dos núcleos cumarina e rodamina. Imagem adaptada da referência 38.....	12
Figura 7. Primeira molécula contendo dois tipos diferentes de núcleos em sua estrutura. O núcleo BODIPY, destacado em vermelho e duas BTDs destacadas em azul.....	13
Figura 8. Representação da estrutura molecular da BTDNHBTD com suas respectivas marcações cristalográficas.....	20
Figura 9. Vista perspectiva ao longo do eixo cristalino b das interações π stacking intermoleculares para a molécula de BTDNHBTD	22
Figura 10. Vista perspectiva ao longo do eixo cristalino c das interações intermoleculares entre S...N para a molécula de BTDNHBTD . Observa-se a formação da cadeia em zigue-zague.....	23
Figura 11. Espectro de ^1H RMN (CDCl_3 , 600 MHz) para a molécula de BTDNHBTD	24
Figura 12. Espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3 , 150 MHz) para a BTDNHBTD	24
Figura 13. Conformações <i>syn</i> e <i>anti</i> para a BTDNHBTD	25
Figura 14. Espectros de NOESY para a molécula de BTDNHBTD (a) irradiação em 7,80 ppm, (b) irradiação em 7,48 ppm, (c) irradiação em 7,49 ppm, (d) irradiação em 7,53 ppm.....	27

Figura 15. Diagrama de Pascal para um acoplamento com dois hidrogênios não homogêneos.....	28
Figura 16. Região aromática do espectro de ^1H RMN da molécula de BTDNHBTD . Neste são mostrados os valores das constantes de acoplamento em Hz.....	29
Figura 17. Espectros de ^1H RMN da BTDNHBTD mantida em solução durante períodos variados de tempo.....	30
Figura 18. Espectro de ^1H -RMN da molécula de BTDNHBTD em CD_3OD	32
Figura 19. Espectro de ^1H -RMN da molécula de BTDNHBTD em DMSO.	33
Figura 20. Espectro de ^{13}C RMN da molécula de BTDNHBTD em DMSO.	34
Figura 21. Estruturas otimizadas com orbitais HOMO e LUMO na fase Gasosa. Cálculos realizados com nível PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-31+g(d).....	38
Figura 22. Diferença de densidade eletrônica calculada para ambos os confôrmeros em fase gasosa.	39
Figura 23. Estruturas otimizadas para ambos os confôrmeros em água com plot dos orbitais HOMO, LUMO e as diferenças de densidade eletrônica. O Cálculos realizados com nível PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-31+g(d).	41
Figura 24. Direita- Diagrama de energia dos orbitais moleculares para ambos os confôrmeros em fase gasosa e solvatados. Esquerda. Espectro UV-Vis teórico para ambos os conformeros separados e em mistura racêmica.....	42
Figura 25. Barreiras rotacionais teóricas para mudança de conformação da molécula de BTDNHBTD em diferentes solventes. A barreira direta representada pela cor azul indica a mudança do confôrmero <i>syn</i> para o confôrmero <i>anti</i> enquanto a barreira inversa indica a mudança do confôrmero <i>anti</i> para o confôrmero <i>syn</i>	44
Figura 26. Espectros de absorção (UV-Vis, esquerda) e fluorescência (direita) da molécula de BTDNHBTD	45
Figura 27. Correlação de Lippert-Mataga para a molécula de BTDNHBTD com os deslocamentos obtidos	47
Figura 28. Células MCF-7 marcadas com a sonda BTDNHBTD e/ou DAPI. Imagens (A), (B), e (C) mostram células fixadas enquanto as imagens (C), (D) e (F) mostram a marcação em células vivas. (C) e (F) Mostram a sobreposição das imagens. O padrão de fluorescência da BTDNHBTD é visto em verde. O núcleo	

das células foram marcados com um o marcador comercial DAPI (azul). Barra de escala em 25 μm	48
Figura 29. Estrutura molecular de um ácido graxo sendo destacadas as partes hidrofóbicas e hidrofílicas.	53
Figura 30. Classificação dos ácidos graxos quanto a conformação e insaturações da cadeia alquílica.	54
Figura 31. Fusão e dissolução das gotas lipídicas causada pelo agente fixador. (A) paraformaldeído (B) metanol frio (C) acetona fria. Células marcadas com BODIPY e adipofilina simultaneamente. Imagem adaptada da referência 7. ...	58
Figura 32. Espectro de absorção (UV-Vis) esquerda e fluorescência (direita) da molécula BTD-AO	61
Figura 33. BTD-AO sob luz branca (esquerda) e irradiação de luz UV ($\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm, direita)	61
Figura 34. Representação da movimentação eletrônica entre os orbitais HOMO e LUMO de duas moléculas para a formação de excímeros.....	63
Figura 35. (Acima, esquerda) Emissão da sonda BTD-AO (20 μM - 5 mM) em acetonitrila. (Acima, direita) Emissão da sonda BTD-AO (2 μM - 1 mM) em solução tampão de fosfato (pH = 7). (Abaixo, esquerda) Emissão da sonda BTD-AO (95 μM - 1 mM) em solução de Triton X100. (Abaixo, direita) Emissão da sonda BTD-AO (50 μM - 1 mM) em solução de SDS. As soluções dos agentes surfactantes foram utilizadas em concentração de saturação.....	64
Figura 36. Correlação de Lippert-Mataga com os deslocamentos obtidos.....	65
Figura 37. Geometria inicial e Geometrias otimizadas para a molécula de BTD-AO em fase gasosa e água. O funcional utilizado foi o CAM-B3LYP e a função de base 6-311G(d).	67
Figura 38. Geometria otimizada com plot dos orbitais HOMO e LUMO (esquerda). Diferença de densidade eletrônica entre os estados S0 e S1 (direita).	69
Figura 39. Diagrama de energia dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula no estado S0 e S1 em meio gasoso e aquoso	71
Figura 40. Células de câncer de mama MDA-MB-231 incubadas com BTD-AO a 4 °C (A-C) e a 37 °C (D-F) por 5 minutos. A sonda foi observada acumulada em vesículas próxima a regiões periféricas da célula. Observa-se os mesmos	

resultados para ambas as temperaturas testadas, como indicado pelas setas nos painéis (A), (B), (C) e (E). O sinal fluorescente azul é visto em (A) e (D) enquanto a emissão verde é visualizada em (B) e (E). (C) e (F) mostram a morfologia normal da célula por microscopia de contraste de fase. Barra de escala em 25 μm 73

Figura 41. Células de câncer de mama MDA-MB-231 incubadas com **BTD-AO** a 4 °C (A-C) e a 37 °C (D-F) por 15 minutos. A sonda foi observada acumulada em vesículas próxima a regiões periféricas e em locais mais internos da célula. Observa-se os mesmos resultados para ambas as temperaturas testadas, como indicado pelas setas nos painéis (A), (B), (C) e (E). O sinal fluorescente azul é visto em (A) e (D) enquanto a emissão verde é visualizada em (B) e (E). (C) e (F) mostram a morfologia normal da célula por microscopia de contraste de fase. Barra de escala em 25 μm 74

Figura 42. Células de câncer de mama MDA-MB-231 incubadas com **BTD-AO** a 4 °C (A-C) e a 37 °C (D-F) por 30 minutos. A sonda foi observada acumulada em vesículas (gotas lipídicas) próxima a regiões periféricas e em locais mais internos desta. Observa-se os mesmos resultados para ambas as temperaturas testadas, como indicado pelas setas nos painéis (A), (B), (C) e (E). O sinal fluorescente azul é visto em (A) e (D) enquanto a emissão verde é visualizada em (B) e (E). (C) e (F) mostram a morfologia normal da célula por microscopia de contraste de fase. Barra de escala em 25 μm 76

Figura 43. Células de câncer de mama MDA-MB-231 incubadas com **BTD-AO** 37 °C por 60 minutos. A sonda foi acumulada em gotas lipídicas e somente próximas ao núcleo celular. (A) Emissão azul e (B) emissão verde. (C) morfologia normal da célula por microscopia de contraste de fase. Barra de escala em 25 μm 77

Figura 44. Análise ortogonal das célula MDA-MB-231 incubadas com **BTD-AO** por 60 minutos. A sonda foi acumulada em vesículas próximas ao núcleo celular. A intercessão da linhas em (A) e (B) mostram o ponto de interação em cima de uma vesícula. As imagens do lado direito de (A) e (B) mostram a visão lateral em 3D formada pelo empilhamento de imagens. As imagens abaixo de (A) e (B) mostram a visão de baixo das imagens em 3D. Ambos os pontos de vista

mostram a vesícula dentro do citoplasma. (A) e (B) mostram diferentes vesículas contendo a nova biossonda (BTD-AO).	77
Figura 45. Viabilidade celular medidas por um ensaio de MTT em cinco linhagens celulares durante o período de 60 minutos. Note que a concentração de BTD-AO (1 mM) é considerada alta para ser utilizada em experimentos de imageamento celular. *P < 0,05, ** P < 0,01 e ***P < 0,001 versus o controle (sem aplicação da sonda).	78
Figura 46. (Esquerda): Celulas HUVEC incubadas com BTD-AO após (A) 5 min (4 °C), (B) 15min (4 °C), (C) 30 min (4 °C) e (D) 60 min (37 °C). (Direita): Células (MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2 e HeLa, respectivamente) incubadas com BTD-AO durante 60 minutos. (A) Gotas lipídicas marcadas com BTD-AO (emissão no canal azul). (B) Núcleo celular marcado com iodeto de propídio (vermelho). (C) Morfologia normal de da célula obtida através da microscopia de contraste, com ambos os marcadores excitados. Em todas as imagens a barra de escala se encontra em 25µM.	79
Figura 47. Estrutura de raios-X da albumina ligada a molécula de ácido mirístico (PDB ID 1BJ5) São destacadas cinco regiões de interação ácido graxo- proteína.	82
Figura 48. Estruturas de raios-X da albumina ligada a molécula de ácido mirístico (PDB ID 1BJ5, imagens Ib, IIb, IIIb e IVb) e as conformações previstas da BTD AO após sua ligação com a albumina (Ia,IIa, IIIa e IVa). A estrutura molecular da BTD-AO é mostrada em azul. As linhas pretas pontilhadas apontam potenciais sítios de interação de hidrogênio entre os ligantes e a proteína.	83
Figura 49. Estruturas de raios-X da albumina ligada a molécula de ácido mirístico (PDB ID 1BJ5, imagem Vb) e as conformações previstas da BTD AO após sua ligação com a albumina (imagem Va). A estrutura molecular da BTD-AO é mostrada em azul para maior destaque. As linhas pretas pontilhadas apontam potenciais sítios de interação de hidrogênio entre os ligantes e a proteína.	85
Figura 50. Estrutura de RMN da FAPB ligada a molécula de um ácido oleico, destacado na cor rosa (PDB ID 2FLJ).....	86
Figura 51. Estrutura de RMN da FAPB ligada a molécula de um ácido oleico (A) e a conformação prevista para a sonda BTD-AO ligada a proteína. As linhas pretas pontilhadas apontam potenciais sítios de interação de hidrogênio entre os ligantes e a proteína.....	87

Figura 52. Estrutura molecular do ácido docosaheptaenóico.	91
Figura 53. Síntese intracelular do DHA a partir do ácido- α -linoleico.	92
Figura 55. Espectros de absorção (UV-Vis, esquerda) e fluorescência (direita) da molécula de BTD-DHA	95
Figura 56. Exemplo de como o efeito de solvatação pode distorcer o plano da molécula de BTD-DHA	97
Figura 57. Correlação de Lippert-Mataga obtida através dos deslocamentos experimentais.	98
Figura 58. Acima, esquerda) Emissão da BTD-DHA em acetonitrila (2 μ M - 5 mM). (Acima, direita) Emissão da BTD-DHA em solução tampão de fosfato pH = 07 (170 μ M - 5 mM). (abaixo, esquerda) Emissão da BTD-DHA em solução de triton X100 (600 μ M - 8 mM) (Abaixo, direita) Emissão da BTD-DHA em solução de SDS (450 μ M - 3 mM)	99
Figura 59. Geometria inicial e otimizadas para a molécula de BTD-DHA em fase gasosa Nota-se a existência de duas conformações com energias bastante similares. O funcional utilizado foi o CAM-B3LYP e a função de base 6-311G(d)	100
Figura 60. Diagrama de energia dos orbitais HOMO e LUMO para ambas as conformações da BTD-DHA no em fase gasosa e em água.	102
Figura 61. Geometria otimizada para a BTD-DHA-1 com plot dos orbitais HOMO e LUMO e diferença de densidade eletrônica nos estados S_0 e S_1	103
Figura 62. Geometria otimizada para a BTD-DHA-2 com plot dos orbitais HOMO e LUMO e diferença de densidade eletrônica nos estados S_0 e S_1	103
Figura 63. Células de câncer MCF-7 incubadas por 1 minuto com a sonda molecular a 4 °C (imagens A, B e C) e a 37 °C (Imagens D, E e F). Nota-se o acúmulo de vesículas próximas as regiões periféricas das células (setas vermelhas). A BTD-DHA foi mobilizada pelo citoplasma celular, como pode ser observado nas regiões indicadas pelas setas brancas. As imagens mostram o mesmo resultados em ambas as temperaturas testadas. As duas faixas de emissão do fluoróforo é mostrada em azul nas imagens A e D e em verde nas imagens B e E. As imagens C mostram os aspectos morfológicos normais através da microscopia de contraste. Barra de escala em 25 μ m.	106

Figura 64. Células de câncer MCF-7 incubadas por 5 minutos com a sonda molecular a 4 °C (imagens A, B e C) e a 37 °C (Imagens D, E e F). Nota-se o acúmulo de vesículas próximas às regiões nucleares das células (setas vermelhas). A **BTD-DHA** foi mobilizada pelo citoplasma celular, como pode ser observado nas regiões indicadas pelas setas brancas. As imagens mostram o mesmo resultado em ambas as temperaturas testadas. As duas faixas de emissão do fluoróforo são mostradas em azul nas imagens A e D e em verde nas imagens B e E. As imagens C mostram os aspectos morfológicos normais através da microscopia de contraste. Barra de escala em 25 µm..... 108

Figura 65. Células de câncer MCF-7 incubadas por 15 (imagens à direita de A a F) e 30 minutos (imagens à esquerda de G a L) a 4 °C (imagens A, B, C, G, H e I) e a 37 °C (Imagens D, E, F, J, K, L). Nota-se o acúmulo de vesículas próximas às regiões nucleares das células, (setas vermelhas) não sendo mais observadas a 37°-30 min (J e K) As setas brancas indicam a distribuição da sonda pelo citoplasma. Os espaços sem marcação mostrados pelas setas amarelas sugerem não haver acúmulo desta sonda fluorescente em endossomos ou lisossomos. As imagens mostram o mesmo resultado em ambas as temperaturas testadas. As duas faixas de emissão do fluoróforo são mostradas em azul nas imagens A, D, G e H e em verde nas imagens B, E, H e K. As imagens C, F, I, J e L mostram os aspectos morfológicos normais através da microscopia de contraste. Barra de escala em 25 µm. 109

Figura 66. Células de câncer MCF-7 incubadas com a sonda **BTD-DHA** a 37 °C durante uma hora. (imagens A, B e C). A imagem mostra o análogo de lipídio totalmente mobilizado pelo citoplasma celular, estando totalmente espalhado por toda a célula. Como indicado pelas setas brancas. Barra de escala em 25 µm. 111

Figura 67. Análise ortogonal das células MCF-7 incubadas com **BTD-DHA** por 60 minutos. A sonda foi acumulada em vesículas próximas ao núcleo celular. A interseção da linha mostra o ponto de interação em cima de uma vesícula. As imagens do lado direito da imagem central mostram a visão lateral em 3D formada pelo empilhamento de imagens. A imagem abaixo da imagem central mostra a visão de baixo das imagens em 3D. Ambos os pontos de vista mostram a vesícula com a sonda **BTD-DHA** dentro do citoplasma. 112

Figura 68. Procedimento de padronização para detecção da sonda BTD-DHA através da tomografia de fluorescência. A imagem mostra fluoescência apenas para os frascos contendo DHA. Sendo a fluoescência mais intensa para esta sonda diluída em DMSO	114
Figura 69. Distribuição do composto BTD-DHA após incubação em uma cobaia. A imagem mostra o corpo do camundongo 30 minutos após inoculação parenteral da sonda. As setas amarelas indicam acumulação desta sonda no fígado e a seta branca no intestino delgado do animal. Nota-se um pequeno acúmulo desta sonda no local de inoculação no animal. A escala de cor apresenta as diferentes intensidades de fluorescência.....	115
Figura 70. Linhagem celular de monócitos THP-1 (5x10 ⁵ /ml) estimuladas com uma concentração de 50 µM do ácido graxo DHA e com a sonda fluorescente BTD-DHA (DHA-F). Sendo analisadas os níveis sobrenadantes de citosinas IL-10 e TNF-α. Os dados foram tratados estatisticamente pelo método ANOVA seguindo do teste de Bonferroni ***P°<0,001.....	116
Figura 71. Exemplos de novos fluoróforos construídos sem utilização de núcleos fluorescentes já pré-estabelecidos. A esquerda a sonda criada por Xiao . Ref. ¹²⁶ e a direita a sonda criada por Murale. Ref. 128.....	121
Figura 72. Exemplos de núcleos híbridos fluorescentes. (Direita) molécula com os núcleos cumarina e hemicianina. ¹²⁶ (Centro) molécula contendo os núcleos rodamina e cianina; ¹²⁹ (direita) molécula contendo os núcleos fluoresceína e carbopironina. ¹³⁰	122
Figura 73. Estrutura molecular do núcleo fluorescente cumarina com sua numeração atômica usual	123
Figura 74. ¹ H RMN (CDCl ₃ , 600MHz) do composto BTD-LIP Erro! Indicador não definido.	
Figura 75. ¹³ C RMN (CDCl ₃ , 600MHz) do composto BTD-LIP Erro! Indicador não definido.	
Figura 76. (Acima Esquerda)- Espectro de absorção (UV-Vis) da molécula BTD-LIP (Acima direita) Espectro de fluorescência com comprimento de excitação no máximo de absorção para o solvente (Abaixo) Plotagem da correlação de Lippert-Mataga com os valores de deslocamento químicos obtidos.	127

Figura 77. Geometrias obtidas para a molécula de BTD-LIP em fase gasosa e água, obtidas através de cálculos com o funcional CAM-B3LYP e função de base 6-311G(d).....	129
Figura 78. Geometria otimizada para a molécula BTD-LIP em fase gasosa com plot dos orbitais HOMO e LUMO (Esquerda). Diferença de densidade eletrônica nos estados S0 e S1. (direita). Cálculos realizados com o funcional/função de base – PBE1PBE/6-311+G(2d,p).....	130
Figura 79. Geometria otimizada para a molécula BTD-LIP solvatada em água com plot dos orbitais HOMO e LUMO (Esquerda). Diferença de densidade eletrônica nos estados S0 e S1. (direita). Cálculos realizados com o funcional/função de base – PBE1PBE/6-311+G(2d,p).....	130
Figura 80. Diagrama de energia dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula BTD-LIP em fase gasosa e solvatado em água. Observa-se um aumento do gap energético com o efeito de solvatação.	132
Figura 81. BTD-LIP marcando especificamente gotas lipídicas em células Caco 2 com efetividade similar tanto para células vivas quanto para células fixadas. As imagens A, B e C mostram células vivas encubadas com a sonda, as imagens D, E e F mostram as células fixadas. As imagens A e D mostram o perfil de corpúsculos lipídicos sendo marcados com esta sonda (indicado pelas setas). Nota-se a associação da sonda também a regiões próximas ao núcleo, correspondendo ao complexo de Golggi e reticulo endoplasmático. (indicado pelas setas azuis claras). As imagens B e E mostram o aspecto morfológico da célula através da microscopia de contraste de fase. As imagens C e F mostram a sobreposição das imagens de contraste com os sinais de fluorescência. A letra N nas imagens indicam o núcleo celular.	134
Figura 82. BTD-LIP marcando gotas lipídicas em células de Caco-2. A imagem A mostra os corpúsculos lipídicos marcados com a BTD-LIP (indicado pelas setas) e a Imagem B mostra estes corpúsculos marcados com um marcador comercial BODIPY (indicado também pelas setas). As imagens B e E mostram o aspecto morfológico da célula através da microscopia de contraste de fase. As imagens C e F mostram a sobreposição das imagens de contraste com os sinais de fluorescência. A letra N nas imagens indicam o núcleo celular.	136
Figura 83. Corpúsculos lipídicos marcados em células de Caco-2 através da marcação simultânea com a BTD-LIP e o marcador comercial BODIPY. A	

imagem A mostra o aspecto fluorescente destas vesículas marcadas com o BODIPY (indicado pelas setas). A imagem B mostra o aspecto fluorescente dos lipídios marcados com a **BTD-LIP**, sendo também observadas as marcações próximas ao núcleo, indicado pelas setas amarelas. Na imagem C pode-se observar a sobreposição da fluorescência de ambos os marcadores (indicado pela seta azul clara), ficando mais evidente as áreas marcadas apenas pela **BTD-LIP** (indicada pela cabeça de seta azul clara) A imagem D mostra os aspecto morfológico normal da célula. 137

Figura 84. Meios de formação das ROS a partir da redução do oxigênio ao ânion superóxido. Imagem adaptada da referência ¹³⁸ 140

Figura 85. Estrutura de uma sonda fluorescente sensível a ROS. Imagem adaptada da referência ¹⁵² 144

Figura 86. Processo de ativação e desativação de fluorescência causado pelo efeito de transferência eletrônica fotoinduzida. Imagem adaptada da referência ¹⁵³ 145

Figura 87. Diagrama de energia dos orbitais moleculares do ferroceno, sendo destacados os orbitais HOMO em azul e LUMO em vermelho. Imagem adaptada da referência ¹⁵⁴ 146

Figura 88. Estrutura de um marcador contendo ferroceno que sofre degradação em água e a luz ambiente. Na imagem é mostrado o efeito de "turn on" deste marcador ao sofrer a degradação do ferroceno. Imagem adaptada da referência ¹⁵⁵ 147

Figura 89. ¹H RMN (CDCl₃, 600 MHz) da molécula **BTDFeBr** 151

Figura 90 ¹³CRMN (CDCl₃, 600 MHz) da molécula **BTDFeBr** 152

Figura 91. ¹H RMN (CDCl₃, 600 MHz) da molécula **BTDFeFe** 153

Figura 92. ¹H RMN (CDCl₃, 600 MHz) da molécula **BTD-ROS** 154

Figura 93. ¹³C RMN (CDCl₃, 600 MHz) da molécula **BTD-ROS** 154

Figura 94. Representação da estrutura molecular da **BTD-ROS** com suas respectivas marcações cristalográficas. 156

Figura 95. Espectros de absorção (UV-Vis, esquerda) e fluorescência (direita) da molécula de **BTD-ROS** 158

Figura 96. Plotagem da correlação de Lippert-Mataga com os deslocamentos obtidos. 160

Figura 97. BTD-ROS sob luz branca (esquerda) e irradiação de luz UV ($\lambda = 365\text{nm}$, direita)	161
Figura 98. Fotoestabilidade da BTD-ROS ($100\ \mu\text{M}$) em solução aquosa a temperatura ambiente. A fonte de excitação foi mantida em $474\ \text{nm}$ sendo o detector ajustado para $565\ \text{nm}$. A intensidade da fluorescência dependente do tempo foi realizada com uma lâmpada de Xenônio ($400\ \text{W}$). Após 60 minutos adicionou-se $100\ \mu\text{L}$ de uma solução aquosa de peróxido de benzoíla (PhCOO^-) previamente aquecida por 3 minutos a solução de $4\ \text{ml}$ contendo a BTD-ROS $100\ \mu\text{M}$ sendo a solução resultante monitorada por mais 60 minutos.....	162
Figura 99. Gráfico das intensidades de fluorescência do sulfato de quinina e da BTD-ROS utilizado para o cálculo do rendimento quântico	163
Figura 100. Geometrias otimizadas para a molécula de BTD-ROS em fase gasosa e solvatada em meio aquoso.	164
Figura 101. Geometria otimizada para a molécula BTD-ROS em fase gasosa com plot dos orbitais HOMO e LUMO (Esquerda). Diferença de densidade eletrônica nos estados S_0 e S_1 . (direita). Cálculos realizados com o funcional/função de base – PBE1PBE/6-311+G(2d,p).....	165
Figura 102. Geometria otimizada para a molécula BTD-ROS em fase gasosa com plot dos orbitais HOMO e LUMO (Esquerda). Diferença de densidade eletrônica nos estados S_0 e S_1 . (direita). Cálculos realizados com o funcional/função de base – PBE1PBE/6-311+G(2d,p).....	165
Figura 103. Diagrama de energia dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula no estado S_0 e S_1 em meio gasoso e aquoso.	166
Figura 104. Células Raw 264.7 tratada com Menadiona. A detecção de ROS por DCFH é mostrada nas imagens A e a pela BTD-ROS é mostrada na imagem C. As imagens indicam os núcleos das células nas amostras tratadas com a BTD-ROS , que produziu uma imagem de fluorescência mais detalhada da célula. As imagens C e D mostram a morfologia normal da célula através da microscopia de contraste de fase. Escala de referência em $25\ \mu\text{M}$	167
Figura 105. Células Raw 264.7 sob condições normais (controle negativo). Não há detecção de ROS pelo marcador DCFH-DA, como mostrado na imagem A. A BTD-ROS foi capaz de detectar as ROS residuais da célula, como mostrado na	

imagem C (setas brancas). As imagens C e D mostram os aspectos normais das células pela microscopia de contraste de fase. Barra de escala em 25 μM ...	169
Figura 106. Layout do Software GaussView© 5.....	184
Figura 107. Janela para “montagem” da molécula de interesse.....	184
Figura 108. Molécula “montada” pronta para a submissão dos cálculos.....	185
Figura 109. Janela de edição de parâmetros de cálculos do GaussView© 5.....	185
Figura 110. Modo texto do arquivo de input.....	186
Figura 111. Janela de edição de parâmetros de cálculos do GaussView© 5, para otimização molecular do estado excitado por DFT.....	189
Figura 112. Janela de edição de métodos do GaussView© 5, para um cálculo single point excitado.....	191
Figura 113. Modo texto do cálculo single point excitado, visualizando as energias de excitações.....	192
Figura 114. Comprimentos de onda de excitação com a suas respectivas forças de osciladores.....	193
Figura 115. Espectro eletrônico com uma série de convoluções de gaussianas, extraído no GaussView.....	193
Figura 116. “Gaussian Calculation Setup” com edição dos parâmetros de solvatação no Software GaussView.....	195
Figura 117. Janela do GaussView com os orbitais moleculares calculados..	196
Figura 118. Diretório do Programa Gaussian em um Sistema Windows.....	197
Figura 119. Modo terminal de execução do “formchk”.....	198
Figura 120. Modo Prompt de comando do “cubegen”.....	199
Figura 121. Modo Prompt de comando do “cubeman”.....	200
Figura 122. Janela de Visualização de Densidades Eletrônicas no GaussView.....	201
Figura 123. Plots dos orbitais HOMO e LUMO, diferença de densidade eletrônica entre os estados S_0 e S_1 , assim como o diagrama de energias dos orbitais moleculares. Cálculos obtidos no nível PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311G(d,p).....	203
Figura 124. Comparação dos Espectros de Absorção Teórico (convolução de gaussianas de um cálculo PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311G(d,p)) com o espectro obtido experimentalmente.....	204

Figura 125. ^1H RMN e ^{13}C RMN APT (CDCl_3 , 300MHz) da sonda fluorescente BTD-AO	217
Figura 126. ESI(+)-MS da molécula BTD-AO. Inserido o espectro de ESI(+)-MS/MS em alta resolução com seleção mono-isotopológica do composto BTD-AO protonado. Massa exata calculada para o composto $[\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{OS}+\text{H}]^+$ 416,2730 Da. Massa encontrada de 416,2729 Da (erro: -0,24 ppm)	218
Figura 127. ^1H RMN (CDCl_3 , 600MHz) do composto BTD-DHA.....	219
Figura 128. ^{13}C RMN (CDCl_3 , 150MHz) do composto BTD-DHA	220

Lista de Esquemas

Esquema 1. Esquema de síntese para a nova sonda fluorescente bis-2,1,3-benzotiadiazó-4-il-amina contendo dois núcleos BTDs. Denominada BTDNHBTD	19
Esquema 2. Síntese da nova sonda fluorescente incorporando o núcleo 2,1,3-benzotiadiazóla (BTD) denominada BTD-AO	60
Esquema 3. Síntese da nova sonda fluorescente incorporando o núcleo 2,1,3-benzotiadiazóla (BTD) denominada BTD-DHA	94
Esquema 4. Síntese de uma sonda híbrida fluorescente contendo o núcleo BTD. Denominada BTD-LIP	125
Esquema 5. Síntese da BTD-ROS a partir do acoplamento do ferroceno à 4,7-dibromo-BTD.	149
Esquema 6. Síntese da BTD-ROS a partir do acoplamento da 4-metil-7-aminocumarina a 4,7-dibromo-BTD.	150

Introdução

Surgimento do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola o design de novos marcadores derivados deste núcleo e seu reconhecimento como marcador celular

Revisão bibliográfica

A célula, estrutura presente em todos os organismos vivos existentes, possui em seu interior uma maquinaria extremamente complexa cujo funcionamento é regulado pela presença e movimentação de biomoléculas e moléculas em seu interior. Todos os processos de alteração e manutenção celular são dependentes do comportamento e da modificação das substâncias representadas por estas moléculas sendo estas sintetizadas pela própria célula ou muitas vezes captadas do meio externo através de processos de absorção.

Uma maior compreensão das interações moleculares no meio celular permite uma melhor elucidação dos diferentes ciclos metabólicos envolvidos na captação e no metabolismo de substâncias o que leva, por sua vez, na compreensão dos processos celulares. Dessa forma, o processo de desenvolvimento tanto de diagnósticos quanto de tratamentos de doenças é facilitado.

Um importante avanço científico para os estudos citológicos foi o desenvolvimento da microscopia de fluorescência. Esta modalidade de microscopia permite a visualização de compostos fluorescentes com uma maior sensibilidade à detecção que a imposta pela luz ($0,2 \mu\text{m}$) A utilização da microscopia de fluorescência também permite a marcação seletiva e a visualização simultânea de diferentes marcadores celulares tornando possível desta maneira visualizações de diferentes especificidades celulares em uma única imagem.^{1,2}

Moléculas fluorescentes estão se tornando indispensáveis para a visualização de processos biológicos ou bioquímicos por meio da microscopia de fluorescência. Grande parte das estruturas moleculares destas moléculas fluorescentes se baseiam em determinados núcleos fluorescentes que são modificados através da variação dos átomos ligados a ele. Este núcleo possui propriedades pré-estabelecidas, como estabilidade fotofísica e química e regiões

espectrais bem definidas. Estes compostos podem ser sintetizados “*de novo*” sendo suas propriedades estudadas e moduladas de acordo com sua aplicação de interesse.^{3,4}

Atualmente, existe um grande número de marcadores fluorescentes, vários já estão disponíveis comercialmente.⁵ Pode-se ter uma ideia do número de marcadores fluorescentes pelo estudo realizado por Lavis e colaboradores.⁶ Estes pesquisadores classificaram 15 núcleos fluorescentes, podendo-se destacar dentre estes as cumarinas, fluoresceínas, cianinas, BODIPYs, rodaminas e fenoxazinas, como observado na Figura 1.

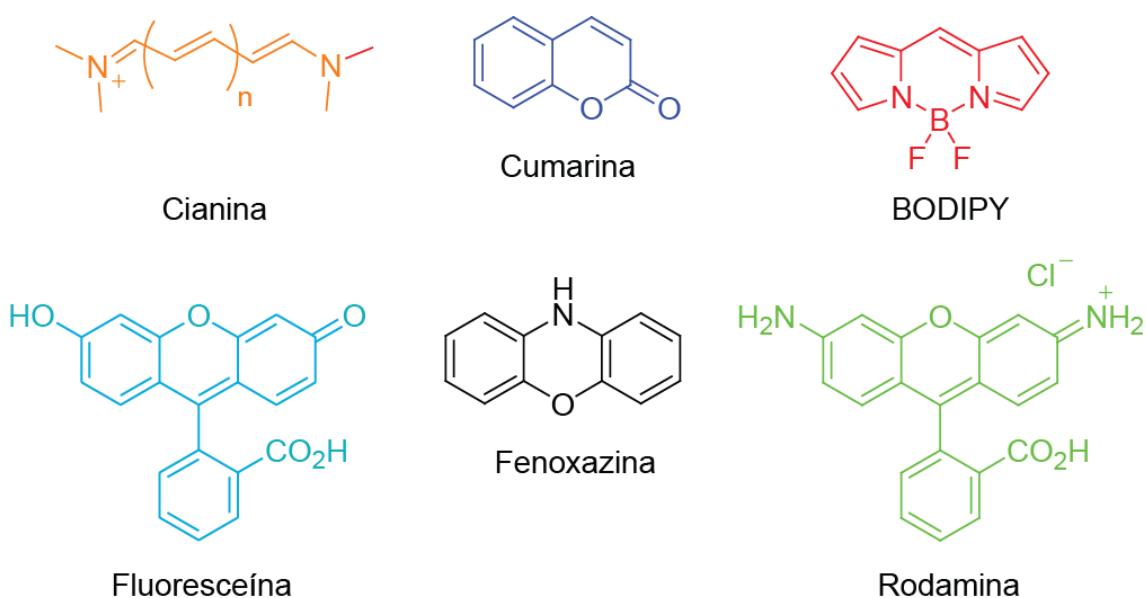


Figura 1. Exemplos de núcleos fluorescentes que podem ser utilizados para criação de novos compostos

Cada um destes núcleos é capaz de sofrer alterações estruturais sem a perda de fluorescência, gerando desta maneira um novo composto fluorescente com propriedades e características únicas. Dada a infinita variedade de combinações atômicas em que podem ser utilizados estes núcleos, inúmeros são os compostos fluorescentes existentes atualmente. Muitos disponíveis comercialmente, outros inéditos, sintetizados apenas para sua proposta de utilização.

As substâncias derivadas destes núcleos fluorescentes, apresentam, na maioria das vezes limitações inerentes a seus precursores, podendo-se citar: a impossibilidade de marcação de células fixadas com derivados de cumarina, a degradação de biosondas derivadas de fluoresceínas e BODIPY à temperaturas acima de -20 °C e formação de agregados em solução de derivados de Rhodaminas. Além disso estes compostos podem também apresentar outras desvantagens para suas aplicações em experimentos de imageamento celular como: possibilidade de fotodegradação, larguras espectrais de emissão bastante amplas, baixos deslocamentos de Stokes e insolubilidade da sonda em meio aquoso.

A marcação de determinadas estruturas celulares pode também ser limitada devido a atipicidade comportamental apresentada por estas organelas ao interagirem com o marcador. Esta interação pode descaracterizar a organela que se deseja realizar a marcação (em marcações de gotas lipídicas, por exemplo, podem ocorrer fusões ou dissolução destas em meio celular, dependendo do marcador que é utilizado para tal finalidade),⁷ ou ainda apresentar elevada citotoxicidade quando utilizada.^{8,9} Somam-se a estas dificuldades, a capacidade do composto transpor a membrana celular, quando estes são aplicados em experimentos *in vivo*, uma vez que a transposição de moléculas em meio celular podem muitas vezes necessitar de proteínas altamente específicas como *binding proteins*, translocases, e *transporter proteins*.^{10,11} Por isso, a extrema necessidade de criação elaboração de moléculas fluorescentes que não apresentem as desvantagens supracitadas e que principalmente sejam permeáveis à membrana celular. Esta criação é altamente desafiadora uma vez que existe uma infinidade de variáveis inerentes a complexidade intrínseca de uma célula.¹²

É importante ressaltar que todos os núcleos fluorescentes citados anteriormente podem ser classificados dentro da classe de “fluoróforos sintéticos pequenos”, moléculas de 300 a 2000 Da que constituem a maior parte das moléculas fluorescentes comerciais.¹³ Existem ainda duas classes de sondas fluorescentes:

- As “proteínas geneticamente codificadas”, uma classe de fluoróforos de tamanho grande, 30 a 50 kDa, sendo a maioria destes marcadores de

origem animal. A proteína verde fluorescente, GFP é um exemplo de fluoróforo pertencente a esta classe.

- Os “nanocristais fluorescentes” sendo estes últimos desenvolvido na área de ciência de materiais e nanotecnologia. Estas substâncias apresentam propriedades únicas como brilho ultra intenso e resistência a fotodegradação. Os Qdots é um exemplo de substâncias pertencente a esta classe de fluoróforos.

Dentre o grande número de núcleos fluorescentes, o heterociclo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD) vem ganhando bastante destaque na química de compostos luminescente, apresentando resultados expressivos em relação a marcações celulares¹⁴⁻¹⁷. Este núcleo possui uma série de propriedades químicas e fotofísicas que o colocam em vantagem frente a estes núcleos, as quais podemos destacar:

- O núcleo de BTD apresenta uma polarização causada pelo anel 2,1,3-tiazola, tornando o potencial eletrônico desta molécula fortemente redutivo; isto facilita os processos de relaxação da molécula quando esta se encontra no estado excitado. Processos como transferência interna de carga, dentre outros,¹⁸ fazem com que os derivados de BTD apresentem alta estabilidade no estado excitado.
- A presença de ligações duplas conjugadas no núcleo de BTD também é uma poderosa ferramenta para a criação de cromóforos com cores intensas. Podendo a variação dos substituintes neste núcleo levar a uma modulação das propriedades fotofísicas desejadas à substância.¹⁷
- Os núcleos de BTD apresentam baixa frequência de excitação, uma característica vantajosa para sua aplicação em aplicações biológicas, uma vez que irradiação de menores energias causam menores chances de alteração celular.
- A alta estabilidade química das BTDs fazem com que o trabalho envolvendo estas substâncias seja facilitado, podendo estes compostos ser mantidos a temperatura ambiente, em solução ou cristalizado, por anos, sem que ocorra sua degradação.

Devido estas características tem-se uma gama de aplicações para os mesmos, sendo usado na fabricação de novos sistemas de diodos orgânicos emissores de luz, os OLED's.^{19,20} e recentemente, derivados fluorescentes de BTD também têm se destacado na marcação celular, apresentando até o momento resultados promissores.¹⁶ Outros núcleos como as benzamidazolas e as quinoxalinas (que podem ser sintetizadas a partir do núcleo de BTD)²¹ são exemplos de núcleos utilizados em aplicações de sistemas fotoluminescentes.

A molécula de BTD, observada na Figura 1, pode sofrer alterações em qualquer uma das posições de seu anel aromático, possibilitando que sejam formadas inúmeras combinações moleculares envolvendo este núcleo, isso permite que estes derivados sejam ajustados de acordo com o propósito de utilização. Encontra-se na literatura diversos tipos de aplicações deste núcleo, sendo estes usados como: marcadores para detecção de metais,²² em dispositivos fotovoltaicos,²³ marcadores de proteínas²⁴ e inúmeras outras aplicações já revisadas recentemente.²¹

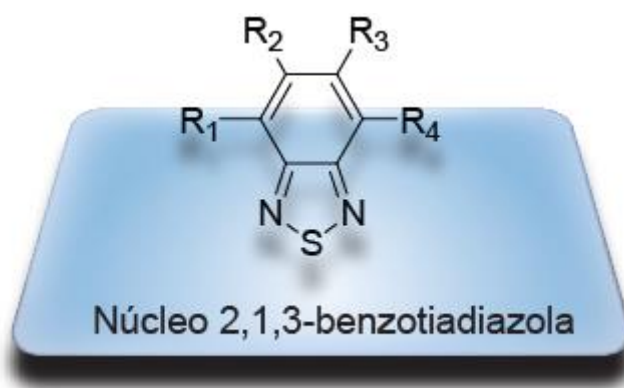


Figura 2. O núcleo 2,1,3-benzotriazola (BTD).

Dentre as posições onde podem ocorrer substituições no anel aromático, as posições 4 e 7 são as mais comuns, devido a molécula de 4,7-dibromo-2,1,3-benzotriazola²⁵ ser bastante utilizada como reagente de partida para derivados deste núcleo. A substituição nestas posições da molécula também geram bons resultados, com relação à fluorescência e a fotoestabilidade de novos compostos sintetizados.^{17,21,26} podendo estas gerar produtos simétricos, quando utilizado o mesmo substituinte nas duas posições da molécula,^{27,28} ou assimétricos, quando

utilizado dois substituintes diferentes^{26,29,30} ou apenas uma substituição na molécula¹⁴

A utilização deste núcleo em aplicações biológicas foi realizada apenas recentemente, pelo nosso grupo de pesquisa em 2007,³¹ Neto e colaboradores estudaram e utilizaram derivados dissustituídos de BTB como intercaladores de DNA, estes derivados se mostraram bastante eficientes, mesmo em baixas concentrações. Estes marcadores apresentaram vantagens em relação a sistemas catiônicos comumente utilizados (sistemas catiônicos apresentam baixa resolução nas bandas de DNA em gel de agarose devido a interações de cargas com o próprio gel). Vale ressaltar que até então poucos sistemas neutros tinham sido utilizados como intercaladores de DNA. Após este trabalho pioneiro, foram publicados outros trabalhos envolvendo este núcleo na detecção de DNA nesta mesma época, mostrando a utilização deste bastante promissora à aplicações biológicas.^{32,33}

Os resultados apresentados pelas BTBs em detecções biológicas incentivaram a utilização de derivados deste núcleo em experimentos de imageamento celular, sendo a “BTDBI” e “BTDBT”,¹⁶ Figura 3, os primeiros fluoróforos derivados do núcleo BTB a serem utilizados como marcadores neste tipo de experimento. As imagens obtidas com a utilização destas substâncias mostraram uma maior seletividade quando deste núcleo quando comparadas as obtidas utilizando um marcador já bastante conhecido e disponível comercialmente, o DAPI (dicloreto de 4,6-diamidino-2-fenilidol). Estes derivados realizaram a transposição das membranas celular e nuclear, sendo altamente específicos às marcações do DNA nuclear, não ocorrendo qualquer tipo de dispersão do fluoróforo pelo citoplasma ou adsorção destes nestas membranas.

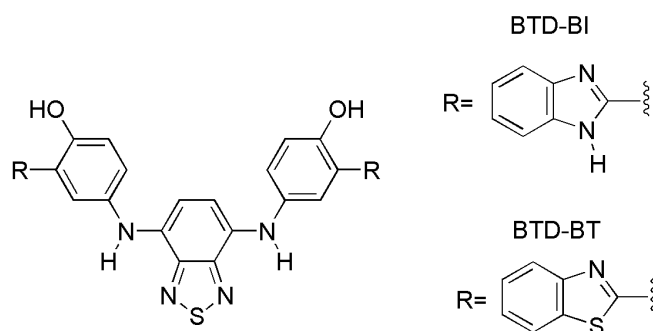


Figura 3. Estrutura molecular dos primeiros derivados de BTB utilizados como marcadores celulares

Posteriormente, inúmeros outros estudos e aplicações de BTDs para imageamento celular foram realizados, sendo muitos derivados deste núcleo eficiente como marcadores de mitocôndrias e outras organelas intracelulares.^{3,14} Além das vantagens fotofísicas já citadas as BTDs também se mostraram eficientes na marcação destas organelas, apresentando.

- A relação sinal-ruído durante o imageamento celular se mostrou alta, o que melhora a qualidade das imagens obtidas com a utilização dos derivados de BTDs.
- As sondas derivadas de BTD apresentam em sua maioria, uma eficiente capacidade de transposição da membrana celular, sendo esta característica uma das principais vantagens deste núcleo em relação a outros núcleos fluorescentes.
- Os derivados deste núcleo não apresentaram alterações de brilho durante os experimentos de imageamento celular.
- As frequências de excitação das BTDs se encontram em uma faixa energia ideal para o trabalho com sondas celulares, uma vez que altas frequências podem causar danos diretos à célula, e frequências próximas ao infravermelho podem causar uma elevação da temperatura celular. A faixa de excitação das BTDs também permite que a autofluorescência celular também seja evitada.

Além destas aplicações, novas BTDs foram sintetizadas e utilizadas em estudos do comportamento de compostos bioativos em meio celular. Um exemplo desta aplicação foi realizado recentemente por Da Cruz com colaboração de nosso grupo de pesquisa,²⁶ sendo sintetizada duas novas moléculas fluorescentes derivadas do núcleo β -lapachona, a BTD-QN e a BTD-FN, Figura 4.

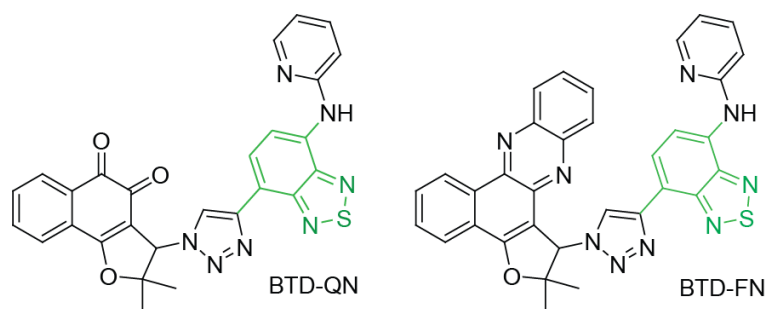


Figura 4. Estruturas moleculares dos derivados de BTD derivados do núcleo β -lapachona. Figura adaptada da referência 26.

As lapachonas são um grupo de moléculas pertencentes a classe das naftoquinonas (quinonas com anel aromático naftalênico). Estas substâncias possuem uma conhecida atividade antitumoral, causada devido a citotoxicidade causada pela unidade quinonoídica. Elas induzem o stress oxidativo intracelular, formando espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) que podem danificar componentes celulares importantes, o que leva a alterações celulares durante sua divisão, induzindo desta maneira à apoptose celular.³⁴ Devido a não fluorescência destas substâncias o estudo de seu mecanismo de ação intracelular é dificultado, não sendo possível localizar as regiões em que estas substâncias atuam no interior celular.

A criação de derivados fluorescentes de β -lapachona apresentou resultados positivos, não havendo interferência do anel BTD na unidade quinonoídica quanto à formação de ROS, nem à transposição da membrana celular por estes derivados. O imageamento celular destas substâncias permitiu uma visualização da localização destas substâncias em meio intracelular, levando a uma compreensão de como estes derivados levam à apoptose celular.

Com inúmeras possibilidades de substituintes para a criação de novas sondas celulares, a síntese racional de novas moléculas torna-se essencial, já que as propriedades fotofísicas de novas estruturas moleculares devem ser ajustadas levando em consideração o momento de dipolo criado pelo arranjo atômico da molécula e também o gap energético existente entre os orbitais HOMO (orbital ocupado de mais alta energia) e LUMO (orbital desocupado de mais baixa energia) desta.³⁰ Dessa forma, na antecipação de propriedades e comportamento da estrutura alvo antes de executar a síntese há

uma grande economia tanto de recursos monetários quanto energéticos isto quando comparado aos métodos tradicionais de tentativas.

Química computacional

A Química Computacional está sendo bastante explorada como uma elegante ferramenta na predição de algumas propriedades bem como características de novas estruturas fluorescentes derivados do núcleo BTB. Esta vertente da Química Quântica, surgiu na década de 60 através da tentativa de grupos de pesquisa em aplicar os métodos Hartree-Fock através de computadores para resolução da equação de Erwin Schrödinger, criada em 1925.³⁵

A investigação teórica das propriedades fotofísicas de novos derivados de BTB vem sendo usado conjuntamente com novas metodologias sintéticas para um design reacional mais eficiente. Um processo racional utilizando a química computacional pode estudar e compreender os efeitos dos substituintes e suas consequências na estrutura e nas propriedades das moléculas.³⁰

O primeiro estudo teórico foi utilizado em dois derivados de BTB, a BTB-Br e a BTB-H,¹⁴ (Figura 4). Este estudo visava não há predição das propriedades fotofísicas dos dois compostos, mas sim, a compreensão dos mecanismos de estabilização destes no estado excitado.

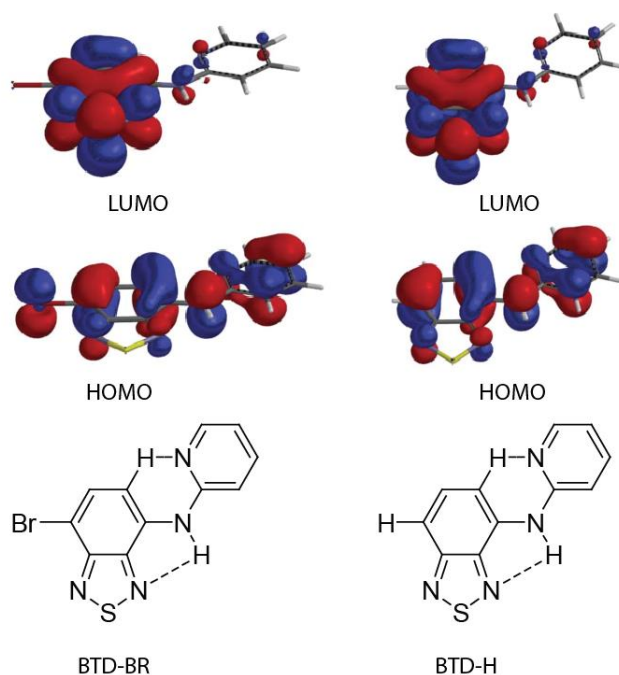


Figura 5. Estruturas dos primeiros derivados de BTD no qual foram realizados estudos teóricos de BTD-Br e BTD-H. Acima, orbitais moleculares (HOMO e LUMO) obtidos em B3LYP/6-311+G(2d,p)/LANL2DZ. Adaptado da referência 14.

Neste estudo, observou-se que a transferência a transferência de prótons no estado excitado (ESIPT, do inglês *excited state intramolecular proton transfer*) e a transferência interna de carga (ICT, do inglês *internal charge transfer*) são os principais mecanismos de estabilização estudados nas BTDs. Estas análises foram feitas por meio da química computacional sendo o ESIPT em um tema ainda discutido na literatura e mostrado recentemente não ser um predominante neste núcleo.¹⁸ Estados excitados mais estáveis levam a grandes deslocamentos de Stokes, evitam que ocorra degradação do fluoróforo e que este não realize o chamado “*self-quenching*”.³⁶

Posteriormente ao estudo de 2007, inúmeros outros trabalhos envolvendo estudos teóricos na síntese e aplicações biológicas de novas moléculas de BTD foram publicados.^{15,17,26,37} Em todos os artigos a química computacional se mostrou extremamente elucidativa para o design e compreensão acerca dos novos derivados deste núcleo.

Desenvolvimento de Novos Fluoróforos

O desafio atual, encontra-se na construção de moléculas fluorescentes que contornem a problemática envolta dos núcleos clássicos no imageamento celular. E tendo em vista estes inconvenientes, atualmente, tem-se desenvolvido de novos fluoróforos a partir da junção de dois ou mais núcleos fluorescentes. Estas novas moléculas buscam conciliar vantagens individuais que cada núcleo possui, sendo observados picos de absorção e emissão em mais de um comprimento de onda e também uma diminuição da energia de excitação destes novos compostos. Estas qualidades são vantajosas para aplicações destes novos derivados em experimentos de imageamento celular.

Um exemplo deste tipo de metodologia foi realizado por Chen e colaboradores³⁸ os quais sintetizaram um composto a partir da fusão de dois fluoróforos, sendo constituído de um núcleo cumarina com diferentes substituições e um núcleo de rodamina, Figura 6, Estas novas moléculas apresentaram um grande deslocamento de Stokes, uma alta fotoestabilidade e uma alto coeficiente de absorvatividade molar. Alguns dos núcleos sintetizados pelo autor foram ainda testados como marcadores celular, mostrando excelentes resultados como: baixa citotoxicidade e alto deslocamento de Stokes com emissões na faixa de cor vermelha.

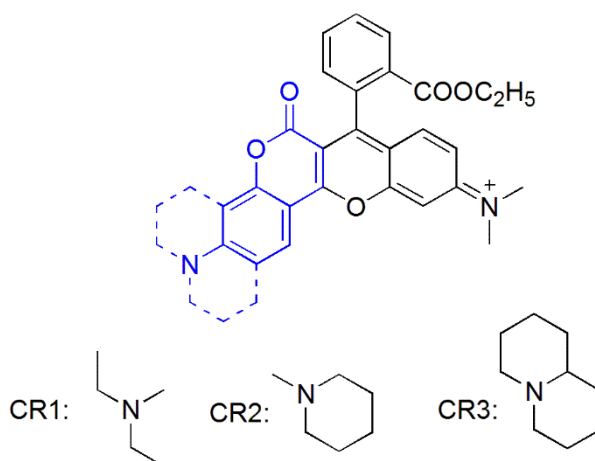


Figura 6. Núcleo fluorescente híbrido derivado dos núcleos cumarina e rodamina. Imagem adaptada da referência 38.

Outros exemplos de núcleos fluorescentes fundidos, como cumarinas-BODYP,³⁹ fluoresceínas-cumarinas⁴⁰, BODIPY-rodamina⁴¹, rodaminas-fluoresceínas⁴² podem ser encontrados na literatura.

No ano de 2014 foi criada a primeira molécula contendo o núcleo BTD e outro núcleo fluorescente, o BODIPY, em uma mesma estrutura, Figura 7.⁴³ Sendo desenvolvida para aplicações em células fotovoltaicas, o sistema “*push-pull-push*” com os tiofenos sendo doadores de densidade eletrônica para os núcleos BTD e BODIPY, mostrou-se eficiente para um aumento da absorvitividade molar desta molécula, porém foi apresentado pela mesma um baixo deslocamento de Stokes, (715 cm^{-1}), não sendo objetivo da pesquisa modular a frequência de emissão da molécula.

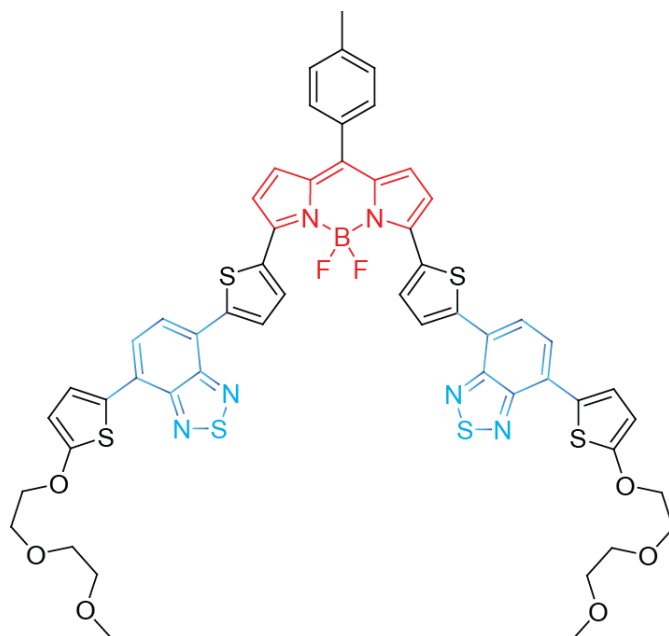


Figura 7. Primeira molécula contendo dois tipos diferentes de núcleos em sua estrutura. O núcleo BODIPY, destacado em vermelho e duas BTDs destacadas em azul.

Objetivos

Gerais

Os objetivos deste trabalho são o planejamento, síntese, caracterização e aplicação de novas moléculas derivadas do núcleo BTD.

Para tanto, optou-se pela criação de novas BTDs através da substituição nas ligações dos carbonos 4 e 7 deste núcleo. A estratégia de escolha dos substituintes tem como base a aplicação de novos compostos fluorescentes em estudos de processos celulares específicos.

Específicos

Objetiva-se sintetizar 5 diferentes moléculas baseados no núcleo BTD, sendo:

1. Uma sonda fluorescente contendo dois núcleos BTDs em sua estrutura;
2. Duas sondas lipofílicas fluorescentes sendo cada sonda fluorescente derivada de um núcleo de BTD monossustituído;
3. Uma sonda contendo dois núcleos fluorescentes, o núcleo BTD e o núcleo cumarina, conjugados em sua estrutura. Sendo parte do design desta sonda baseado em pesquisas já realizadas pelo grupo;
4. Uma sonda contendo os núcleos fluorescentes citados anteriormente em sua estrutura e um substituinte à BTD sensível a ROS.

- As estruturas serão aplicadas em experimentos de imageamento celular, sendo cada substância aplicada em meio celular visando diferentes estudos.

- Os novos derivados de BTD terão suas propriedades fotofísicas estudadas por experimentos de absorção e fluorescência, em diferentes solventes.

- A Química Computacional será utilizada para uma melhor compreensão dos comportamentos fotofísicos das moléculas e de suas propriedades eletrônicas. Busca-se também investigar os possíveis processos de estabilização no estado excitado e a geometria adotada por estas em solução

aquosa. Além disso, serão mapeados os orbitais moleculares dos compostos, bem como a diferença de densidade eletrônica entre estas no estado fundamental e excitado

Capítulo 1

Design de uma sonda fluorescente com dois núcleos BTDs conjugados. a BTDNHBTD

Introdução

A busca por fluoróforos que apresentem uma alta performance em experimentos de imageamento celular (grandes deslocamentos de Stokes, altos valores de absorvatividade molar, transposição a membrana celular e uma marcação seletiva) vem sendo foco de muitos grupos de pesquisa ao redor do mundo.^{6,44} [ENREF 44](#) [ENREF 44](#)

O desenvolvimento de novos marcadores fluorescentes pode ser realizado pela modificação de substituintes em fluoróforos já conhecidos (BODIPYs, cumarinas, cianinas, ...) sendo a fusão de mais de um núcleo fluorescente em uma mesma estrutura molecular uma opção para este tipo de modificação. A vantagem da criação de novos fluoróforos através desta metodologia é que as novas moléculas criadas podem sofrer ajustes finos, existindo inúmeras possibilidades de combinações entre as diferentes classes de fluoróforos.⁴⁵

O design de novas sondas moleculares é uma tarefa bastante desafiadora, uma vez que o fluoróforo deve possuir características estruturais que facilitem marcações celulares específicas em ensaios biológicos bem como algumas qualidades no meio celular. Transposição da membrana celular, baixa citotoxicidade, alta solubilidade em meio aquoso e estabilidade em meios biológicos são exemplos das qualidades buscadas.

Para a criação de novas sondas moleculares devem ser levados em consideração inúmeros princípios, de forma a garantir que esta nova substância apresente marcações celulares específicas, otimizando desta maneira a aplicação destas em ensaios biológicos. Transposição da membrana celular, baixa citotoxicidade, alta solubilidade em meio aquoso e estabilidade em meios biológicos são exemplos de qualidades buscadas em um bom fluoróforo, sendo o design de moléculas que apresentem estas qualidades extremamente desafiador.

Devido ao grande número de compostos fluorescentes existentes e aos diversos estudos destas substâncias em diferentes áreas, algumas propriedades que devem ser levadas em consideração no design e síntese de novas moléculas já são conhecidas. Sistemas eficientes de “*push and pull*” dos elétrons nos fluoróforos faz com que estes sejam estabilizados no estado excitado através do mecanismo de ICT, evitando desta maneira a fotodegradação e perda de fluorescência da molécula quando exposta a fonte de excitação durante experimentos de imageamento celular. Sistemas moleculares que apresentam uma maior rigidez, e preferencialmente uma geometria molecular plana também irão apresentar uma maior estabilidade do estado excitado, sendo muitas vezes estes sistemas compostos por ligações π conjugadas, o que favorece a emissão de fluorescência destes sistemas com um maior caráter batocrômico. O design de moléculas que possuam sítios favoráveis a ocorrência de ESIPT também deve ser buscado, este processo é bastante eficiente na estabilização de estados excitados, sendo discutidos na literatura a existência ou não deste mecanismo em derivados de BTB.¹⁸

Levando em consideração todas as propriedades citadas anteriormente e utilizando a Química Computacional para a previsão das propriedades eletrônicas da molécula planejada sintetizou-se racionalmente uma nova molécula derivada do núcleo BTB.

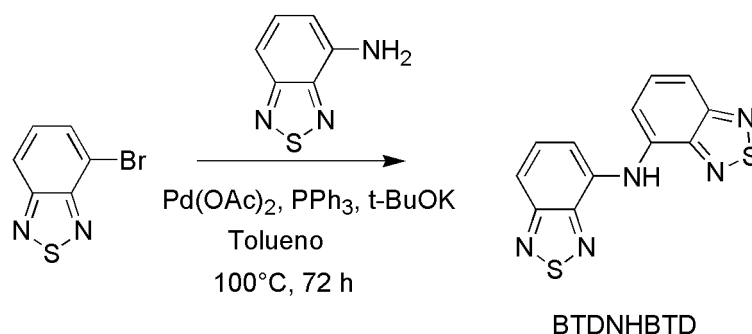
Resultados e discussão

A síntese da BTDNHBTD

A utilização de métodos computacionais, utilizando a DFT para o cálculo das propriedades eletrônicas do novo composto, permitiu a escolha de um produto que pudesse ser facilmente sintetizado através de uma rota sintética direta e simples, existindo na molécula final um conjunto de características favoráveis à sua aplicação em experimentos de imageamento celular.

Para a obtenção da bis-2,1,3-benzotiadiazó-4-il-amina (**BTDNHBTD**) realizou-se de aminação entre de dois derivados de BTB (estes comercialmente

disponíveis), o 4-amino-2,1,3-benzotiadiazola (**BTDNH**) e o do 4-bromo-2,1,3-benzotiadiazola (**BTDBr**), em uma etapa reacional, Esquema 1.



Esquema 1. Síntese da nova sonda fluorescente bis-2,1,3-benzotiadiazolo-4-il-amina contendo dois núcleos BTDs, denominada **BTDNHBT**

Para a síntese deste novo composto foi realizada a aminação através da reação de Buchwald-Hartwig, sendo utilizada uma adaptação da síntese de aminação empregada por Sakurai e colaboradores.⁴⁶ Os detalhes das condições experimentais e os procedimentos de purificação do produto estão descritos mais detalhadamente na parte experimental deste trabalho. A nova molécula sintetizada, bis-2,1,3-benzotiadiazolo-4-il-amina (**BTDNHBT**), apresentou um rendimento de 40% para a reação utilizada.

A **BTDNHBT** apresenta em sua estrutura: ligações π conjugadas sendo sua geometria estrutural plana e rígida, um sistema “*push and pull*” compostos por dois núcleos BTD e um átomo de nitrogênio ligado a estes, o que favorece a estabilização destes sistema por ICT e a possibilidade de realização de ES IPT, existindo dois sítios nucleofílicos próximos a um hidrogênio lábil na estrutura molecular deste composto (existe uma ligação de hidrogênio entre os nitrogênios dos anéis tiadiazola da molécula e o hidrogênio da amina entre as BTDs). Além disso este composto apresentou uma alta estabilidade devido aos substituintes utilizados em sua síntese.

Para a caracterização do produto foram realizados experimentos de ressonância nuclear, difração de raio-X, fotofísicos além dos cálculos computacionais. Por meio, tanto da difração de raio-X quanto da RMN foi possível determinar a conformação espacial adota pela **BTDNHBT**.

Estrutura de raios-X

A polarização causada pelo anel 2,1,3-tiadiazola no sistema molecular, pode muitas vezes levar a formação de estruturas cristalinas bem ordenadas por compostos contendo o núcleo BTD.¹⁹ A **BTDNHBTD** apresentou a formação de cristais bem definidos o que permitiu a análise de sua estrutura através da difração de raios-X. A representação desta molécula pode ser observada na Figura 8.

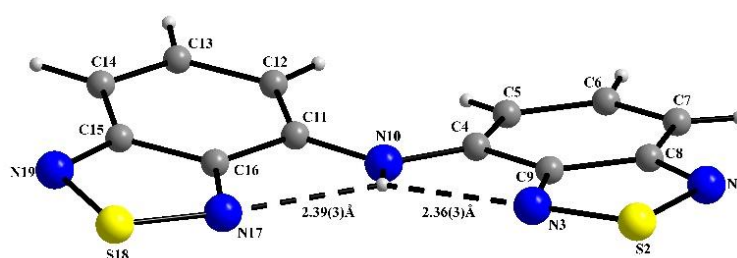


Figura 8. Representação da estrutura molecular da **BTDNHBTD** com suas respectivas marcações cristalográficas.

A Tabela 1 apresenta os dados utilizados para a o refinamento dos dados e dedução da estrutura molecular da análise por difração de raios-X de monocristal para as **BTDNHBTD**.

Tabela 1. Dados obtidos por difração de raios-X e parâmetros refinados para a **BTDNHBTD**

	BTDNHBTD
Fórmula química	C ₁₂ H ₇ N ₅ S ₂
M (g mol ⁻¹)	285.35
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo Espacial	<i>P21/c</i>
Cela unitária	
<i>a</i> (Å)	11.642(7)
<i>b</i> (Å)	14.699(8)
<i>c</i> (Å)	6.942(4)
β	100.918(4)
<i>V</i> (Å ³)	1166.33(12)
<i>Z</i>	4
<i>D_c</i> /g cm ⁻³	1.625
Índices de Varredura	-14 ≤ <i>h</i> ≤ 14 -18 ≤ <i>k</i> ≤ 18 -8 ≤ <i>l</i> ≤ 8
Coefficiente de Absorção /mm ⁻¹	0.447
Correção de Absorção	multi-scan
Max/min transmissão	0.9711 / 0.8646
Reflexões medidas	12085
Reflexões independentes / <i>R</i> _{int}	2398 / 0.0616
Parâmetros refinados	200
<i>R</i> 1 (<i>F</i>) / <i>wR</i> 2	0.0457 / 0.0966
(<i>F</i> ²) (<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>))	
Goof	1.039
Densidade eletrônica residual (eÅ ⁻³)	0.286 and -0.372

Pelos resultados obtidos (Figura 8 e Tabela 1), observa-se que a geometria molecular da **BTDNHBTD**, no estado sólido, apresenta uma estrutura quase plana com o ângulo de diedro da ligação C11-N10-C4 de apenas 26,6°. Vale ressaltar que esta planaridade apresentada era esperada uma vez que durante o design deste fluoróforo havia sido prevista através dos cálculos de DFT.

Outro ponto de destaque na geometria da molécula é a existência de dois sítios de ligações de hidrogênio na molécula, chamada interação de hidrogênio bifurcada⁴⁷ esta ligação do tipo 4 centros 6 elétrons é formada entre os átomos N10-H10...N3 [*d*(N...N) = 2.766(3) Å, ∠(N10H10...N3) = 116(3)°] e N10-H10...N17 [*d*(N...N) = 2.775(3) Å, ∠(N10H10...N17) = 113(3)°]. Como a molécula tem total liberdade para girar ao redor das ligações C11-N10-C4, atribui-se às estas ligações de hidrogênio a causa da baixa angulação do ângulo de diedro entre

estes átomos o que leva a orientação da estrutura a uma geometria planar favorecendo a uma melhor conjugação das duplas ligações no sistema.

As distâncias das interações N10-H10...N3 2,36(3) Å e N10-H10...N17 2,39(3) Å também aumentam a probabilidade de ESIPT por esta molécula, contribuindo ainda mais para uma estabilização do estado excitado.

A orientação do sistema molecular ao longo do eixo “b” pode ser visto na **Figura 9** onde se observam duas colinas de moléculas intercaladas entre si pelo anél de BTD em sua estrutura. As interações intermoleculares dos orbitais π formam um empilhamento de moléculas, π -stacking, a uma distância de 2,530 Å entre os anéis BTDs, estas interações, como já citadas anteriormente favorecem a organização do sistema molecular em compostos contendo anéis BTD, levando à formação de estruturas cristalinas por estas substâncias.^{19,48}

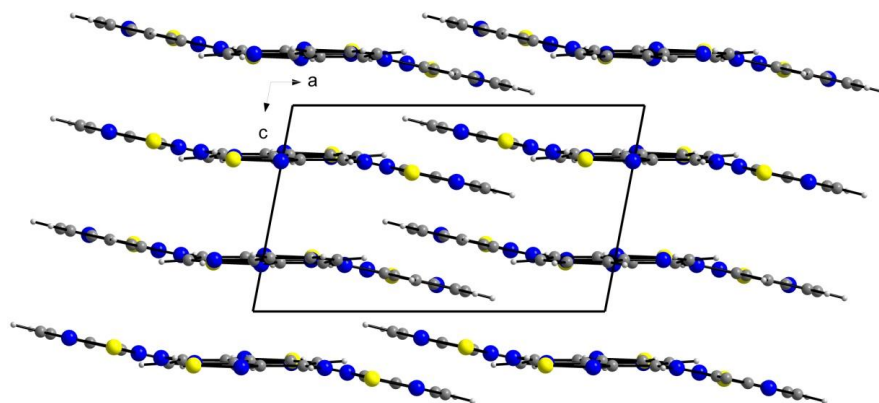


Figura 9. Vista perspectiva ao longo do eixo cristalino b das interações π stacking intermoleculares para a molécula de **BTDNHBTB**

Também foi observado, através dos experimentos de raio-X, as interações intermoleculares existentes no sistema como a interação entre o átomo de enxofre de um anel tiadiazola e o átomo de nitrogênio do anel vizinho, interação S...N 3.114(3) Å, (Figura 10). Este tipo de interação já foi mostrado na literatura,⁴⁸ porém com distâncias menores que as observadas para a **BTDNHBTB**, 3.003(2) Å, e para interações entre o enxofre do núcleo BTD e o nitrogênio presente em uma piridina presente na estrutura do composto. A interação entre ambos os núcleos BTD leva a formação de uma estrutura cristalina em forma de zigue-zague, como a observada para a **BTDNHBTB** ao longo do eixo “c”.

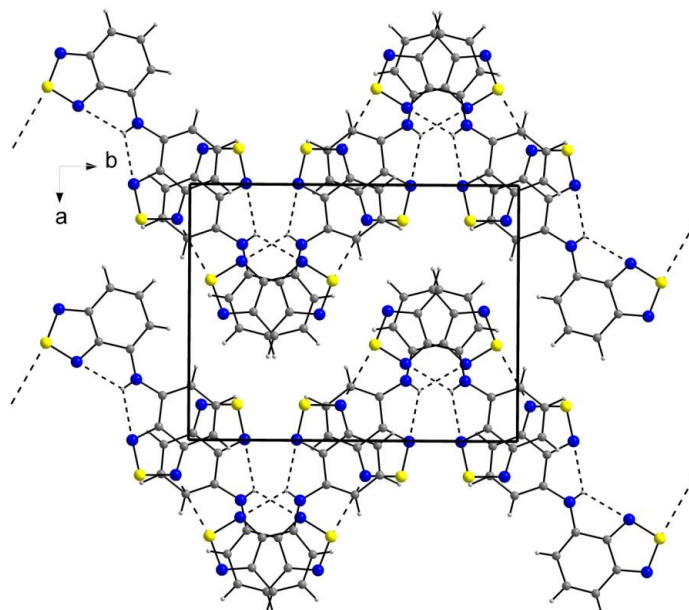


Figura 10. Vista perspectiva ao longo do eixo cristalino c das interações intermoleculares entre S...N para a molécula de **BTDNHBTD**. Observa-se a formação da cadeia em zigue-zague

Análise conformacional por RMN

Para a caracterização da **BTDNHBTD** também foi utilizada a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN). Sendo analisado inicialmente os espectros de ^1H e ^{13}C deste composto em uma solução de CDCl_3 . (Figura 11 e Figura 12)

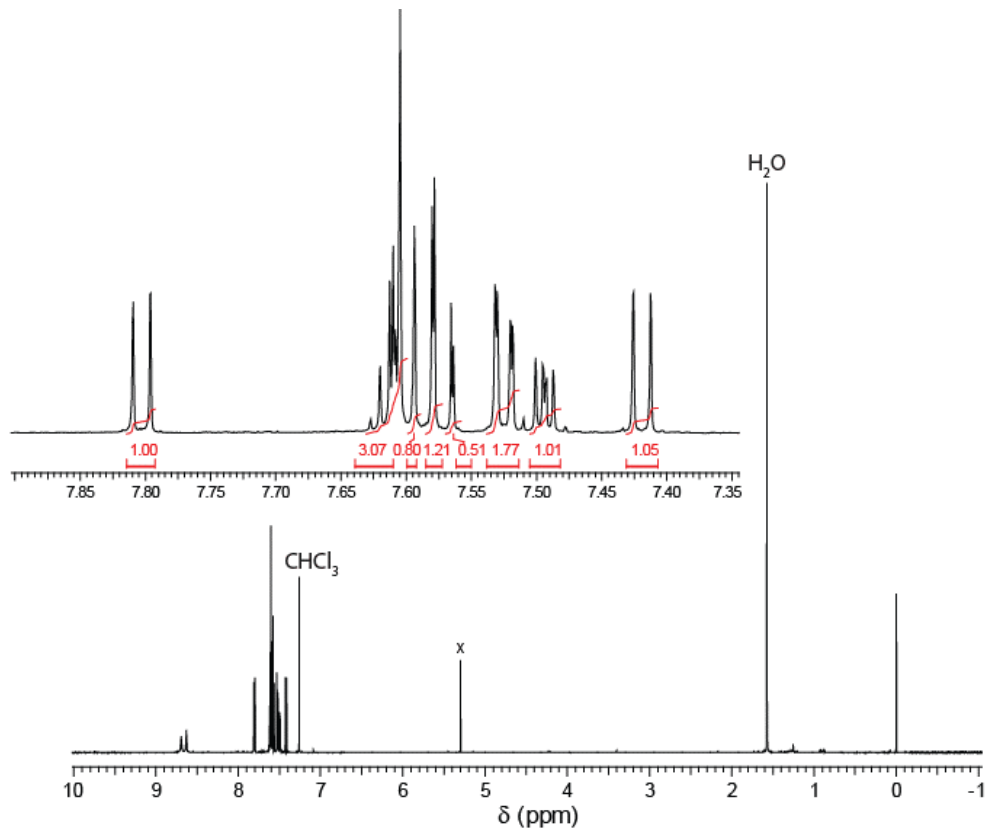


Figura 11. Espectro de ^1H RMN (CDCl_3 , 600 MHz) para a molécula de BTNHBTD.

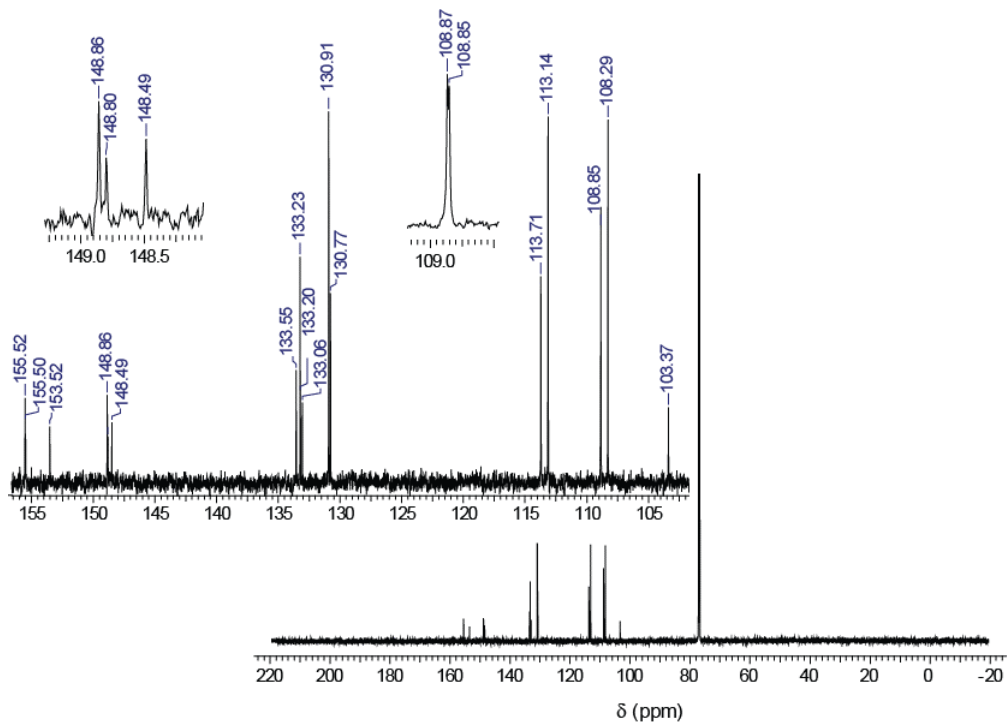


Figura 12. Espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3 , 150 MHz) para a BTNHBTD.

Foi observado através da análise de RMN desta substância que os sinais, no espectro de ^1H e ^{13}C , apresentavam um perfil diferente do esperado para a molécula, com um número de hidrogênios e carbonos superior ao da estrutura proposta para o produto, seriam esperados 3 hidrogênios e 6 carbonos para a molécula de **BTDNHBTB**. A pureza desta substância já havia sido confirmada pela análise de difração de raios-X, não restando dúvida de que todos os sinais dos espectros eram referentes a uma mesma substância.

Observando o espectro de hidrogênio com maior acuidade, o sinal referente ao desdobramento do próton da amina secundária se destacou, por não corresponder ao esperado. E foi mediante a este, que foi proposto a presença de mais de um confôrmero desta substância, em solução. A labilidade deste próton na molécula impossibilita uma integração confiável destes sinais, não sendo possível determinar a proporção relativa entre estes isômeros. Como esperado, não se observa nenhum sinal além dos hidrogênios aromáticos no espectro de ^1H -RMN.

Dessa forma, de acordo com a proposta, haveriam dois isômeros da **BTDNHBTB** em solução, como se pode observar na **Figura 13**. Conformações *syn* e *anti* para a **BTDNHBTB**. A presença destes dois corresponderiam a uma soma total de 09 hidrogênios na molécula. A integração dos hidrogênios no espectro obtido experimentalmente apresenta um valor bastante próximo do esperado (10,42) sendo a imprecisão deste valor atribuída a sobreposição de muitos sinais, principalmente entre 7.55 e 7.65 ppm e também à possibilidade dos isômeros não apresentarem proporções idênticas em solução.

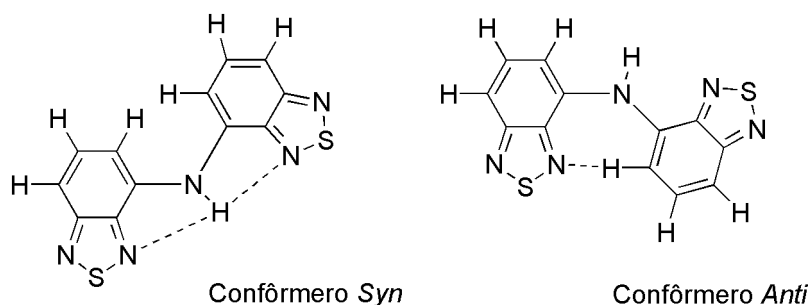


Figura 13. Conformações *syn* e *anti* para a **BTDNHBTB**

Através do espectro de ^{13}C da mesma substância foi observado a presença de 18 carbonos, muito destes bastante sobrepostos, como por

exemplo, pode ser observado nos carbonos referentes aos sinais 108.8(7) e 108.8(5) ppm, (Figura 12). Este número de carbonos confirma a hipótese de existência de dois confôrmeros da molécula em solução sendo levado em consideração a simetria do Confôrmero *syn* (06 carbonos) e a não simetria do Confôrmero *anti* (12 carbonos).

Devido à sobreposição dos sinais dos hidrogênios da molécula, torna-se difícil a atribuição dos sinais destes confôrmeros, sendo necessário desta maneira a realização de outros experimentos de RMN com a molécula de BTDNHBDT em solução

Experimentos de NOESY pela RMN

Para se analisar a interação espacial entre os hidrogênios da molécula foi realizado o experimento de NOESY. Nesta análise, um hidrogênio da molécula sofre excitação em sua frequência específica, sendo a polarização causada por esta excitação passada por acoplamento cruzado para os núcleos que estão próximos a este espacialmente. O resultado é observado pelo espectro através da presença de outros sinais além do próton que sofre a excitação.

Os espectros obtidos pelos experimentos de NOESY podem ser observados na Figura 14, sendo mostrada apenas a região dos hidrogênios aromáticos para uma melhor visualização dos sinais obtidos.

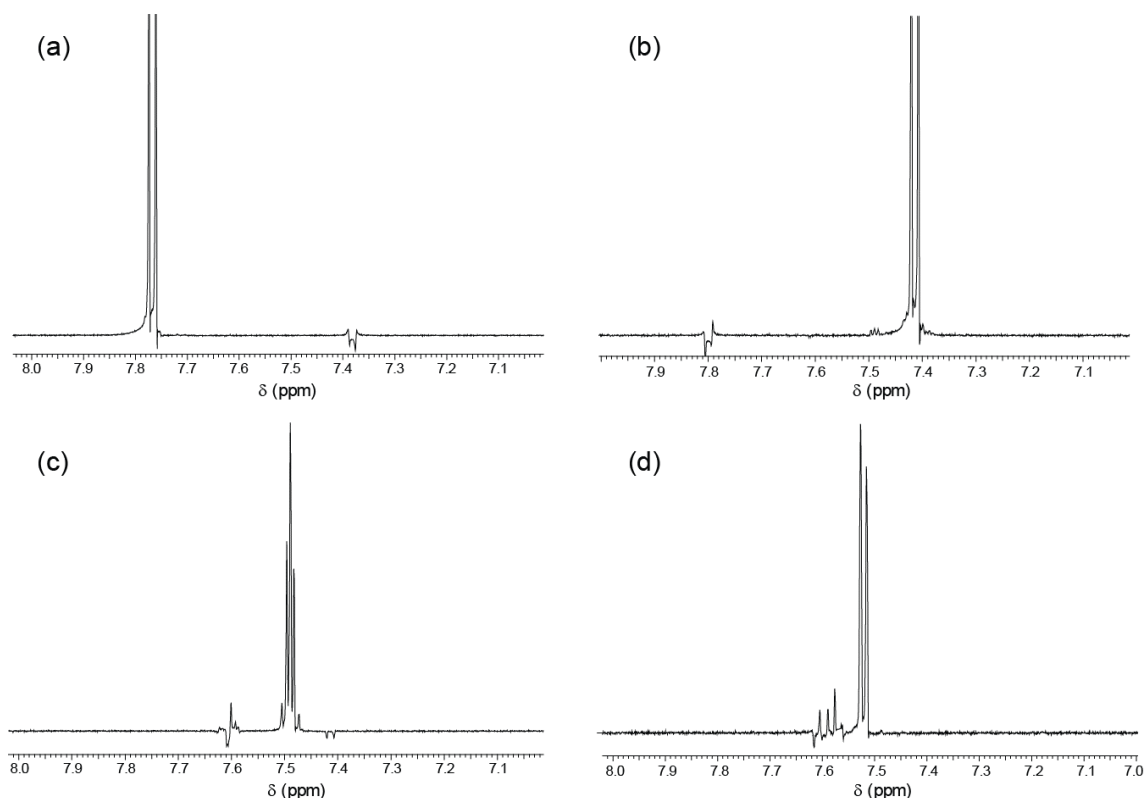


Figura 14. Espectros de NOESY para a molécula de **BTDNHBTD** (a) irradiação em 7,80 ppm, (b) irradiação em 7,48 ppm, (c) irradiação em 7,49 ppm, (d) irradiação em 7,53 ppm.

A irradiação do hidrogênio mais desblindado da molécula, 7,80 ppm, (Figura 14^a), mostra uma resposta do próton localizado em 7,42 ppm, ou seja, na molécula observada, este próton está próximo espacialmente apenas de seu vizinho, o mesmo não ocorrendo com o sinal localizado em 7,42 ppm. Ao ser irradiado, (Figura 14 b), este hidrogênio causa uma pequena perturbação no sinal em 7,49 ppm.

Observando a multiplicidade dos sinais em 7,80 e 7,45 ppm, ambos se apresentam como dupletos, com constantes de acoplamento de 8,1 Hz e 7,7 Hz respectivamente. É possível que estes sinais correspondam aos hidrogênios 8 e 9 do conformero *anti* (Figura 13), com o hidrogênio 7 não ligado ao anel aromático. Considerando esta proposta, não seria possível a observação de nenhum próton espacialmente próximo aos hidrogênios citados, tornando difícil assim a interpretação desta pequena perturbação do hidrogênio em 7. Figura 14 b

A irradiação do sinal em 7.49 ppm, (Figura 14 c) confirma a proximidade espacial entre este hidrogênio e o próton localizado em 7.45 ppm e também mostra uma proximidade com o hidrogênio localizado em 7.60 ppm, o sinal mais intenso da região dos aromáticos. O sinal de 7.49 ppm pode ser considerado como um tripleto mal resolvido, (Figura 15), possuindo as constantes de acoplamento ($J = 4.82$ e 3.46 Hz).

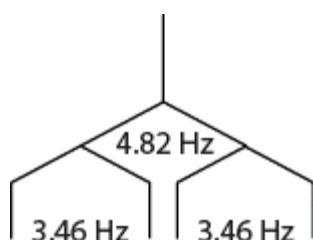


Figura 15. Diagrama de Pascal para um acoplamento com dois hidrogênios não homogêneos.

Existem duas constantes de acoplamento com valores próximos das observadas para este sinal de hidrogênio, estas se encontram nos sinais localizados em 7.61ppm. As constantes, que podem ser observadas na **Figura 16**, possuem os valores de 4.80 e 3.40 Hz.

O último sinal irradiado no experimento de OESY foi o sinal em 7.53 ppm, (Figura 14 d). A irradiação deste próton gerou respostas no hidrogênio em 7.57 ppm e nos hidrogênios na região próxima a 7.60 ppm. Este hidrogênio, possui um sinal de acoplamento com o hidrogênio em 7.57 ppm, apresentando um sinal pequeno de acoplamento, 1.10 Hz, sendo um valor bastante baixo para acoplamentos maiores que J_4 .⁴⁹

Através dos experimentos realizados, o que se observa na **BTDNHBTD** em solução são acoplamentos não homogêneos entre hidrogênios de acoplamento direto, J_3 , e alguns valores de acoplamento abaixo dos esperados para hidrogênios próximos, como os valores encontrados no sinal de 7.49 ppm.

Os experimentos de NOESY permitiram que fossem atribuídas as constantes de acoplamento para os sinais dos hidrogênios da molécula, (Figura 16). Estas constantes explicam o fato de não serem observados tripletos no espectro da **BTDNHBTD**.

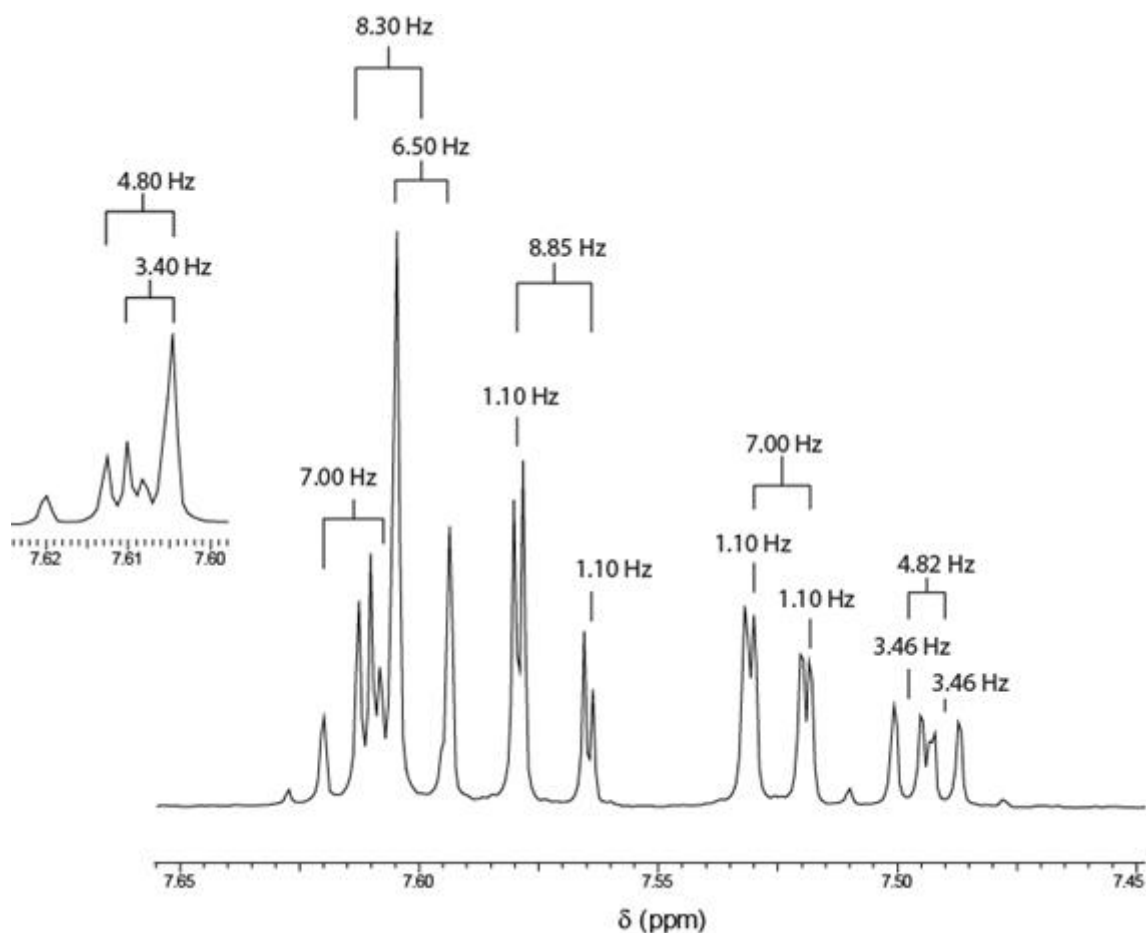


Figura 16. Região aromática do espectro de ^1H RMN da molécula de **BTDNHBTD**. Neste são mostrados os valores das constantes de acoplamento em Hz

Apesar da complexidade dos espectros obtidos, estes confirmam a estrutura do composto sintetizado, sendo necessárias posteriores análises para o assinalamento de cada hidrogênio correspondente a estes confôrmeros.

Análise conformacional x tempo de preparo

Devido a existência destes confôrmeros em solução cogitou-se a possibilidade de haver uma conversão após determinado intervalo de tempo do confôrmero menos estável da **BTDNHBTD** no confôrmero mais estável. Para corroborar esta hipótese, foram realizados estudos do comportamento da molécula em solução por tempo, onde seria possível se observar alguma variação nos padrões dos sinais da molécula. Para a realização deste estudo, foram obtidos espectros da mesma amostra em solução de CDCl_3 , alterando apenas o tempo em que fora analisada. A mesma amostra foi analisada em dois

diferentes intervalos de tempo, 48 e 120 horas (2 e 5 dias), Figura 17. Espectros de ^1H RMN da **BTDNHBTB** mantida em solução durante períodos variados de tempo.

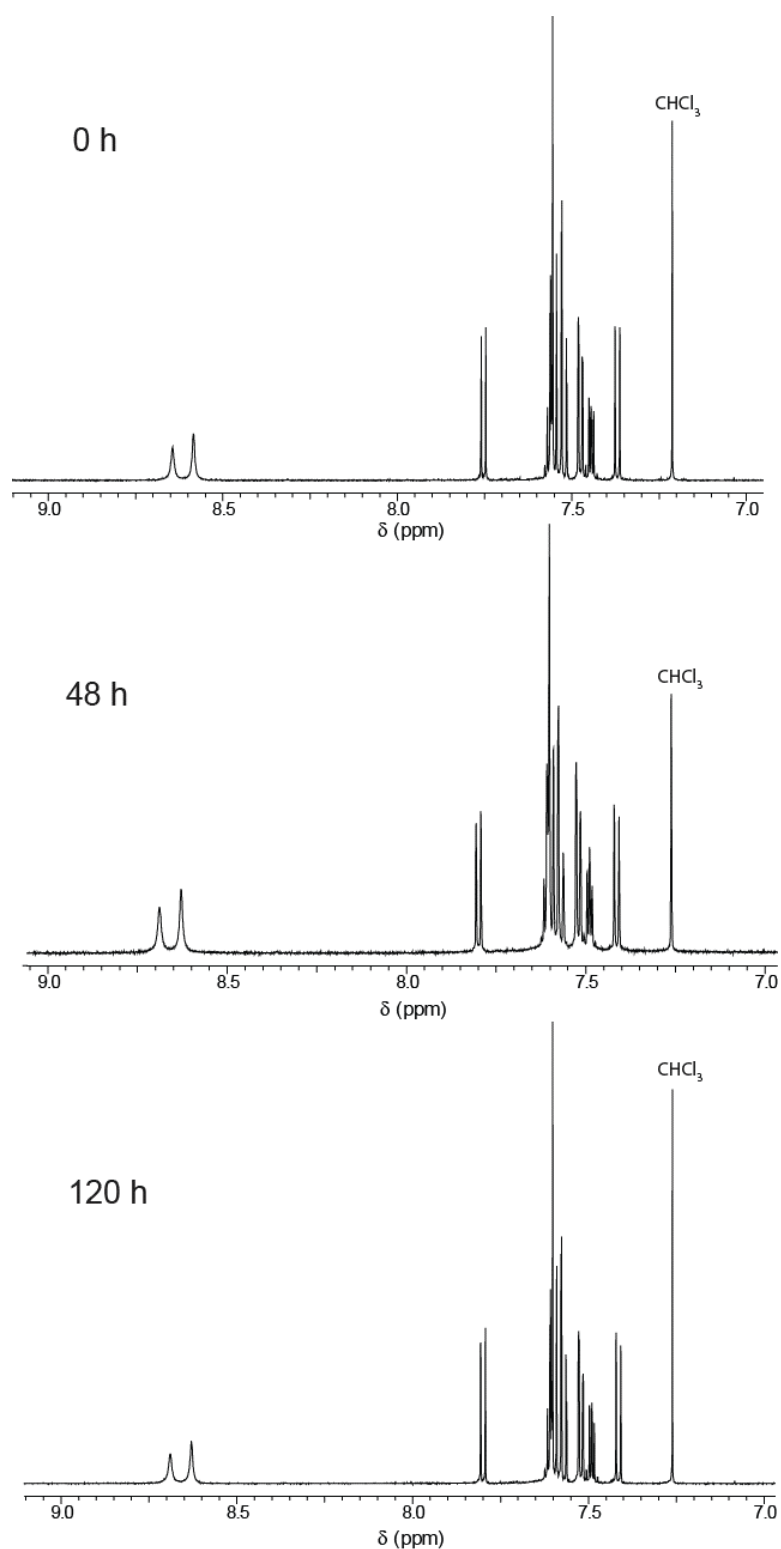


Figura 17. Espectros de ^1H RMN da **BTDNHBTB** mantida em solução durante períodos variados de tempo.

Os espectros obtidos da **BTDNHBTD**, que ficou em solução de CDCl_3 durante 48 e 120 horas, não apresentaram nenhum sinal em regiões diferentes daqueles que haviam sido previamente observados para esta amostra recém preparada. Os sinais referentes ao hidrogênio da amina secundária da molécula também apresentaram o mesmo padrão de intensidade e desdobramento. Desta maneira, mesmo após um grande intervalo de tempo de preparo, a **BTDNHBTD** em solução ainda apresentou ambos os confômeros em solução. Os mesmos padrões de acoplamento e intensidade entre os hidrogênios aromáticos também foram observados. Não havendo desta maneira uma variação significativa entre a proporção dos isômeros em solução.

Existe desta maneira, uma proporção bastante estável entre estes confômeros, o que faz com que esta não seja alterada mesmo após longos tempos em solução. A não existência do confômero *anti* quando a **BTDNHBTD** se encontra cristalizada indica que a barreira energética de conversão destas estruturas não é tão alta, sendo ultrapassada pela energia liberada com a diminuição da entropia do sistema durante o processo de cristalização. Este estudo também mostrou a estabilidade desta substância quando solvatada, não sendo observado nenhum sinal que indicasse a ocorrência de degradação do composto.

Para uma melhor compreensão do comportamento do composto em solução, foi investigado através do RMN a amostra em outros dois solventes, dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol (MeOD).

Análise conformacional x variação de solvente

Vale destacar que durante os experimentos a variação dos solventes as concentrações de **BTDNHBTD** variaram de acordo com sua solubilidade nos solventes utilizados. Outro ponto a ser destacado é que em todas as análises foi usado o mesmo produto (oriundo de uma única síntese), não havendo assim erros de análise devido a variação do lote da substância.

Metanol – d4

Em metanol deuterado, CD₃OD, esta substância apresentou uma baixa solubilidade. Para o preparo da amostra foram adicionados 0,5 ml do solvente em 0,08 g da amostra, a mistura foi agitada e a solução de MEOD saturada com **BTDNHBTD** filtrada para um tubo de RMN. Foi diluída uma quantidade menor que 0,002 g do composto para este solvente.

O espectro da **BTDNHBTD** em CD₃OD pode ser observado na Figura 18.

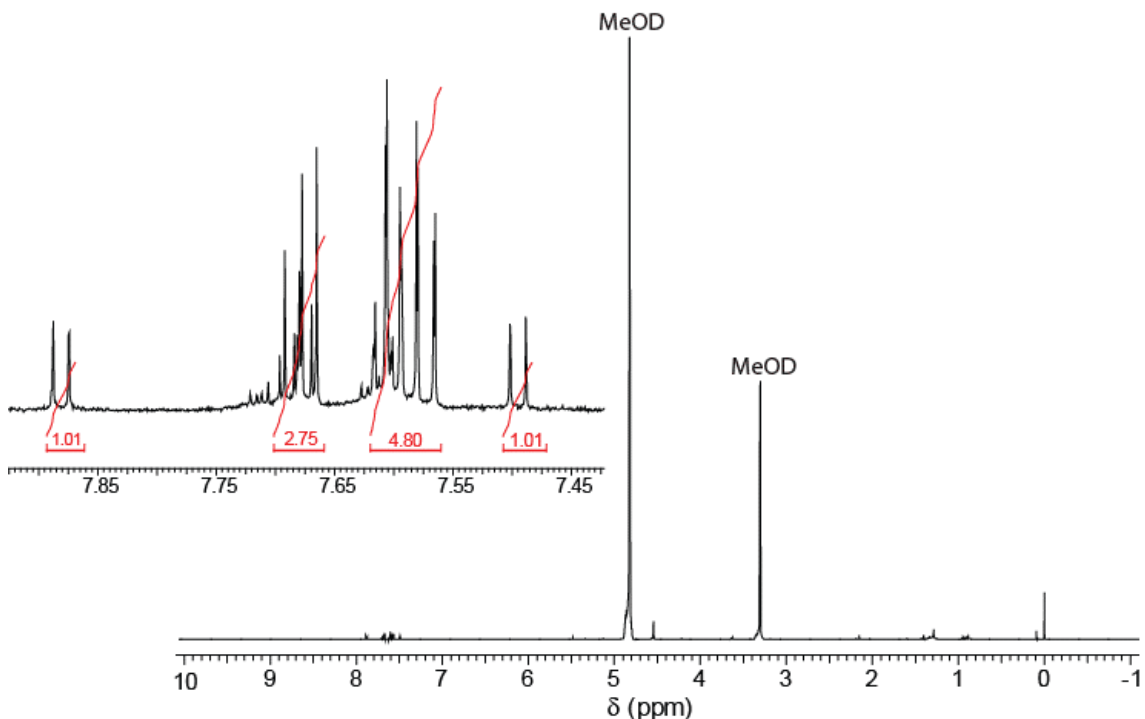


Figura 18. Espectro de ¹H-RMN da molécula de **BTDNHBTD** em CD₃OD.

Devido a concentração da substância em solução, não foi possível observar os sinais desta molécula no experimento de ¹³C, mesmo com um grande tempo de máquina utilizado para a aquisição deste espectro.

Não se observa no espectro de metanol, os sinais referentes ao hidrogênio da amina presente no composto, ocorrendo isto devido a troca deste próton pelo átomo de deutério presente no solvente. Os sinais aromáticos da molécula apresentaram uma integração próximo de dez hidrogênios (9,57) em solução de MeOD, o que mostra que neste solvente também se observa a existência de mais de um confômero da molécula.

Ocorre uma mudança no perfil dos acoplamentos dos hidrogênios da molécula localizados entre 7.75 e 7.55 ppm. Os sinais localizados em 7.88 e 7.49

ppm foram os únicos a apresentar o mesmo padrão de acoplamento que o observado para a molécula em CDCl_3 , (dupletos- 8,1 Hz). Além disso todos os sinais sofreram um deslocamento para campos mais baixos neste solvente, por volta de 0.08 ppm.

DMSO-d6

O mesmo procedimento experimental realizado para o preparo da amostra em MeOD foi utilizado para a substância em dimetilsulfóxido, DMSO. Foram colocados 0,5 ml do solvente em um balão contendo 0,07 g da amostra e a solução resultante (saturada com **BTDNHBTD**) foi filtrada, para a retirada do sobrenadante, e colocada em um tubo de RMN para análise. Ao se realizar este procedimento, foram solubilizados 0,01 g da **BTDNHBTD** pelo DMSO.

Os espectros de ^1H e ^{13}C da molécula neste solvente podem ser observados na Figura 19 e Figura 20.

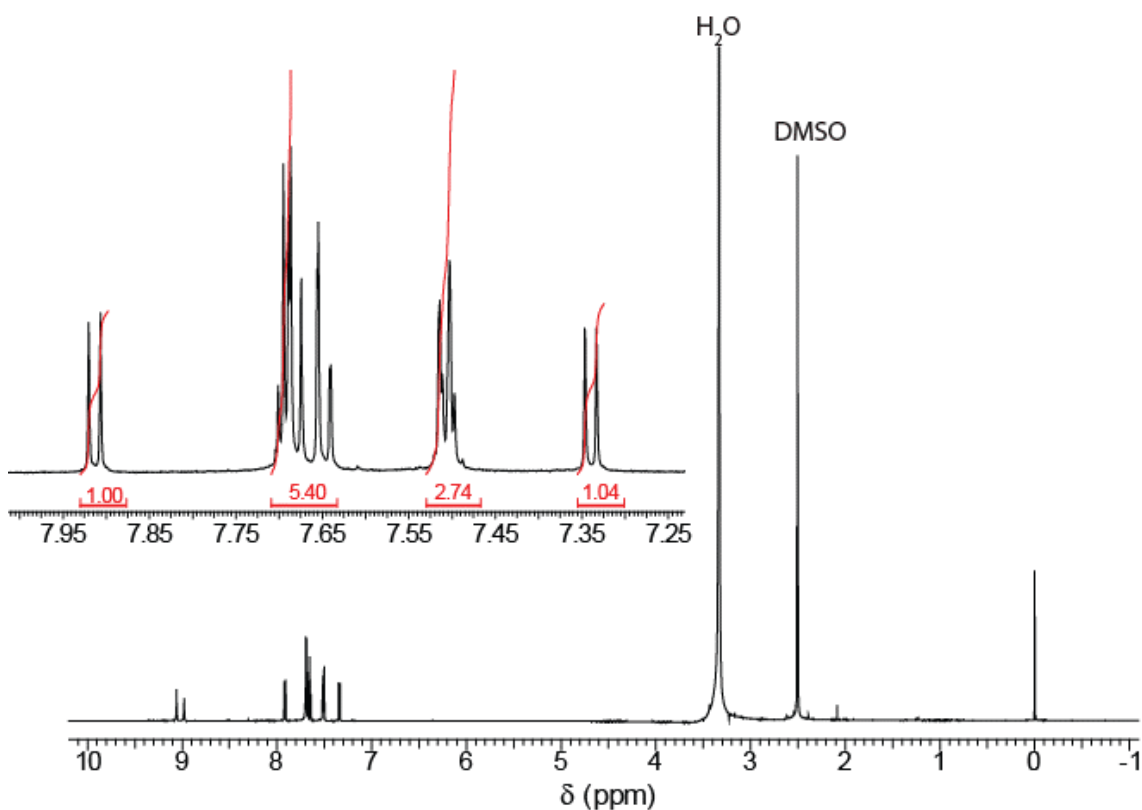


Figura 19. Espectro de ^1H -RMN da molécula de **BTDNHBTD** em DMSO.

Os sinais dos hidrogênios da molécula podem ser observados apenas na região entre 7.00 e 10.00 ppm indicando não haver problemas de degradação desta substância com a variação do solvente.

Diferente do espectro adquirido em MeOD, são observados em DMSO os sinais referentes ao hidrogênio da amina da molécula, 9.06 e 8.98 ppm. Assim como em CDCl₃, existem dois sinais referentes a este próton, portanto em DMSO também é observada a existência de dois confôrmeros em solução, o que é confirmado pelos valores das integrais dos hidrogênios aromáticos, mostrando novamente a existência de aproximadamente nove hidrogênios (10,14) nesta região;

O perfil dos acoplamentos destes hidrogênios, Figura 19, também é diferente do observado para a molécula nos solventes anteriores, com exceção para os sinais em 7.91 e 7.34 ppm (d, 8,07Hz). Estes sinais apareceram em todos os solventes com a mesma constante de acoplamento, variando apenas o campo

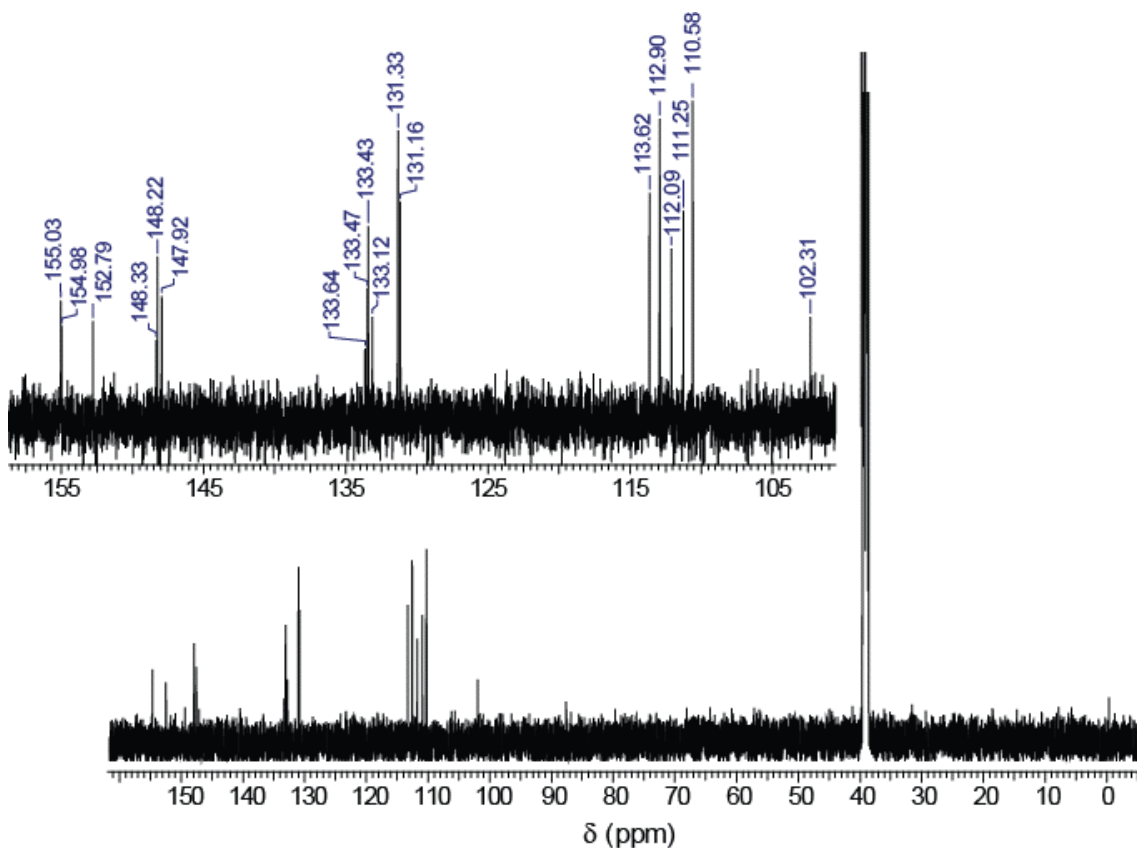


Figura 20. Espectro de ¹³C RMN da molécula de BTDNHBTD em DMSO.

Pode-se observar a presença de 18 sinais de carbono no espectro da molécula, a mesma quantidade observada em CDCl_3 , o que confirma a presença de dois isômeros da molécula em solução de DMSO.

O estudo de variação do solvente mostrou que mesmo quando a polaridade do solvente e o tipo de interação solvente/molécula são alterados, se observa a presença de ambos os isômeros em solução. Este resultado mostra que a conversão do isômero *syn* em um isômero *anti* possui uma barreira energética baixa suficiente para que a variação do solvente não seja suficiente para impedir a rotação da ligação, o que torna um isômero “cis” em um “trans” ou vice-versa, esta barreira, como já citada é ultrapassada durante o processo de cristalização, onde todo o confômero *anti* é convertido em *syn*.

A orientação causada pelas interações intermoleculares entre os anéis BTD e a ligação de hidrogênio na molécula favorecem à configuração molecular *syn* desta substância, observada no estado sólido, porém quando em solução algumas destas interações deixam de existir, a interação entre o átomo de enxofre de um anel tiadiazola e o átomo de nitrogênio do anel vizinho $\text{S}\cdots\text{N} 3.114(3) \text{ \AA}$ é um exemplo, o que faz com que exista um equilíbrio entre ambos os confômeros. O processo de cristalização faz com que o equilíbrio *syn/anti* seja deslocado para a conformação *syn*, uma vez que sua cristalização diminui o equilíbrio deste confômero em solução, levando a conversão do *anti* em *syn*, seguindo o princípio de Le Chatelier.

Devido aos resultados obtidos através da técnica de RMN, realizou-se um estudo das configurações eletrônicas e das barreiras energéticas envolvidas em ambos os confômeros. Estes estudos foram realizados teoricamente, sendo apresentado nesta parte do trabalho as geometrias previstas antes da síntese do novo composto e também os mecanismos de estabilização do estado excitado para esta molécula, além das barreiras de conversão entre estes confômeros.

Estudos computacionais

Os cálculos computacionais com a molécula de **BTDNHBTD** foram realizados com o intuito de estudar as configurações eletrônicas e as energias envolvidas na conformação *syn* e *anti* da molécula. O tratamento teórico para

estes confôrmeros foram realizados através da teoria do funcional de densidade (DFT) através do programa Gaussian 09.⁵⁰ A otimização da geometria molecular foi realizada através de uma função de base 6-311G(d) Pople's Split valence. Esta função de base, recebe este nome por ter sido criada pelo grupo de pesquisa de John Pople, Nobel de Química de 1998 e por dividir os elétrons da molécula em internos, chamados elétrons de caroço, e de valência, sendo estes últimos tratados com um maior número funções durante a execução dos cálculos computacionais. Na função de base supracitada, por exemplo, é utilizada uma equação resultante da combinação de seis gaussianas para os elétrons de caroço enquanto os elétrons de valência representados por três funções (funções em que os elétrons de valência são tratados desta maneira são chamadas *triple-zeta*, existem também as *funções double-zeta* em que estes elétrons são representados por duas gaussianas e a *single-zeta* onde apenas uma gaussianas é utilizada nos elétrons de valência), uma formada pela combinação de três gaussianas e outras duas representadas por uma gaussianas cada. O "d" apresentado na função de base se refere a uma função de polarização, para que sejam considerados durante os cálculos os orbitais "d" dos átomos, mesmo estes não estando ocupados, sendo muitas vezes representado também por um asterisco no lugar da letra, por exemplo: 6-311G*.

O funcional de cálculo utilizado para a otimização da geometria foi o CAM-B3LYP,⁵¹ um funcional híbrido derivado do B3LYP (Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr) com uma modificação realizada por Handy e colaboradores, em que é incorporada uma atenuação coulombica através da adição de mais parâmetros ao método (*Coulomb-attenuating method-CAM*), causando uma maior flexibilidade ao funcional e permitindo cálculos de maior acurácia em processos de transferência de carga mais fortes na molécula. Para a confirmação de que a geometria encontrada para os confôrmeros *syn* e *anti* eram mínimos globais foram observadas as frequências harmônicas das geometrias obtidas, não havendo frequências negativas para tais. Tanto o estado fundamental (S_0) quanto o estado excitado (S_1) foram calculados para ambos os confôrmeros.

O cálculo de single point para as geometrias dos confôrmeros no estado S_0 , foi realizado através de uma vertente do método DFT⁵² porém dependente do tempo, a TD-DFT (*time dependent density functional theory*), criada em 1984

por Runge e colaboradores,⁵³ já sendo relatado na literatura uma melhora de resultados para estudos fotofísicos de BTDs utilizando métodos baseados nesta vertente.¹⁸ O funcional utilizado para o cálculo de *single-point* da molécula foi o PBE1PBE/ 6-311+G(2d,p). Este surgiu a partir da modificação de um funcional já estabelecido criado por Perdew, Burke e Ernzerhof, o PBE,⁵⁴ sendo este expandido por Adamo⁵⁵ e tornando-se assim um híbrido que leva em consideração não apenas a troca eletrônica em um sistema mas também a correlação eletrônica deste (75% correlação e 25% troca). Este funcional também é conhecido como PBE0. A função de base utilizada é uma função do tipo Pople's Split valence, triple-zeta, sendo a mesma utilizada durante a otimização da geometria, porém incorporado se a esta.

- Uma função difusa para os átomos que não o hidrogênio, representada pelo sinal "+". Esta função contém pequenos expoentes que decaem lentamente com a distância do núcleo e são utilizados quando se quer levar em consideração interações fracas e propriedades como momento de dipolo e polarização da molécula.
- Duas funções de polarização, "2d,p", utilizadas quando se quer levar em consideração as assimetrias nestes orbitais causadas pela distorção de um terceiro átomo ao ambiente eletrônico. O termo "2d" implica a existência de duas funções de polarização para os orbitais "d", nesta função de base e o termo "p" que a polarização também será considerada para os átomos leves, como hidrogênio e hélio.

Se escolheu este funcional para os cálculos das energias da molécula de **BTDNHBTD** por este apresentar bons resultados em estudos anteriores para previsão de comportamentos fotofísicos, inclusive para moléculas derivadas do núcleo BTD.^{26,30,37,56}

Tendo em vista o estudo conformacional da molécula de **BTDNHBTD** *syn* e *anti*, Figura 13, foram realizados dois processos de otimização da geometria molecular, um para cada conformação prevista. Para estes cálculos a geometria inicial foi ajustada de modo a se alcançar um mínimo para cada conformação. Estas geometrias foram otimizadas com a molécula no estado gasoso.

A Figura 21 apresenta a geometria molecular encontrada para cada confôrmero, bem como os orbitais moleculares HOMO e LUMO destes. Existe

uma maior planaridade na conformação *syn* devido a esta conformação possuir dois sítios de ligação de hidrogênio, como já discutido durante as análises de raios-X. A geometria *syn* se mostrou bastante semelhante à geometria obtida experimentalmente. No confômero *anti* se observa um alinhamento de um anel BTD com a ligação N-H, o que é esperado devido a ligação e hidrogênio entre a amina que está entre ambos os anéis e o nitrogênio deste núcleo. Neste confômero, porém não é observada a mesma planaridade molecular observada no confômero *syn*.

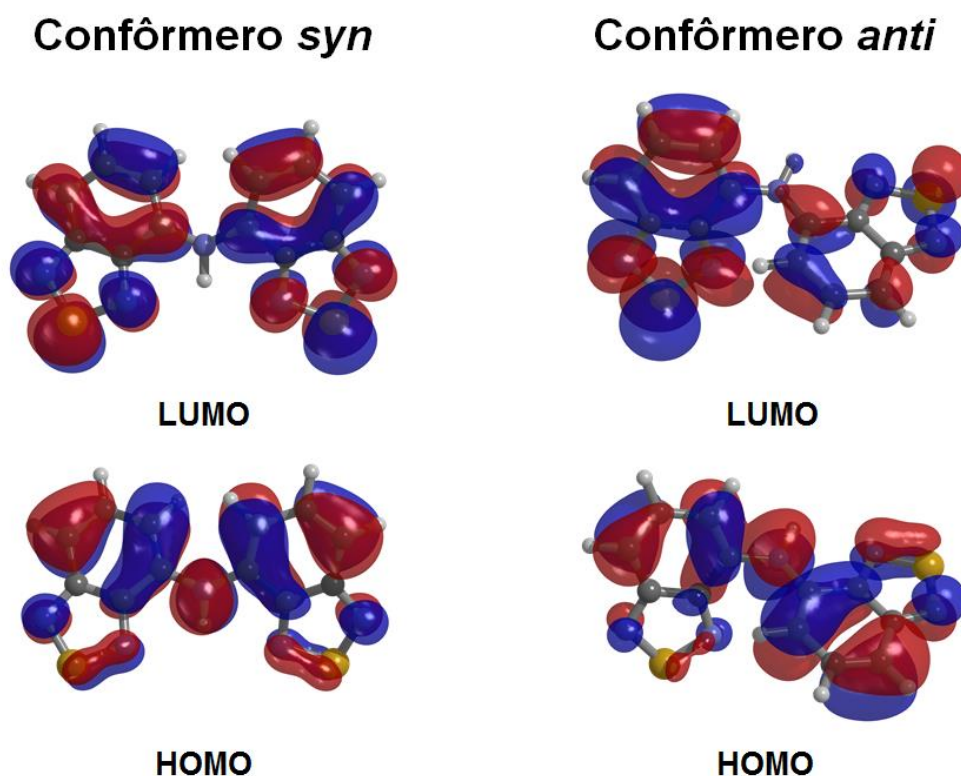


Figura 21. Estruturas otimizadas com orbitais HOMO e LUMO na fase Gasosa. Cálculos realizados com nível PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-31+g(d).

Os orbitais moleculares HOMO e LUMO para o confômero *syn* apresentam-se bastante distribuídos e simétricos em ambos os núcleos BTDs da molécula. Há no orbital HOMO deste confômero uma maior concentração de carga nos anéis aromáticos e na amina que liga estes anéis, o que é esperado pois este é um sistema conjugado e a densidade eletrônica se encontra maior nesta região da molécula. Como o anel 2,1,3-tiadiazola é um aceptor de elétrons,

existe nesta parte da molécula, principalmente no átomo de enxofre uma maior porção da densidade do orbital LUMO havendo pouca participação do nitrogênio da amina neste orbital.

No confôrmero *anti* não é observada uma simetria orbitalar na molécula, existindo uma maior densidade no orbital HOMO do núcleo BTD que realiza a ligação de hidrogênio com a amina do sistema, havendo uma parte considerável deste orbital no anel 2,1,3-tiadiazola deste núcleo. No núcleo onde não é realizada a ligação de hidrogênio a densidade deste orbital é reduzida, isto ocorre pois há uma interação eletrônica favorável com um maior alinhamento dos orbitais π presentes na molécula. Ao contrário do orbital HOMO, o orbital LUMO deste confôrmero apresenta uma maior densidade eletrônica no núcleo onde não há ligação de hidrogênio, sendo este orbital bastante distribuído neste núcleo. A perda da planaridade na geometria molecular faz com que um núcleo BTD não apresente uma conjugação tão eficiente, adquirindo um maior caráter acceptor de elétrons e desta maneira favorecendo a processo de estabilização por processos de ICT.

O processo de estabilização do estado excitado pode ser melhor compreendido através do estudo da diferença de densidade eletrônica ($\Delta\rho$) do estado S_0 e S_1 nestes confôrmeros, Figura 22.

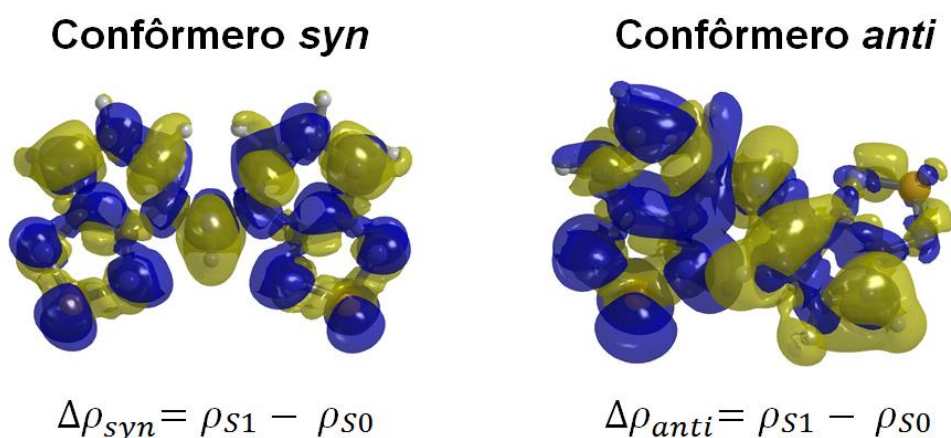


Figura 22. Diferença de densidade eletrônica calculada para ambos os confôrmeros em fase gasosa.

A diferença de densidade eletrônica observada mostra a existência no confôrmero *syn*, assim como observado nos orbitais moleculares, de uma

simetria na variação da densidade eletrônica deste. Há uma diminuição de densidade eletrônica do nitrogênio da amina entre ambos os núcleos (observado pela superfície amarela neste átomo) e um aumento desta densidade no anel 2,1,3-tiadiazola (observado pela superfície azul na molécula), isto evidencia a capacidade desta molécula em realizar processos de ICT, sendo este processo de estabilização confirmado posteriormente durante os estudos fotofísicos experimentais da molécula.

No confôrmero *anti* existe um maior deslocamento de densidade eletrônica pela molécula (observa-se na molécula regiões distintas de superfícies azuis e amarelas), há um aumento de densidade eletrônica no núcleo BTD em que não ocorre a ligação de hidrogênio e uma diminuição desta no núcleo em que esta interação existe. Observa-se pouca participação do anel 2,1,3-tiadiazola em que é há a ligação de hidrogênio, ocorrendo, assim, uma perda de densidade eletrônica nos nitrogênios do anel, ao contrário dos nitrogênios do núcleo BTD onde não existiu uma interação com a amina, pois nestes tem-se um grande aumento da densidade eletrônica.

Os cálculos das energias, orbitais e diferença de densidade eletrônica nestes confôrmeros também foram estudados levando-se em consideração os efeitos de solvatação. Como foi levado em consideração a aplicação em meio celular, o solvente escolhido para este estudo foi a água. Dessa forma, para incluir os efeitos de solvatação no meio foi utilizado o modelo *self-consistent reaction field (SCRF)*, no qual os efeitos de polarização produzidos por um solvente a um soluto são representados por uma constante dielétrica, a execução deste foi realizada através do chamado “*Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model*” (IEFPCM), um modelo contínuo implícito de solvatação onde o solvente é considerado como um “contínuo polarizável” e não como moléculas individuais.⁵⁷

Os funcionais bem como as funções de base usadas na otimização da geometria e nos cálculos de energia molecular foram os mesmos utilizados para a molécula no estado gasoso. Não houve grande diferença para os resultados obtidos neste cálculo, sendo, assim, bastante semelhante aos encontrados para a molécula no estado gasoso, como observado na, Figura 23.

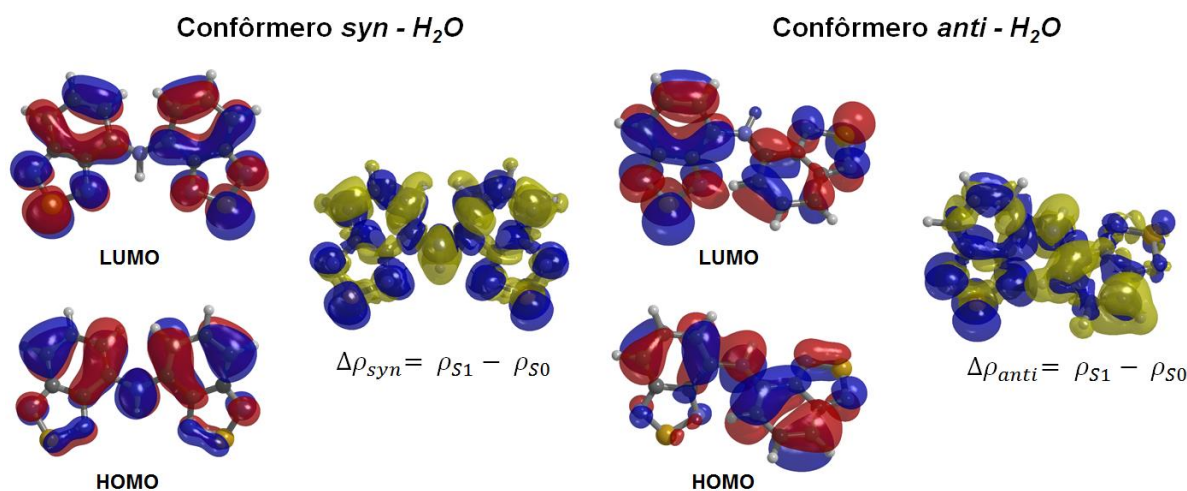


Figura 23. Estruturas otimizadas para ambos os confôrmeros em água com plot dos orbitais HOMO, LUMO e as diferenças de densidade eletrônica. O Cálculos realizados com nível PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-31+g(d).

Para a molécula **BTDNHBTD** em sua conformação *syn* é observada a simetria entre os orbitais HOMO e LUMO, sendo encontrada uma maior densidade HOMO nos anéis benzênicos dos núcleos BTD e uma maior densidade LUMO no anél 2,1,3-tiadiazola. Na diferença de densidade eletrônica, neste confôrmero, existe uma perda de densidade eletrônica no nitrogênio entre os núcleos BTDs, bem como um aumento desta densidade nos átomos de enxofre da molécula.

Na conformação *anti* a simetria entre os orbitais é quebrada devido a ligação de hidrogênio ocorrer em apenas um núcleo BTD, existindo, dessa forma, uma maior presença do orbital HOMO no núcleo da molécula devido esta interação, também é observado uma maior perda de densidade eletrônica nesta região com a passagem da molécula para o estado excitado. No núcleo onde não há ligação de hidrogênio existe uma maior densidade orbitalar LUMO bem como um aumento da densidade eletrônica nesta região com a passagem da molécula para o estado excitado.

Através dos cálculos de *single-point* foi possível construir um diagrama de energia dos orbitais moleculares de ambos os confôrmeros e simular, através das energias de excitação obtidas pelo cálculo, um perfil do espectro de

absorção destas moléculas. Estes resultados serão posteriormente comparados com dados obtidos experimentalmente (Figura 24).

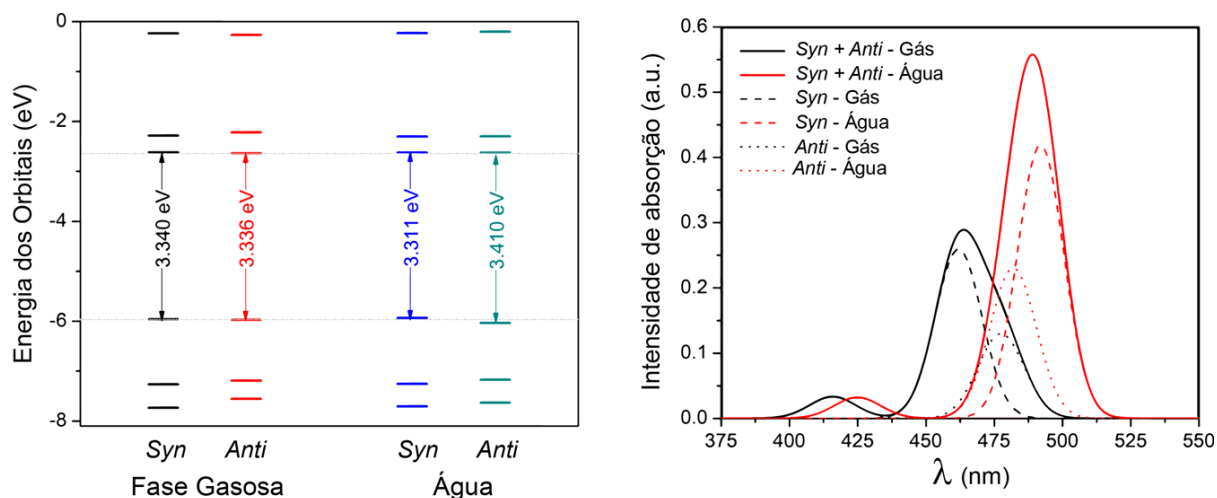


Figura 24. Direita- Diagrama de energia dos orbitais moleculares para ambos os confômeros em fase gasosa e solvatados. Esquerda. Espectro UV-Vis teórico para ambos os conformeros separados e em mistura racêmica.

Os orbitais HOMO/LUMO dos confômeros sofrem variações diferentes de energia quando em fase gasosa e solvatadas. É observado no confômero *syn* uma redução da energia com a solvatação da molécula, $3,311 - 3,340 = -0,029$ eV, sendo assim, o confômero é desestabilizado, enquanto no confômero *anti*, o que se observa é um aumento de energia $3,410 - 3,336 = 0,074$ eV. A solvatação faz com que o confômero *anti* seja estabilizado, o que pode ser notado na Figura X através de uma diminuição da energia do orbital HOMO em meio aquoso, causando um aumento do *band-gap* desta transição neste confômero. Esta inversão de estabilidade com a solvatação pode ser compreendida através da diferença na distribuição eletrônica em ambos dos confômeros. No confômero *syn* existe uma maior simetria molecular, assim, os elétrons se distribuem uniformemente, conferindo um menor momento dipolar à molécula, para o confômero *anti* já é observado uma diferença na densidade eletrônica entre os anéis BTDs, assim como observado nas distribuições dos orbitais HOMO/LUMO e na $\Delta\rho$ desta molécula, isto faz com que esta molécula ao ser solvatada em água, solvente polar, sofra maior interação dipolar e por fim, sendo mais estabilizada.

Para a simulação do espectro, ambos os confôrmeros foram considerados em proporções iguais, sendo as bandas de absorção simuladas a partir das forças dos osciladores geradas teoricamente para os confôrmeros. Foi utilizado o programa GaussView para esta simulação, onde é utilizada uma série de convoluções de funções gaussianas centradas em cada pico de absorção para criação destas bandas. A largura a meia altura (*full width at half maximum*, FWHM) de todas as bandas de absorção foram ajustadas para 20nm.

No espectro simulado observa-se uma estabilização dos confôrmeros quando solvatados, o que pode ser observado pelo deslocamento batocrômico destas absorções (curvas em vermelho) quando comparados às absorções desta molécula no estado gasoso (curvas em preto). As absorções de ambos os confôrmeros também foram plotadas (linhas pontilhadas para o confôrmero *anti* e tracejadas para o confôrmero *syn*). A banda de absorção da molécula de **BTDNHBTD** no estado gasoso apresenta um “ombro” bastante discreto na região de aproximadamente 475 nm, causada pela absorção do confôrmero *anti* no estado gasoso, este comportamento não é observado na absorção da molécula solvatada.

O último estudo computacional realizado com a **BTDNHBTD** foi o cálculo energético da barreiras rotacionais entre os núcleos BTB quando a molécula se encontra solvatada em diferentes solventes: clorofórmio, acetona, metanol e DMSO. Sendo analisado em 4 solventes de diferentes polaridades: clorofórmio, acetona, metanol e DMSO, três dos quais foram usados no estudo de RMN.

Para este estudo, as geometrias moleculares e as energias *syn* e *anti* foram calculadas para cada solvente, sendo os efeitos de solvatação implementados pelo modelo SCRF-IEFPCM. O funcional e a função de base utilizada durante a otimização da geometria e o cálculo de *single-point* foram os mesmos já utilizados nos estudos já apresentados no trabalho: CAM-B3LYP/ 6-311G* para otimização e PBE1PBE/ 6-311+G(2d,p).

As energias envolvidas na alteração de um confôrmero *syn* em um *anti* (barreira direta- pontos vermelhos) e um confôrmero *anti* em um *syn*, (barreira inversa- pontos azuis) foram calculadas e plotadas em função das constantes dielétricas (ϵ) dos solventes escolhidos, Figura 25.

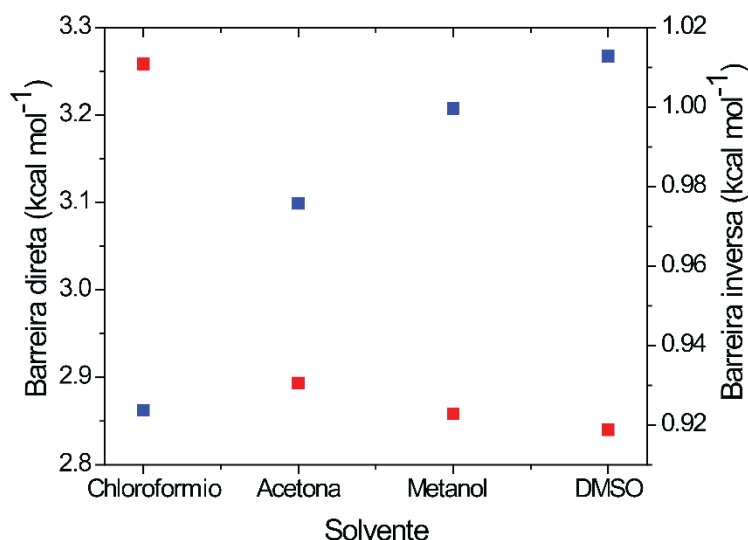


Figura 25. Barreiras rotacionais teóricas para mudança de conformação da molécula de **BTDNHBTD** em diferentes solventes. A barreira direta representada pela cor azul indica a mudança do confômero *syn* para o confômero *anti* enquanto a barreira inversa indica a mudança do confômero *anti* para o confômero *syn*.

A barreira de rotação direta possui valores de energias maiores que a barreira inversa (um aumento de aproximadamente 2,0 kcal mol⁻¹), este aumento de energia ocorre devido a conformação *syn* ser estabilizada por duas ligações de hidrogênio intramoleculares, sendo necessária a quebra de uma destas interações para mudança de conformação da molécula, o que leva a uma maior desestabilização molecular. Na conformação *anti* existe apenas um núcleo BTD realizando ligação de hidrogênio, o que facilita a rotação da molécula. Ambas as energias de rotação conformacional apresentam valores baixos, podendo existir nos solventes estudados qualquer uma das espécies conformacionais. Este resultado corrobora com o resultado encontrado nas análises por RMN, onde foram observados a presença de ambos os confômeros em metanol e DMSO.

A variação da polaridade do solvente afeta tanto a barreira direta quanto a inversa de rotação, sendo o aumento desta polaridade inversamente proporcional a energia de rotação direta e diretamente proporcional a barreira de rotação inversa. A assimetria da molécula no confômero *anti* faz com que esta apresente uma estabilização com a polaridade do solvente pois existe um maior momento de dipolo neste confômero. O inverso ocorre no confômero *syn* onde simetria molecular cria um maior caráter apolar à molécula, diminuindo o momento de dipolo, o que faz com que esta apresente uma maior estabilidade

em solventes apolares e conseqüentemente uma maior resistênciã à rotaçãõ nestes solventes.

A **BTDNHBTB** também foi caracterizada por meio de experimentos fotofísicos, sendo realizados em diferentes solventes. Desta forma, os resultados obtidos experimentalmente podem ser comparados aos obtidos através de cálculos computacionais.

Estudos Fotofísicos

Para a realizaçãõ dos estudos, inicialmente foram escolhidos sete solventes com diferentes polaridades: DMSO, água, acetato de etila, diclorometano, acetonitrila, tolueno e etanol. Sendo realizado nestes solventes experimentos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos. Os espectros obtidos durante o estudo fotofísico podem ser observados na Figura 26.

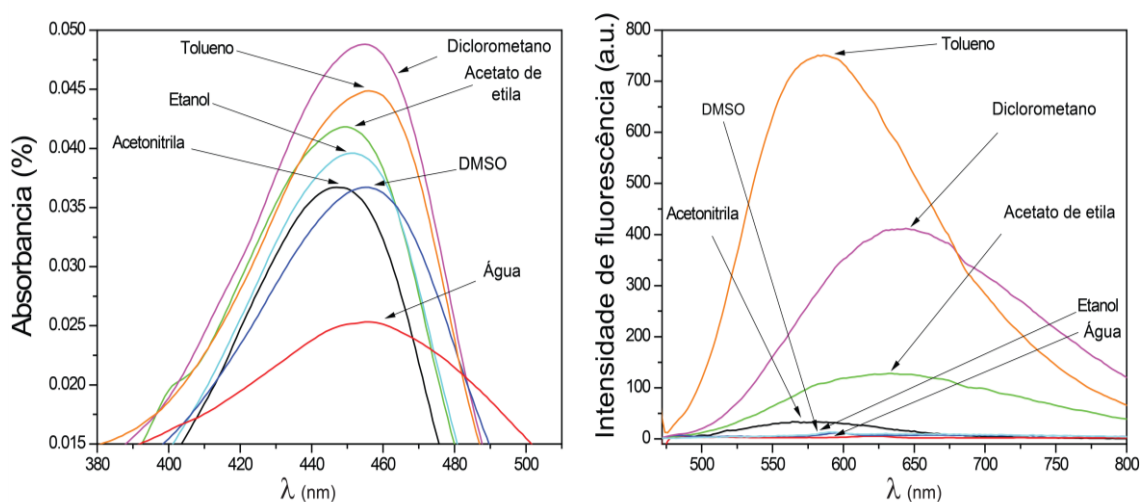


Figura 26. Espectros de absorçãõ (UV-Vis, esquerda) e fluorescênciã (direita) da molécula de **BTDNHBTB**

Dentre os setes solventes estudados, a maior intensidade de absorçãõ da molécula de **BTDNHBTB** ocorre em diclorometano, um solvente apolar prótico, enquanto a menor absorçãõ é apresentada quando esta molécula está em água, o solvente com maior polaridade. Não há uma grande variaçãõ da

energia absorvida pela molécula conforme a variação do solvente, sendo a transição $\pi-\pi^*$ a de menor energia em qualquer um dos solventes utilizados. A fluorescência da molécula apresenta uma maior intensidade em tolueno e uma maior variação de comprimento de onda com a mudança de solvente, ou seja, após excitada a molécula torna-se mais sensível ao meio em que está solvatada, apresentando maiores intensidades de absorção e emissão em solventes menos polares. Para o cálculo dos valores de deslocamento de Stokes nos solventes estudados foram utilizados os comprimentos de onda nas maiores intensidades de absorção e emissão. Estes resultados podem ser observados na Tabela 2, sendo também calculado o logaritmo da absorvidade molar ($\log \epsilon$) para cada solvente.

Tabela 2. Dados de UV-Vis e emissão de fluorescência em diferentes solventes para a molécula **BTDNHBTD**. Todos os experimentos foram conduzidos com concentração de 10 μM

Solventes	λ_{max} (abs)(nm)	$\log \epsilon$	λ_{max} (em)(nm)	Desl.Stokes (nm)
DMSO	455	3.57	596	141
Água	458	3.40	622	164
Acetato de etila	449	3.62	633	184
Diclorometano	454	3.68	643	189
Acetonitrila	447	3.56	575	128
Tolueno	457	3.66	584	127
Etanol	451	3.59	592	141

A absorvidade molar está relacionada a capacidade da molécula em absorver determinada radiação eletromagnética, ela é uma medida analítica que depende apenas da transição eletrônica da molécula para um estado excitado.⁵⁸ As medidas do logaritmo da absorvidade molar para **BTDNHBTD** apresentaram valores entre 3,40 e 3,68, podendo esta molécula ser considerada um bom cromóforo. Estes valores também indicam a ocorrência de ESIPT nesta molécula, sendo reportado na literatura valores análogos em moléculas onde este processo de estabilização ocorre.⁵⁹

O deslocamento de Stokes para a molécula nos diferentes solventes também apresentou resultados bastante elevados, 127-189 nm, o que indica existir nesta substância um eficiente processo de relaxação do estado excitado.

Devido aos cálculos computacionais indicarem apenas a ocorrência de ICT e não de ESIPT, foi construído para a molécula um gráfico um gráfico Lippert-Mataga, ⁶⁰ (Figura 27. Correlação de Lippert-Mataga para a molécula de BTDNHBTD com os deslocamentos obtidos). Neste são plotados os deslocamentos de Stokes em função da transição molar normalizada, E_T^N , um valor parametrizado de acordo com a polaridade dos solventes, para tal foram utilizados os valores obtidos por Reichardt ⁶¹

Através deste gráfico pode-se estudar a sensibilidade fotofísica do composto em relação à polaridade do solvente ao qual este se encontra solvatado. Moléculas estabilizadas por ESIPT não são sensíveis à polaridade do solvente.⁵⁹

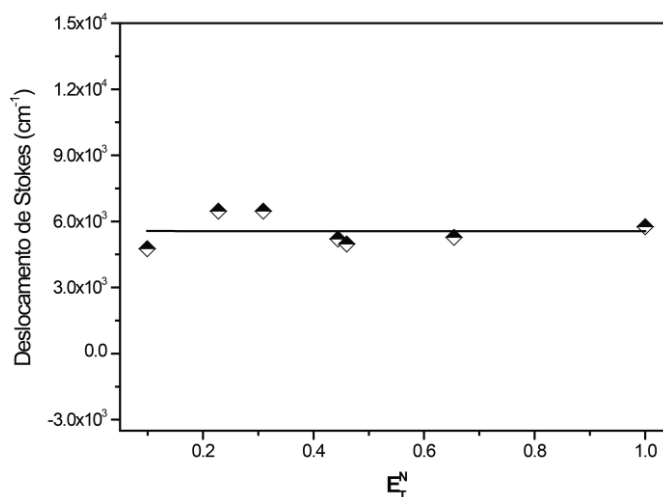


Figura 27. Correlação de Lippert-Mataga para a molécula de **BTDNHBTD** com os deslocamentos obtidos

Pode-se observar que existe uma variação dos deslocamentos de Stokes com a polaridade do solvente. Esta variação não é linear com o aumento da polaridade, apresentando um valor baixo para a regressão linear, $R^2 = 0,199$. A ocorrência do processo de ICT na molécula, indicado através dos resultados computacionais, estão desta forma de acordo com os estudos fotofísicos supracitados.

Bioimageamento e análises biológicasⁱ

Após realizada a caracterização da molécula, partiu-se, então, para a aplicação biológica, onde esta foi testada como sonda fluorescente em meio biológico. Para esta proposta foram realizados experimentos de imageamento celular, sendo utilizadas células da linhagem MCF-7 (células de câncer de mama). Os ensaios biológicos com a **BTDNHBTD** foram realizados em células vivas e fixadas, sendo também utilizado durante estes o DAPI, um marcador comercial seletivo aos núcleos celulares. Os resultados obtidos através da microscopia de fluorescência para podem ser vistos na Figura 28.

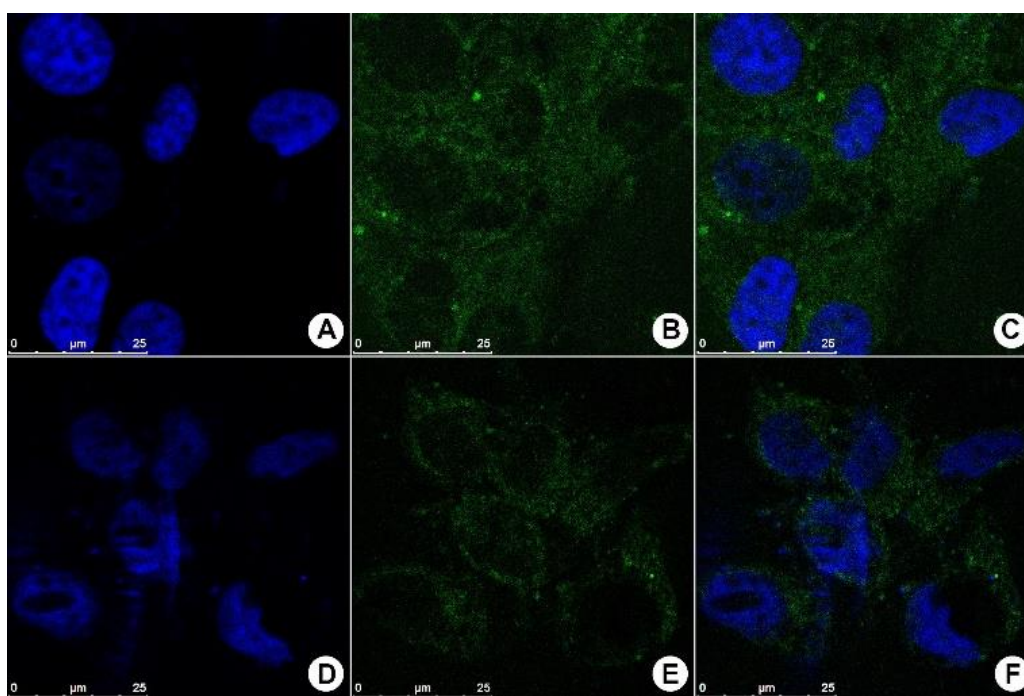


Figura 28. Células MCF-7 marcadas com a sonda **BTDNHBTD** e/ou DAPI. Imagens (A), (B), e (C) mostram células fixadas enquanto as imagens (D), (E) e (F) mostram a marcação em células vivas. (C) e (F) Mostram a sobreposição das imagens. O padrão de fluorescência da **BTDNHBTD** é visto em verde. O núcleo das células foram marcados com um o marcador comercial DAPI (azul). Barra de escala em 25 µm

ⁱ Todos os experimentos biológicos foram realizados pelo professor José Raimundo Corrêa e seu grupo de pesquisa no Laboratório de microscopia eletrônica no Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. IB-UnB

Observa-se pelos experimentos realizados com as células vivas que o novo composto fluorescente sintetizado foi capaz de transpor a membrana celular marcando o citoplasma das células incubadas. Vale ressaltar, que esta a transposição da membrana celular é uma das propriedades mais procuradas em novos marcadores celulares,¹² As imagens C e F mostram não haver interação da **BTDNHBTD** com o núcleo celular, marcados com o DAPI em azul.

Durante experimentos de imageamento celular, através da microscopia de fluorescência, normalmente se observa que a exposição prolongada dos marcadores à fonte de excitação pode causar diminuição da fluorescência destes, muitas vezes causada pela fotodegradação do composto. A **BTDNHBTD** não apresentou diminuição de fluorescência durante os procedimentos de imageamento, evidenciando sua alta fotoestabilidade, este resultado está em concordância com os resultados de fotofísica discutidos. Esta uma condição altamente favorável para sua aplicação em estudos biológicos.

Conclusão

A conjugação de dois núcleos BTD em uma mesma molécula se mostrou eficiente, sendo a molécula **BTDNHBTD** um fluoróforo altamente estável mesmo no estado excitado.

A arquitetura molecular deste novo composto, guiada através de cálculos teóricos, mostra a capacidade da Química computacional na predição das propriedades estruturais e eletrônicas de novas substâncias. As características moleculares premeditadas à síntese possibilitam um processo de criação racional, sendo o design de novos compostos projetado de acordo com sua proposta de utilização.

A **BTDNHBTD** apresentou grande estabilidade de manuseio durante todos os procedimentos experimentais realizados, não havendo degradação do composto à variação de solvente, temperatura e armazenamento. A estabilidade de substâncias derivadas do núcleo BTD já é reportada na literatura,¹⁴ sendo esta uma enorme vantagem dos derivados de BTD em relação a outros fluoróforos.

Os resultados fotofísicos e teóricos mostraram que apesar de haver características moleculares que indicam a ocorrência de ESIPT (planaridade estrutural com duas fortes ligações de hidrogênio, grande deslocamento de Stokes e transferência de carga intramolecular durante o processo de excitação da molécula) a molécula de **BTDNHBTD** utiliza o ICT como principal processo de relaxação do estado excitado, não podendo o ESIPT, no entanto, ser totalmente descartado.

Este novo composto fluorescente foi aplicado com sucesso nos experimentos de imageamento celular, sendo internalizado pela célula através da transposição da membrana plasmática e mostrando seletividade ao citosol. Além disso este não apresentou perda de fluorescência durante os experimentos de imageamento celular.

Capítulo 2

Sonda lipofílica fluorescente derivada do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola para imageamento celular

Introdução

Os lipídeos ou gorduras, são uma série de substâncias que apresentam uma insolubilidade em meio aquoso. Sendo a própria palavra lipídeo derivada do grego “*lipos*” que significa gordura. Os lipídios, de uma maneira geral, podem ser divididos em triglicerídios, diglicerídeos, monoglicerídeos, colesterol, fosfolipídeos e ácidos graxos, sendo todos estes componentes solúveis em solventes apolares (hexano, éter, clorofórmio, etc).⁶² No organismo os lipídios possuem inúmeras funções, podendo-se destacar:⁶³

- O armazenamento de energia (sendo estas substâncias armazenadas principalmente como triglicerídeos)
- Os lipídios são um dos principais componentes da membrana celular.
- Participam da regulação de processos fisiológicos, estando envolvidos diretamente à produção de eicosanoides, que são moléculas derivadas dos ácidos graxos.
- São responsáveis pela absorção de determinadas vitaminas, como as vitaminas A, D, E e K, auxiliando também no transporte destas vitaminas.
- Contribuem para o sabor, odor e textura dos alimentos, ou seja, na palatabilidade dos alimentos.
- Alguns lipídeos podem atuar ainda como: cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, âncoras hidrofóbicas, hormônios e mensageiros intracelulares.⁶⁴

Os lipídios podem ser divididos em classes, de acordo com as suas composições e propriedades físico-químicas.⁶⁵

Simples

- Ácidos Graxos
- Gorduras netras: glicerol, mono-, di- e triglicerídeos
- Ceras: Ésteres de ácidos graxos, esterol e não esterol

Compostos

- Fosfolipídios
- Glicolipídeos
- Lipoproteínas

Derivados de álcoois: Esteróis e hidrocarbonetos

Os ácidos graxos (lipídios simples), são a classe de moléculas que existem na maioria dos lipídeos existentes em óleos e gorduras. Estas substâncias são formadas por moléculas de ácidos monocarboxílicos que apresentam um grupo carboxila (região polar da molécula) ligado a uma cadeia alquílica, (região apolar, 4-28 carbonos) saturada ou insaturada, sendo curta (de 2 a 4 átomos de carbono), média (de 6 a 10 átomos de carbono) ou longa (acima de 12 átomos de carbono). Um exemplo de ácido graxo é o ácido linoleico, apresentado na **Figura 29**

Ácido Linoleico

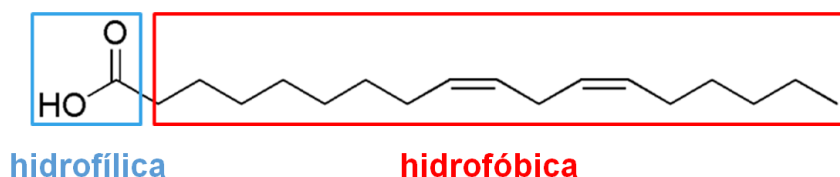


Figura 29. Estrutura molecular de um ácido graxo sendo destacadas as partes hidrofóbicas e hidrofílicas.

As diferentes propriedades dos ácidos graxos ocorrem devido ao tamanho da cadeia alquílica destas substâncias (3 a 24 átomos de carbono) e principalmente devido às insaturações presentes nestas moléculas, podendo os

ácidos graxos serem classificados como: saturados, quando não há insaturações em sua cadeia alquílica, monoinsaturados, quando existe apenas uma insaturação e poli-insaturados, quando há mais de uma insaturação em sua cadeia alquílica.

Devido à ausência de insaturações na cadeia carbônica dos ácidos graxos saturados, suas moléculas possuem uma maior liberdade de rotação de suas ligações o que causa a molécula uma maior flexibilidade. Estas tendem a adotar conformações lineares, o que aumenta sua interação quando empacotados.⁶⁴ A maior flexibilidade e conseqüentemente um empilhamento mais eficiente destas moléculas torna esta classe de ácidos graxos sólida a temperatura ambiente.

Os ácidos graxos mono- e poliinsaturados não possuem a mesma flexibilidade molecular que os ácidos graxos saturados. Estas substâncias ainda possuem: menores ponto de fusão devido à insaturação diminuir suas interações moleculares; uma maior instabilidade quando comparadas aos ácidos graxos saturados e possibilidade de conformeros geométricos devido as duplas ligações.

Exemplos de ácido graxo saturado, insaturado *trans* e insaturado *cis* podem ser vistos na Figura 30.

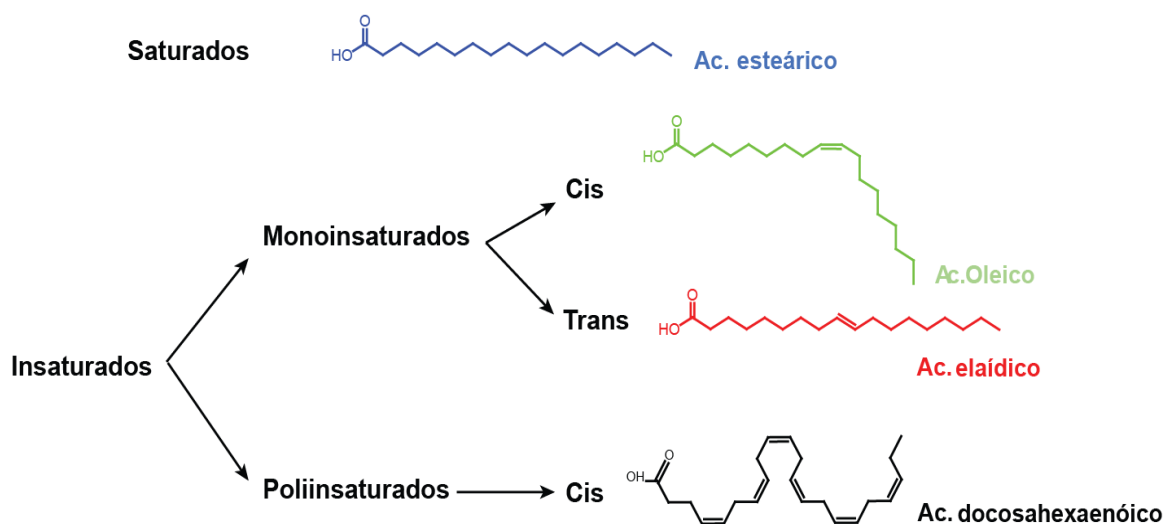


Figura 30. Classificação dos ácidos graxos quanto a conformação e insaturações da cadeia alquílica.

Devido à instabilidade anteriormente citada, os ácidos graxos insaturados podem passar por processos onde as duplas ligações destas substâncias são

quebradas, sendo estes processos chamado de hidrogenação. Este processo pode ser parcial, quando apenas algumas insaturações sofrem redução ou total quando o ácido graxo deixa de possuir insaturações. O caminho inverso, ou seja a formação de insaturações nas moléculas de ácidos graxos também é possível, sendo a inserção de duplas ligações nas cadeias alquílicas destas substâncias realizadas através de enzimas em rotas biossintéticas.⁶⁴

O consumo destas substâncias pelo homem é de extrema importância, sendo alguns ácidos graxos considerados essenciais à manutenção da vida quanto outros, prejudiciais a esta.

Os ácidos graxos saturados, principalmente o ácido láurico (formado por 12 carbonos e 0 insaturações, 12:0), o mirístico (14:0) e o palmítico (16:0) influenciam significativamente nos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoprotein*, LDL) no organismo,⁶⁶ reduzindo a absorção e o metabolismo celular destas substâncias pela célula e conseqüentemente aumentado os níveis desta lipoproteína, considerada um tipo de colesterol, na corrente sanguínea, o que aumenta os riscos de problemas cardíacas.

Ácidos graxos insaturados com configuração trans, também podem levar ao risco de problemas cardíacos. Estes ácidos aumentam a concentração de LDL no organismo e ao mesmo tempo diminuem as concentrações das lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoprotein*, HDL), que são substâncias que ajudam a eliminar depósitos de gorduras no sistema circulatório. Além disso, os ácidos graxos saturados também podem inibir algumas enzimas relacionadas ao metabolismo de eicosanoides, moléculas consideradas hormônios locais, que participam de sinalizações intracelulares relacionadas a processos inflamatórios, coagulação sanguínea entre outros,⁶⁷ podendo aumentar a formação de trombos no sistema circulatório e posteriormente levar à trombose.

A baixa taxa de mortalidade por problemas cardíacos de pessoas com alto consumo de ácidos graxos monoinsaturados, como em países do mediterrâneo, mostra uma tendência contrária ao consumo dos ácidos graxos saturados. Estas substâncias estão relacionadas à diminuição das concentrações de LDL no organismo através da neutralização dos efeitos supressores aos receptores celulares de LDL, aumentando conseqüentemente a absorção desta lipoproteína pelo organismo.⁶⁶ Acredita-se ainda que os ácidos graxos monossaturados não

alteram os níveis de HDL no sangue, além também de ajudar no controle dos níveis de glicose sanguínea, como mostrado em um estudo com pacientes diabéticos que seguiram dietas de alimentos ricos em ácidos graxos monoinsaturados.⁶⁸

Devido à grande variedade de ácidos graxos existentes, criaram-se sistemas de nomenclatura sistemáticas para estas substâncias. Uma destas é realizada da seguinte maneira:⁶⁴ O último carbono da cadeia alquílica é denominado carbono ω (ômega), e os carbonos adjacentes ao grupo carboxila são denominados de carbono α e β , independentemente do tamanho do ácido graxo. A posição da primeira dupla ligação, iniciando-se a contagem a partir do carbono ω , irá denominar a classificação do ácido graxo. Como por exemplo pode-se citar o ácido oleico; este ácido monoinsaturado possui sua insaturação entre os carbonos 9 e 10, podendo ser considerado um ácido graxo monoinsaturado $\omega 9$. Para os ácidos polinsaturados, também é considerada apenas a primeira dupla ligação para se designar a classe, como por exemplo o ácido docosaenoico, que é um ácido $\omega 3$.⁶⁴

Em um outro sistema de nomenclatura denomina-se a posição da primeira insaturação contando o número de carbonos a partir da carboxila. Esta posição é indicada pelo símbolo Δ seguida do número deste átomo, como exemplo o ácido docosahexaenoico é um ácido graxo do tipo Δ^4 .

Apesar do organismo humano possuir enzimas elongases que inserem átomos de carbono à cadeia alquílica de ácidos graxos absorvidos e enzimas dessaturases que criam insaturações nestas substâncias, nos mamíferos duas classes de ácidos graxos não podem ser biosintetizados *de novo*, sendo elas:

- Os ácidos graxos da família $\omega 3$, podendo-se destacar os ácidos alfa-linoleico (18:3n-3) e eicosapentaenoico (20:5n-3), e o docosahexaenoico (22:6n-3).
- Os ácidos $\omega 6$, sendo exemplos destes o ácido linoleico (18:2n-6) e araquidônico (20:4n-6).

As enzimas dessaturases são capazes de criar insaturações nas posições Δ^5 , Δ^6 , principalmente em ácidos graxos poliinsaturados, e Δ^9 , em ácidos graxos monoinsaturados. Os ácidos pertencentes a família $\omega 3$ e $\omega 6$ são,

por isso, considerados ácidos graxos essenciais, sendo o termo “essencial” adotado pela primeira vez em 1929-1930 por George O. Burr e sua esposa Mildred ao estudarem os efeitos prejudiciais causados pela exclusão destas substâncias na dieta de camundongos.^{69,70}

Apesar dos ácidos graxos não essenciais poderem ser sintetizados *de novo* pelo organismo, sua produção é pequena, sendo necessário seu consumo de meios externos. Ao serem ingeridos, os lipídeos são emulsificados no duodeno com ajuda de ácidos biliares, interagindo com estas substâncias e formando micelas contendo triacilgliceróis, fosfolipídios e alguns ésteres, que são então digeridos por enzimas lipases e colipases. Após esta digestão os ácidos graxos entram passivamente nos enterócitos. Os ácidos graxos poliinsaturados são absorvidos para dentro dos enterócitos através de uma proteína específica para o transporte destes (*fatty acid binding protein*, FABP). Após esta absorção estas substâncias são novamente esterificadas, se tornando triacilgliceróis, que são liberados na circulação linfática na forma de quilomícrons^{71,72} Os quilomícrons são distribuídos as células para que estes sejam, então, metabolizados.

Devido tanto a composição celular basicamente formada por ambientes polares quanto as características anfifílicas dos ácidos graxos a estrutura celular criou mecanismos específicos para captação destas e outras substâncias de natureza lipídica. Um destes mecanismos é chamado “endocitose mediada por receptores”.^{73,74} A célula possui receptores em sua membrana que irão se ligar às moléculas de ácido graxo, iniciando um processo de empacotamento das mesmas através da evaginação da membrana e formação de vesículas contendo os ácidos graxos absorvidos para o interior celular.⁷⁵

Alguns experimentos recentes apontam também outros mecanismos de absorção dos ácidos graxos, os quais podem: i) ser absorvidos através da difusão simples pela membrana celular, sendo este um processo passivo; ii) ser internalizados por proteínas específicas à transposição destas substâncias pela membrana celular, tal como proteínas translocases, em um processo ativo; iii) sofrer processos simultâneos de captação.⁷⁶ Estes mecanismos irão depender do tipo de absorvidos.

Devido à natureza lipofílica das vesículas formadas, a identificação destas substâncias através de métodos microscópicos é limitada, não sendo estas

resistentes aos processos de fixação celular para sua posterior marcação. Ocorrem durante estes processos a fusão destes corpúsculos ou sua dissolução pelos agentes fixantes. Em um estudo realizado por DiDonato e colaboradores⁷ são mostradas as diferenças na marcação dos corpúsculos lipídicos em meio celular quando utilizadas diferentes técnicas de fixação, como pode ser observado na Figura 31.

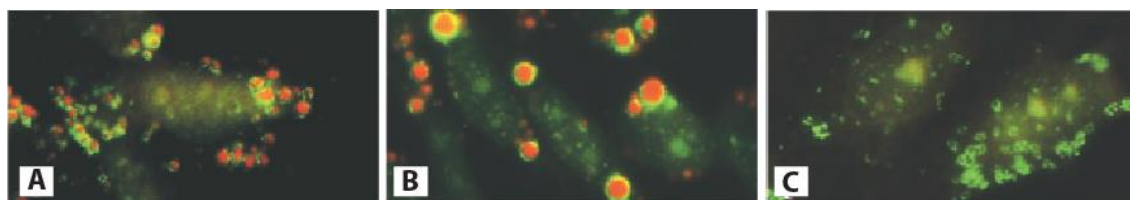


Figura 31. Fusão e dissolução das gotas lipídicas causada pelo agente fixador. (A) paraformaldeído (B) metanol frio (C) acetona fria. Células marcadas com BODIPY e adipofilina simultaneamente. Imagem adaptada da referência 7.

Uma outra opção de marcação a estes corpúsculos ocorre através do acoplamento de núcleos fluorescentes à molécula de lipídeo, antes que estes sejam aplicados no meio celular para posterior absorção. Esta opção permite que sejam também estudados processos de captação celular destas substâncias, uma vez que estes são realizados em células vivas.

Devido aos ácidos graxos estarem ligados a inúmeros processos celulares e a célula possuir diferentes modos de captação destas substâncias, experimentos utilizando a variação de temperatura são utilizados como uma ferramenta para estes estudos, uma vez que processos de difusão e transporte celular são dramaticamente influenciados por esta variável. Sabe-se que a 4°C os processos de endocitose celular não são permitidos⁷⁷

Apesar de saber da influência da temperatura nestes processos, não são encontrados muitos exemplos deste tipo de aplicação de fluoróforos a baixas temperaturas, sendo nestes estudos a taxa de internalização destas moléculas bastante afetada pela célula⁷⁸ ou até mesmo não ocorrendo.⁷⁹ Além das dificuldades de internalização à baixas temperaturas, as sondas fluorescentes aplicadas nestes experimentos também devem ter suas propriedades moduladas de modo a obter-se melhores resultados de imageamento celular, sendo: uma boa fotoestabilidade, um alto deslocamento de Stokes (evitando interferência da

fonte de excitação durante os experimentos de imageamento), a manutenção da fluorescência e de seu estado físico quando levado a baixas temperaturas, exemplos de qualidades buscadas nestas substâncias.

Dado o interesse em nosso grupo de pesquisa no desenvolvimento de novas sondas contendo o núcleo BTD e os bons resultados já apresentados por diferentes derivados deste núcleo em experimentos de imageamento celular, como transposição a membrana celular em células vivas e fixada,^{80,81} boas qualidades de imagens devido a seu deslocamento de Stokes elevado, estabilidade à variações de ambiente (não são necessárias condições específicas de armazenamento destas substâncias), fotoestabilidade, dentre outras qualidades.²¹ Planejou-se a síntese de uma nova sonda fluorescente, derivada de um ácido graxo, visando o estudo da dinâmica de captação e dinâmica celular a moléculas lipídicas. Na síntese desta nova substância buscou-se mimetizar o design molecular de um ácido graxo conhecido e bastante consumido mundialmente, o ácido oleico, sendo a sonda sintetizada desta maneira provida de uma cadeia alquílica monoinsaturada contendo 18 carbonos.

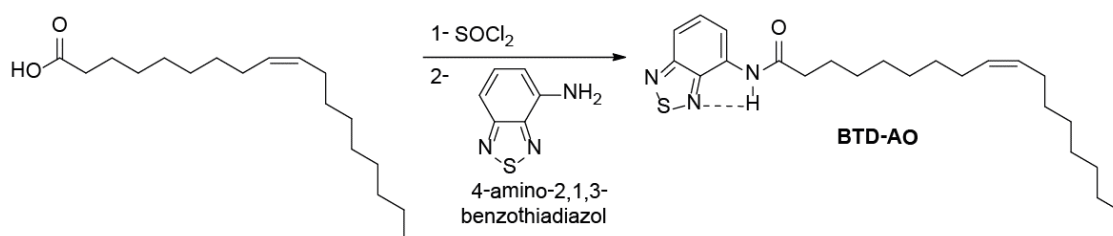
O número de átomos de carbono em sistemas biológicos varia entre 14 e 24 (C14 – C24), sendo os ácidos graxos C16 e C18 os mais comuns em humanos. Além disso, o ácido oleico possui apenas uma instauração (C18; 18:1), o que o torna ideal para estudos de absorção celular, levando-se em conta o tamanho da cadeia carbônica.⁸² Além disso esta substância é de grande importância biológica, sendo uma das gorduras mais recomendadas para o consumo humano, capaz de atuar na prevenção de inúmeras doenças como alguns tipos cânceres e doenças cardiovasculares.^{83,84} Estudos mostram que pessoas que seguem dietas mediterrâneas, caracterizadas pelo alto índice de consumo de azeite de oliva (composto em mais de 70% de ácido oleico) apresentam um número menor de problemas relacionados a altas taxas de colesterol, menor probabilidade de doenças do coração e menor incidência de câncer.^{85,86}

Para o estudo de dinâmica celular desta substância foi realizada a variação da temperatura de incubação, sendo realizados experimentos a 37°C e 4°C onde a evaginação da membrana celular e processos endocitóticos são inibidos.

Resultado e Discussão

Síntese e caracterização da nova sonda fluorescente derivada de um ácido graxo. A BTD-AO

A síntese do novo composto fluorescente contendo a cadeia alquílica do ácido oleico foi realizada através da reação de formação de amida via cloreto de ácido, dessa forma, foram necessárias duas etapas sintéticas, como mostrado no (Esquema 2).



Esquema 2. Síntese da nova sonda fluorescente incorporando o núcleo BTD denominado **BTD-AO**.

O ácido oleico foi utilizado como precursor do novo derivado de BTD. Para sua utilização, este foi destilado e, então, tratado com cloreto de tionila, o que resultou na formação de um cloreto de acila derivado do ácido oleico. O produto bruto foi, então, utilizado na próxima etapa reacional, onde se adicionou a este um da molécula de 4-amino-2,1,3-benzotiazola, formando como produto final uma amida entre a BTD e o ácido oleico. A **BTD-AO** foi obtida com 61% de rendimento. A caracterização da molécula sintetizada foi confirmada através análises de RMN, e ESI-MS(/MS) de alta resolução

Estudos fotofísicos

Para a caracterização da amostra por estudos fotofísicos foram realizadas duas análises, a espectrofotometria e a espectrofluorimetria. Sendo o estudo feito em seis diferentes solventes, que apresentam diferenças consideráveis de

polaridade. Os gráficos dos espectros de absorção e emissão da amostra nos solventes podem ser observados na Figura 32

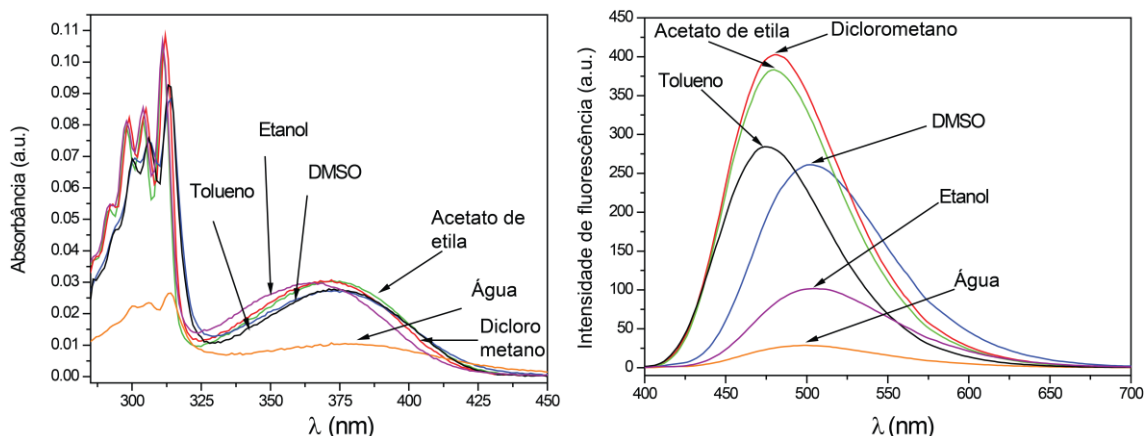


Figura 32. Espectro de absorção (UV-Vis) esquerda e fluorescência (direita) da molécula **BTD-AO**

Observa-se uma menor absorbância e emissão da molécula de **BTD-AO** quando esta se encontra solvatada em água, isso pode ocorrer devido a sua solubilidade em meio aquoso ser reduzida pela cadeia alquílica presente na molécula. Os demais solventes apresentam tanto intensidade quanto comprimento de onda bastante similares na absorção. Na fluorescência o solvente que apresentou maior intensidade foi diclorometano, contudo a solução em etanol possui um maior comprimento de onda, 505 nm

A fluorescência da **BTD-AO**, na concentração em que foram realizados os experimentos pode ser facilmente visualizada a olho nu, com sua exposição a uma lâmpada de UV ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$), conforme visualizado na Figura 33.



Figura 33. **BTD-AO** sob luz branca (esquerda) e irradiação de luz UV ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$, direita)

Através dos resultados das duas análises foi possível tanto obter os valores de deslocamento de Stokes para o fluoróforo quanto estudar o comportamento da sonda **BTD-AO** em relação a polaridade do meio em que se encontra.⁶¹ A Tabela 3 sumariza os resultados do estudo solvatocrômico.

Tabela 3. Dados de UV-Vis e emissão de fluorescência (em diferentes solventes) para a sonda **BTD-AO**. Todos os experimentos foram conduzidos em concentração de 10 μ M.

Solventes	λ_{max} (abs)(nm)	$\log \epsilon$ (ϵ)	λ_{max} (em)(nm)	Desl. Stokes nm
DMSO	375	3,43	502	127
Água	379	3,02	499	120
Acetato de etila	373	3,48	481	108
Diclorometano	372	3,48	481	109
Tolueno	375	3,43	475	100
Etanol	365	3,46	505	140

Observa-se um alto deslocamento de Stokes em todos os solventes, (todos acima de 100 nm), o que evidencia uma boa estabilização no estado excitado da molécula. O caráter aceptor de elétrons do núcleo BTD e os átomos de nitrogênio e oxigênio, com pares de elétrons livres, próximos a este núcleo podem fazer com que sua densidade eletrônica seja alterada durante o estado excitado, sendo possível assim, a estabilização do fluoróforo por processo de ICT.

Como observado nos experimentos de absorção e fluorescência a molécula na possui grande solubilizada quando o meio é água e devido esta hidrofobicidade da **BTD-AO** levou se em consideração possibilidade de existência de excímeros.

Os excímeros são espécies formadas quando uma molécula no estado excitado interage com outra ainda não excitada, resultando em uma estabilização da espécie formada. A interação das energias destes orbitais pode ser visualizada na **Figura 34**. Estes complexos podem ser observados através de mudança de deslocamento ou pelo surgimento de mais de um comprimento de onda de emissão com a variação de concentração do fluoróforo. Sendo existentes apenas quando uma das moléculas se encontra no estado excitado.

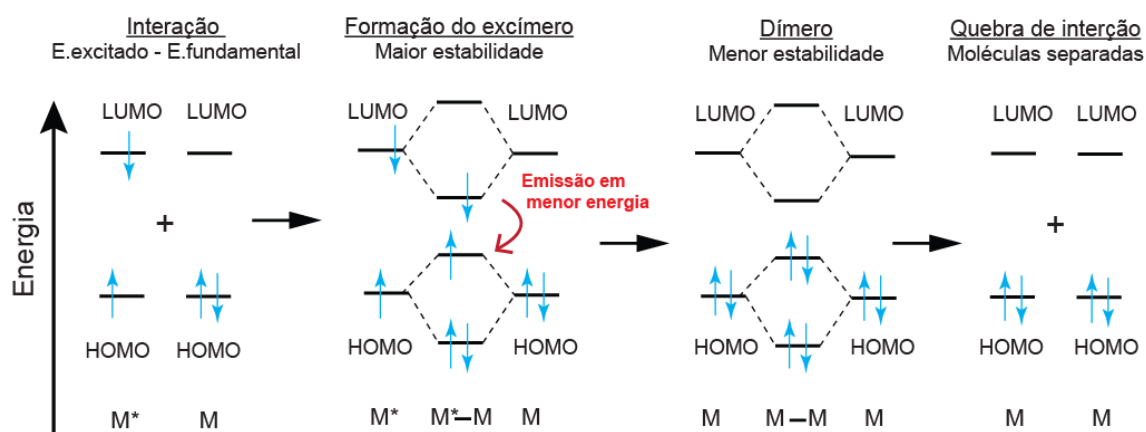


Figura 34. Representação da movimentação eletrônica entre os orbitais HOMO e LUMO de duas moléculas para a formação de excímeros.

Desta maneira, para se confirmar a presença de excímeros foram realizados experimentos de titulação do fluoróforo, **BTD-AO**, em meio aquoso e em condições de favorecimento de formação micelar, para tal foram utilizados os surfactantes Triton-X 100 e dodecil sulfato de sódio (SDS). Nestas condições a agregação de substâncias lipofílicas e a formação de excímeros seria favorecida. Os resultados são visualizados na Figura 35.

Foram também realizadas titulações em acetonitrila, um solvente polar aprótico, a fim de se observar como a ausência de ligações de hidrogênio pelo solvente interferem na formação dos excímeros. Vale lembrar, que na estrutura da **BTD-AO** existe uma ligação de hidrogênio que pode influenciar significativamente a estabilidade da molécula, caso as condições que esta se encontre sofra alterações. Como objetiva-se aplicar a **BTD-AO** em meio celular e o pH do meio pode alterar a estabilidade da molécula foram realizadas titulações do fluoróforo em solução tampão de fosfato com o pH neutro.

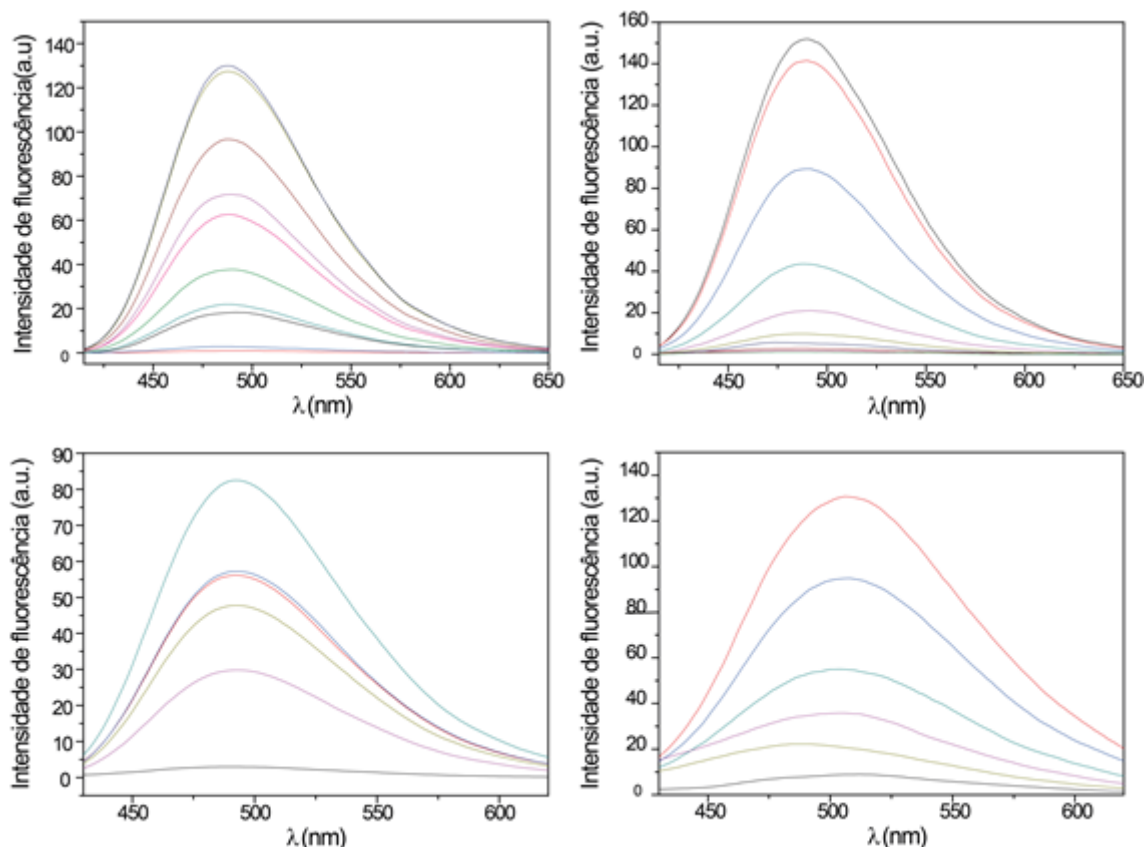


Figura 35. (Acima, esquerda) Emissão da sonda **BTD-AO** (20 μM - 5 mM) em acetonitrila. (Acima, direita) Emissão da sonda **BTD-AO** (2 μM - 1 mM) em solução tampão de fosfato (pH = 7). (Abaixo, esquerda) Emissão da sonda **BTD-AO** (95 μM - 1 mM) em solução de Triton X100. (Abaixo, direita) Emissão da sonda **BTD-AO** (50 μM - 1 mM) em solução de SDS. As soluções dos agentes surfactantes foram utilizadas em concentração de saturação.

Em nenhuma das condições estudadas houve formação destes excímeros com o aumento da concentração, não sendo perceptível qualquer variação nos comprimentos de onda de emissão da molécula mesmo em concentrações 100 vezes maiores que as utilizadas em experimentos de imageamento celular. A formação dos excímeros é indicada por mudanças bastantes significativas nos comprimentos de onda de emissão ⁸⁷

Por último avaliou-se o efeito da polaridade do solvente na estabilização do estado excitado da molécula, sendo construído um gráfico do tipo Lippert-Mataga (Figura 36). Para tal, são utilizados os valores de deslocamento de Stokes previamente obtidos e os valores de “transição molar normalizada (E_T^N),

cujo valor é parametrizado de acordo com a polaridade de cada solvente estudado.⁸⁸ Observa-se através reta traçada pela regressão linear dos pontos do gráfico que existe uma inclinação positiva da reta com o aumento da polaridade do solvente, indicando uma maior estabilidade do fluoróforo nestas condições. Apesar da molécula conter uma cadeia alquílica relativamente grande, sua fluorescência é originada no núcleo BTD, sendo esta região a parte polar da molécula e por isso sendo observada uma estabilização com o aumento desta polaridade

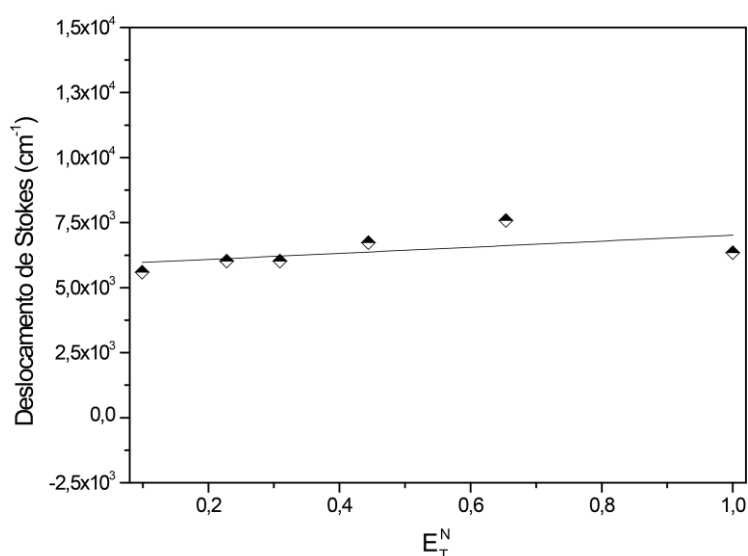


Figura 36. Correlação de Lippert-Mataga com os deslocamentos obtidos.

O valor de R^2 para a molécula é bastante baixo (0,13) o que indica que o composto sofre alterações de seus momentos dipolares no estado excitado com a variação do solvente. Possivelmente a sensibilidade desta molécula com a variação do solvente ocorre devido a esta substância ser anfifílica, não sendo seu comportamento linear com o aumento da polaridade do meio. Nota-se pelo gráfico que solventes de polaridade média levaram a maiores deslocamentos de Stokes que solventes com nenhuma ou muita polaridade.

Afim de melhor se compreender a variação da densidade eletrônica da molécula durante a estabilização do estado excitado, bem como confirmar a proposta de estabilização por ICT (proposto através dos experimentos fotofísicos) foram realizados experimentos computacionais com esta nova molécula.

Estudos Computacionais

Para os estudos computacionais da substância utilizou-se, assim como na molécula **BTDNHBTD**, a vertente da Teoria do Funcional da Densidade dependente do tempo (*time dependent density functional theory* - TD-DFT).⁵³ Esta vertente da DFT é bastante empregada para o cálculo dos estados excitado de moléculas, apresentando resultados de *band gaps* e transições eletrônicas bastante precisos.⁸⁹ Esta teoria também já se mostrou eficaz para sistemas BTDs com um uma ligação de hidrogênio intramolecular similar ao do **BTD-AO**, conforme recentemente descrito por Brenno e Laurent.¹⁸

Para otimização da geometria molecular foi utilizado o funcional CAM-B3LYP.⁵¹ Como já descrito no Capítulo 2, este se baseia no funcional híbrido B3LYP porém com modificações para atenuações coloumbicas (por isso a sigla CAM, *coloumb attenuating method*). Estes parâmetros dão uma maior flexibilidade ao funcional o que melhoram os resultados de cálculos obtidos. Já sendo comprovado na literatura que este método possui uma melhor acurácia para efeitos de polarização em cadeias longas, processos de excitação e transferências de carga no estado excitado. A função de base utilizada para este funcional foi a 6-311G(d), uma função do tipo triple zeta que trata com um uma maior precisão os elétrons de valência.

A geometria da molécula otimizada apresenta apenas uma variação no ângulo da insaturação da cadeia alquílica quando comparada a geometria pré otimização, como pode ser visto na Figura 37. Nota-se pouca diferença entre as geometrias da molécula no estado gasoso e solvatada em meio aquoso.

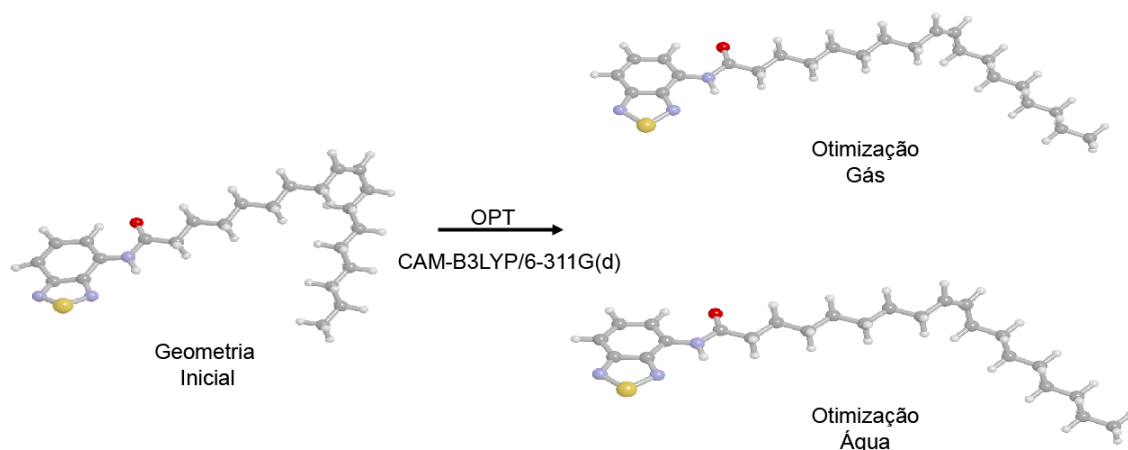


Figura 37. Geometria inicial e Geometrias otimizadas para a molécula de **BTD-AO** em fase gasosa e água. O funcional utilizado foi o CAM-B3LYP e a função de base 6-311G(d).

O estudo computacional desta molécula também foi realizado levando-se em consideração os efeitos de solvatação em meio aquoso, uma vez que seu planejamento e síntese foram realizados para posterior aplicação biológica. Estes efeitos foram inseridos nos cálculos computacionais através do método SCRF, sendo o solvente representado por uma constante dielétrica ao redor da molécula.

Com as geometrias da **BTD-AO** otimizadas buscou-se então o melhor funcional para o cálculo das energias deste composto. Esta busca foi realizada através de uma varredura de cálculo com diversos funcionais, todos baseados no método TD-DFT (Tabela 1), sendo o funcional escolhido aquele cujo comprimento de onda para excitação eletrônica da molécula se aproximou mais do obtido experimentalmente em meio aquoso.

Tabela 4. Resultados dos cálculos realizados para **BTD-AO**, no seu estado fundamenta e excitado obtido através de diferentes funcionais de correlação e troca (XC), e função de base 6-311+g(2d,p). As geometria utilizada para o cálculo da energia foi otimizada pelo método CAM-B3LYP combinada com a função de base 6-311G(d).

Funcionais	Estado	$\mu(D)$		HOMO(eV)		LUMO(eV)		$\Delta E_{HOMO-LUMO}(eV)$		$\lambda_{abs}(nm)$	
		Gás	Água	Gás	Água	Gás	Água	Gás	Água	Gás	Água
B2PLYP	S₀	1,9736	3,0491	-7,168	-7,209	-1,284	-1,310	5,886	5,899	341,74	343,18
	S₁	2,4862	3,4578	-6,671	-6,730	-1,660	-1,715	5,010	5,014	-	-
B3LYP	S₀	1,9368	3,0588	-6,332	-6,358	-2,634	-2,644	3,698	3,714	394,21	394,62
	S₁	2,2225	3,3835	-5,960	-5,975	-2,971	-2,984	2,990	2,990	-	-
CAM-B3LYP	S₀	1,9763	3,1089	-7,664	-7,696	-1,496	-1,510	6,168	6,186	347,58	347,63
	S₁	2,2882	3,4559	-7,233	-7,249	-1,868	-1,895	5,364	5,355	-	-
M062X	S₀	2,0647	3,2418	-7,526	-7,587	-1,701	-1,734	5,824	5,853	340,79	340,40
	S₁	2,3759	3,5739	-7,079	-7,124	-2,078	-2,125	5,002	4,999	-	-
PBE1PBE	S₀	1,9477	3,0554	-6,526	-6,575	-2,477	-2,508	4,049	4,066	380,32	380,61
	S₁	4,8057	3,4053	-6,139	-6,177	-2,822	-2,860	3,316	3,317	-	-
wB97XD	S₀	1,9684	3,0940	-8,202	-8,251	-0,863	-0,894	7,339	7,357	344,33	344,98
	S₁	2,2852	3,4471	-7,775	-7,809	-1,233	-1,278	6,542	6,531	-	-

A função de base utilizada para todos os cálculos de energia nos diferentes funcionais foi a 6-311+g(2d,p). Nesta função além de se considerar os orbitais “d” do sistema, foi também considerada uma função de polarização para os orbitais “p” do átomo de hidrogênio. Existe nesta molécula uma região de ligação de hidrogênio entre o nitrogênio do núcleo BTD e o hidrogênio ligado a amida, o efeito de polarização adicionado ao cálculo permite, desta maneira, uma maior assimetria orbitais deste átomo em relação ao núcleo, dessa forma, qualquer distorção causada por este tipo de interação foi considerado. Devido a ligação de hidrogênio e também a possibilidade de outras interações fracas na molécula a função de base também foi aumentada para uma função difusa, indicado pelo símbolo “+”. As funções difusas possuem expoentes que decaem lentamente com a distância, sendo desta maneira as interações mais fracas da molécula levadas em consideração.

Os resultados obtidos através do funcional PBE1PBE conduziram ao comprimento de absorção em água ($\lambda_{max\ teor. (abs)} = 380,61$), um valor bastante

próximo do valor experimental ($\lambda_{\text{max exp (abs)}} = 379 \text{ nm}$). Os funcionais B2PLYP, CAM-B3LYP, M062X e wB97XD apresentaram valores mais energéticos de absorção para a molécula solvatada. O método B3LYP levou a uma menor energia de absorção, sendo esta tendência já relatada na literatura para moléculas com fortes transferências de carga.^{18,90,91} Este erro é muitas vezes causado devido ao potencial eletrônico de moléculas com este tipo de transferência não ser tratado corretamente pelo funcional aplicado. Grandes mudanças de localização de elétrons pela molécula, causados por transferências de carga fazem com que existam grandes distâncias elétrons núcleos, sendo necessário assim um funcional que leve em consideração esta distância, com o decaimento do potencial não tão abrupto com o aumento da distância elétron-núcleo.⁹² A descrição de todos os funcionais utilizados nesta varredura pode ser vista no Capítulo 7 deste trabalho.

O funcional escolhido bem como a função de base utilizados para execução dos cálculos de energia (resultados de orbitais e de densidade eletrônica) foram o PBE1PBE/6-311+G(2d,p) o mesmo utilizado para a molécula de **BTDNHBT** previamente descrito no capítulo 2 do trabalho.

Os orbitais atômicos HOMO e LUMO e também a diferença de densidade eletrônica entre o estado excitado e fundamental podem ser observados na Figura 38.

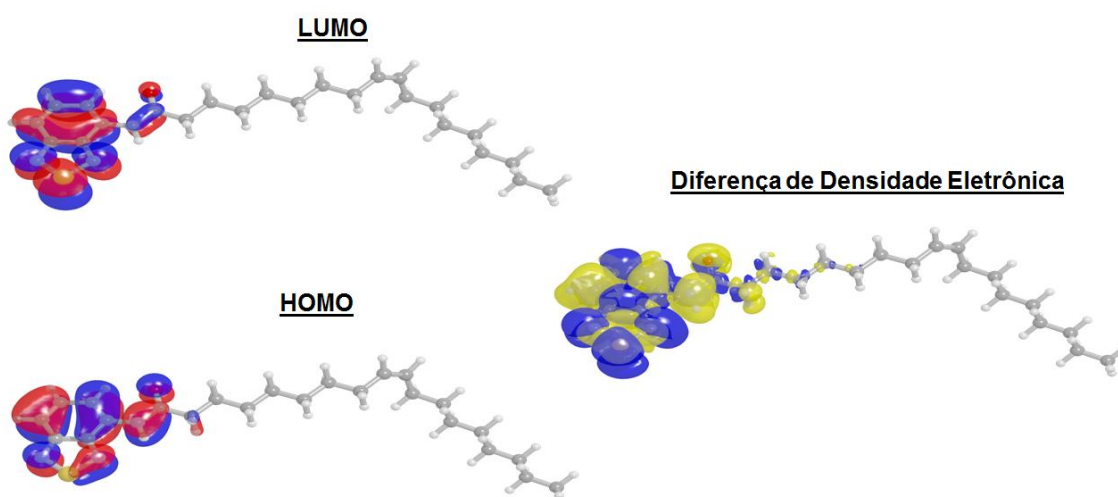


Figura 38. Geometria otimizada com plot dos orbitais HOMO e LUMO (esquerda). Diferença de densidade eletrônica entre os estados S0 e S1 (direita).

Através dos orbitais atômicos observa-se que a densidade eletrônica dos orbitais de fronteira da molécula de **BTD-AO** estão centrados no anel BTD e na amida presente na molécula. Não é observada nenhuma densidade de carga na cadeia alifática da molécula, esta ausência ocorre devido aos elétrons desta região serem bastante estáveis, sendo a energia de seus orbitais eletrônicos baixa o suficiente para que estes não participem dos orbitais de fronteira da **BTD-AO**.

O maior caráter LUMO no anel 2,1,3-tiadiazola evidencia o caráter aceptor eletrônico desta parte da molécula, sendo este orbital perceptível em todo o núcleo BTD. A densidade do orbital HOMO é maior na região do anel benzênico da BTD e menor no anel 2,1,3 tiadiazola da molécula.

A diferença de densidade eletrônica para a molécula mostra o comportamento dos elétrons quando esta é excitada. As regiões moleculares onde houve uma diminuição de densidade eletrônica são representadas pelas superfícies amarelas, e seu aumento representado pela superfície azul. Através da Figura X nota-se que ao ser excitada, esta molécula realiza uma transferência de carga para o anel 2,1,3 tiadiazola da BTD, sendo reduzidas as densidades eletrônicas do anel benzênico e principalmente na amida ligada a este núcleo. Nota-se uma participação muito pequena de transferência eletrônica pelos carbonos α e β da cadeia alquílica.

Esta análise mostra que a **BTD-AO** realiza processo de ICT para estabilização do estado excitado, podendo este processo também ser observado através do diagrama de energia dos orbitais moleculares para a molécula em ambos os estados, fundamental (S_0) e excitado (S_1) como pode ser visto na Figura 39.

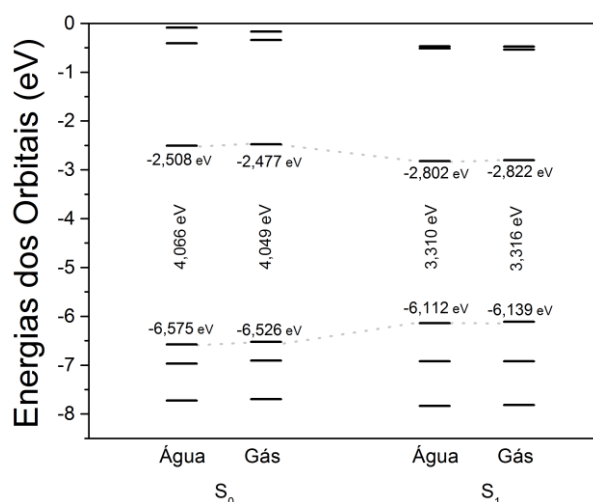


Figura 39. Diagrama de energia dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula no estado S₀ e S₁ em meio gasoso e aquoso

A diminuição do *band gap* entre os orbitais HOMO e LUMO do estado S₀ para o S₁, é bastante evidente. Esta estabilização é de 0,756 eV em meio aquoso e 0,733 eV em meio gasoso. Assim, há uma maior estabilização da molécula em meio aquoso (apesar desta estabilização ser bastante pequena), mostrando que o efeito do solvente também deve ser levado em consideração para esta molécula. Deve-se ressaltar que só através dos estudos computacionais envolvendo **BTD-AO** foi possível concluir que esta molécula sofre estabilização por ICT, uma vez que a regressão linear (R²) fornecida pelo gráfico de Lippert-Mataga foi baixa quando comparada a linearidades de moléculas que apresentam uma alta estabilização por ICT.¹⁷

Imageamento e Dinâmica celular

Com o composto caracterizado quimicamente foram então realizados os ensaios biológicos com a nova sonda fluorescente. Nestes ensaios foram utilizadas inicialmente uma linhagem de células (vivas) de câncer de mama invasivo MDA-MB-231.

As imagens celulares foram adquiridas através da excitação em 405-488 nm. Nesta faixa de excitação foi possível a observação do fluoróforo em meio celular (dentro da célula) em duas faixas de emissão, uma correspondente a coloração verde e a outra azul. A característica multicolor apresentada pelo fluoróforo **BTD-AO** é extremamente interessante em experimentos de imageamento celular, onde podem ser utilizados mais de um marcador para o monitoramento simultâneo de diferentes especificidades celulares. Através dos experimentos fotofísicos realizados, exclui-se que a mudança de cor deste fluoróforo ocorra devido à formação de excímeros.

A realização dos experimentos em duas temperaturas distintas (4 °C e 37 °C) permite que sejam estudados os mecanismos de internalizados de derivados lipofílicos com perfil lipídicos, como o que ocorre com os ácidos graxos para o meio celular. Na temperatura de 4 °C são inibidos os processos de endocitose celular, uma vez que nesta temperatura a bicamada fosfolipídica da célula perde a mobilidade necessária para realização deste processo. Os imageamentos com as células incubadas após cinco minutos com o marcador podem ser visualizados na Figura 40.

Todos os experimentos biológicos foram realizados pelo professor José Raimundo Corrêa e seu grupo de pesquisa no Laboratório de Microscopia Eletrônica no Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. (IB-UnB)

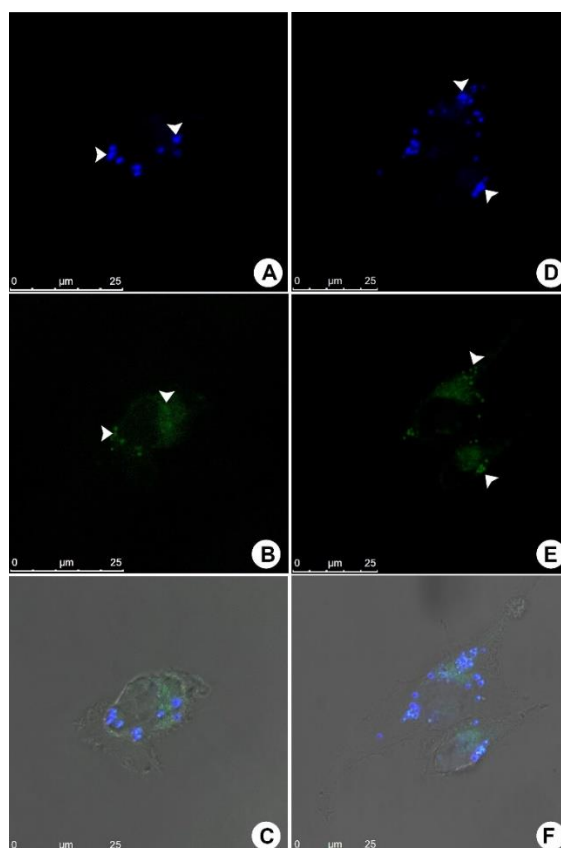


Figura 40. Células de câncer de mama MDA-MB-231 incubadas com **BTD-AO** a 4 °C (A-C) e a 37 °C (D-F) por 5 minutos. A sonda foi observada acumulada em vesículas próxima a regiões periféricas da célula. Observa-se os mesmos resultados para ambas as temperaturas testadas, como indicado pelas setas nos painéis (A), (B), (C) e (E). O sinal fluorescente azul é visto em (A) e (D) enquanto a emissão verde é visualizada em (B) e (E). (C) e (F) mostram a morfologia normal da célula por microscopia de contraste de fase. Barra de escala em 25 µm.

Pelos primeiros 5 minutos de incubação, observa-se que o marcador celular foi rapidamente absorvido pela célula, mesmo a baixas temperaturas (4 °C). Esta indiferença de absorção relacionada à temperatura mostra que a movimentação dos ácidos graxos para o interior da célula ocorre por mecanismos específicos, que não dependem do estado físico da membrana celular (não há invaginação da membrana a 4 °C), ocorrendo assim por processos ativos, correlacionados a existência de proteínas específicas responsáveis pelo carreamento destes ácidos e por proteínas translocases celulares específicas que realizam a passagem desta substância pela bicamada fosfolipídica.^{11,92} [ENREF 34](#) A intensidade de emissão do marcador também

não sofreu alterações durante todos os experimentos de imageamento celular, não apresentando assim fotodegradação pela fonte de excitação do microscópio, confirmando desta maneira os estudos computacionais, que mostraram uma alta estabilidade fotoquímica desta molécula devido à realização de processos ICT.

Os resultados do imageamento celular com as amostras incubadas durante 15 minutos podem ser visualizados na Figura 41.

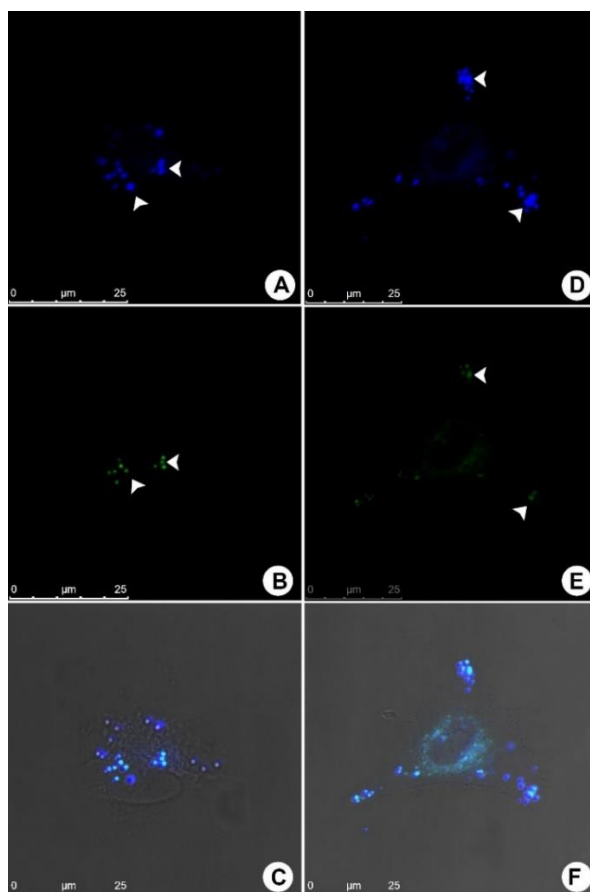


Figura 41. Células de câncer de mama MDA-MB-231 incubadas com **BTD-AO** a 4 °C (A-C) e a 37 °C (D-F) por 15 minutos. A sonda foi observada acumulada em vesículas próxima a regiões periféricas e em locais mais internos da célula. Observa-se os mesmos resultados para ambas as temperaturas testadas, como indicado pelas setas nos painéis (A), (B), (C) e (E). O sinal fluorescente azul é visto em (A) e (D) enquanto a emissão verde é visualizada em (B) e (E). (C) e (F) mostram a morfologia normal da célula por microscopia de contraste de fase. Barra de escala em 25 μm.

Através destes resultados nota-se a mesma distribuição intracelular do novo fluoróforo para as temperaturas de 4 °C e 37 °C, como observado no tempo de incubação de 5 minutos. Desta forma, a taxa de absorção do fluoróforo pela

célula é similar em ambas as temperaturas. Devido a posição e a forma do marcador na célula, pode-se associá-lo às estruturas chamadas de corpúsculos lipídicos (CL). Estes resultados também demonstram a dinâmica da captação, empacotamento e tráfego celular destes lipídios. A relevância deste resultado reside na possibilidade de estudos das interações e mobilização destes lipídios com diferentes organelas celulares como por exemplo mitocôndrias e retículos endoplasmáticos.

Os experimentos de 30 e 60 minutos (Figura 42 e Figura 43) mostram a “migração” dos CL para a proximidade do núcleo da célula, sendo observado um número cada vez maior destes em regiões mais internas da célula com o passar do tempo.

A migração dos CL para as regiões celulares mais internas, próximas ao núcleo, relaciona-se ao estoque de lipídios pela célula, onde estes serão processados nas mitocôndrias, as quais são abundantes na região nuclear, onde os lipídeos deverão ser metabolizados.⁹³ Desta maneira os resultados obtidos por imageamento celular, após 60 minutos de experimento (Figura 43), estão de acordo com esta proposta.

O comportamento do marcador celular **BTD-AO**, desta maneira, é similar ao esperado para os ácidos graxos de cadeia longa, sendo o processo de absorção celular destas substâncias já proposto e descrito na literatura.⁹⁴

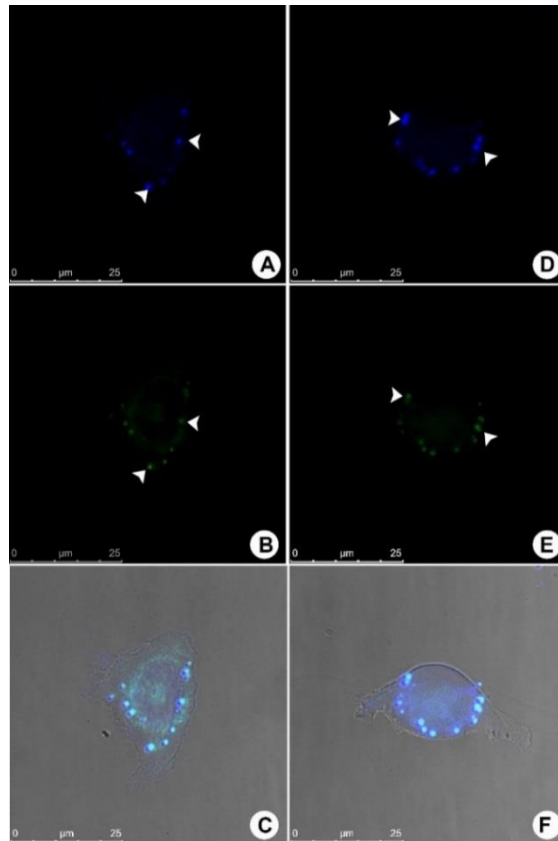


Figura 42. Células de câncer de mama MDA-MB-231 incubadas com **BTD-AO** a 4 °C (A-C) e a 37 °C (D-F) por 30 minutos. A sonda foi observada acumulada em vesículas (gotas lipídicas) próxima a regiões periféricas e em locais mais internos desta. Observa-se os mesmos resultados para ambas as temperaturas testadas, como indicado pelas setas nos painéis (A), (B), (C) e (E). O sinal fluorescente azul é visto em (A) e (D) enquanto a emissão verde é visualizada em (B) e (E). (C) e (F) mostram a morfologia normal da célula por microscopia de contraste de fase. Barra de escala em 25 μm .

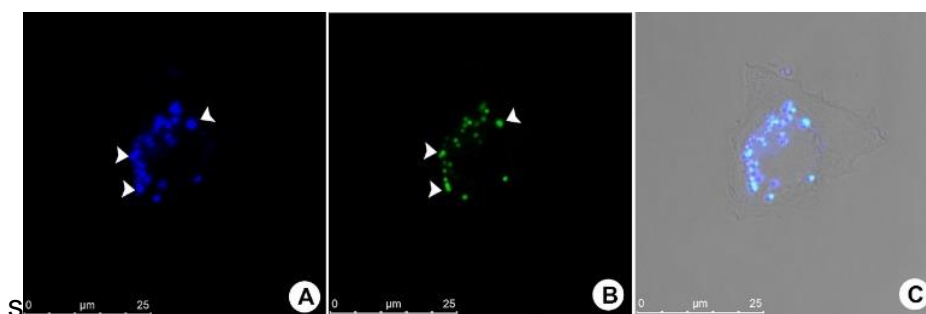


Figura 43. Células de câncer de mama MDA-MB-231 incubadas com **BTD-AO** 37 °C por 60 minutos. A sonda foi acumulada em gotas lipídicas e somente próximas ao núcleo celular. (A) Emissão azul e (B) emissão verde. (C) morfologia normal da célula por microscopia de contraste de fase. Barra de escala em 25 μm.

Para a confirmação de que a sonda **BTD-AO** foi de fato internalizado pela célula e não permaneceu acumulada na parede da membrana fosfolipídica da bicamada celular, foram realizadas análises ortogonais de imageamento celular (Figura 44).

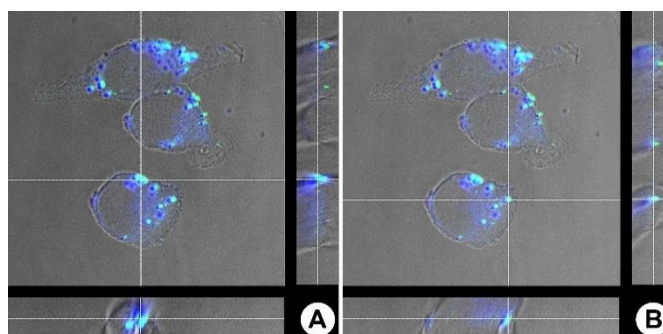


Figura 44. Análise ortogonal das célula MDA-MB-231 incubadas com **BTD-AO** por 60 minutos. A sonda foi acumulada em vesículas próximas ao núcleo celular. A intercessão da linhas em (A) e (B) mostram o ponto de interação em cima de uma vesícula. As imagens do lado direito de (A) e (B) mostram a visão lateral em 3D formada pelo empilhamento de imagens. As imagens abaixo de (A) e (B) mostram a visão de baixo das imagens em 3D. Ambos os pontos de vista mostram a vesícula dentro do citoplasma. (A) e (B) mostram diferentes vesículas contendo a nova biossonda (**BTD-AO**).

As imagens obtidas pela análise ortogonal, com uma boa localização celular após a internalização, permitiram uma rotação de 360° (rotação 3D) mostrando a posição dos CL dentro do citoplasma e em diferentes posições.

Durante os experimentos de imageamento celular não foram observados efeitos citotóxicos estatisticamente significativos utilizando-se **BTD-AO**. Para confirmar que este novo marcador celular não apresenta características citotóxicas foram realizados testes com quatro linhagens de células cancerígenas e uma linhagem normal (Figura 45), de maneira a identificar qualquer citotoxicidade deste composto. Nestes testes utilizou-se para a incubação celular uma concentração do marcador 100 vezes maior da qual foram realizados os experimentos de imageamento já apresentados

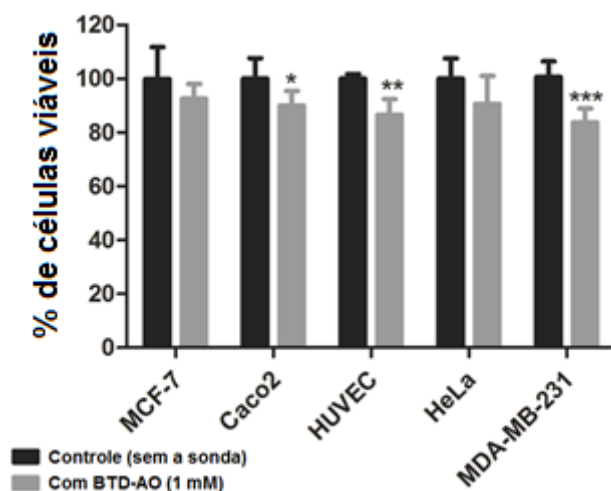


Figura 45. Viabilidade celular medidas por um ensaio de MTT em cinco linhagens celulares durante o período de 60 minutos. Note que a concentração de **BTD-AO** (1 mM) é considerada alta para ser utilizada em experimentos de imageamento celular. *P < 0,05, ** P < 0,01 e ***P < 0,001 versus o controle (sem aplicação da sonda).

Finalmente, para se ter uma melhor compreensão acerca do comportamento deste novo marcador celular, bem como observar se há o mesmo comportamento desta sonda a 4 °C, foram realizados ensaios biológicos de imageamento celular em mais três linhagens de células cancerígenas (MCF-7, Caco-2 e HeLa) e uma normal (HUVEC), conforme visualizado na Figura 46. Em todos os experimentos realizados com estas amostras, foram obtidos resultados similares aos já observados e discutidos para a linhagem celular MDB-MA-231. Nestas quatro linhagens celulares testados, após 60 minutos de incubação, a sonda **BTD-AO** foi encontrada em regiões próximas ao núcleo

celular (Figura 46), o que confirma mais uma vez que esta sonda apresenta um elevado potencial para estudos celulares *in vivo* com ácidos graxos (e seus derivados) e suas respectivas dinâmicas de internalização e metabolismo.

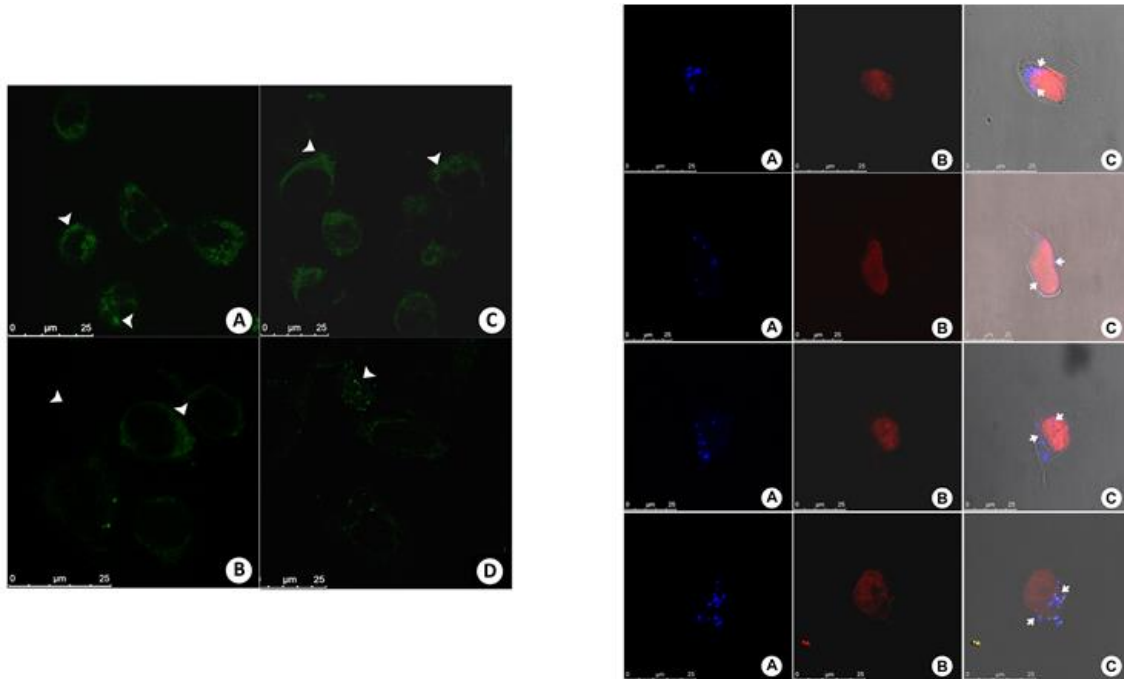


Figura 46. (Esquerda): Células HUVEC incubadas com **BTD-AO** após (A) 5 min (4 °C), (B) 15min (4 °C), (C) 30 min (4 °C) e (D) 60 min (37 °C). (Direita): Células (MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2 e HeLa, respectivamente) incubadas com **BTD-AO** durante 60 minutos. (A) Gotas lipídicas marcadas com **BTD-AO** (emissão no canal azul). (B) Núcleo celular marcado com iodeto de propídio (vermelho). (C) Morfologia normal de da célula obtida através da microscopia de contraste, com ambos os marcadores excitados. Em todas as imagens a barra de escala se encontra em 25 μ M.

Docking e Design Molecular do Marcador.

Nesta seção será discutido a série de características em que se baseou o planejamento da nova sonda celular **BTD-AO** e os princípios biológicos envolvidos no design racional da nova sonda fluorescente.

O docking molecular simula computacionalmente a formação de complexos receptores ligantes, utilizando estas simulações afim de se entender as interações existentes entre duas moléculas.⁹⁵ São gerados durante um

experimento de docking um grande número de conformações do complexo molecular, normalmente sendo este complexo um ligante e uma proteína. O objetivo deste cálculo encontrar o melhor ajuste entre ambas as moléculas.

Atualmente os experimentos de docking molecular são realizados em *softwares* de modelagem contendo vários algoritmos, utilizados para realizar a busca de conformações estáveis em um dado grau de liberdade translacional, rotacional e conformacional do complexo ligante receptor envolvidos.

Os resultados obtidos através de ensaios biológicos para a **BTD-AO** mostraram um eficiente método de captação e tráfego destas substâncias para o interior celular. O transporte citosólico de ácidos graxos é realizado através de uma classe de proteínas responsáveis por este carreamento, as chamadas proteínas ligantes de ácidos graxos (*fatty acids binding proteins, FABPs*), sendo também a albumina uma transportadora destas substâncias.⁶⁴

Os experimentos de Docking molecular para o novo composto sintetizado foram realizados pela Prof. Dra. Thereza Amélia Soares da Silva, e seu grupo de pesquisa BIOMAT (*Biomaterial Modeling Group*), da Universidade de Pernambuco. Estes estudos permitiram um enriquecimento do trabalho através de uma melhor compreensão das interações existentes entre esta molécula, um derivado fluorescente de ácido graxo, e proteínas relacionadas ao transporte destas substâncias. Todos os resultados bem como as escolhas dos métodos de cálculos e análise dos resultados apresentados nestas do capítulo foram realizados desta forma pela pesquisadora e seu grupo de pesquisa.

Foram escolhidas duas proteínas para a execução dos cálculos de docking. A albumina e uma FABP. A estrutura da albumina utilizada para os cálculos de docking foi obtida através do banco de dados de proteínas (PDB ID 1BJ5), sendo sua estrutura obtida a partir de dados cristalográficos da interação desta com o ácido mirístico,⁹⁶ um ácido graxo saturado com 14 átomos de carbono. A FABP utilizada foi também obtida através do banco de dados de proteínas (PDB ID 2FJ), sendo esta estrutura com o ácido oleico caracterizada por RMN.⁹⁷

A albumina é conhecida como uma das principais carreadoras de ácidos graxos. A interação desta molécula a estas substâncias se dá por uma maior afinidade e que as lipoproteínas, havendo e condições normais até três ácidos

graxos ligados a uma albumina. O transporte de ácidos graxos livres pela corrente sanguínea também é realizado por esta proteína.⁶⁴

Como foi observado, houve a captação de moléculas de **BTD-AO** mesmo a baixas temperaturas (4°C), este processo pode, portanto, ocorrer através de proteínas específicas para o transporte destas substâncias pela membrana celular.

As FABPs são proteínas específicas para os ácidos graxos, sendo a estrutura utilizada neste trabalho originada das células musculares da asa de um gafanhoto (*Locusta migratória*).⁹⁷ Estas proteínas são semelhantes às encontradas em seres vertebrados, sendo a elucidação desta molécula já realizada com sua estrutura complexada ao ácido oleico, o que facilita a comparação dos dados experimentais com teóricos, uma vez que o mesmo tamanho da cadeia alquílica e insaturações são observadas para a molécula de **BTD-AO** e ácido oleico.

O método de procura utilizado pelo grupo de pesquisa da Prof. Thereza para encontrar as conformações mais estáveis entre receptor/ligante foi um método híbrido baseado no algoritmo genético de Lamarckian (LGA), implementado no software AutoDock4.^{98,99} A molécula de **BTD-AO** foi deixada completamente livre durante a realização do cálculo, sendo permitidas às variações conformacionais diferentes orientações e translações.

Os resultados obtidos através da interação da molécula de **BTD-AO** para a albumina podem ser observados a seguir,

Para a estrutura de raios-X da albumina ligada a molécula de ácido mirístico (PDB ID 1BJ5) são observadas cinco regiões de interação entre este ácido graxo e a proteína, como pode ser observado na Figura 47.ⁱⁱⁱ

ⁱⁱⁱ Todas as imagens obtidas a partir dos dados cristalográficos e cálculos de docking molecular foram geradas pelo grupo de pesquisa BIOMAT, da Prof. Dr. Thereza Amelia Soares da Silva (DQF-UFPE)

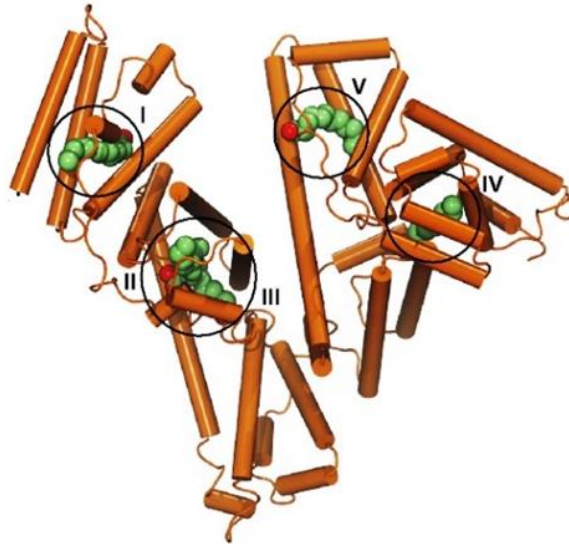


Figura 47. Estrutura de raios-X da albumina ligada a molécula de ácido mirístico (PDB ID 1BJ5) São destacadas cinco regiões de interação ácido graxo- proteína.

Foram calculadas para as mesmas regiões de interação do ácido mirístico (I,II,III, IV e V) as conformações mais estáveis da molécula de **BTD-AO** com a proteína, sendo os resultados discutidos a seguir.

Para os sítios de interação I II, e IV, as interações entre a nova sonda fluorescente e a proteína foram bastante similares as encontradas para o ácido mirístico, como pode ser visto nas **Figura 48** (Para uma melhor visualização os carbonos da **BTD-AO** foram representados da cor azul).

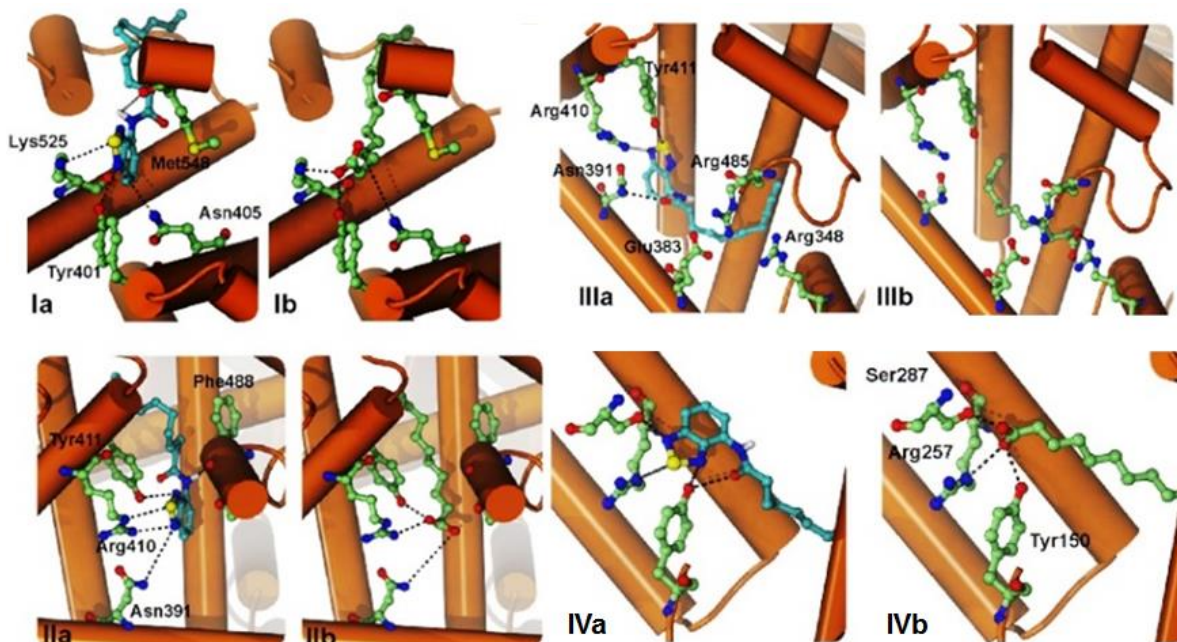


Figura 48. Estruturas de raios-X da albumina ligada a molécula de ácido mirístico (PDB ID 1BJ5, imagens Ib, IIb, IIIb e IVb) e as conformações previstas da BTD AO após sua ligação com a albumina (Ia,IIa, IIIa e IVa). A estrutura molecular da **BTD-AO** é mostrada em azul. As linhas pretas pontilhadas apontam potenciais sítios de interação de hidrogênio entre os ligantes e a proteína.

A conformação da cadeia alquílica de ambas as moléculas com a proteína foi bastante similar no sítio de interação I. As ligações de hidrogênio (representadas pelas linhas tracejadas pretas) entre os aminoácidos da proteína e a região polar da molécula também foram as mesmas, sendo mostradas três ligações destas moléculas com a proteína (Lisina 525, Asparagina 405 e Tirosina 401). No segundo sítio de interação, II, nota-se uma pequena mudança na conformação da cadeia alquílica, porém isto pode ocorrer devido ao maior número de carbonos da **BTD-AO**. Três aminoácidos interagem com ambos os ácidos graxos neste sítio, a Arginina 410, a Asparagina 391 e a Tirosina 411, nota-se que para a molécula de **BTD-AO** existe um maior número de ligações de hidrogênio com a arginina 440, resultando no total de quatro sítios, enquanto no ácido mirístico há apenas uma ligação entre a molécula e cada aminoácido.

No sítio de interação III, quando comparadas as disposições do ácido mirístico e da sonda **BTD-AO** observa-se uma inversão de suas posições, o que leva o ácido oleico a uma interação diferente com os aminoácidos deste sítio. A **BTD-AO** realiza ligações de hidrogênio com os aminoácidos arginina 440, asparagina 391, e tirosina 411, enquanto a parte polar do ácido mirístico realiza apenas uma ligação de hidrogênio com a arginina 348. A cadeia alquílica de ambas as moléculas interagem com os aminoácidos ácido glutâmico 383 e arginina 485.

Para o sítio IV são observadas interações de ambas as moléculas com os mesmos aminoácidos, sendo eles a serina 287 a arginina 257 e a tirosina 150. Assim como no sítio II, a molécula de **BTD-AO** apresentou um número maior de ligações de hidrogênio, existindo duas ligações deste com a tirosina 150. Este efeito é causado devido ao maior número de heteroátomos na molécula de **BTD-AO**, principalmente nitrogênios, o que aumenta desta maneira os sítios de interação entre esta e os aminoácidos da proteína.

A última análise com a albumina foi referente ao sítio 5, que pode ser visualizada na Figura 49.

Todas as imagens obtidas a partir dos dados cristalográficos e cálculos de docking molecular foram geradas pelo grupo de pesquisa BIOMAT, da Prof. Dr. Thereza Amelia Soares da Silva (dQF-UFPE)

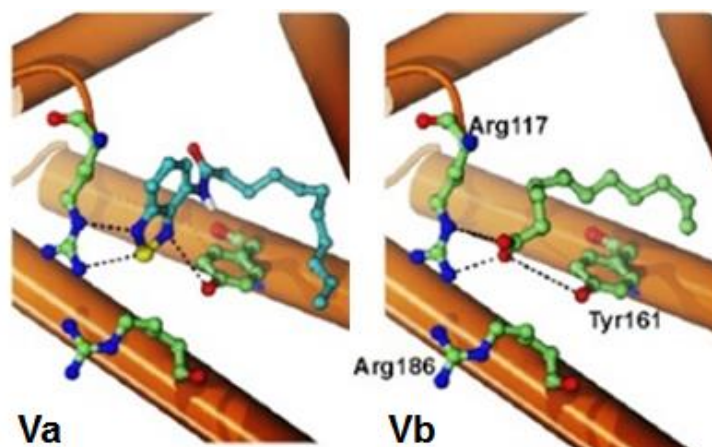


Figura 49. Estruturas de raios-X da albumina ligada a molécula de ácido mirístico (PDB ID 1BJ5, imagem Vb) e as conformações previstas da BTD AO após sua ligação com a albumina (imagem Va). A estrutura molecular da **BTD-AO** é mostrada em azul para maior destaque. As linhas pretas pontilhadas apontam potenciais sítios de interação de hidrogênio entre os ligantes e a proteína.

Observa-se uma mesma disposição espacial para a molécula de **BTD-AO** e ácido mirístico neste sítio, além disso, ambas realizam ligações de hidrogênio com os aminoácidos arginina 117 e tirosina 161, havendo uma ligação a mais para o núcleo BTD.

Não existem nas cinco interações entre este ácido e a proteína uma especificidade dos aminoácidos ao qual esta molécula realiza as ligações de hidrogênio, como pode ser visto pela variação destes em cada sítio de ligação. Esta não especificidade facilita a mimetização da **BTD-AO** a este ácido, uma vez que esta substância possui um número maior de átomos doadores/aceptores de hidrogênio quando comparadas a moléculas de ácido graxo.

A interação entre a sonda **BTD-AO** e a albumina resultou, em valor energético de aproximadamente $2,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ mais favorável, para o confôrmero mais estável, quando comparado com a interação do ácido mirístico e esta proteína. Esta maior estabilidade possivelmente decorre do maior número de ligações de hidrogênio realizado pelo núcleo BTD, uma vez que este possui mais átomos que favorecem esta interação, levando desta maneira a uma maior estabilidade ligante receptor.

Todas as imagens obtidas a partir dos dados cristalográficos e cálculos de docking molecular foram geradas pelo grupo de pesquisa BIOMAT, da Prof. Dr. Thereza Amelia Soares da Silva (dQF-UFPE)

A estrutura do ácido oleico ligado à FABP, obtida a partir do banco de proteína (PDB ID 2FLJ) pode ser vista na Figura 50.

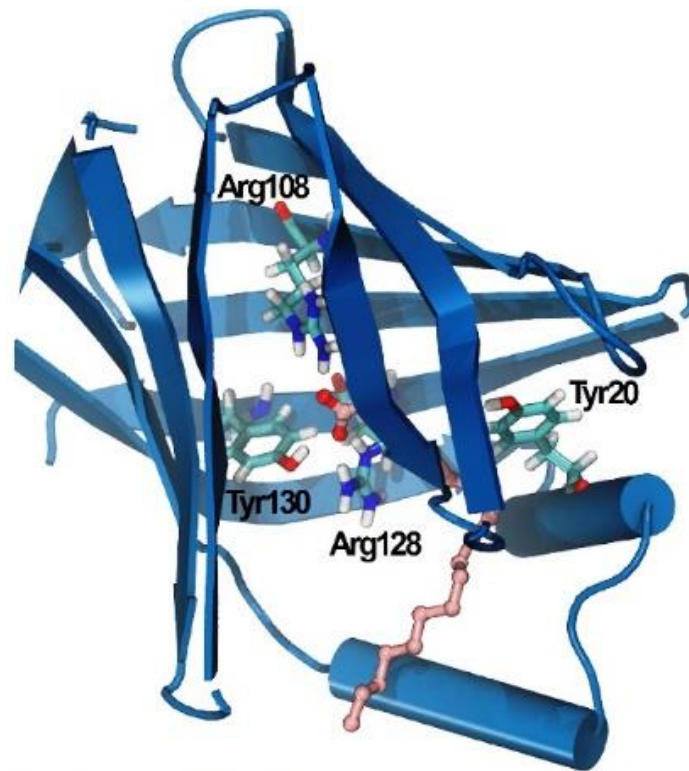


Figura 50. Estrutura de RMN da FABP ligada a molécula de um ácido oleico, destacado na cor rosa (PDB ID 2FLJ)

Nesta figura o ácido oleico foi destacado com seus carbonos colocados na cor rosa. Nota-se que a molécula de ácido graxo se encontra na cavidade desta proteína, interagindo com quatro aminoácidos. Duas argininas, 108 e 128 e duas tirosinas, 20 e 130.

A conformação de menor energia obtida para o cálculo de docking molecular da interação entre a **BTD-AO** e esta proteína pode ser visto na Figura 59

vii Todas as imagens obtidas a partir dos dados cristalográficos e cálculos de docking molecular foram geradas pelo grupo de pesquisa BIOMAT, da Prof. Dr. Thereza Amelia Soares da Silva (dQF-UFPE)

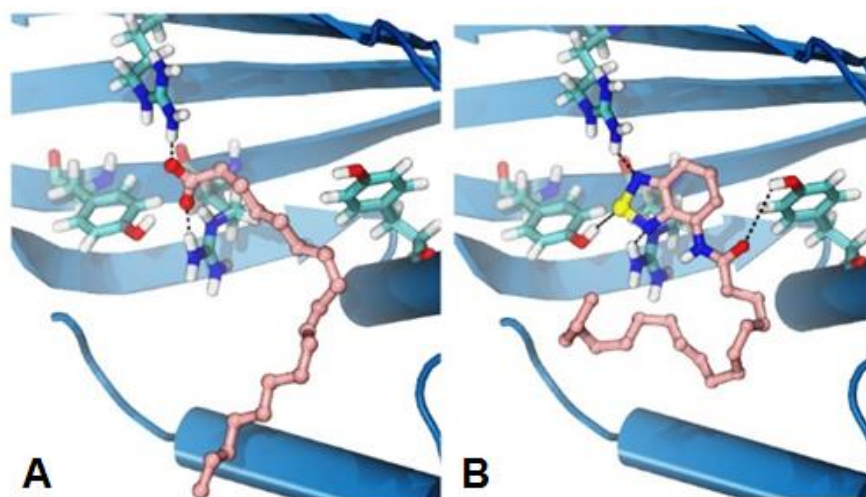


Figura 51. Estrutura de RMN da FAPB ligada a molécula de um ácido oleico (A) e a conformação prevista para a sonda **BTD-AO** ligada a proteína. As linhas pretas pontilhadas apontam potenciais sítios de interação de hidrogênio entre os ligantes e a proteína.

Os cálculos obtidos para a molécula mostram que a sonda **BTD-AO**, Figura 51 B se liga a mesma cavidade da proteína que o ácido oleico, Figura 51 A. Contudo é válido ressaltar que existe uma diferença na conformação da cadeia alquílica de ambas as moléculas, isto pois o ácido oleico apresenta uma cadeia mais linear que na molécula de **BTD-AO**. E devido esta conformação que a quantidade de sítios de interação de ambas as moléculas se diferem em relação ao número de ligações de hidrogênio.

Foi possível através dos cálculos de dockings (assim como os realizados para albumina) determinar que a molécula de **BTD-AO** possui um maior número destas interações, existindo quatro sítios de ligações de hidrogênio, dois com as argininas 108 e 128 e dois com as tirosinas 20 e 130 enquanto para o ácido oleico convencional observa-se apenas dois sítios de interação, ambos com as argininas, 108 e 128. A maior estabilização da sonda **BTD-AO**, frente ao ácido oleico, neste sítio da proteína é atribuída a este maior número de ligações de hidrogênio, sendo a energia resultante da interação **BTD-AO**-proteína por volta de 3 kcal mol⁻¹.

Todas as imagens obtidas a partir dos dados cristalográficos e cálculos de docking molecular foram geradas pelo grupo de pesquisa BIOMAT, da Prof. Dr. Thereza Amelia Soares da Silva (dQF-UFPE)

Os estudos de docking molecular mostraram que a nova sonda fluorescente **BTD-AO** consegue interagir com as proteínas responsáveis pelo carregamento dos ácidos graxos em meio celular de maneira análoga a estas substâncias. O anel BTD presente neste novo marcador sintetizado não mostrou qualquer impedimento estérico às interações desta molécula com a proteína, causando, pelo contrário, a sua presença trouxe um efeito benéfico para o sistema, uma vez que aumentou a estabilização nos sítios de interações estudados devido a um maior número de ligações de hidrogênio com os aminoácidos.

Conclusões

Neste capítulo uma nova sonda lipofílica fluorescente, derivada do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (**BTD-AO**) foi planejada, sintetizada, caracterizada e aplicada em experimentos de imageamento celular em células vivas. Sua utilização viabilizou estudos de mecanismos de internalização e dinâmica celular mesmo em baixas temperaturas (4 °C).

Os mecanismos de fluorescência deste composto foram estudados através de dados fotofísicos e estudos computacionais, sendo mostrados através da Química computacional como a molécula estabiliza seu estado excitado, além de quais regiões desta molécula estão envolvidos em seus processos de luminescência.

Os cálculos computacionais de docking molecular, realizados em colaboração com a Prof. Dra. Thereza Amélia da Silva Soares e seu grupo de pesquisa, permitiram um estudo das interações desta nova molécula fluorescente com as principais proteínas carreadoras de ácidos graxos, sendo mostrado a capacidade desta nova sonda em mimetizar estas substâncias.

Os experimentos celulares mostraram que este novo composto pode ser utilizado com sucesso para estudos de dinâmica e absorção celular de ácidos graxos de cadeia longa, não sendo até hoje descrito na literatura nenhum marcador tão eficiente quanto o apresentado neste trabalho. Existem poucos marcadores celulares que possuem afinidade e seletividade aos ácidos graxos e seus derivados,^{4 100} entretanto, nenhum com a mesma estabilidade e

seletividade pelas vias de captação, estoque e mobilização de ácidos graxos nas células.

Este composto se mostrou altamente estável a temperatura ambiente, não ocorrendo também mudanças de suas propriedades fluorescentes após os procedimentos de fixação celular, podendo estes ser realizados em uma sala com iluminação padrão. Não foi observada nenhuma citotoxicidade estatisticamente significativa com o uso do marcador **BTD-AO** durante todo o tempo de experimentação e por ensaios de MTT.

Atualmente este trabalho fornece a metodologia racional para estudos de absorção celular, dinâmica e rastreamento de ácidos graxos dentro de células vivas, incluindo experimentações realizadas a baixas temperatura (4°C), expandindo assim, os limites de aplicação de sondas fluorescentes aplicadas em estudos por imageamento celular.

A estratégia descrita poderá, posteriormente, ser aplicada para outros derivados lipídicos, em especial derivados de ácidos graxos de cadeia longa. Finalmente, a estratégia desenvolvida e aplicada neste trabalho poderá ser uma poderosa ferramenta de estudo da influência lipídica específica na regulação do sistema celular.

Capítulo 3

Síntese de uma sonda lipofílica fluorescente derivada de um ácido graxo essencial: BTD-DHA

Introdução

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPs) são uma classe de lipídeos que possuem em sua cadeia alquílica mais de uma insaturação. Estas substâncias possuem um papel fundamental no desenvolvimento humano, sendo associadas a formação de estruturas presentes no cérebro, olhos, músculos cardíacos e esperma.¹⁰¹⁻¹⁰⁴

Dentre os inúmeros AGPs, destaca-se o ácido docosahexaenóico (DHA), Figura 52, um ácido graxo essencial da classe dos ácidos ω -3, contendo seis insaturações em sua cadeia alquílica.

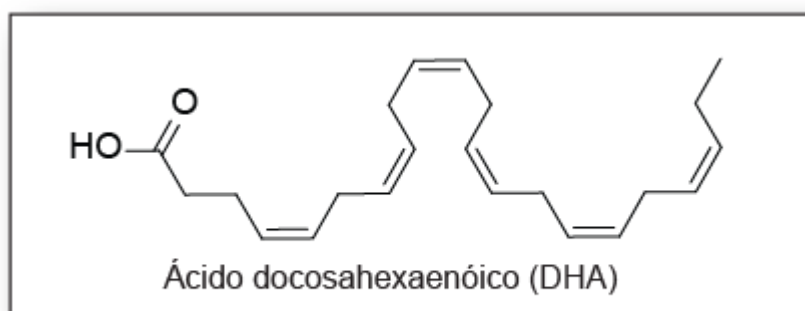


Figura 52. Estrutura molecular do ácido docosahexaenóico.

Esta substância é o ácido graxo presente em maior concentração no sistema nervoso central mamífero,¹⁰⁵ estando diretamente ligado a saúde dos seres humanos. Sua escassez pode acarretar em diversos problemas tais como: depressão, problemas cognitivos e tendências suicidas.^{106,107} Este ácido graxo é também o mais abundante na maioria das membranas celulares.¹⁰⁸

Os ácidos graxos da classe ω -3 não são produzidos *de novo* pelo organismo dos mamíferos, sendo as enzimas dessaturases, responsáveis pela oxidação dos carbonos da cadeia alquílica e formação das duplas ligações, capazes de produzir tão somente ligações a partir do quinto carbono contado a partir da metoxila.

Além do consumo direto, o DHA pode também ser sintetizado dentro das células a partir do ácido α -linolênico (AFA) sendo necessária a atuação de uma série de enzimas dessaturases e elongases (causando alongamentos e insaturações à cadeia alquílica deste ácido), Figura 53. Este processo é realizado no retículo endoplasmático, onde após a formação das insaturações e alongamento da cadeia alquílica esta substância é transportada para o peroxissomos e beta-oxidada. Referida síntese exige da célula um gasto exacerbado de energia,^{109,110} resultando em uma baixíssima conversão de menos 1% do AFA presente no organismo em DHA.

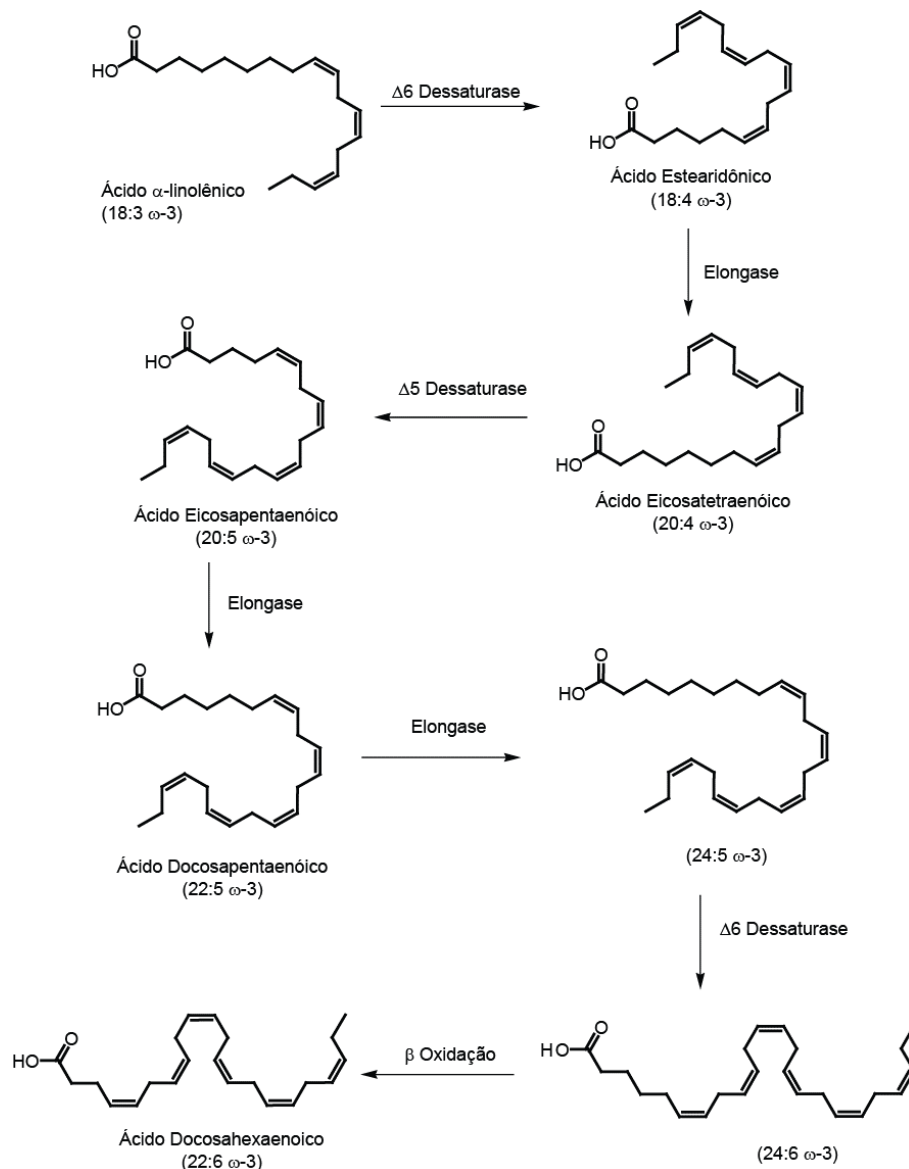


Figura 53. Síntese intracelular do DHA a partir do ácido- α -linoleico.

Desta maneira o DHA deve ser consumido pelo homem através de dietas ricas em peixes como salmão, atum e sardinha e em sementes como nozes, linhaça e canola.^{106,111,112}

A captação de ácidos graxos pelas células dos mamíferos é realizada por intermédio de uma série de proteínas de membranas relacionadas a estas substâncias. São elas: proteínas ligantes de ácido graxo (*fatty acid binding protein*, FABP), proteínas ligantes de ácidos graxos citoplasmáticas (*cytoplasmatic acid binding (protein*, CABP), translocases de ácidos graxos (*fatty acids translocase*, FAT) e proteínas transportadoras de ácidos graxos (*fatty acids transporter proteins*, FATP)^{10,113} Devido a sua cadeia alquílica hidrofóbica o transporte dessa substância requer mecanismos específicos, os quais carecem maior entedimento.^{113,92}

Existe uma lacuna na existência de sondas específicas para marcação da localização dos ácidos graxos nos tecidos celulares durante seu processo de captação, sendo o núcleo BODIPY uma das poucas moléculas modificáveis capaz de gerar derivados lipofílicos fluorescentes. Um deles é conhecido desde 2007 e não possui especificidade a um determinado ácido graxo,⁴ o outro foi desenvolvido a cerca de dois anos¹¹⁴ e possui fluorescência apenas quando internalizada por endossomos presentes na célula, permitindo assim, estudos das taxas de endocitose nesta organela. Ambos os compostos são derivados de fosfolipídios.

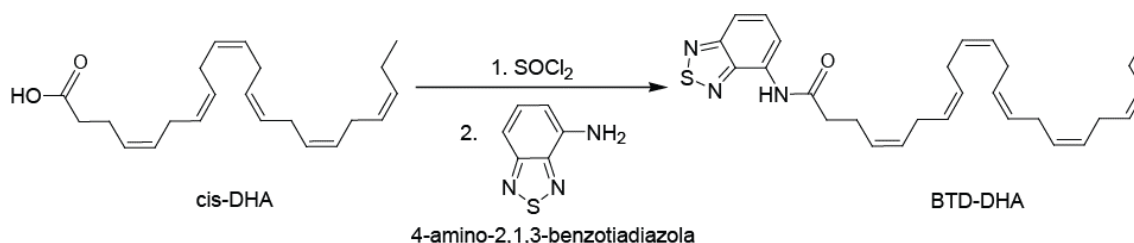
Nosso grupo vem trabalhando no desenvolvimento de moléculas fluorescentes análogas aos ácidos graxos de modo a incorporar o núcleo BTDDHA a estas substâncias, como vislumbrado na criação da **BTDDHA-AO**.³⁷ Esta estratégia mostra-se bastante promissora pois permite que o graxo marcado seja rastreado durante todo o processo de captação e dinâmica celular.

Observadas as inúmeras implicações dos lipídios no desenvolvimento humano.^{115,116} ante a carência de sondas fluorescentes dele derivadas.^{4,79} este capítulo apresenta a síntese de uma substância análoga ao ácido graxo DHA, demonstrando, além de todos os estudos físico-químicos com esta nova sonda, estudos do processo de captação deste ácido pelas células a temperatura de 4 °C e 37 °C, além de sua dinâmica em organismos vivos.

Resultados e discussão

Síntese de um derivado de ácido graxo poliinsaturado fluorescente- A BTD-DHA.

Para síntese do novo composto fluorescente, foi utilizada a mesma metodologia empregada no capítulo anterior, sendo formado um cloreto de acila derivado do ácido graxo para posterior formação de uma amida contendo o núcleo BTD, como pode ser observado no Esquema 3. Síntese da nova sonda fluorescente denominada BTD-DHA. O precursor para esta nova foi o ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosaheptaenóico (cis-DHA)



Esquema 3. Síntese da nova sonda fluorescente denominada BTD-DHA.

O ácido graxo cis-DHA, obtido comercialmente, não precisou de tratamentos prévios, sendo diretamente tratado com cloreto de tionila (SOCl₂) para formação do cloreto de ácido. Todo o procedimento reacional foi realizado em atmosfera inerte, de maneira a evitar a oxidação dos reagentes. Ao cloreto formado foi então adicionado a 4-amino-BTD, ocorrendo a substituição do átomo de cloro ligado a carbonila pelo nitrogênio ligado ao anel benzênico da BTD, formando assim uma amida. As condições reacionais nesta reação foram mais brandas que as utilizadas para a síntese da **BTD-AO** devido ao número de insaturações presentes no composto. O composto foi obtido com um rendimento de 57%. Sendo o produto caracterizado através dos espectros de ¹H e ¹³C RMN.

Estudos fotofísicos

Após a caracterização estrutural realizou-se o estudo fotofísico da substância, sendo observado o comportamento das curvas de absorção (UV-Vis) e emissão de fluorescência desta a mudanças de ambiente químicos causados pela variação do solvente.

Foram utilizados oito solventes para realização destes experimentos. Devido a característica extremamente hidrofóbica da **BTD-DHA**, não foi utilizada a solução aquosa para estudos de polaridade do solvente (para a construção do gráfico de Lippert-Mataga é necessária a mesma concentração do fluoróforo em todos os solventes utilizados).

Os espectros de absorção e emissão da molécula de **BTD-DHA** podem ser vistos na Figura 54.

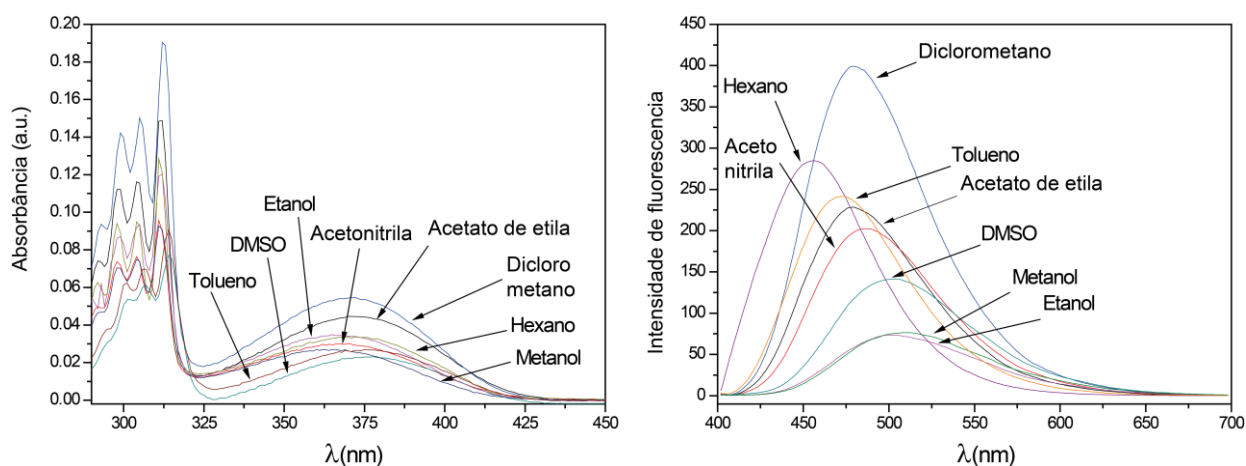


Figura 54. Espectros de absorção (UV-Vis, esquerda) e fluorescência (direita) da molécula de **BTD-DHA**.

Em todos os solventes o máximo da absorção no comprimento de onda menos energético foi de aproximadamente 375 nm. Esta absorção corresponde as transições eletrônicas do anel BTD presente na molécula, sendo energeticamente similar as observadas para a molécula de **BTD-AO**. Apesar de um maior número de insaturações presentes na molécula de **BTD-DHA**, estas não causaram um efeito batocrômico para estes deslocamentos. As absorções observadas de 300-325 nm correspondem a excitação dos elétrons da cadeia alifática. Por este composto apresentar um maior número de insaturações que a

molécula de **BTD-AO** um diferente perfil da banda de absorção foi observados nesta região.

Para o espectro de emissão observa-se uma variação dos deslocamentos com a mudança de polaridade do solvente, bem como a intensidade destas emissões. Em diclorometano, um solvente bastante apolar, a molécula apresentou uma maior intensidade de emissão, enquanto que em metanol e etanol estas intensidades foram bastante reduzidas, ambos solventes polares próticos. A ligação de hidrogênio entre a molécula e estes solventes diminui a capacidade de emissão do fluoróforo, porém não afetam muito sua absorvitividade molar, como pode ser visto no perfil de absorção da **BTD-DHA**. Os cálculos do deslocamento de Stokes e absorvitividade molar para a molécula de **BTD-DHA** podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Dados de UV-Vis e Emissão de fluorescência (em diferentes solventes) para a **BTD-AO** (concentração de 10 μ M)

Solventes	λ_{max} (abs)(nm)	log ϵ	λ_{max} (em)(nm)	Desl. Stokes (nm)
DMSO	378	3.36	504	126
Acetato de etila	373	3.65	479	106
Diclorometano	372	3.74	479	107
Acetonitrila	370	3.48	487	117
Tolueno	375	3.43	473	98
Etanol	365	3.54	500	135
Hexano	372	3.53	456	84
Metanol	365	3.43	511	146

Os valores do log ϵ para a molécula foram todos superiores a 3,30, indicando que a molécula de DHA é um bom cromóforo. Estes valores estão bastante próximos dos encontrados para a **BTD-AO**, sendo o número de insaturações na cadeia alquílica destas sondas lipofílicas indiferentes à capacidade do núcleo BTD na absorção de radiação.

Os deslocamentos de Stokes para a molécula de **BTD-DHA** foram altos em todos os solventes, sendo em tolueno o menor deles com 98 nm, e os maiores em etanol e metanol com 135 e 146 nm, respectivamente. Apesar da intensidade de fluorescência ser a menor observada para os solventes polares

próticos, nestes obteve-se uma maior estabilidade do estado excitado da molécula.

A solvatação da molécula através dos solventes metanol e etanol permite que a radiação por ela absorvida seja dissipada de outras formas que não a radioativa, o que é notado pelo seu valor de absorvitividade e a intensidade de fluorescência apresentada. Além disso, estes solventes também causam uma maior estabilidade desta molécula no estado excitado, acarretando em maiores deslocamentos de stokes. Este comportamento já foi observado em outros derivados de BTDD¹¹⁷ sendo proposta uma distorção do plano da molécula, causada pela substituição das ligações de hidrogênio intramoleculares pelas ligações soluto solvente, desfavorecendo assim, a emissão de energia por vias radioativas (Figura 55).

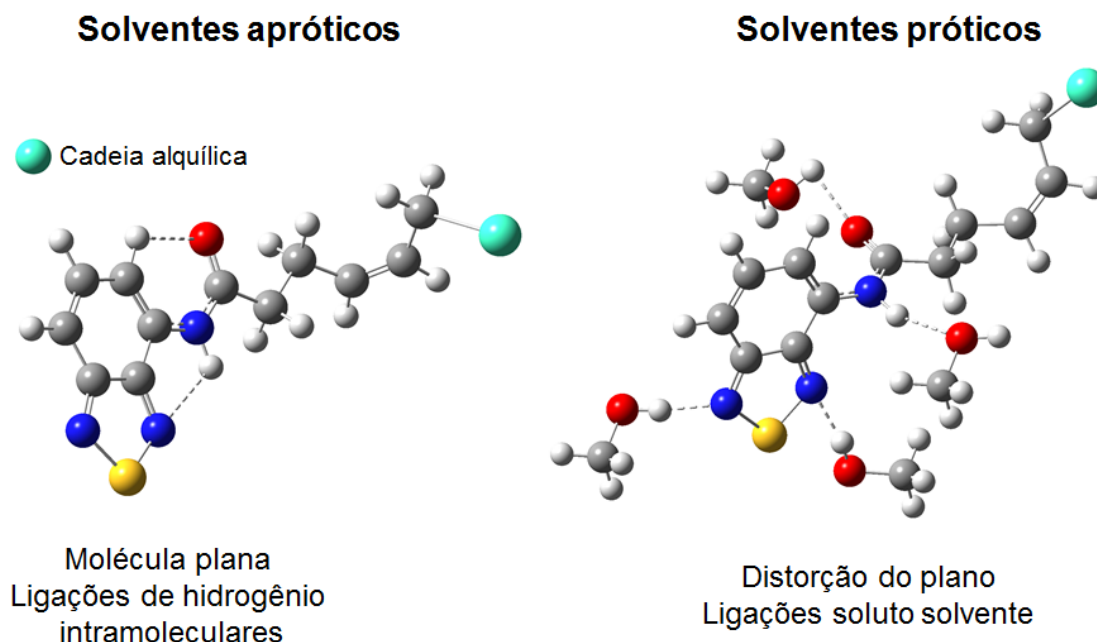


Figura 55. Exemplo de como o efeito de solvatação pode distorcer o plano da molécula de BTDD-DHA.

Com os deslocamentos de Stokes para a molécula nos diferentes solventes, também se construiu o gráfico de Lippert-Mataga para este composto, como pode ser visto na Figura 56.

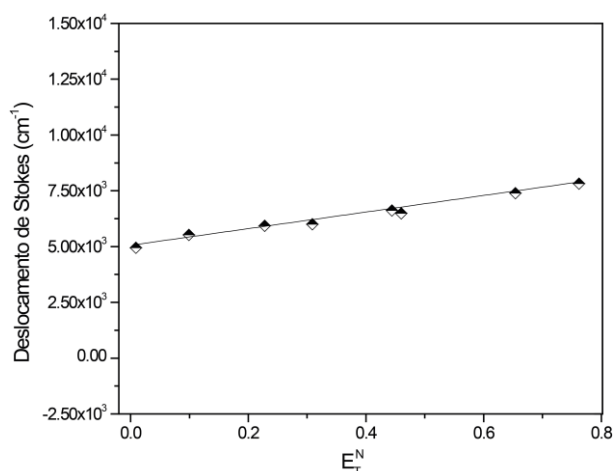


Figura 56. Correlação de Lippert-Mataga obtida através dos deslocamentos experimentais

Existe uma linearidade entre a estabilização da molécula no estado excitado e o aumento da polaridade do solvente. Para a **BTD-DHA**, quanto mais polar o meio em está solvatada, maior o deslocamento de Stokes. Ao contrário da **BTD-AO** que apresentou uma baixa regressão linear entre os pontos plotados, para a **BTD-DHA** obteve-se um valor de $R^2= 0,98$ considerado muito alto, o que evidencia a existência de um processo de estabilização intramolecular.

Foram realizadas titulações, variando-se a concentração do fluoróforo nas mesmas condições e solventes dos experimentos realizados com a **BTD-AO**:

- solução tampão de fosfato (pH=7) uma vez que a nova sonda lipofílica será utilizada para estudos fisiológicos;
- acetonitrila, como meio de evitar ligações de hidrogênio solvente-soluto, o que poderia desfavorecer a formação de excímeros;
- solução saturada de triton X100, um surfactante contendo uma cadeia alifática hidrofóbica e uma cadeia de óxido de polietileno hidrofílica, favorável a ligações de hidrogênio; e
- solução saturada de SDS, um surfactante assim como o triton X100, porém com uma menor estrutura molecular e iônica.

Ambas as soluções contendo os surfactantes favorecem a aproximação de moléculas de **BTD-DHA** uma vez que a liberdade destas moléculas em solução é reduzida e conseqüentemente a formação de excímeros favorecida.

Para a formação destas espécies é necessário que uma molécula excitada se choque com uma molécula no estado fundamental.

Os resultados das titulações nas condições supracitadas podem ser observados na Figura 57.

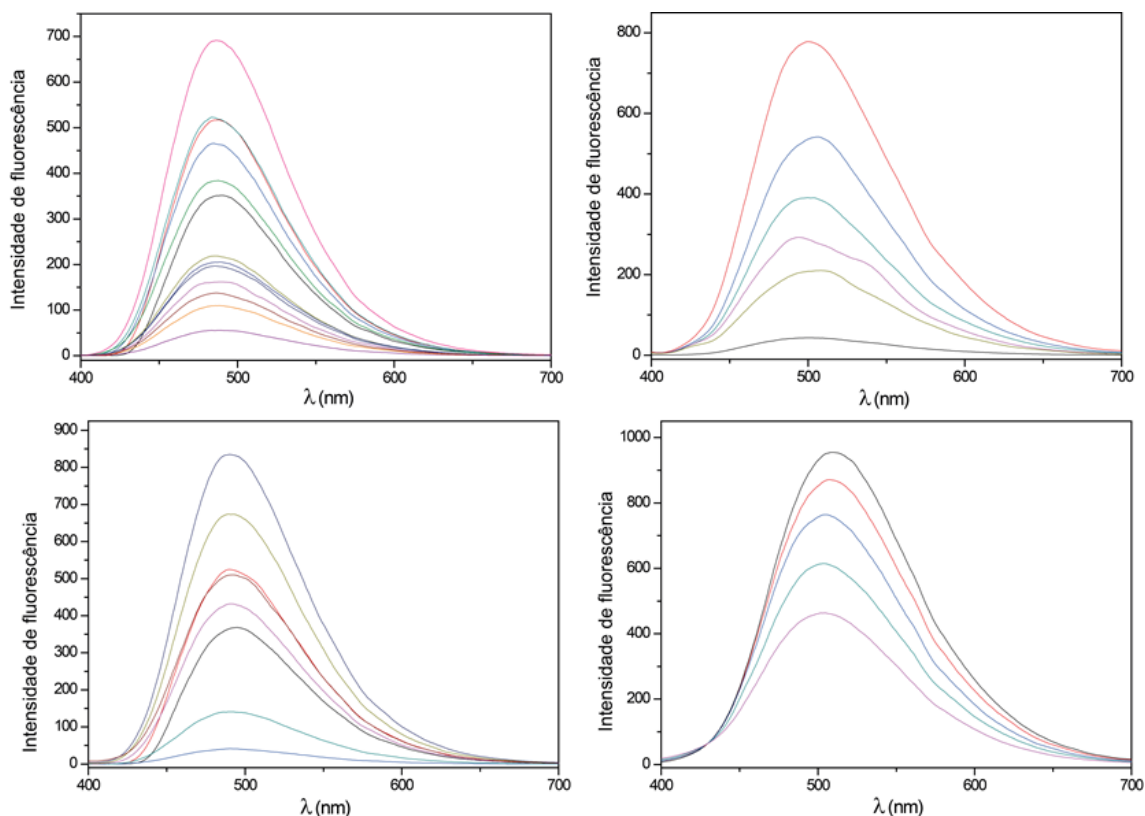


Figura 57. Acima, esquerda) Emissão da **BTD-DHA** em acetonitrila (2 μ M - 5 mM). (Acima, direita) Emissão da **BTD-DHA** em solução tampão de fosfato pH = 07 (170 μ M - 5 mM). (abaixo, esquerda) Emissão da **BTD-DHA** em solução de triton X100 (600 μ M - 8 mM) (Abaixo, direita) Emissão da **BTD-DHA** em solução de SDS (450 μ M - 3 mM)

Devido à ausência de mudanças de deslocamento nos experimentos, pode-se concluir que a **BTD-DHA** não forma estas espécies em solução.

Os procedimentos utilizados para a realização destes experimentos permitiram que fossem observadas as emissões deste fluoróforo em solução aquosa. O máximo de emissão para a **BTD-DHA** em solução tampão de fosfato foi de aproximadamente 500 nm, um comprimento de onda bastante próximo dos analisados durante os estudos de variação de solvente para esta substância.

Para o estudo dos mecanismos de estabilização intramoleculares na molécula de **BTD-DHA** foram realizados cálculos computacionais.

Estudos Computacionais

Os cálculos realizados com a molécula de **BTD-DHA** foram similares aos utilizados para a **BTD-AO** com a aplicação de métodos TD-DFT para otimização da geometria e cálculos das energias envolvidas na transição eletrônica deste fluoróforo.

A otimização da geometria da molécula foi realizada através do funcional CAM-B3LYP⁵³ com a função de base 6-311G(d). Esta combinação já foi utilizada em outras moléculas de **BTD** gerando geometria de acordo com dados cristalográficos¹¹⁸ além de resultados satisfatórios para a primeira sonda lipofílica fluorescente criada pelo grupo, a **BTD-AO**. Para a molécula de **BTD-DHA** foram encontradas duas geometrias otimizadas com energias bastante próximas, como pode ser observado na Figura 58

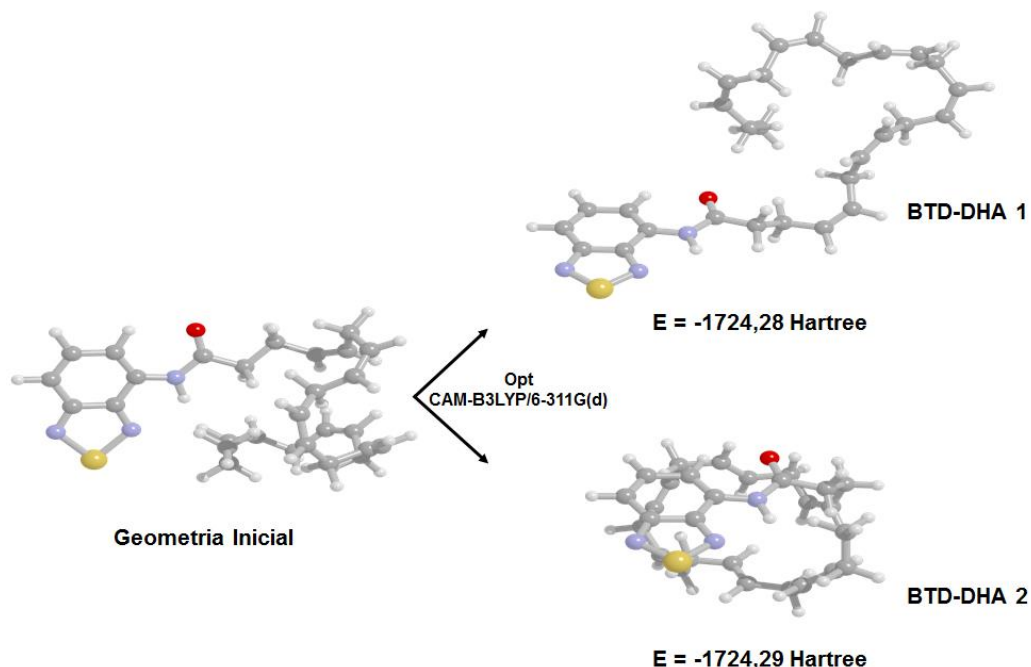


Figura 58. Geometria inicial e otimizadas para a molécula de **BTD-DHA** em fase gasosa. Nota-se a existência de duas conformações com energias bastante similares. O funcional utilizado foi o CAM-B3LYP e a função de base 6-311G(d)

Devido à proximidade energética de ambas as geometrias, foram realizados cálculos de energia e mapeamentos dos orbitais moleculares, além da diferença de densidade eletrônica para as conformações, uma vez tais espécies podem coexistir em solução (os valores energéticos mostrados na figura X foram calculados com a molécula solvatada em água através do modelo de solvatação contínua IEFPCM

Após a otimização da molécula foram realizados os cálculos eletrônicos para uma melhor compreensão do comportamento da molécula no estado excitado.

Os mapeamentos computacionais dos orbitais moleculares HOMO e LUMO, bem como a diferença de densidade eletrônica para a molécula foi calculado utilizando o funcional PBE1PBE⁵⁵ combinado com o conjunto de função de base 6-311+G(2d,p). As energias obtidas para a molécula solvatada e em meio gasoso podem ser vistas na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados obtidos dos cálculos de “single point” realizados para ambas as conformações da molécula de **BTD-DHA**, no estado líquido e gasoso. Utilizou-se o funcional PBE1PBE com a função de base 6-311+g(2d,p). As geometrias utilizada para este cálculo foram obtidas através do funcional CAM-B3LYP e função de base 6-311G(d).

Gometrias	Meio	$\mu(D)$	HOMO(eV)	LUMO(eV)	$\Delta E_{HOMO-LUMO}(eV)$	$\lambda_{abs}(nm)$
BTD-DHA-1	Gás	4,781	-6,649	-2,590	4,059	378,34
	Água	6,265	-6,591	-2,518	4,073	386,21
BTD-DHA-2	Gás	4,271	-6,496	-2,494	4,002	384,37
	Água	5,777	-6,602	-2,518	4,084	383,93

Observa-se na geometria **BTD-DHA-2** uma maior diferença de energia entre os orbitais quando a molécula esta solvatada no meio. Nela há uma maior estabilização do orbital HOMO em meio aquoso, enquanto o orbital LUMO sofre uma pequena queda com a solvatação, ao contrário da **BTD-DHA-1** que é instabilizada. Nesta molécula a energia dos orbitais HOMO e LUMO sofre um pequeno aumento. Na geometria da molécula **BTD-DHA-1** existe uma maior superfície de contato entre a molécula e o solvente, o que não ocorre com a da

BTD-DHA-2. Esta diferença de interação soluto-solvente pode ser a causa do comportamento observado. As variações de energia dos orbitais com a solvatação podem ser melhor visualizadas através do diagrama de energia mostrado na Figura 59.

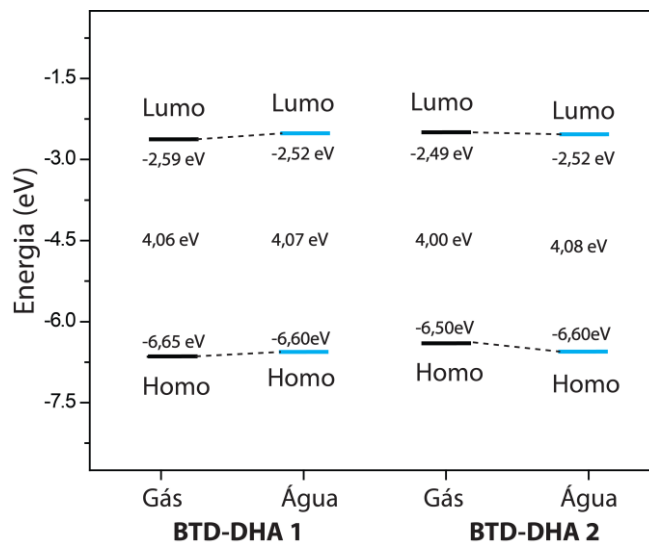


Figura 59. Diagrama de energia dos orbitais HOMO e LUMO para ambas as conformações da **BTD-DHA** no em fase gasosa e em água.

A geometria da **BTD-DHA-2** se mostrou mais sensível a variação do meio, havendo uma maior variação de energia entre os estados solvatados e gasoso.

Os orbitais moleculares de ambas as geometrias, bem como a diferença de densidade eletrônica para estas moléculas podem ser observadas nas Figura 60 e Figura 61.

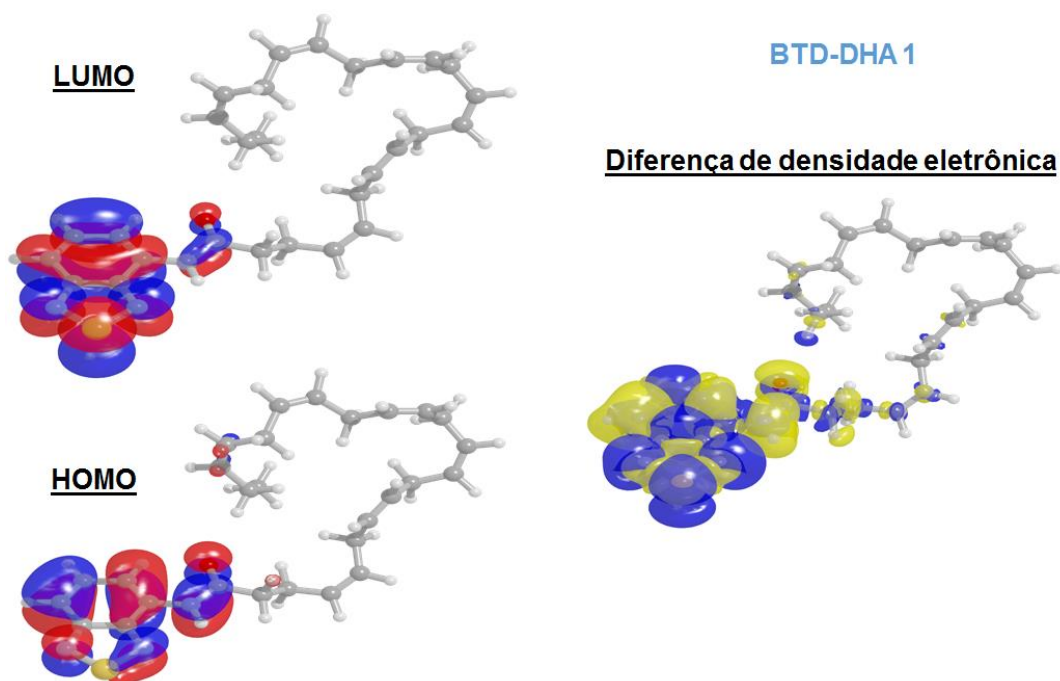


Figura 60. Geometria otimizada para a **BTDDHA-1** com plot dos orbitais HOMO e LUMO e diferença de densidade eletrônica nos estados S_0 e S_1 .

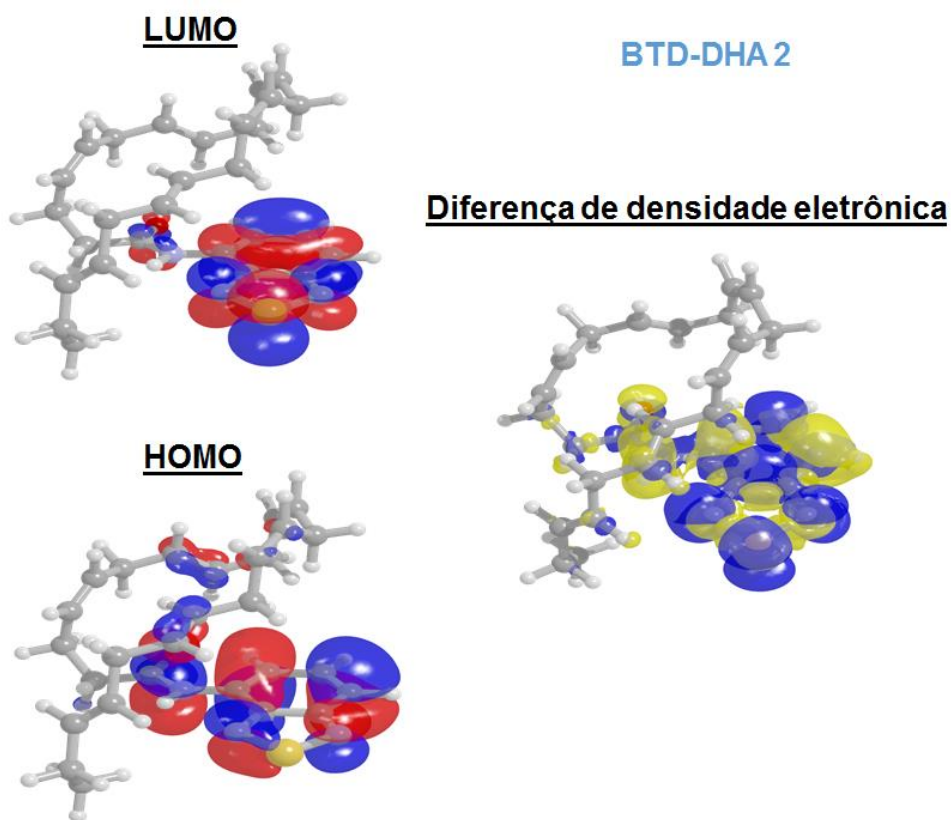


Figura 61. Geometria otimizada para a **BTDDHA-2** com plot dos orbitais HOMO e LUMO e diferença de densidade eletrônica nos estados S_0 e S_1 .

Os orbitais moleculares de ambas as geometrias encontradas estão principalmente centrados no anel BTB da molécula, fato este já esperado devido a maior densidade eletrônica nesta região. Existe uma participação da cadeia alquílica nos orbitais HOMO de ambos os casos, mas para a molécula de **BTB-DHA-2** referida participação é maior. Nesta geometria há uma maior aproximação das duplas ligações com o anel BTB, havendo contribuição dos orbitais π destas duplas. Na **BTB-DHA-1** apenas uma olefina participa do orbital HOMO da molécula, o alinhamento dos orbitais p desta olefina com o anel BTB é desfavorável, resultando numa interação não tão eficiente quanto a observada na **BTB-DHA-2**

Os orbitais LUMO de ambas as moléculas estão centrados no anel BTB e na amida lateral destas moléculas, já sendo conhecido o forte caráter acceptor de elétrons do núcleo BTB.¹⁹

Durante a solvatação, as interações entre a água e os hidrogênios da cadeia alquílica que participam do orbital HOMO da **BTB-DHA-2** podem ser a causa da maior estabilização em meio solvatado que a molécula de **BTB-DHA-1**, que não possui muita contribuição dos orbitais π desta cadeia no orbital HOMO, no entanto esta conclusão deve ser considerada apenas como sugestiva, uma vez que não foram realizados cálculos que a comprovem

As diferenças de densidade eletrônica entre o estado excitado e o fundamental para ambas as geometrias aponta não haver grande participação dos elétrons da cadeia alquílica no que tange a estabilização do estado excitado da molécula, ocorrendo a maior transferência de carga entre a amida e o anel 2,1,3-tiadiazola do núcleo BTB. O processo de ICT para esta molécula é similar ao observado para a molécula de **BTB-DHA**, sendo aumentada a densidade eletrônica no anel 2,1,3-tiadiazola da BTB durante o estado excitado e em ambas as geometrias e diminuída no anel benzênico deste núcleo, principalmente na amida a ele ligada.

Imageamento e Dinâmica celular

Após caracterização físico-química da **BTD-DHA**, foram realizados os testes biológicos com este novo fluoróforo. A nova sonda lipofílica fluorescente foi submetida a estudos in vitro, in vivo e a testes quantitativos de incorporação e secreção.

Testes biológicos in vitro

Os testes in vitro foram realizados com células de câncer de mama da linhagem MCF-7. Estas células foram incubadas com 100 μ M da sonda fluorescente **BTD-DHA**, a 4 °C e a 37 C por diferentes períodos de tempo: 1, 5, 15, 30 e 60 min (o experimento de 60 minutos foi realizado apenas para a molécula a 37 °C). Os resultados de imageamento celular obtidos para o tempo de 1 minuto de incubação podem ser vistos na Figura 62.

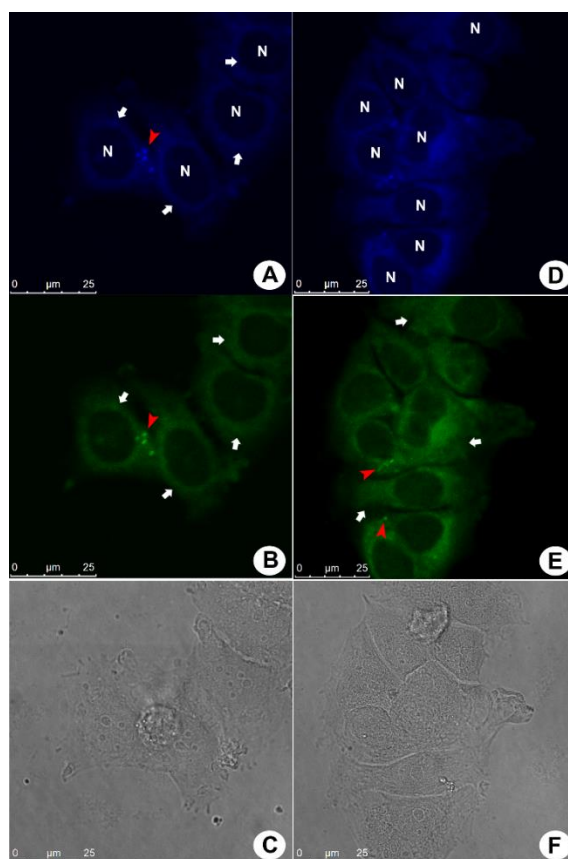


Figura 62. Células de câncer MCF-7 incubadas por 1 minuto com a sonda molecular a 4 °C (imagens A, B e C) e a 37 °C (Imagens D, E e F). Nota-se o acúmulo de vesículas próximas as regiões periféricas das células (setas vermelhas). A **BTDDHA** foi mobilizada pelo citoplasma celular, como pode ser observado nas regiões indicadas pelas setas brancas. As imagens mostram o mesmo resultados em ambas as temperaturas testadas. As duas faixas de emissão do fluoróforo é mostrada em azul nas imagens A e D e em verde nas imagens B e E. As imagens C mostram os aspectos morfológicos normais através da microscopia de contraste. Barra de escala em 25 µm.

A Figura 62 mostra as células de câncer incubadas durante 1 minuto com a sonda **BTDDHA** a 4 °C (imagens A, B e C) e a 37 °C (imagens D, E e F). Assim como a **BTDDAO**, esta nova sonda fluorescente apresentou dois comprimentos de onda de emissão (fluorescências verde e azul), que, segundo os experimentos fotofísicos feitos com a molécula, não decorrem da formação de excímeros. A fluorescência azul foi menos intensa para todas as amostras, o que dificultou a marcação dos corpúsculos formados quando utilizada esta faixa de emissão. As imagens em verde permitiram uma maior visualização dos detalhes morfológicos durante os experimentos. Os resultados para as

temperaturas estudadas foi o mesmo, existindo um acúmulo de **BTD-DHA** nas regiões periféricas da célula (setas vermelhas). Com apenas 1 minuto de experimento a sonda lipofílica já se apresentou internalizada e mobilizada no citoplasma (setas brancas). Os experimentos de incubação com a célula a 4 °C eliminam a captação celular por processos endocitóticos, sendo impedidos os movimentos de evaginação da membrana plasmática para que estes processos ocorram.

A Figura 63 mostram as imagens com a célula incubada durante 5 minutos com a sonda fluorescente.

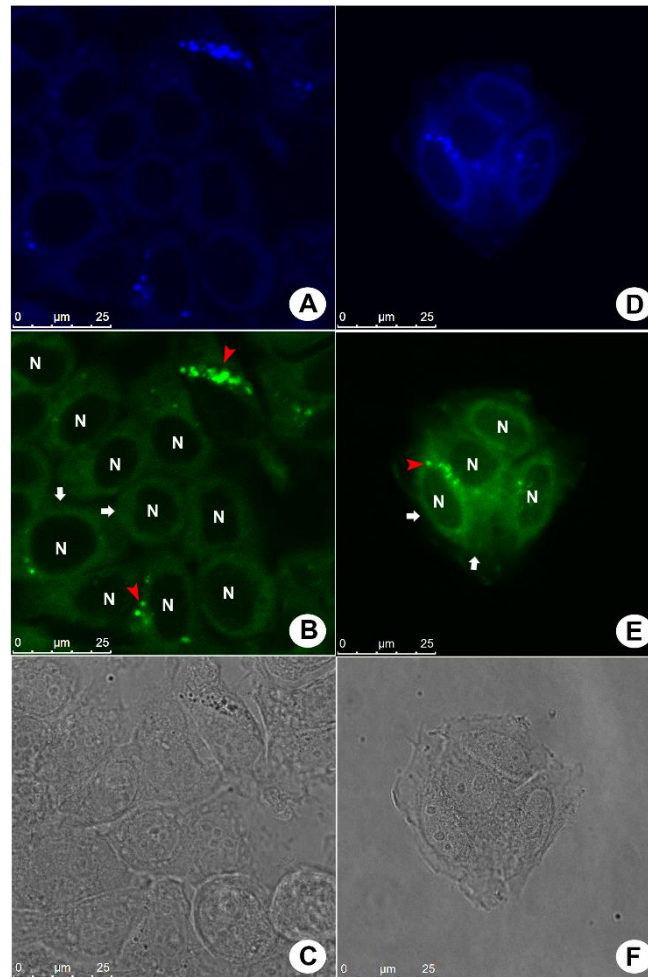


Figura 63. Células de câncer MCF-7 incubadas por 5 minuto com a sonda molecular a 4 °C (imagens A, B e C) e a 37 °C (Imagens D, E e F). Nota-se o acúmulo de vesículas próximas as regiões nucleares da células (setas vermelhas). A **BTD-DHA** foi mobilizada pelo citoplasma celular, como pode ser observado nas regiões indicadas pelas setas brancas. As imagens mostram o mesmo resultados em ambas as temperaturas testadas. As duas faixas de emissão do fluoróforo é mostrada em azul nas imagens A e D e em verde nas imagens B e E. As imagens C mostram os aspectos morfológicos normais através da microscopia de contraste.. Barra de escala em 25 µm.

Com maior tempo de experimento pode-se confirmar que a **BTD-DHA** foi captada pela célula independentemente do estado físico da membrana, tal como comprova **Figura 63** imagens A e B, estando a sonda em vesículas celulares nas regiões periféricas da célula. Após cinco minutos também não se observam diferenças de distribuição destas vesículas com a mudança de temperatura, fato este observado quando comparadas as imagens A e B com D e E (nestas imagens os corpúsculos lipídicos são indicados com a seta vermelha). Este

aspecto morfológico atesta que a captação celular pode acontecer em taxas de velocidades similares para ambas as temperaturas.

As imagens com os tempos de incubação de 15 e 30 minutos são observadas a seguir, Figura 64.

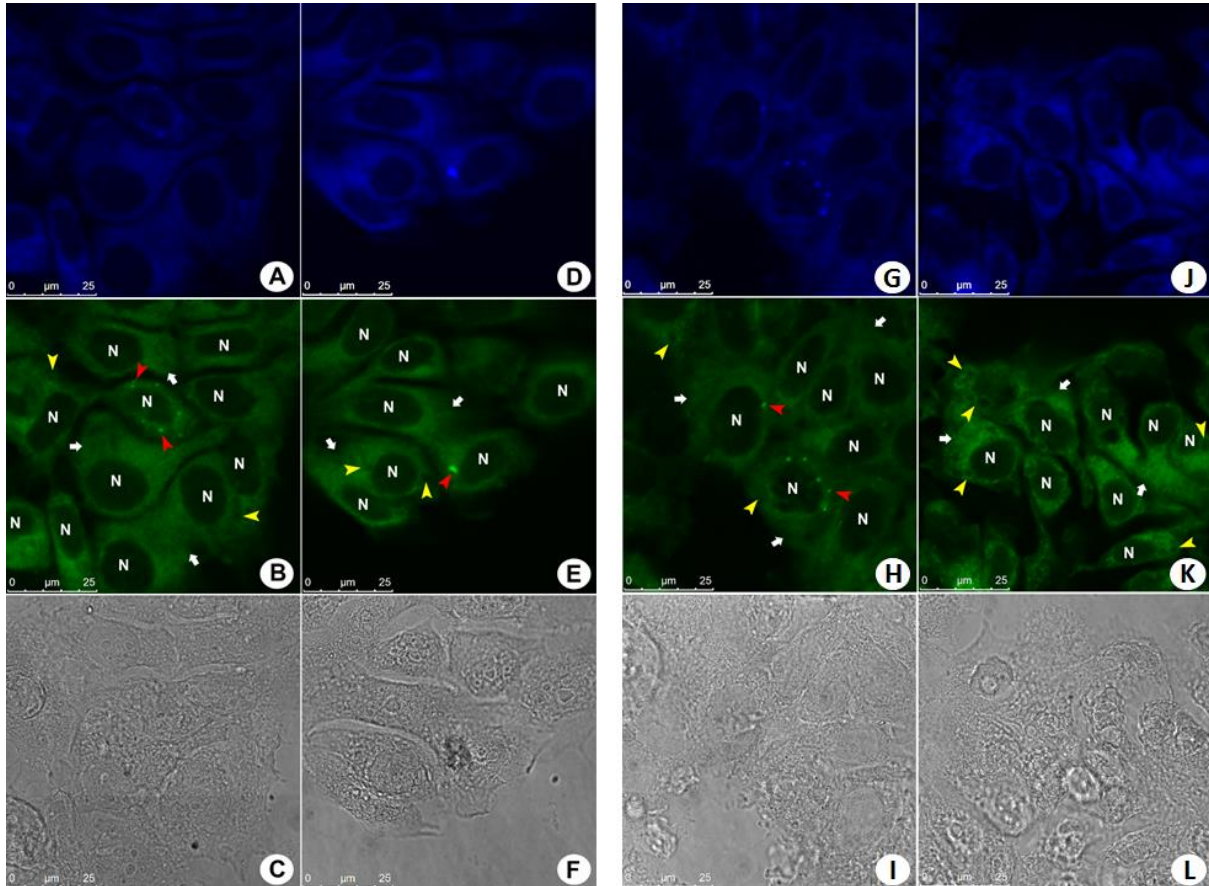


Figura 64. Células de câncer MCF-7 incubadas por 15 (imagens a direita de A a F) e 30 minutos (imagens a esquerda de G a L) a 4 °C (imagens A, B,C G H e I) e a 37 °C (Imagens D, E, F, J, K, L). Nota-se o acúmulo de vesículas próximas as regiões nucleares da células, (setas vermelhas) não sendo mais observadas a 37°-30 min (J e K) As setas brancas indicam a distribuição da sonda pelo citoplasma. Os espaços sem marcação mostrados pelas setas amarelas sugerem não haver acúmulo desta sonda fluorescente em endossomos ou lisossomos. As imagens mostram o mesmo resultados em ambas as temperaturas testadas. As duas faixas de emissão do fluoróforo é mostrada em azul nas imagens A, D, G e H e em verde nas imagens B, E, H e K. As imagens mostram os aspectos morfológicos normais através da microscopia de contraste. Barra de escala em 25 µm.

As imagens obtidas com a sonda fluorescente incubada a 15 e 30 minutos sugerem a não dependência entre os mecanismos de captação endocitóticos e o mecanismo utilizado pela célula para esta sonda. A ideia da existência de proteínas específicas para o transporte dos ácidos pela membrana celular tem sido proposta por diversos autores. Segundo uma revisão de Dutta Roy e colaboradores¹¹³ a ideia partiu de grupos que, notando a influência da albumina nos estudos cinéticos de captação de ácidos graxos em meio celular, passaram a sugerir a presença deste tipo de proteína específica a partir de experiências, sendo a primeira delas efetuada com ácidos graxos isolados do fígado do rato. Ainda segundo os autores, as velocidades de passagem destas substâncias reforçam ainda mais a veracidade dessa teoria. Segundo a pesquisadora Lin⁹² existem muitas proteínas propostas como facilitadoras de captação dos ácidos graxos, como as translocases de ácidos graxos (FAT/CD36), as FABP e membros da família das proteínas Acil-coenzima A (*fatty acid transport protein/very long-chain acyl-CoA synthetase*, FATP/ACSVL), sendo, apesar de conhecidas pela facilitação no transporte destas substâncias, seus mecanismos ainda não compreendidos.

Mesmo para períodos curtos de incubação, em 1 minuto, o análogo fluorescente do ácido graxo DHA já havia sido internalizado pela célula e estocado em corpúsculos lipídicos nas regiões próximas a membrana citoplasmática. Estes resultados sugerem que as células mamárias têm uma alta demanda por este ácido graxo específico. Com o aumento do tempo de incubação, Figura 64 K, houve um espalhamento desta sonda pelo citoplasma, reforçando a hipótese supracitada. O tráfego das vesículas fluorescentes através do citoplasma celular também pode ser visualizado, sendo a substância absorvida levada para regiões próximas ao núcleo celular tornando-se provável a mobilização deste ácido graxo pelo retículo endoplasmático.. As vesículas próximas ao núcleo podem ser melhor observadas nos experimentos a 4 °C, indicadas por setas vermelhas na imagem B e H da Figura 64, devido a nesta temperatura a célula ter sua taxa metabólica bastante reduzida.

Estes experimentos permitem ainda a visualização das regiões do citoplasma celular que não são marcadas pela **BTD-DHA** (indicado pelas setas amarelas nas imagens B, E, H e K da Figura 64), sendo estas regiões relacionadas a estruturas celulares presentes no citoplasma.

O experimento realizado com o tempo de 1 hora de incubação pode ser observado na figura abaixo, Figura 65.

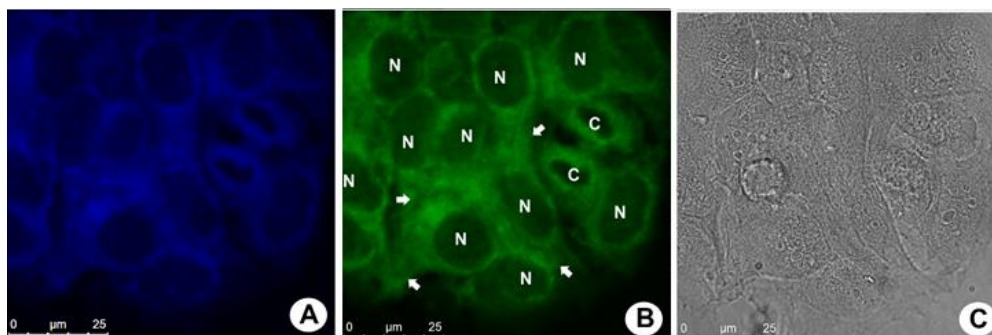


Figura 65. Células de cancer MCF-7 incubadas com a sonda **BTD-DHA** a 37 °C durante uma hora. (imagens A,B e C). A imagem mostra o análogo de lipídio totalmente mobilizado pelo citoplasma celular, estando totalmente espalhado por toda a célula. Como indicado pelas setas brancas. Barra de escala em 25 µm.

As imagens mostram uma intensa distribuição dos lipídios por todo o citoplasma celular, e este, por sua vez, não apresenta corpúsculos lipídicos. Possivelmente este ácido graxo após uma hora de incubação já foi mobilizado e distribuído por toda a célula, o que comprova mais uma vez a alta demanda desta célula pelo DHA, uma vez que a **BTD-DHA** mimetiza este ácido graxo.

Afim de se comprovar que esta sonda fluorescente foi internalizada pela célula e não ficou ligada a membrana celular devido a sua característica anfipática, realizou-se a análise ortogonal de uma célula incubada durante uma hora a 37 °C, estando a vesícula observada próxima a região nuclear, como já comentado. Esta análise pode ser observada a seguir, (Figura 66).

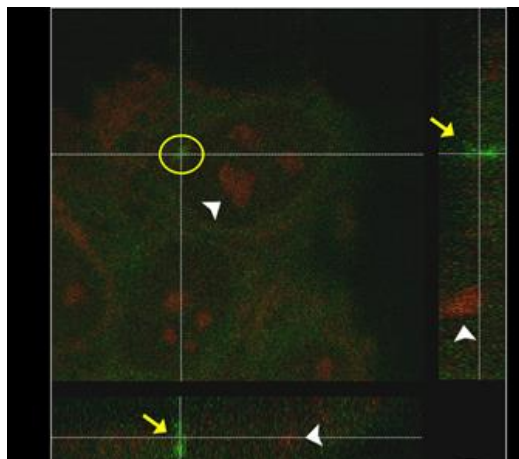


Figura 66. Análise ortogonal das célula MCF-7 incubadas com **BTDDHA** por 60 minutos. A sonda foi acumulada em vesículas próximas ao núcleo celular. A intercessão da linha mostra o ponto de interação em cima de uma vesícula. A imagens do lado direito da imagem central mostra a visão lateral em 3D formada pelo empilhamento de imagens. A imagem abaixo da imagem central mostra a visão de baixo das imagens em 3D. Ambos os pontos de vista mostram a vesícula com a sonda **BTDDHA** dentro do citoplasma.

A análise ortogonal mostrou com precisão a vesícula contendo a sonda lipofílica no citoplasma celular. Nas imagens a sonda está acumulada em uma região próxima ao núcleo. A imagem central apresenta a vesícula selecionada para a análise, à sua direita encontra-se a imagem lateral da célula, enquanto a que está abaixo apresenta a célula vista por baixo. Este conjunto de imagens comprova a que a sonda está internalizada pela célula.

Nenhum dos ensaios *in vitro* acarretou em efeitos citotóxicos capazes de causar qualquer alteração nas células, tendo estas apresentado aspectos morfológicos normais em todos os experimentos de imageamento realizados.

O processo de captação celular pode ser explicado através do caminho proposto por Hanebutt e colaboradores.⁹⁴ A sonda lipofílica se liga a superfície das lipoproteínas encontradas no soro fetal bovino presente no meio de cultura celular. Ao entrar em contato com a membrana celular a sonda interage com uma enzima (*lipoprotein lipase, LPL*) que atua na quebra das ligações do ácido graxo com a lipoproteína fetal. Referidos ácidos ligam-se então a proteínas

Todos os experimentos biológicos foram realizados pelo professor José Raimundo Corrêa e seu grupo de pesquisa no Laboratório de microscopia eletrônica no Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. IB-UnB

transportadoras de ácidos graxos presentes na membrana celular sendo inseridas no citoplasma celular e estocadas em compartimentos de membrana que são então transportados até o retículo endoplasmático ou mantidos no citoplasma celular para agir como substrato em inúmeras demandas metabólicas celulares.

A nova sonda fluorescente **BTD-AO** foi capaz de manter as propriedades originais do ácido graxo DHA, como mostrado nestes experimentos in vitro, o que possibilita a aplicação biológica destas substâncias em uma grande gama de procedimentos experimentais, como já citado, os mecanismos de captação destas substâncias ainda não é compreendido, sendo desta maneira esta nova sonda fluorescente uma poderosa ferramenta para estudos deste processo.

Testes biológicos in vivo

Os testes biológicos com a nova sonda celular também foram realizados em cobaias, sendo realizado inicialmente uma análise padrão de comportamento da sonda para estes estudos e verificação dos reagentes utilizados. Foram analisados, através de um tomógrafo de fluorescência, cinco frascos eppendorf contendo: o ácido graxo DHA; a **BTD-DHA** diluída em DMSO; outro frasco contendo a **BTD-DHA** em meio de cultura celular; um frasco com água utilizada durante o experimento e um último com DMSO usado para diluir a **BTD-DHA**. A imagem deste experimento pode ser visualizada na Figura 67.

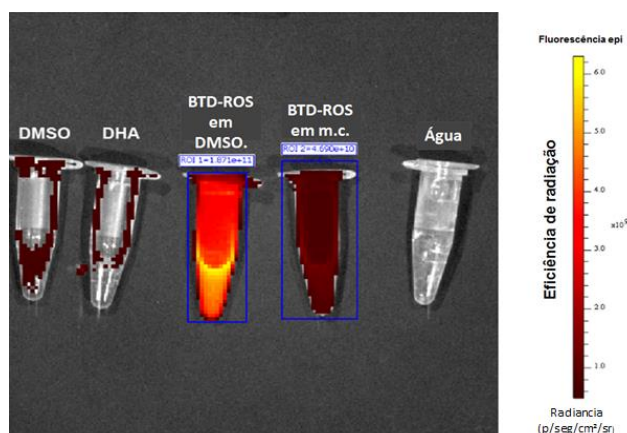


Figura 67. Procedimento de padronização para detecção da sonda **BTDDHA** através da tomografia de fluorescência. A imagem mostra fluorescência apenas para os frascos contendo DHA. Sendo a fluorescência mais intensa para esta sonda diluída em DMSO^{xi}

As imagens foram adquiridas utilizando a fonte de excitação em 480 nm e capturadas no comprimento de onda de 570 nm. Os frascos contendo DMSO, DHA, e água, não apresentaram emissão de fluorescência durante o teste. O frasco com maior eficiência de fluorescência foi com a sonda celular diluída em uma solução de DMSO, porém esta solução não pode ser utilizada durante os experimentos devido à alta toxicidade do DMSO em ratos (concentrações acima de 2% já apresentam toxicidade a cobaia) A sonda fluorescente em meio de cultura também apresentou uma alta emissão de fluorescência.

Para realização do estudo *in vivo* da distribuição da **BTDDHA**, utilizou-se a linhagem de camundongo albino BALB/c com aproximadamente cinco semanas de idade. Foram injetados através da cauda do animal 100 µL de **BTDDHA** diluídos no meio de cultura DMEM e após a aplicação este foi colocado imediatamente no tomógrafo de fluorescência. As imagens foram adquiridas nas mesmas configurações que a análise de anteriormente citada, 30 minutos após aplicada a injeção no animal. Durante todo o experimento o camundongo foi mantido sedado. As imagens obtidas para este experimento podem ser observadas na Figura 68.

Todos os experimentos biológicos foram realizados pelo professor José Raimundo Corrêa e seu grupo de pesquisa no Laboratório de microscopia eletrônica no Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. IB-UnB

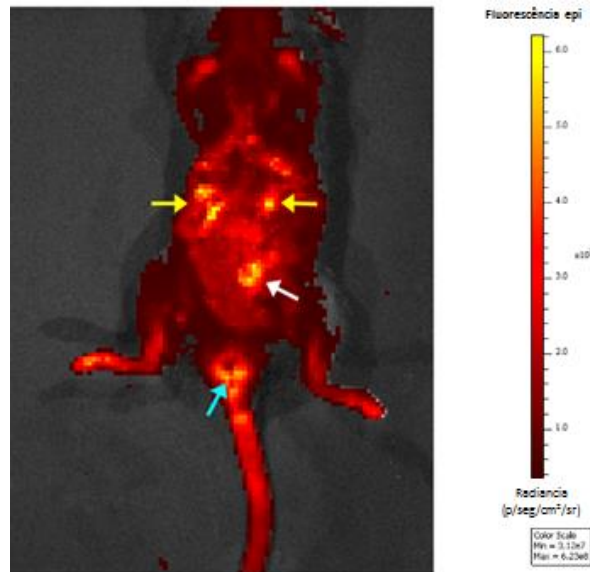


Figura 68. Distribuição do composto **BTDDHA** após incubação em uma cobaia. A imagem mostra o corpo do camundongo 30 minutos após inoculação parenteral da sonda. As setas amarelas indicam acumulação desta sonda no fígado e a seta branca no intestino delgado do animal. Nota-se um pequeno acúmulo desta sonda no local de inoculação no animal. A escala de cor apresenta as diferentes intensidades de fluorescência.

Após 30 minutos à aplicação da **BTDDHA** foi observada uma distribuição do sinal de fluorescência no organismo do camundongo. Nota-se o acúmulo da sonda fluorescente acumulada principalmente no fígado (setas amarelas) e no intestino delgado (setas brancas) do animal. Observa-se uma pequena retenção da **BTDDHA** no local de inoculação desta (seta azul clara). Os pontos brilhantes nas orelhas, e nas patas traseiras são produzidas pela reflexão da radiação de excitação na pele do animal.

O ensaio *in vivo* demonstrou que nova sonda lipofílica fluorescente pode ser bastante útil para estudos de dietas por vias parenterais, uma vez que esta permitiu a visualização de regiões de acúmulo dentro do camundongo. Baseando-se nos resultados obtidos através dos experimentos *in vitro*, era esperado o acúmulo da **BTDDHA** no fígado do animal. Foi demonstrado que a captação desta sonda ocorre por vias naturais, sendo seu acúmulo no fígado do animal de acordo com o papel descrito ao fígado em relação ao armazenamento e metabolismo de DHA. Segundo uma revisão realizada por Mayurasakorn e colaboradores ¹⁰⁵ o DHA fornecido através da dieta é levado ao fígado e

posteriormente liberado na corrente sanguínea ligado à albumina ou esterificados em fosfolipídios para distribuição no organismo, sendo então captados pelas células.

As propriedades anti-inflamatórias do DHA são uma das qualidades mais notáveis na modulação de respostas do sistema imunológico, já sendo descrito que este ácido graxo é capaz de diminuir a expressão de enzimas inflamatórias como ciclooxigenase-2 (COX-2),¹¹⁹ diminuir a produção de citosinas pró inflamatórias como TNF- α e aumentar a produção de citosinas anti-inflamatórias como IL-10 em diversos tipos de células, como revisado por Mocellin e colaboradores¹²⁰ A IL-10 é uma potente citosina imunoregulatória ligada a inúmeras condições inflamatórias¹²¹ Baseando-se nestas informações foram realizados testes para se verificar as funções imunoregulatórias da **BTD-ROS**, sendo seus dados comparados aos do DHA.

Os testes foram realizados em uma linhagem celular de monócitos, a THP-1, estas células foram estimuladas por 24 horas com o ácido graxo DHA e com **BTD-DHA** (50 μ M), sendo posteriormente analisadas os níveis da citosina pró inflamatória TNF- α e anti-inflamatória IL-10 através da técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). As análises dos níveis destas citosinas em meio celular podem ser vistas na **Figura 69**.^{xii}

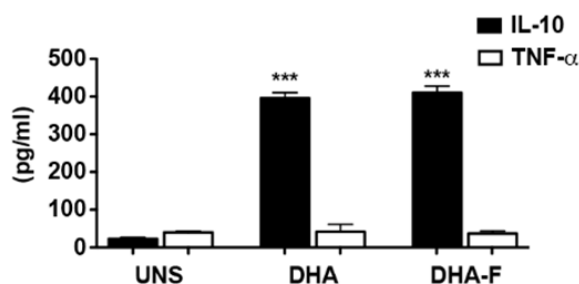


Figura 69. Linhagem celular de monócitos THP-1 (5×10^5 /ml) estimuladas com uma concentração de 50 μ M do ácido graxo DHA e com a sonda fluorescente **BTD-DHA** (DHA-F). Sendo analisadas os níveis sobrenadantes de citosinas IL-10 e TNF- α . Os dados foram tratados estatisticamente pelo método ANOVA seguindo do teste de Bonferroni *** $P^{\circ} < 0,001$

Todos os experimentos biológicos foram realizados pelo professor José Raimundo Corrêa e seu grupo de pesquisa no Laboratório de microscopia eletrônica no Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. IB-UnB

A nova sonda fluorescente **BTD-DHA** mostrou uma função imunoregulatória similar ao ácido graxo DHA, causando um aumento da citosina anti-inflamatória IL-10 e induzindo a níveis insignificantes da citosina pro-inflamatória TNF- α , as células estimuladas pela sonda fluorescente apresentaram níveis mais baixos desta citosina, o que mostra que esta sonda se comporta em meio celular basicamente como o seu ácido graxo de origem.

Conclusão

Este capítulo mostrou a síntese, caracterização, comportamentos químicos e aplicações biológicas de um derivado fluorescente de um ácido graxo poliinsaturado, não sendo encontrados na literatura nenhum análogo fluorescente a estas substâncias. Normalmente os ácidos graxos insaturados sofrer processos oxidativos a temperatura ambiente

A **BTD-DHA** mostrou-se bastante estável a manipulações, sendo os estudos de caracterização, fotocomportamento e aplicações biológicas realizados a temperatura ambiente.

Os estudos fotofísicos mostraram que esta substância apresenta propriedades consideradas vantajosas a compostos fluorescentes, como uma alta estabilização do estado excitado por processos eletrônicos intramoleculares e baixos efeitos de fotodegradação, levando maiores deslocamentos de Stokes e uma melhora na qualidade das imagens obtidas através da microscopia de fluorescência.

Os estudos computacionais mostraram que devido a possuir um maior número de insaturações na cadeia alquílica e ao seu maior comprimento, esta substância pode apresentar conformações favoráveis a interações orbitales entre o anél BTD e os orbitais π desta cadeia.

Os resultados demonstraram que esta molécula é análoga ao seu ácido graxo de origem, podendo ser aplicada para estudos específicos de captação, mobilização e distribuição dentro das células e tecidos, como mostrados nos experimentos *in vivo* e *in vivo*. Quando colocados juntos, os aspectos biológicos mostrados pela nova sonda lipofílica sintetizada, tem um grande impacto em análises relacionadas ao estudo de doenças e saúde humanas, uma vez que o

ácido graxo que esta sonda mimetiza, o DHA, está ligado a inúmeras implicações no desenvolvimento humano. O fato desta sonda ter seguido os mecanismos naturais de captação e tratamento pela célula coloca este composto como uma nova e importante ferramenta capaz de tratar muitas questões em diferentes condições médicas, como doenças cardíacas, diabetes, obesidade, câncer, envelhecimento, doenças autoimunes, processos embriológicos, dentre outros.

Os resultados apresentados neste capítulo abrem um novo horizonte para o estudo de dinâmica dos ácidos graxos em células vivas e organismos.

Capítulo 4

Síntese da primeira sonda híbrida fluorescente derivada do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola: BTD-LIP

Introdução

O esforço para o desenvolvimento de novas sondas moleculares, que possam ser utilizadas em aplicações biológicas, envolve, além do planejamento biológico destas moléculas, a modulação das propriedades fluorescentes do novo composto, sendo suas propriedades de emissão, absorção e deslocamento de Stokes importantes para se conseguir imagens de melhor qualidade através de técnicas espectroscópicas altamente sensíveis existentes atualmente.¹²²

O controle dos comprimentos de onda de emissão e absorção em um fluoróforo podem ser alterados através da mudança das conjugações existentes na molécula e também através da modulação do seu deslocamento eletrônico durante processos de excitação, sendo este ajuste realizado por sítios doadores e receptores de elétrons em uma mesma estrutura molecular.¹²³ Um alto deslocamento de Stokes em um fluoróforo minimiza os efeitos de auto quenching, no qual as moléculas absorvem a radiação emitidas por ela mesma, melhoram a relação sinal ruído em experimentos de imageamento celular, melhorando a qualidade de imagens obtidas e também e também permitem uma maior penetração da fonte de excitação na amostra, uma vez que esta não sofre interferência das radiações emitidas pela molécula.¹²⁴

Existem algumas questões que devem ser levadas em consideração para a criação de fluoróforos com boas qualidades espectrais, não sendo, porém, estas questões específicas a cada núcleo fluorescente e, devido a isto, nem sempre eficientes em todas as condições aplicadas.⁴⁵ O aumento do efeito “push-pull”, causado por grupos doadores e retiradores de elétrons em uma molécula pode fazer com que sejam aumentados os deslocamentos de Stokes observados, uma vez que o processo ICT neste caso é favorecido, porém muitas vezes este efeito também causa um deslocamento batocrômico no espectro de absorção da molécula, não sendo obtidas distâncias consideráveis entre a energia de absorção e emissão da molécula.

A extensão das conjugações π em uma molécula também pode levar a inúmeras vantagens como: deslocamentos batocrômicos de emissão; aumento da absorvitividade molar e melhora da intensidade de fluorescência, porém estas conjugações também podem causar uma diminuição da solubilidade destes compostos em meio aquoso e muitas vezes torna-los instáveis, dificultando desta maneira a aplicação destas em meios fisiológicos além de torna-los suscetíveis a efeitos de degradação.¹²⁵

A criação de novas moléculas fluorescentes pode ser realizada de duas maneiras: Pelo planejamento e síntese de estruturas moleculares completamente inéditas, como as mostradas na Figura 70, sintetizadas por Xiao e colaboradores¹²⁶ (esquerda) e por Murale e colaboradores¹²⁷ (direita); ou pela criação de uma nova substâncias contendo em sua estrutura um núcleo fluorescente já conhecido, com propriedades espectroscópicas bem definidas e desejadas. Neste caso a compreensão das propriedades destes núcleos fluorescentes é importante para o planejamento de um fluoróforo que atenda suas expectativas de aplicação, existindo inúmeras moléculas disponíveis comercialmente.⁶

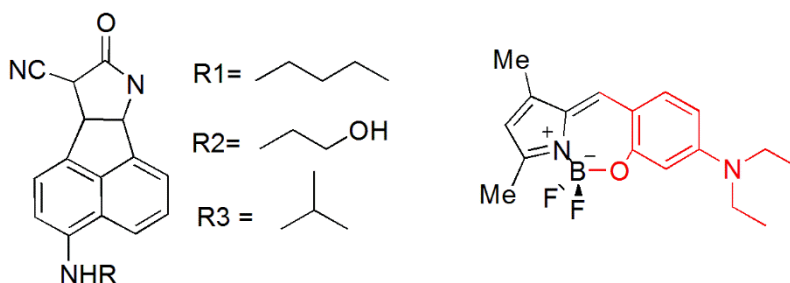


Figura 70. Exemplos de novos fluoróforos construídos sem utilização de núcleos fluorescentes já pré-estabelecidos. A esquerda a sonda criada por Xiao. Ref. 126 e a direita a sonda criada por Murale. Ref. 128.

Como citado anteriormente, o ajuste das propriedades fotofísicas destes fluoróforos nem sempre aumentam a qualidade do composto sintetizado, uma vez que não são estabelecidas regras específicas para os inúmeros núcleos fluorescentes existentes. Desta maneira a síntese de novas moléculas fluorescentes muitas vezes se baseia na tentativa e erro,⁴⁵ sendo novas

substâncias sintetizadas sem um planejamento adequado de sua estrutura molecular.

Baseando-se na criação de novos fluoróforos a partir da variação de diferentes ligantes a núcleos fluorescentes conhecidos, cientistas tem realizado a fusão de mais de um núcleo fluorescente em uma mesma molécula, criando fluoróforos híbridos, com propriedades fluorescentes diferentes das de seus precursores, porém com as vantagens inerentes aos núcleos utilizados. Este plano para criação de novos compostos fluorescentes vem mostrando resultados promissores de aplicação e imageamento celular.^{5,9-11} Além dos exemplos citados na introdução deste trabalho outros exemplos podem ser vistos na Figura 71.

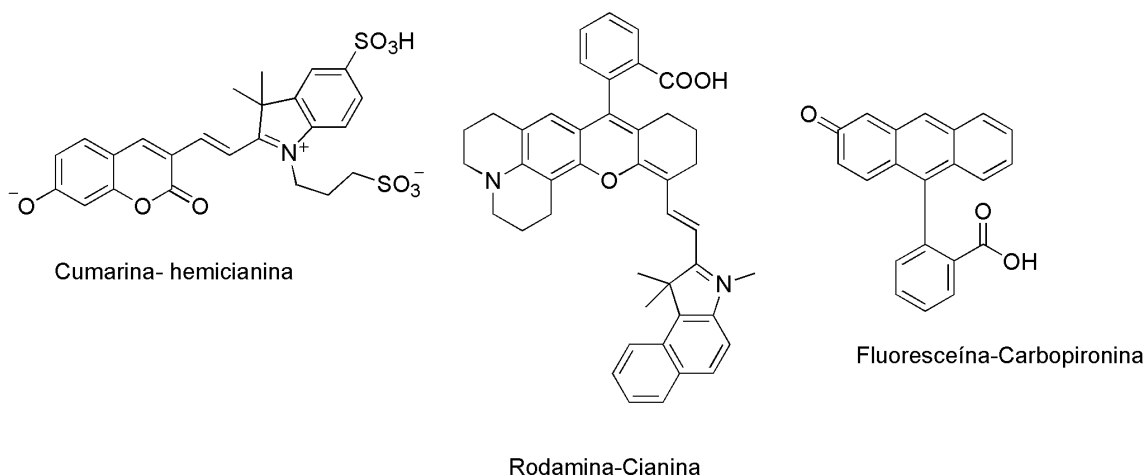


Figura 71. Exemplos de núcleos híbridos fluorescentes. (Direita) molécula com os núcleos cumarina e hemicianina.¹²⁶ (Centro) molécula contendo os núcleos rodamina e cianina;¹²⁹ (direita) molécula contendo os núcleos fluoresceína e carbopironina.¹³⁰

Dos núcleos fluorescentes conhecidos, as benzo- α -pironas mais conhecidas como cumarinas, são uma família de moléculas que possuem uma ampla variedade de propriedades fluorescentes.¹²⁸ A estrutura principal das cumarinas é formada por um anél 2-pirona fundido a um anél benzênico, podendo, além das duas formas supracitadas esta estrutura ser chamada de 2H-cromen-2-ona ou 1-benzopira-2-ona segundo a IUPAC. A Figura 72, mostra a estrutura básica das cumarinas,

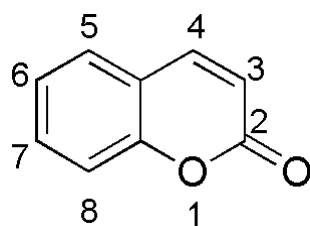


Figura 72. Estrutura molecular do núcleo fluorescente cumarina com sua numeração atômica usual.

O primeiro estudo de fluorescência desta substância foi publicado em 1970 por Song e colaboradores¹²⁹ sendo o comportamento da fluorescência desta substância estudado com a variação da polaridade dos solventes. Foi observado pelo autor que em solventes não polares a emissão desta substância apresentava deslocamentos batocrômicos. Posteriormente inúmeros outros estudos e revisões destas substâncias foram realizadas.¹³⁰⁻¹³³

As cumarinas são fluoróforos polares que apresentam mudanças no comportamento de fluorescência causadas pelo ambiente que estes se encontram, sendo estes núcleos sensíveis a polaridade, polarizabilidade, formações de ligações de hidrogênio e variação de pH.¹³² Os derivados deste núcleo podem apresentar ainda comportamentos opostos a estas mudanças, como a 7-aminocumarina e 7-alcoxicumarinas. Enquanto a primeira apresenta um aumento de sua intensidade de fluorescência em meios apolares, a outra apresenta uma maior intensidade em meios polares.¹³⁴ Além disso, fluoróforos de cumarina apresentam normalmente valores altos de deslocamentos de Stokes, causados devido a variação de seu momento dipolo durante o estado excitado, esta mudança leva a uma reorganização do solvente ao redor da molécula, sendo parte desta energia absorvida durante a excitação dissipada por esta movimentação.⁶

Dentre as inúmeras possibilidades de construção de compostos fluorescentes contendo o núcleo cumarina, os derivados substituídos na posição 7 por um heteroátomo apresentam faixas de excitação em regiões de UV e UV-próximas, sendo as 7-aminocumarinas um dos derivados de cumarina mais estudados e com maior número de aplicações como sondas fluorescentes.¹³⁴

A versatilidade apresentada por este núcleo em relação a sua sensibilidade ao meio é extremamente vantajosa pois permite com que sejam escolhidas as alterações de fluorescência desta substância de acordo com sua proposta de utilização. Diversas sínteses de híbridos de fluorescência, desta maneira, utilizam este núcleo como um precursor para formação do fluoróforo final, como visto nos exemplos dados anteriormente neste trabalho. A cumarina-hemicianina,¹²⁵ a cumarina-BODIPY³⁹ e a cumarina- fluoresceína.⁴⁰ são apenas alguns exemplos de fluoróforos híbridos contendo este núcleo.

Dos inúmeros fluoróforos híbridos já existentes, apenas um utiliza o núcleo BTD em sua estrutura, sendo este publicado no ano de 2014 por Mirloup e colaboradores.⁴³ A molécula apresentada neste trabalho é um híbrido do núcleo BODIPY com duas moléculas de BTD ligadas a este por um tiofeno. Este híbrido foi utilizado para utilização em células fotovoltaicas não existindo desta maneira nenhum híbrido fluorescente contendo o núcleo BTD para aplicações biológicas.

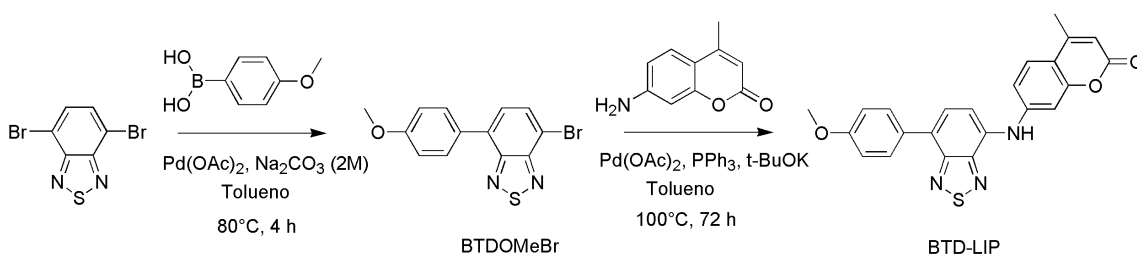
Dado o interesse de nosso grupo de pesquisa na criação de novas sondas fluorescentes contendo o núcleo BTD, a possibilidade de formação de híbridos de fluorescência com propriedades espectroscópicas inéditas e a inexistência uma sonda híbrida fluorescente contendo este núcleo. É apresentado neste capítulo a criação e aplicação biológica da primeira sonda híbrida fluorescente, derivada do núcleo BTD, a **BTD-LIP**.

Devido as propriedades das cumarinas citadas anteriormente, escolheu-se para a criação deste híbrido a molécula 7-amino-4-metilcumarina, sendo as ligações entre os núcleos fluorescentes conjugadas através de uma amina como espaçador. Esta conjugação favorece a movimentação eletrônica na molécula, aumentando desta maneira os processos de ICT e levando desta maneira a uma maior estabilização do estado excitado.

Resultados e discussão

Síntese do produto 4-(7-amino-4-metilcumarina)-7-(4-metoxi-feni)-(2,1,3)-benzotiadiazola

Para a síntese desta nova molécula foi utilizado como material de partida a 4,7-dibromo-BTD. Sendo realizadas duas etapas reacionais para a criação de uma molécula de BTD contendo dois diferentes substituintes. Como pode ser observado no **Esquema 4**.



Esquema 4. Síntese da sonda fluorescênte híbrida derivada dos núcleos BTD e cumarina. **BTD-LIP**.

Inicialmente foi realizado o acoplamento do ácido 4-metoxi-fenil borônico com a molécula de 4,7-dibromo-BTD através do acoplamento padrão promovido por paládio sendo o produto gerado já sintetizado por nosso grupo de pesquisa, nomeado **BTDOMeBr**,¹¹⁷ O rendimento para este produto foi de 60%

A segunda etapa foi a reação de aminação entre a molécula BTDOMeBr e a 7-amino-4-metilcumarina. O processo de aminação foi o mesmo realizado no capítulo anterior, sendo seguidos os procedimentos descritos por Sakurai⁴⁶ para a reação de Buchwald-Hartwig. O produto obtido foi a molécula 4-(7-amino-4-metilcumarina)-7-(4-metoxi-feni)-(2,1,3)-benzotiadiazola (**BTD-LIP**), sendo este produto obtido com 30% de rendimento. O rendimento global para a reação foi, desta maneira de 18%. O ponto de fusão da substância foi de 182°C.

A molécula **BTD-LIP** foi caracterizada por ¹H e ¹³C RMN sendo confirmada a estrutura molecular do composto.

Estudos fotofísicos.

Após a síntese e caracterização da molécula foram realizados os experimentos de absorção (UV-Vis) e fluorescência desta substância. Assim como nos estudos realizados nos capítulos anteriores estes estudos são realizados para se verificar o comportamento desta substância com a mudança do solvente. O perfil das bandas de absorção e emissão da substância, bem como o plot do gráfico Lippert Mataga e a tabela com os dados obtidos nestes experimentos podem ser observadas abaixo. Tabela 7 e Figura 73.

Tabela 7. Dados de UV-Vis e emissão de fluorescência (em diferentes solventes) para a sonda **BTD-LIP**. Todos os experimentos foram conduzidos em concentração de 10 μM

Solventes	λ_{max} (abs)(nm)	$\log \epsilon$	λ_{max} (em)(nm)	Desl. Stokes (nm)
DMSO	469	3.80	643	174
Acetato de etila	465	3.79	605	140
Diclorometano	462	3.91	608	146
Acetonitrila	455	3.88	624	169
Tolueno	460	3.96	600	140
Etanol	463	3.96	626	163
Hexano	467	3.42	585	118
Metanol	459	3.96	640	181
Água	483	3.64	628	145
Clorofórmio	459	3.81	605	146

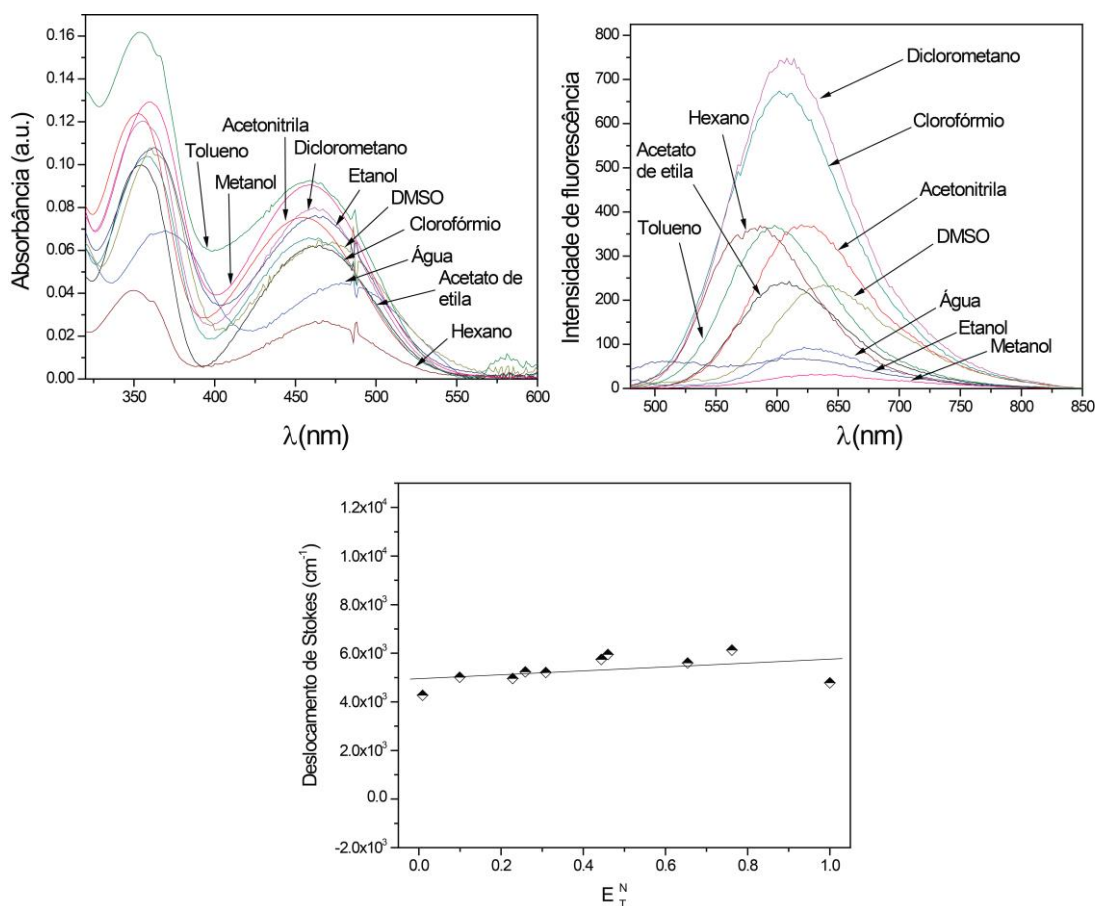


Figura 73. (Acima Esquerda)- Espectro de absorção (UV-Vis) da molécula **BTD-LIP** (Acima direita) Espectro de fluorescência com comprimento de excitação no máximo de absorção para o solvente (Abaixo) Plotagem da correlação de Lippert-Mataga com os valores de deslocamento químicos obtidos.

Os resultados obtidos mostram que tanto a absorção quanto a emissão de radiação do novo fluoróforo estão em comprimentos de onda bastante elevados, com a molécula emitindo radiação na região do vermelho. As menores emissões de fluorescência pelo composto foram encontradas nos solventes polares próticos podendo este fato estar relacionado a ligações de hidrogênio entre o solvente e a **BTD-LIP**. Esta interação pode levar a uma quebra de planaridade molecular do fluoróforo, diminuindo desta maneira a quantidade de radiação dissipada sob forma de luz.

São relatados na literatura o aumento da estabilidade de cumarinas em solventes polares, principalmente próticos como o etanol e metanol. Segundo Dahiya¹³⁵ a formação de ligações de hidrogênio estabiliza o processo de

transferência intramolecular de carga torcido (*twisted intramolecular charge transfer*, TICT), este processo se dá quando a transferência de carga na molécula é acompanhada de um movimento intramolecular específico. O caráter doador das ligações de hidrogênio faz com que a molécula consiga uma maior estabilização de seu estado excitado, transferindo a radiação absorvida desta maneira na forma de energias não radioativas através destas interações e deslocando seu comprimento de onda desta maneira para valores batocrômicos.

Para a construção do gráfico pela função de Lippert Mataga⁶⁰ foram utilizados os máximos das emissões obtidas através das excitações nos comprimentos de onda apresentados nos espectros de absorção deste composto. Observa-se uma inclinação positiva bastante discreta da regressão linear dos pontos, $R^2 = 0,08$ com o aumento da polaridade do solvente. Este valor indica a existência de interações intermoleculares específicas entre o soluto e o solvente, como por exemplo ligações de hidrogênio entre estas moléculas. Os deslocamentos de Stokes para este fluoróforo também foram bastante altos, todos apresentaram valores acima de 100 nm, sendo o maior valor obtido para a **BTD-LIP** solvatada em metanol (deslocamento de Stokes = 181 nm). Lavis e colaboradores⁶ relatam em uma revisão que os grandes deslocamentos de Stokes observados nas cumarinas ocorrem devido a estas moléculas conseguirem uma grande alteração de seu momento dipolo quando excitadas, levando a um rearranjo do solvente ao seu redor e dissipando parte da energia absorvida.

Apesar deste valor ser um indicativo de que a molécula não realiza processos de ICT apenas os cálculos computacionais podem confirmar sua existência, uma vez que a estrutura molecular do composto foi planejada para que ocorressem estes processos.

Estudos Computacionais

Como citado durante os estudos fotofísicos, a estrutura molecular da **BTD-LIP** foi planejada para que processos de ICT estabilizassem o estado excitado do fluoróforo. O núcleo BTD-conjugado com a Cumarina possui um forte caráter acceptor de elétrons, sendo ligado a esta estrutura o 4-metox-fenil que possui um

caráter doador eletrônico. Além disso todas as ligações químicas neste composto são conjugadas o que favorece o deslocamento eletrônico pela estrutura molecular.

Foram investigados desta maneira, através dos cálculos computacionais, a movimentação eletrônica pela molécula durante o processo de ICT.

O método de cálculo utilizado para as otimizações e energias foi o mesmo aplicado a todas as outras BTDs descritas nos capítulos anteriores deste trabalho, além disso, as mesmas combinações de funcionais e função de base, já foram utilizadas pelo grupo em outros derivados deste gerando bons resultados teóricos.¹¹⁷ Os cálculos foram efetuados com métodos TD-DFT, sendo a estrutura molecular otimizada tanto em meio aquoso quanto em fase gasosa pelo funcional CAM-B3LYP combinado com a função de base 6-31+gG(d) e as energias calculadas pelo funcional PBE1PBE combinado com a função de base 6-311+G(2d,p). O efeito de solvatação foi realizado através do método de solvatação implícito IEFPCM.

As geometrias otimizadas para fase gasosa e com a molécula solvatada não apresentaram mudanças e conformação. O resultado gerado pela otimização pode ser observado na Figura 74.

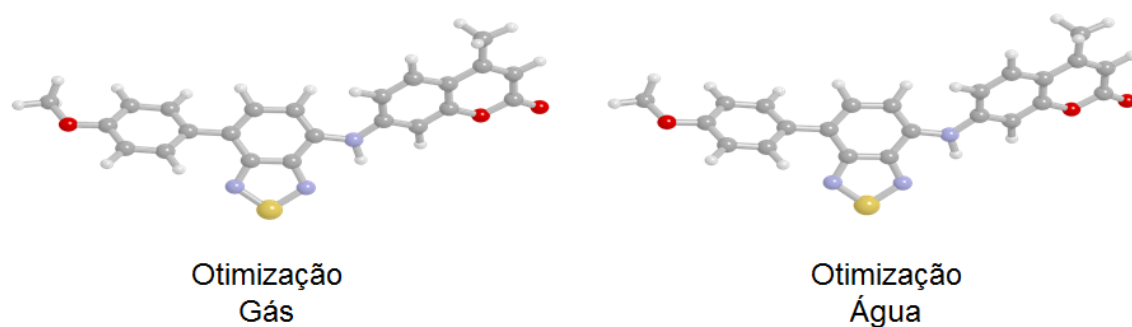


Figura 74. Geometrias obtidas para a molécula de **BTD-LIP** em fase gasosa e água, obtidas através de cálculos com o funcional CAM-B3LYP e função de base 6-311G(d)

Nota-se apenas uma variação do ângulo entre os núcleos ligados ao anel BTD. Para a otimização em gás existe um ângulo diedro ente o anél BTD e o ligante 4-metoxfenil de 35,98° e entre a BTD e a amino-cumarina de 15,45°. Para a molécula solvatada esta angulação passa a ser 39,45° entre o 4-metoxfeinl e a BTD e 15,38° para BTD e a aminocumarina.

Os orbitais moleculares obtidos para ambas as moléculas, bem como sua diferença de densidade eletrônica podem ser observados na Figura 75 e Figura 76.

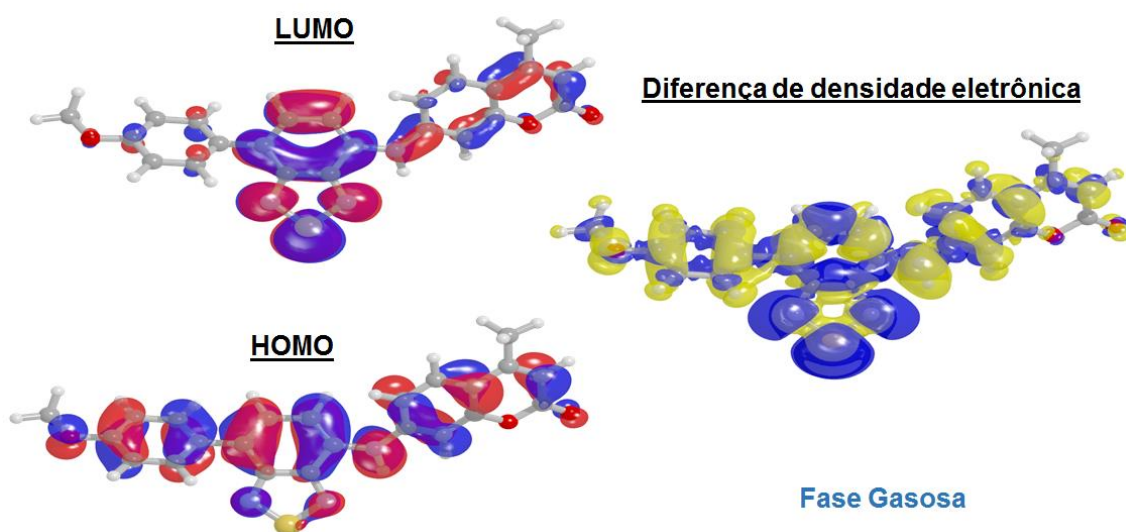


Figura 75. Geometria otimizada para a molécula **BTD-LIP** em fase gasosa com plot dos orbitais HOMO e LUMO (Esquerda). Diferença de densidade eletrônica nos estados S0 e S1. (direita). Cálculos realizados com o funcional PBE1PBE/6-311+G(2d,p)

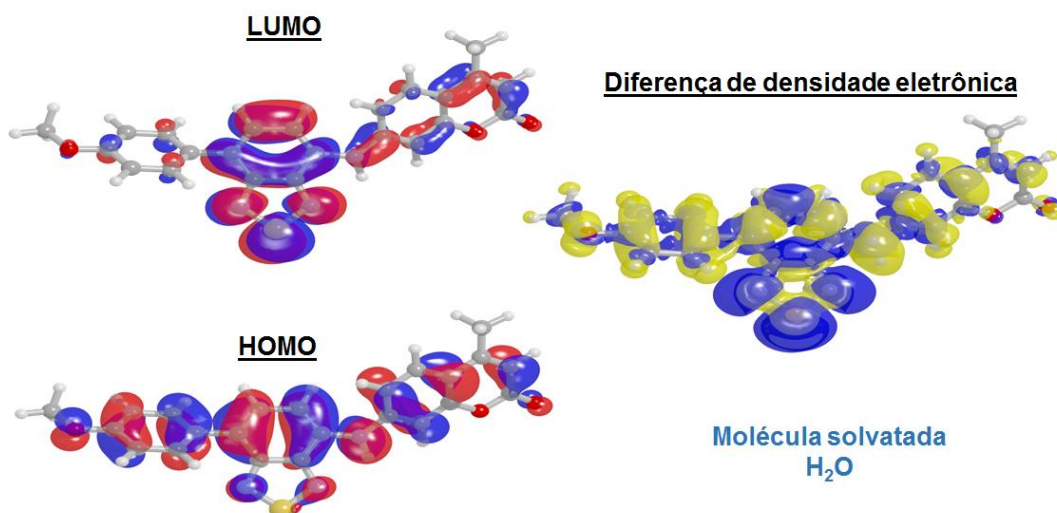


Figura 76. Geometria otimizada para a molécula **BTD-LIP** solvatada em água com plot dos orbitais HOMO e LUMO (Esquerda). Diferença de densidade eletrônica nos estados S0 e S1. (direita). Cálculos realizados com o funcional PBE1PBE/6-311+G(2d,p)

Os orbitais moleculares calculados para a fase gasosa e com a molécula solvatada apresentaram-se bastante similares, não havendo nenhuma diferença causada pela diferença de angulação entre os substituintes da BTD. Devido ao

maior caráter doador do substituinte 4-metoxifenil observa-se para ele uma maior densidade HOMO e uma densidade muito pequena do orbital LUMO. Os anéis benzênicos tanto da BTD quanto do núcleo cumarina apresentaram uma significativa participação na formação do orbital HOMO da molécula, sendo para o orbital LUMO observada apenas uma participação do anel aromático da BTD. Isso mostra que o núcleo BTD possui um maior caráter acceptor que o grupo cumarina.

Existe também uma pequena densidade do orbital HOMO nos nitrogênios da molécula de BTD, isso ocorre devido aos pares de elétrons nestes átomos, pode-se notar uma pequena deformação deste orbital no nitrogênio voltado para a amina do substituinte, esta deformação provavelmente é causada por uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio da amina e o nitrogênio do anel BTD. Não se observa esta interação no nitrogênio da BTD voltado para o 4-metoxifenil, isto porque, como visto nas geometrias, a angulação entre estes ligantes é maior ($35,98^\circ$ e $39,45^\circ$ para fase gasosa e molécula solvatada respectivamente), o que desfavorece as ligações de hidrogênio nesta região

Pela diferença de densidade eletrônica observa-se um forte processo de ICT nesta molécula. O caráter acceptor eletrônico do núcleo BTD é confirmado pelo forte aumento de densidade eletrônica nesta região da molécula quando excitada (indicado pela superfície azul nesta molécula) o caráter acceptor do substituinte 4-metoxifenil também pode ser observado pela grande diminuição de densidade nesta região da molécula (indicado pela superfície amarela). A participação da aminocumarina para o processo de ICT também é significativa, existindo uma doação eletrônica deste núcleo para o anel BTD com o processo de excitação. O anel piran-2-ona deste núcleo tem pouca participação no processo de estabilização da molécula, como pode ser observado pela pouca densidade eletrônica nesta região da molécula.

Foram também calculadas as energias a transição eletrônica entre os orbitais HOMO e LUMO, o momento de dipolo com a molécula solvatada e em fase gasosa e também comprimento de onda de absorção ($\lambda_{\text{max teóric}})$ para a molécula. Os resultados podem ser observados na Tabela 8 e Figura 77.

Tabela x. Resultados teóricos do composto **BTDLIP** obtido pelo funcional e função de base PBE1PBE/6-311+G(2d,p).

Tabela 8. Resultados obtidos dos cálculos de “*single point*” realizados a molécula **BTD-LIP**, no estado líquido e gasoso. Utilizou-se o funcional PBE1PBE com a função de base 6-311+g(2d,p). As geometrias utilizada para este cálculo foram obtidas através do funcional CAM-B3LYP e função de base 6-311G(d).

		μ (D)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	$\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$ (eV)	λ (nm)
PBE1PBE	Gás	6,552	-5,739	-2,567	3,171	220,17
6-311+G(2d,p)	Água	8,737	-5,737	-2,509	3,228	235,46

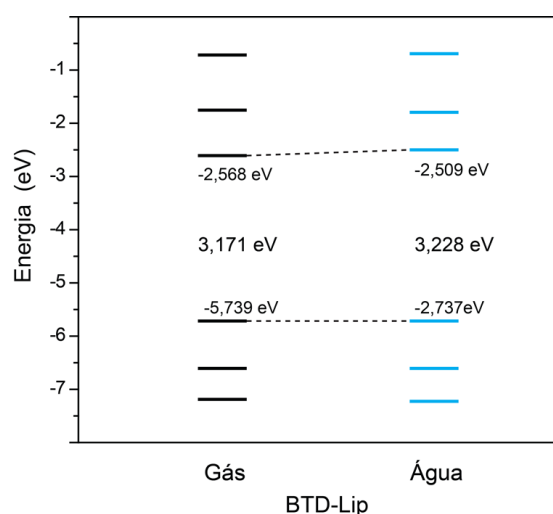


Figura 77. Diagrama de energia dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula **BTD-LIP** em fase gasosa e solvatado em água. Observa-se um aumento do gap energético com o efeito de solvatação.

Observa-se que para o cálculo da solvatação há apenas uma pequena variação da energia, sendo esta variação causada principalmente pelos orbitais LUMO. O comprimento de onda de absorção teórico para a molécula solvatada em água teve uma grande diferença do resultado experimental, podendo esta diferença estar relacionada a utilização de um método de solvatação contínuo, onde interações intermoleculares específicas como as ligações de hidrogênio entre o soluto e o solvente não são levadas em consideração.

$$\lambda_{\text{max exp}} (\text{nm}) = 145,0 \text{ e } \lambda_{\text{max teórico}} (\text{nm}) = 235,5 \text{ nm.}$$

Imageamento e Dinâmica celular

Nesta seção são apresentados os ensaios biológicos com a nova sonda híbrida fluorescente **BTD-LIP**. Para estes ensaios foi utilizada a linhagem de célula Caco 2 (um tipo de célula extraído de adenocarcinoma de cólon humano). As marcações celulares foram realizadas com células vivas e fixadas. Para a excitação do fluoróforo foi utilizado o comprimento de onda de excitação de 488 nm, sendo observado apenas uma faixa de emissão para a nova sonda fluorescente.

Os resultados de marcação com esta nova sonda fluorescente, tanto para marcação de células vivas, quanto para células fixadas podem ser observados na **Figura 78**.

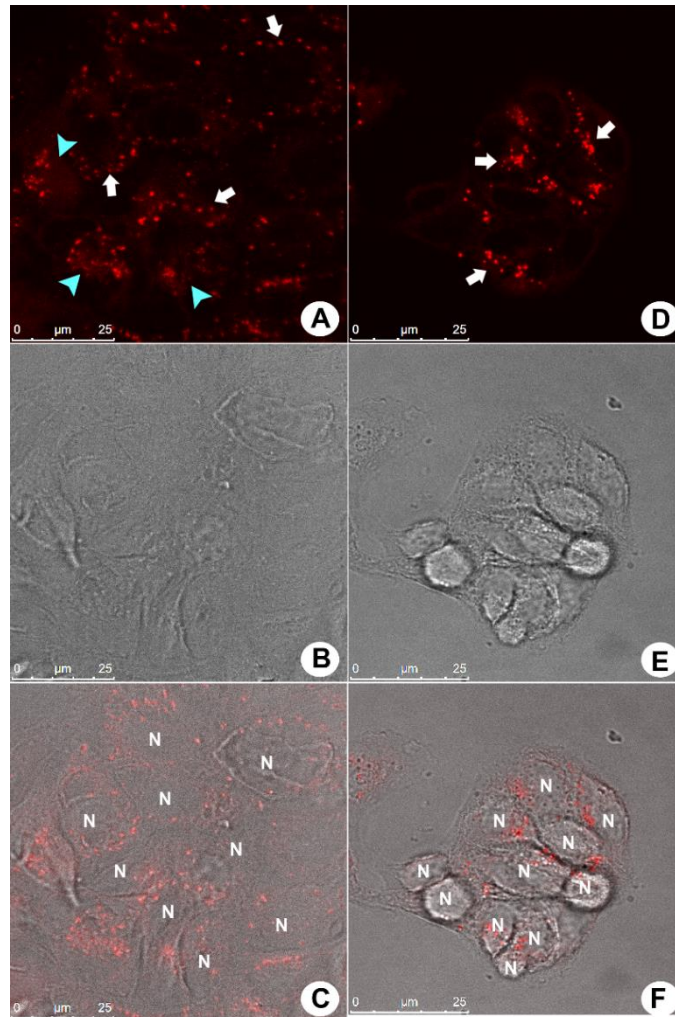


Figura 78. BTD-LIP marcando especificamente gotas lipídicas em células Caco-2 com efetividade similar tanto para células vivas quanto para células fixadas. As imagens A, B e C mostram células vivas incubadas com a sonda, as imagens D, E e F mostram as células fixadas. As imagens A e D mostram o perfil de corpúsculos lipídicos sendo marcados com esta sonda (indicado pelas setas). Nota-se a associação da sonda também a regiões próximas ao núcleo, correspondendo ao complexo de Golgi e retículo endoplasmático. (indicado pelas setas azuis claras). As imagens B e E mostram o aspecto morfológico da célula através da microscopia de contraste de fase. As imagens C e F mostram a sobreposição das imagens de contraste com os sinais de fluorescência. A letra N nas imagens indicam o núcleo celular.

A nova sonda fluorescente apresentou uma intensa radiação vermelho fluorescente, não sendo observado nenhum tipo de fotodegradação durante todo o processo de aquisição das imagens. Sondas vermelhas em geral apresentam uma alta taxa de fotodegradação devido a esta cor de emissão ser de baixa

energia, fazendo com que a molécula dissipe a energia de outras formas não radioativas o que pode levar a mudanças de sua estrutura molecular e conseqüentemente perda de fluorescência.

A Figura 78 mostrou um padrão de fluorescência dentro da célula, sendo os sinais restrito a pequenas vesículas distribuídas pelo citoplasma. Este efeito foi observado tanto em células vivas quanto em células fixadas. Estas vesículas são indicadas nas imagens pelas setas brancas. Foi observado também uma leve marcação nas regiões próximas ao núcleo celular, indicado nas figuras pelas setas azuis claras, esta região é uma região específica de organelas celulares como complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Não são notadas diferenças entre a especificidade de marcações realizadas com células vivas e fixadas, como pode ser notado pelo mesmo padrão de marcação para ambas. Não houve para os experimentos realizados em células vivas, efeitos citotóxicos, o que pode ser notado pela morfologia normal da célula através da microscopia de contraste

Devido as formas, tamanho e localização das vesículas celulares, cogitou-se que a nova sonda híbrida fluorescente estivesse marcando corpúsculos lipídicos no interior celular.

Os corpúsculos lipídicos (CL), que são comuns em diversas células como leucócitos e adipócitos, exercem funções celulares importantes. No passado acreditava-se que estas estruturas estavam relacionadas apenas ao estoque de lipídios nas células, não sendo reconhecidas como organelas dinâmicas e com atividades celulares específicas.⁸ Atualmente, por exemplo, sabe-se as CL estão relacionadas com respostas imunológicas onde observa-se o aumento das mesmas em eicosanoides durante processos inflamatórios.¹³⁶ A homeostase celular, estoque e metabolismo de lipídios dentre inúmeros outros mecanismos celulares envolvem a mobilização destas moléculas hidrofóbicas, e são dependentes da atividade dos CL.^{8,136} A marcação destas estruturas celulares é bastante limitada, os CL possuem uma natureza apolar, o que pode levar a uma atipicidade comportamental destas organelas quando há interação destas com marcadores celulares, podendo ocorrer muitas vezes a dissolução ou fusão destes corpúsculos em meio celular.^{8,9}

Para confirmação de que a sonda molecular **BTD-LIP** estava realmente marcando os CL no interior celular foram realizados testes comparativos com um

marcador comercial de lipídios derivado do núcleo BODIPY. As imagens das marcações de ambas as sondas podem ser observada na Figura 79.^{xiv}

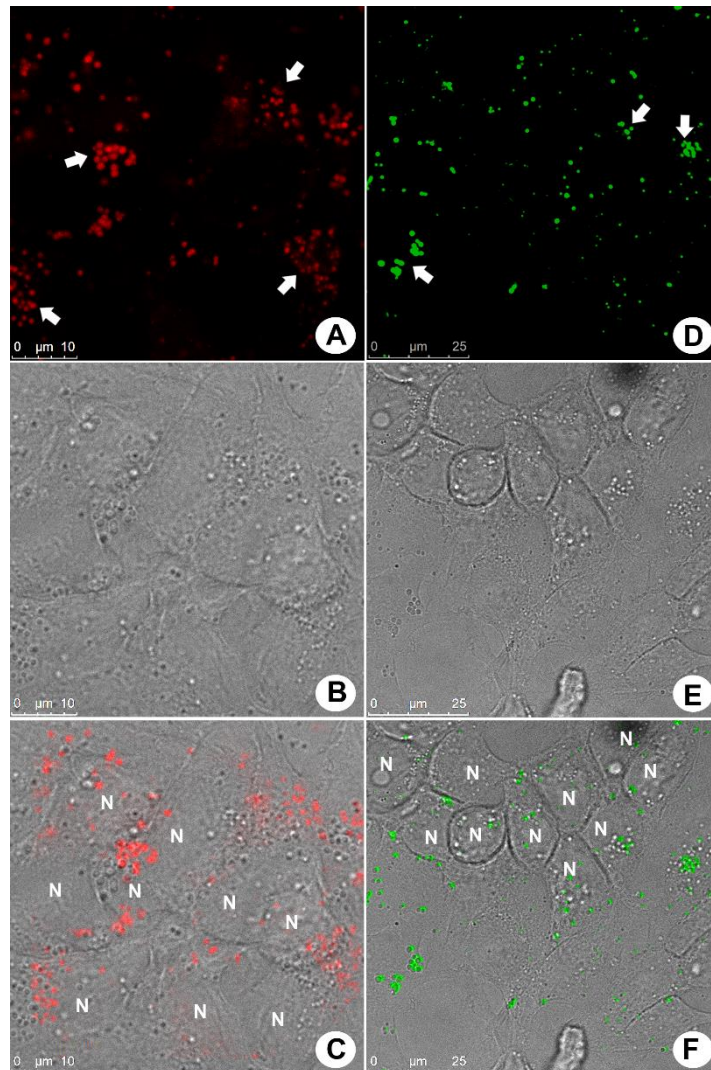


Figura 79. BTD-LIP marcando gotas lipídicas em células de Caco-2. A imagem A mostra os corpúsculos lipídicos marcados com a **BTD-LIP** (indicado pelas setas) e a Imagem B mostra estes corpúsculos marcados com um marcador comercial BODIPY (indicado também pelas setas). As imagens B e E mostram o aspecto morfológico da célula através da microscopia de contraste de fase. As imagens C e F mostram a sobreposição das imagens de contraste com os sinais de fluorescência. A letra N nas imagens indicam o núcleo celular.

Observa-se o mesmo padrão de marcação para a nova sonda celular desenvolvida e o marcador comercial, como indicado pelas setas na imagem.

Todos os experimentos biológicos foram realizados pelo professor José Raimundo Corrêa e seu grupo de pesquisa no Laboratório de microscopia eletrônica no Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. IB-UnB

Confirmando que a **BTD-LIP** desta forma é uma nova sonda derivada do núcleo BTD que pode ser utilizada para marcações lipídicas. Estes experimentos foram realizados apenas em células fixadas não sendo o marcador comercial aplicado para experimentos de células vivas.

As diferentes cores de emissão destes fluoróforos permitiram que estes fossem utilizados simultaneamente para marcação dos CL, como pode ser visto no último experimento realizado com este fluoróforo, Figura 80.

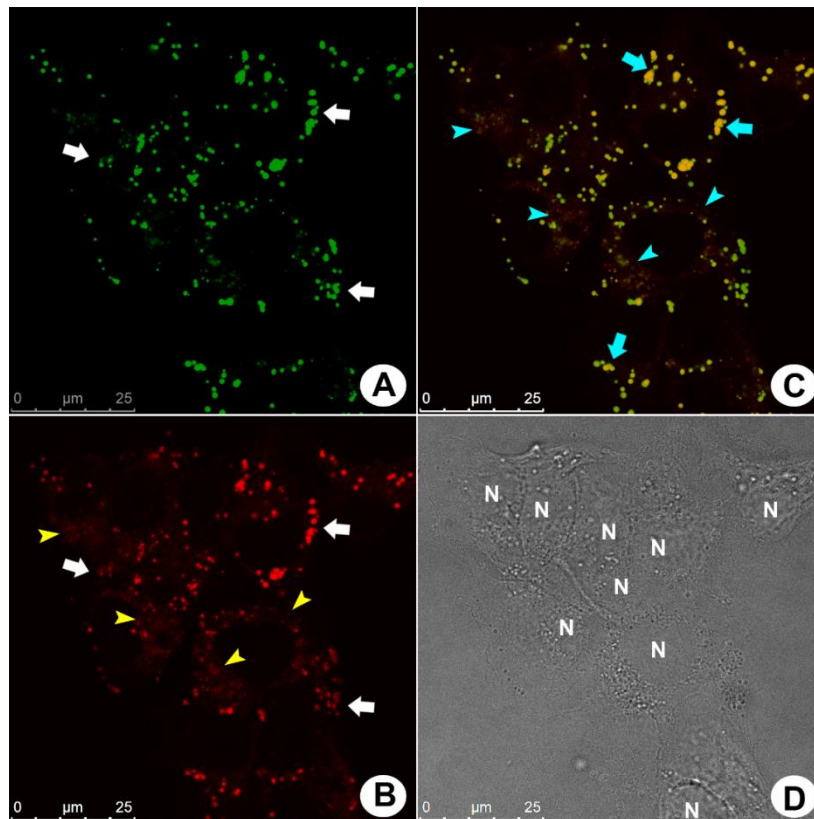


Figura 80. Corpúsculos lipídicos marcados em células de Caco-2 através da marcação simultânea com a **BTD-LIP** e o marcador comercial BODIPY. A imagem A mostra o aspecto fluorescente destas vesículas marcadas com o BODIPY (indicado pelas setas). A imagem B mostra o aspecto fluorescente dos lipídios marcados com a **BTD-LIP**, sendo também observadas as marcações próximas ao núcleo, indicado pelas setas amarelas. Na imagem C pode-se observar a sobreposição da fluorescência de ambos os marcadores (indicado pela seta azul clara), ficando mais evidente as áreas marcadas apenas pela **BTD-LIP** (indicada pela cabeça de seta azul clara) A imagem D mostra o aspecto morfológico normal da célula.

Todas as imagens da Figura 80 mostram a mesma lâmina contendo ambos os fluoróforos, sendo apenas ajustados os filtros do microscópio para captação das emissões. Pelas imagens observa-se que ambas as sondas foram capazes de marcar os CL sem que uma interferisse na marcação da outra. A imagem C mostra a detecção de ambas as sondas simultaneamente, o padrão similar de marcação destas sondas mostra uma sobreposição das cores de emissão destes fluoróforos, produzindo uma coloração amarela, indicado pelas setas azuis claras na imagem. Este experimento também confirma a hipótese citada anteriormente, que além dos CL a nova sonda celular **BTD-LIP** também foi capaz de marcar regiões perinucleares ricas em organelas celulares como retículo endoplasmático e complexo de Golgi.

Capítulo 5

Design e síntese de uma nova sonda fluorescente sensível a espécies reativas de oxigênio em meio celular. A BTD-ROS

Introdução

As espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS), são moléculas ou radicais livres, com propriedades oxidantes, presentes em meio celular.¹³⁷ Estas espécies são formadas a partir da redução do oxigênio molecular (O_2) ao ânion superóxido (O_2^-), seguida de outras reações moleculares a qual são produzidas diferentes ROS, Figura 81.

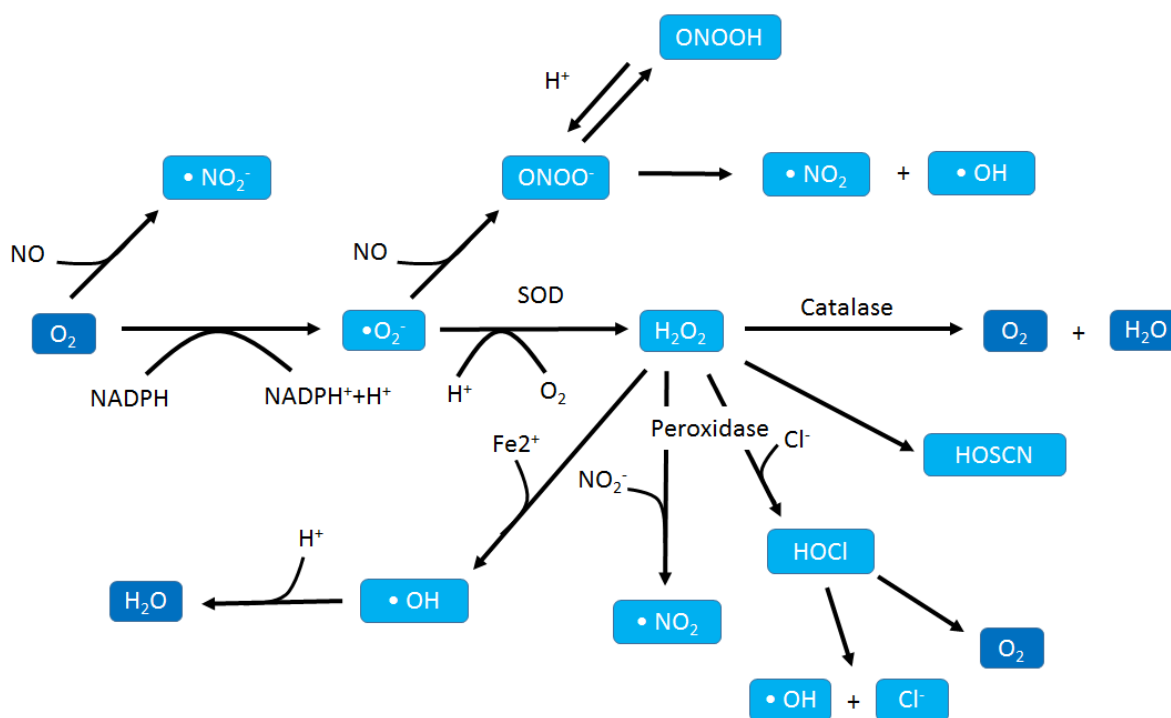


Figura 81. Meios de formação das ROS a partir da redução do oxigênio ao ânion superóxido. Imagem adaptada da referência¹³⁸

As ROS são geradas nas células por reações enzimáticas, sendo estas espécies formadas durante o processo de respiração celular, principalmente nas mitocôndrias, a partir da enzima NADPH oxidase.¹³⁹ O superóxido formado é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da ação de uma segunda enzima chamada superoxide dismutases (SOD1-3); a molécula de H_2O_2 também

pode reagir com o (NO_2) presente em meio celular formando o peróxido nítrico (ONOO^-), sendo desencadeados tanto pelo peróxido de hidrogênio quanto o peróxido nítrico a formação de inúmeras outras ROS.¹³⁸

Ocorre durante o processo de respiração mitocondrial um escape de elétrons do sistema na qual se tem a transformação de ADP em ATP, sendo assim, a geração de ROS uma consequência inevitável à produção de energia em meio celular.¹³⁹ Desta forma, o controle da sua concentração em meio celular é fundamental, sendo este realizado por enzimas antioxidantes que reduzem, quando necessário, a quantidade das espécies de ROS no meio equilibrando o seu balanço natural em uma célula saudável. São exemplos de enzimas antioxidantes: a glutathiona peroxidase, a peroxirredoxina e a hidroxiperoxidase.¹⁴⁰

Devido ao fato de reativas, as ROS foram durante muito tempo caracterizadas como espécies prejudiciais ao meio celular, sendo estas espécies consideradas subprodutos da respiração aeróbica da célula e estando sua função ligada apenas a respostas imunológicas em meios celulares.¹⁴¹ Contudo, atualmente sabe-se que estas espécies estão relacionadas a diversos outros processos que não são prejudiciais ao meio celular, podendo-se destacar:

- Ao stress celular, atuando na adaptação celular a qualquer perturbação causada. Células sobre hipóxia aumentam seus níveis de ROS, ativando enzimas responsáveis por reduzir determinados processos celulares e conseqüentemente o consumo de oxigênio pela mesma.¹⁴⁰
- A regulação de processos autofágicos pelas células, sendo as ROS requeridas para indução de autofagia celular de proteínas e organelas danificadas ou com mal funcionamento. A autofagia também é utilizada pela célula como um modo de sobrevivência, podendo também causar a “morte celular autofágica”.¹⁴²
- A processos imunológicos, atuando diretamente através oxidação de agentes patógenos e também indiretamente a processos mais sutis como o disparo de enzimas ligadas a funções imunológicas inativas como antivirais, antibactericidas e antiparasitas em meio celular.¹⁴⁰
- Na diferenciação celular de células troncos, sendo mostrado que as ROS são requeridas para que o processo de diferenciação aconteça. Estudos

mostraram que a transformação de “mesenchymal stem cells” em tecido adiposo é pausada quando há redução do nível de ROS nestas células.¹⁴³

- A regulação do envelhecimento celular, existindo na literatura pontos contraditórios ao papel das ROS nestes processos. Segundo Hekimi¹⁴⁴ o envelhecimento celular seria a causa do aumento da produção das ROS em meio celular e não a consequência desta produção como acreditado pela grande maioria da comunidade científica.

Apesar destas espécies estarem presentes em diversos processos, tanto produção quanto a remoção de ROS em meio celular deve ser extremamente controlada, pois o descontrole destas espécies podem gerar danos ao meio celular, podendo levar a célula a cometer apoptose.¹⁴⁵ Estas espécies possuem um importante papel na adaptação celular frente a perturbações que podem ocorrer nestas estruturas. Perturbações à célula podem levar esta a uma grande produção de ROS, sendo esta levada a apoptose enquanto situações moderadas de estresse celular podem alterar a quantidade destas espécies de modo a célula se adequar a este stress.

Inúmeros processos celulares relacionados as ROS ainda são questões de debate na literatura. Apesar das mitocôndrias consumirem cerca de 95% do oxigênio celular e serem consideradas as maiores produtoras destas espécies,^{140,146,147} alguns autores como Brown¹⁴⁸ alegam falta de evidências experimentais deste fato, colocando-as como recicladoras das ROS uma vez que as mitocôndrias possuem enzimas capazes de degradar o superóxido e o peróxido de hidrogênio e também existir nas células outras estruturas capazes de produzir a mesma quantidade de ROS que estas organelas, como o retículo endoplasmático e os peroxissomos.

Devido a importância das ROS e também a existência de lacunas na compreensão destas espécies em meio celular, há um grande número de trabalhos relacionados ao desenvolvimento de métodos para detecção destas espécies.

O baixo tempo de vida destas espécies em meio celular, bem como sua baixa concentração impossibilita que estas espécies sejam medidas através de técnicas diretas como a ressonância de spin eletrônico, (*eléctron spin resonance*, ESR) sendo necessário para a utilização desta técnica os chamados *spin-traps*,

substâncias que retardam a degradação do ânion superóxido em meio celular.¹⁴⁹ Devido à célula ser um sistema redutivo estes *spins-traps* podem sofrer outras interações intracelulares que não com as ROS sendo gerados resultados falso negativos para estas medidas.¹⁵⁰

Brand em seu trabalho sobre o estudo topológico dos sítios de produção das ROS em mitocôndrias¹⁴⁶ afirma que a utilização de métodos indiretos para detecção destas espécies (são utilizados inibidores transporte de elétrons para o reconhecimento dos sítios de ROS em mitocondriais) pode afetar o funcionamento normal da célula, alterando conseqüentemente a produção de ROS e gerando assim uma confiabilidade em estudos quantitativos. A utilização de sondas fluorescentes para esta quantificação, como a dihidroclorofluoresceína e a dihidrorodamina também esbarra no problema supracitado além da falta de conhecimento da especificidade destas substâncias em meio celular o que pode levar a erros interpretativos de quantificação. O estudo topológico dos sítios de produção de ROS nas mitocôndrias realizado pelo autor é vital para informações acerca de quais localizações na matriz mitocondrial são suscetíveis a maiores danos oxidativos.

Segundo Kelkka¹³⁸ as ROS em meio celular fazem parte de um sistema cuidadosamente balanceado o qual é sensível a qualquer perturbação. Sendo um desafio atual a criação de sondas celulares capazes marcar estas espécies sem mudanças fisiológicas significativas nas células e conseqüentemente não alterando a produção de ROS no meio celular.

Inúmeros compostos são capazes de marcar as ROS em meio celular de maneira indireta,¹⁵¹ sendo estes diferenciados através do tipo de interação às espécies oxidativas. Marcadores como a lucigenina (bis-N-metilacridínio nitrato) e o luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) são marcadores quimioluminescentes às ROS, gerando fótons ao reagirem com estas espécies.¹³⁸

O diacetato diclorodifluoresceína (DCFH-DA) é um marcador fluorescente, sendo o mais utilizado para detecção de ROS em meio celular. Esta substância é rapidamente absorvida e oxidada pelo H₂O₂, gerando a 2,7-diclorofluoresceína que é altamente fluorescente quando excitada. Apesar de mais utilizada, existem algumas desvantagens à DCFH-DA como a não seletividade ao H₂O₂, podendo esta substância ser oxidada por outras espécies

oxidativas em meio celular, a dependência do íon Fe^{2+} para sua oxidação e a possibilidade de autooxidação, gerando uma amplificação artificial de fluorescência em meio celular.¹⁵¹

Devido às dificuldades de seletividade e limitações em marcadores que realizam reações redox às ROS (muitas vezes estes marcadores interagem com outras substâncias em meio celular, que não as ROS), outros tipos de sondas, baseadas em diferentes reações foram desenvolvidas. Maeda et. al.¹⁵² mostra em seu trabalho um marcador derivado do núcleo fluoresceína sensível às ROS através de uma reação de substituição nucleofílica, **Figura 82**. Esta nova sonda apresentou uma seletividade as ROS, não sendo fluorescente a agentes redutores como o ácido ascórbico e a 1,4-dihidroquinona.

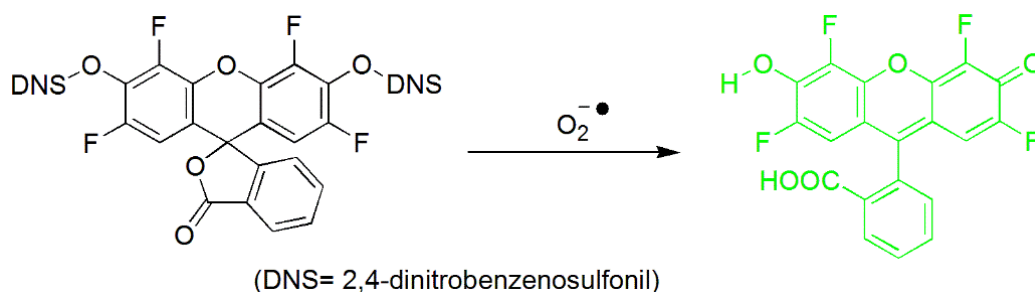


Figura 82. Estrutura de uma sonda fluorescente sensível a ROS. Imagem adaptada da referência 152.

Outro tipo de detecção indireta destas espécies são sondas que exploram o efeito de quenching molecular através da chamada “transferência de elétron por foto-indução” (*photo-induced electron transfer*, PET). Este efeito ocorre quando uma molécula contém em sua estrutura uma parte doadora de elétrons suficientemente energética para doar um elétron a parte receptora quando esta é excitada. A vacância gerada no orbital HOMO do fluoróforo, através da excitação, é preenchida pelo elétron doado, impedido o retorno do elétron excitado ao seu orbital de origem o que causa desta maneira uma supressão da fluorescência, uma vez que a energia de retorno dissipada pelo elétron não é mais a mesma, Figura 83. Para que ocorra o efeito “*turn on*” do fluoróforo, após a reação com as ROS presentes em meio celular, o orbital HOMO da parte doadora de elétrons, deve estar energeticamente abaixo do

orbital HOMO do fluoróforo inativando assim o efeito de quenching causado por esta molécula

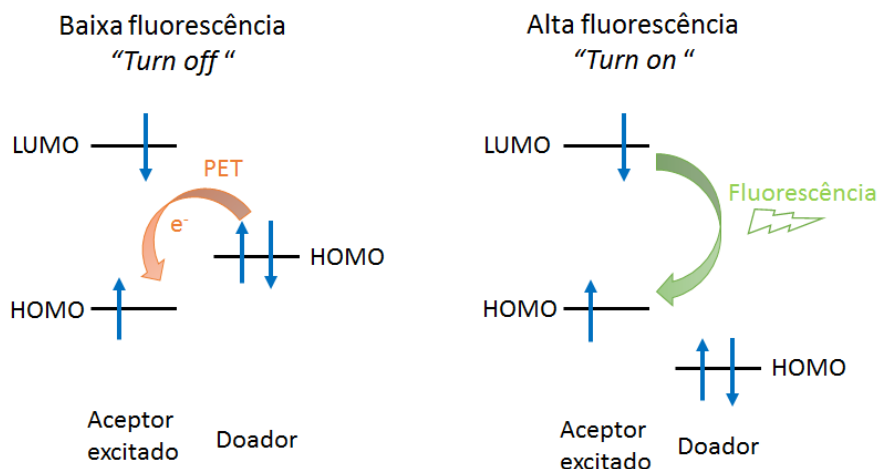


Figura 83. Processo de ativação e desativação de fluorescência causado pelo efeito de transferência eletrônica fotoinduzida. Imagem adaptada da referência 153.

Segundo Soh et. al.¹⁵³ a vantagem de se ter sondas baseadas no efeito de "turn off-on" causado pela PET, é que as sondas possuam uma menor taxa de oxidação, desta forma, apresentando uma seletividade às ROS e também apresentam uma alta sensibilidade a estas espécies. No estudo do autor, sua sonda DPPEA-HC (7-hidroxi-2-oxo-N-(2-(difenilfosfino)etil)-2H-cromeno-3-carboxamida) apresenta uma fluorescência 137 vezes maior após reagir com o peróxido de hidrogênio.

O ferroceno, um composto organometálico de 18 elétrons formado por um átomo de ferro (normalmente com estado de oxidação +2) entre dois anéis ciclopentadienil, vem sendo utilizado como um quencher de luminescência em processos intramoleculares.¹⁵⁴ A energia de seus orbitais moleculares difere das energias comumente vistas nos diagramas de energia de moléculas orgânicas. Sua formação ocorre pela coordenação dos orbitais π dos ciclopentadienos com os orbitais "d" do átomo de ferro.

O diagrama de energia dos orbitais desta molécula pode ser visto na Figura 84. Segundo Fery-Forgues e colaboradores¹⁵⁴ são aceitos como HOMO desta molécula os orbitais $e_{2g}(d)$ e $a_{1g}(d)$ e como LUMO o orbital $e_{1g}(d)$, sendo

desta maneira os responsáveis pelas propriedades fotofísicas desta molécula essencialmente os orbitais pertencentes ao centro metálico.

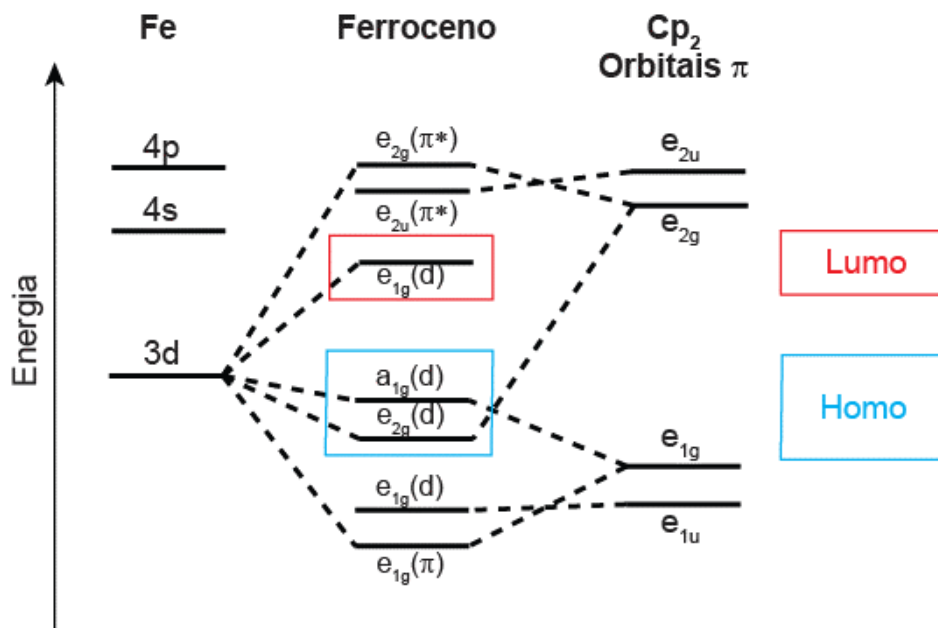
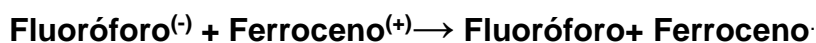
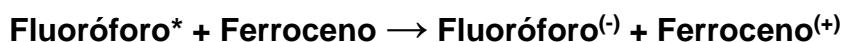


Figura 84. Diagrama de energia dos orbitais moleculares do ferroceno, sendo destacados os orbitais HOMO em azul e LUMO em vermelho. Imagem adaptada da referência 154.

O efeito de quencher em moléculas no estado excitado pela molécula de ferroceno e também de seus derivados pode ocorrer através de dois principais processos: ¹⁵⁴

- A transferência de energia da molécula excitada para o complexo organometálico, sendo esta energia dissipada através de relaxação térmica.
- A transferência de um elétron do ferroceno para a molécula excitada, sendo formado temporariamente um cátion ferroceno (a carga da molécula é mantida nula), que posteriormente retorna a sua espécie neutra.



A este processo dá-se o nome de transferência de elétron por fotoindução, PET, citado anteriormente no texto.

É importante ressaltar que para que o processo de PET ocorra é necessário que o potencial de redução do ferroceno ou de seu derivado seja menor que o potencial de redução da molécula, ou seja, é necessário que o ferroceno consiga reduzir a molécula quando esta se encontra no estado excitado.

A utilização da molécula de ferroceno como quencher em sondas sensíveis a ROS ocorre devido a sua reatividade frente a estas espécies quando ligados a núcleos fluorescentes. Apesar de sua estrutura única ser extremamente estável e também fotoquimicamente inerte,¹⁵⁴ sendo necessárias condições extremas de temperatura (>400 °C) e sistemas extremamente oxidativos para a degradação desta formação molecular, o pesquisador Chen e colaboradores,¹⁵⁵ em um estudo recente, apresentou um novo marcador fluorescente em que a degradação desta espécie é observada em condições brandas como temperatura ambiente e luz natural. O marcador sintetizado, um derivado do BODIPY, Figura 85, foi desenvolvido com a proposta de uma nova sonda fluorescente para detecção de ROS em meio celular. Porém ao ser deixado em solução aquosa sob luz natural, observou-se uma mudança de coloração da solução e surgimento de fluorescência, sendo proposto pelos autores que, em solução água, a estrutura do ferroceno sofre dissociação, reativando a fluorescência do BODIPY. Segundo os autores, este foi o primeiro estudo a mostrar a dissociação do ferroceno em condições brandas.

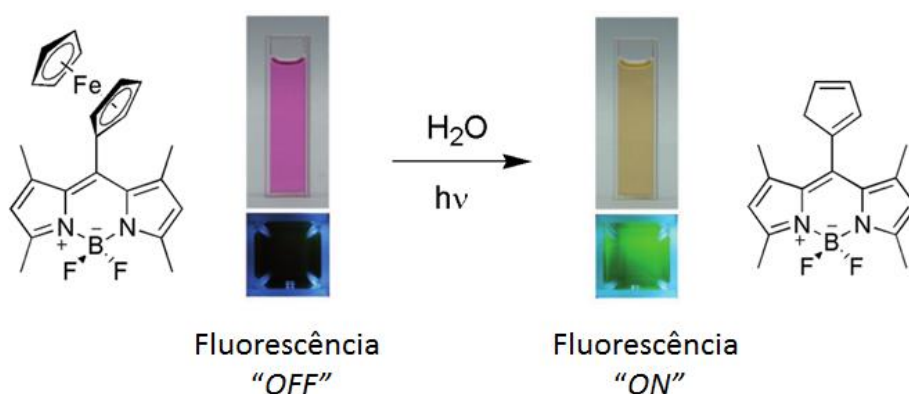


Figura 85. Estrutura de um marcador contendo ferroceno que sofre degradação em água e a luz ambiente. Na imagem é mostrado o efeito de "turn on" deste marcador ao sofrer a degradação do ferroceno. Imagem adaptada da referência 155

A aplicação em ensaios biológicos com sondas contendo o ferroceno em sua estrutura também já se mostrou viável. O composto (9-antril)etenilferroceno (9-AEF)¹⁵⁶ foi permeável a membrana celular e altamente específico a um tipo de ROS, o ácido hipocloroso. O processo “*turn on*” de fluorescência desta sonda também ocorre, segundo os autores, com a reação do ferroceno a estas espécies e consequentemente a ativação do fluoróforo.

Devido a fácil detecção e à alta velocidade de marcação apresentada pelas sondas fluorescentes em meio celular, estas tem sido consideradas peças-chaves à detecção de ROS neste meio,¹⁵¹ sendo a busca por sondas que possuam o efeito de “*turn on*” a estas espécies, ideal para estudos de células sob condições de stress oxidativo. Recentemente foi destacado por nosso grupo de pesquisa a potencialidade do núcleo BTD no desenvolvimento de novas sondas fluorescentes para estudos de bioimageamento em células vivas.¹⁵⁷

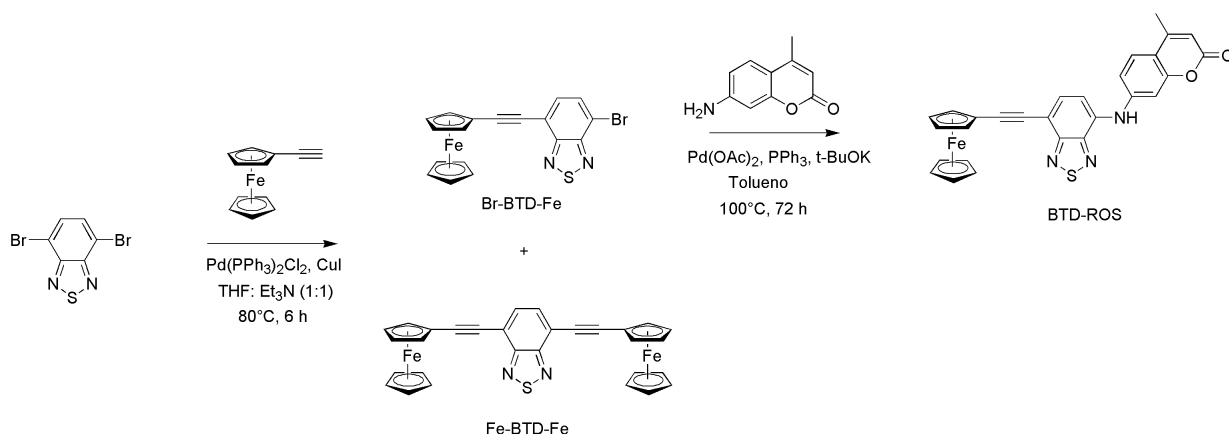
Sondas fluorescentes contendo o núcleo ferroceno como um quencher tem se mostrado bastante sensíveis às ROS,¹⁵⁶ não apresentando citotoxicidade e sendo permeáveis a membrana citoplasmática.

Baseando-se nestas vantagens busca-se desenvolver uma nova sonda fluorescente derivada do núcleo fluorescente BTD sensível às ROS. Esta nova sonda possui um substituinte ferroceno acoplado a um fluoróforo híbrido contendo os núcleos BTD e cumarina. Para o favorecimento do processo de ICT, o núcleo de cumarina será acoplado na molécula pelo qual se acredita que contribuirá significativamente para o aumento dos valores de deslocamento de Stokes e havendo deslocamentos batocrômicos em sua emissão.^{39,134} A conjugação de dois núcleos aromáticos também facilita o efeito de quenching realizado pelo ferroceno, uma vez que a transferência do elétron é favorecida pela aproximação dos orbitais moleculares HOMO de ambas as partes da molécula (receptora e aceptora).

Resultados e discussão

Síntese da nova sonda fluorescente 4-(7-amino-4-metilcumarina)-7-etinilferroceno-(2,1,3)-benzotiadiazola.

Para a síntese do novo composto, utilizou-se como material de partida a 4,7-dibromo-BTD. Este material de partida foi sintetizado pelo grupo, sendo sua reação de formação já relatada na literatura.¹⁹ A primeira etapa reacional foi o acoplamento cruzado do derivado de BTD com o etinilferroceno (obtido comercialmente). Este acoplamento foi realizado através da reação de Sonogashira de acordo com o descrito por Kitamura e colaboradores,¹⁵⁸⁻¹²⁵ O produto desta reação¹²⁶ foi obtido com 50% de rendimento e em seguida usado na segunda etapa reacional como precursor do 4-bromo-7-ferroceniletinil-(2,1,3)-benzotiadiazola (**BTDFeBr**). **Esquema 5**



Esquema 5. Síntese da **BTD-ROS** a partir do acoplamento do ferroceno à 4,7-dibromo-BTD.

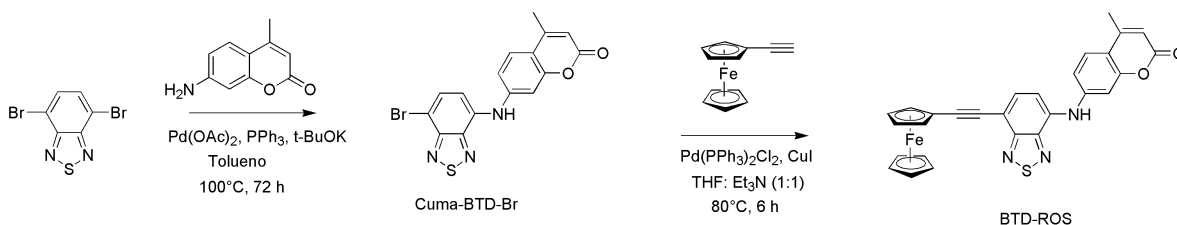
Na primeira etapa reacional foi isolado o subproduto 4-7-dietinilferroceno-(2,1,3)-benzotiadiazola (**BTDFeFe**), referente a dissustituição no derivado da BTD. A formação deste subproduto diminui o rendimento do produto desejado, sendo o controle do tempo reacional e da temperatura importantes para se evitar esta dissustituição. A estequiometria dos reagentes também deve ser levada em consideração, uma vez que o excesso de etinilferroceno em solução favorece

à dissubstituição da molécula, desta maneira a reação foi realizada com um excesso de 4,7-dibromo-BTD

O segundo procedimento reacional foi uma reação de aminação a molécula Br-BTD-Fe, sendo o bromo substituído por um núcleo cumarina contendo uma amina, sendo a molécula 7-amino-4-metilcumarina utilizada nesta etapa reacional. O processo de aminação foi realizado segundo uma adaptação da reação de Buchwald-Hartwig descrita por Sakurai e colaboradores.⁴⁶ O produto final 4-(7-amino-4-metilcumarina)-7-etinilferroceno-(2,1,3)-benzotiadiazola (**BTD-ROS**) foi obtido com um rendimento de 32%. O rendimento global da reação de formação desta molécula foi de $0,50 \times 0,32 = 0,16$ ou 16%.

Tanto o intermediário e o subproduto quanto o produto final foram caracterizados por ^1H e ^{13}C .RMN.

Para a síntese da **BTD-ROS** também foi testado inicialmente a reação de aminação, sendo gerado o precursor 4-bromo-7-(7-amino-4-metilcumarina)-BTD (Cuma-BTD-Br), através da substituição de um bromo da 4,7-dibromo-BTD pelo núcleo 7-amino-4-metilcumarina. A este precursor foi então realizada a reação de acoplamento com o etinilferroceno, sendo formado o produto final desejado, conforme observado no Esquema 6.



Esquema 6. Síntese da BTD-ROS a partir do acoplamento da 4-metil-7-aminocumarina a 4,7-dibromo-BTD.

Para esta via de formação da **BTD-ROS** obteve-se um rendimento de 53% na primeira etapa reacional, sendo, porém, o rendimento obtido na segunda etapa bastante abaixo do esperado (8%), ficando desta maneira o rendimento global da reação abaixo de 12% (4%). Dessa forma, esta metodologia não foi considerada a mais favorável por fornecer um rendimento global tão baixo. Sendo preferível para a formação da **BTD-ROS**, a utilização da primeira metodologia aqui apresentada.

Análise estrutural por RMN

Foram realizados os experimentos de ^1H e ^{13}C -RMN para caracterização dos precursores gerados a partir da reação de acoplamento da molécula de etinilferroceno à 4,7-dibromo-BTD.

Para a caracterização da molécula **BTDFeBr**, os assinalamentos do espectro de hidrogênio, bem como seus acoplamentos calculados são, Figura 86 e Figura 87: ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,80 (d, $J = 7,70$ Hz, 1H); 7,61 (d, $J = 7,30$ Hz, 1H); 4,63 (t, $J = 1,8$ Hz, 2H); 4,32 (t, $J = 1,8$, 2H); 4,3 (s, 5H). ^{13}C RMN (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 154,22; 153,15; 132,12, 132,06; 117,49; 113,60; 97,07; 81,09; 71,90; 70,22; 69,45; 36,27.

Os assinalamentos do espectro de hidrogênio, bem como seus acoplamentos calculados são:

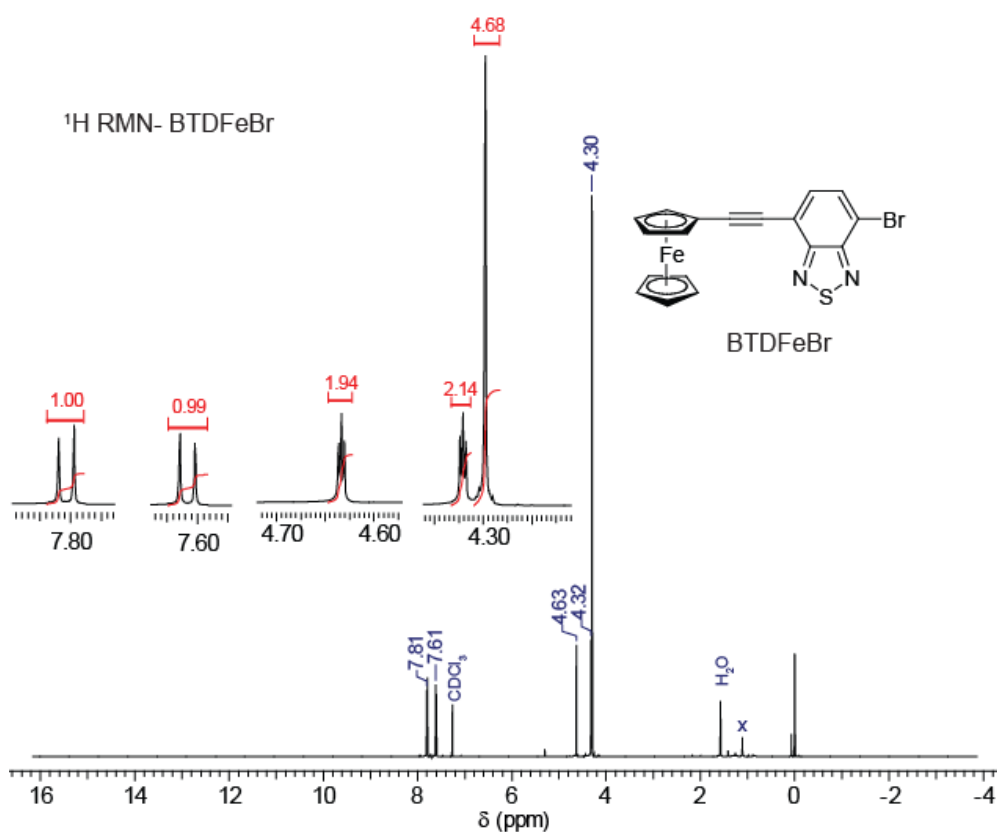


Figura 86. ^1H RMN (CDCl_3 , 600 MHz) da molécula **BTDFeBr**

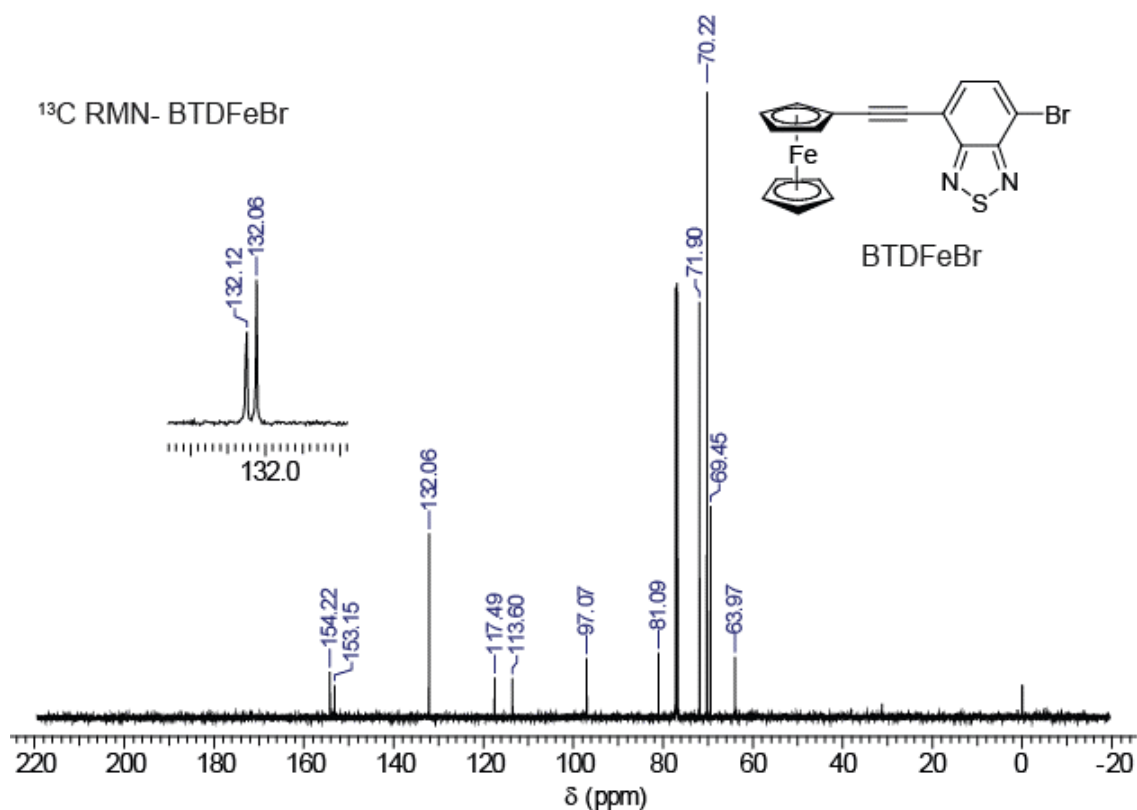


Figura 87 ¹³C RMN (CDCl₃, 600 MHz) da molécula **BTDFeBr**

O subproduto Fe-BTD-Fe também foi caracterizado através da RMN, sendo este experimento realizado apenas para confirmação desta molécula, uma vez que já era esperado a formação deste produto de diss substituição na molécula de BTD. Seu espectro de ¹H-RMN pode ser visto na Figura 88. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7,71 (s, 2H,); 4,65 (t, *J* = 1,75 x 2 Hz, 4H); 4,33 (t, *J* = 1,80 Hz, 4H); 4,31 (banda larga, 10H,).

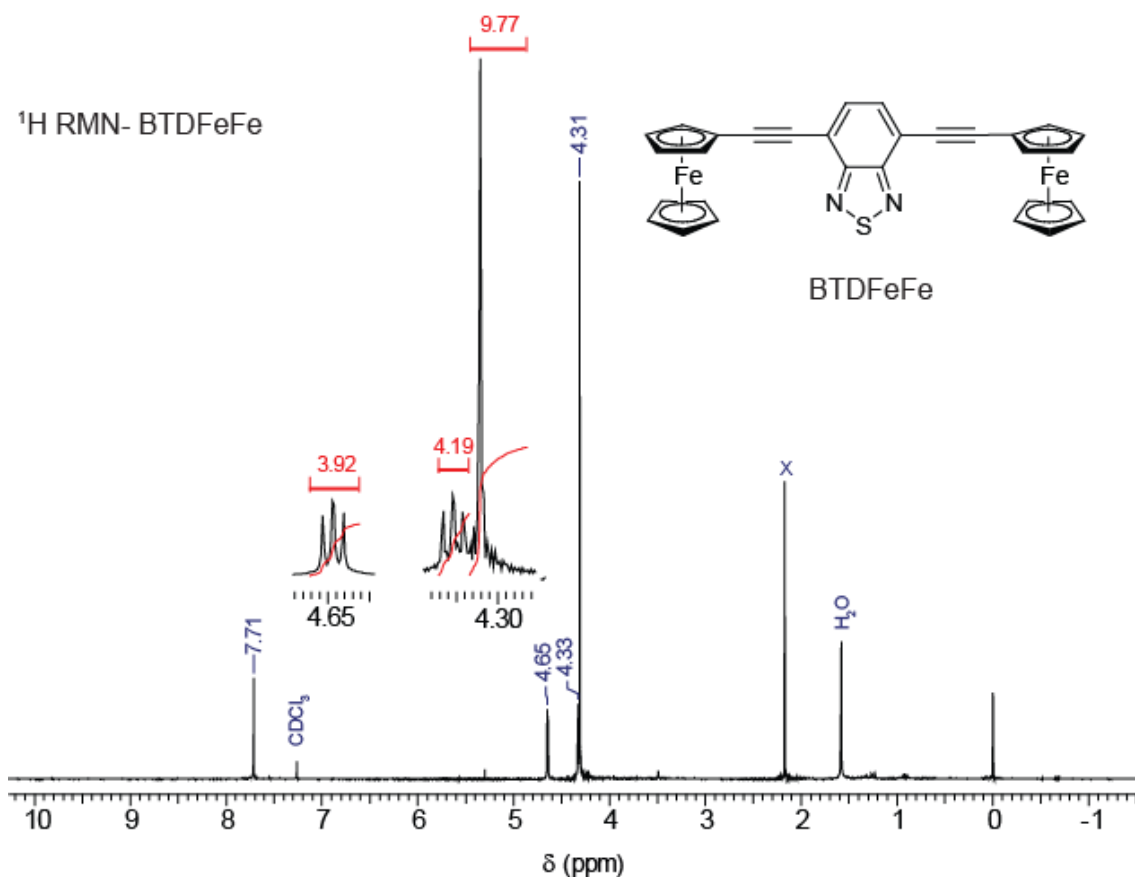


Figura 88. ¹H RMN (CDCl₃, 600 MHz) da molécula **BTDFeFe**

Os espectros obtidos para o produto final, a **BTD-ROS**, podem ser visualizados na Figura 89 e Figura 90. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7,71 (d, *J* = 7,70 Hz, 1H, BTD); 7,59 (d, *J* = 8,80 Hz, 1H, Ar-Cumarina); 7,53 (*banda larga*, 1H, NH); 7,36 (d, *J* = 7,70 Hz, 1H); 7,34 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H); 7,19 (dd, *J* = 8,4 e 2,6 Hz, 1H); 6,19 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H); 4,62 (t, *J* = 1,8 Hz, 2H); 4,31 (s, *banda larga*, 5H); 4,29 (t, *J* = 1,8 Hz, 2H); 2,44 (d, *J* = 1,1 Hz, 3H, CH₃); ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 161,01; 155,19; 155,18 (BTD); 152,18; 148,07; 143,87; 133,97; 133,32; 125,88; 115,22; 114,87; 112,59; 109,08; 107,95; 105,20; 93,32; 81,57; 71,71; 70,13; 69,04; 64,95; 18,58

Anal. Elem. Calc para C₂₈H₁₉FeN₃O₂S C, 65.00; H, 3.70; N, 7.68. Encontrada C, 65.09; H, 3.78; N, 7.79.

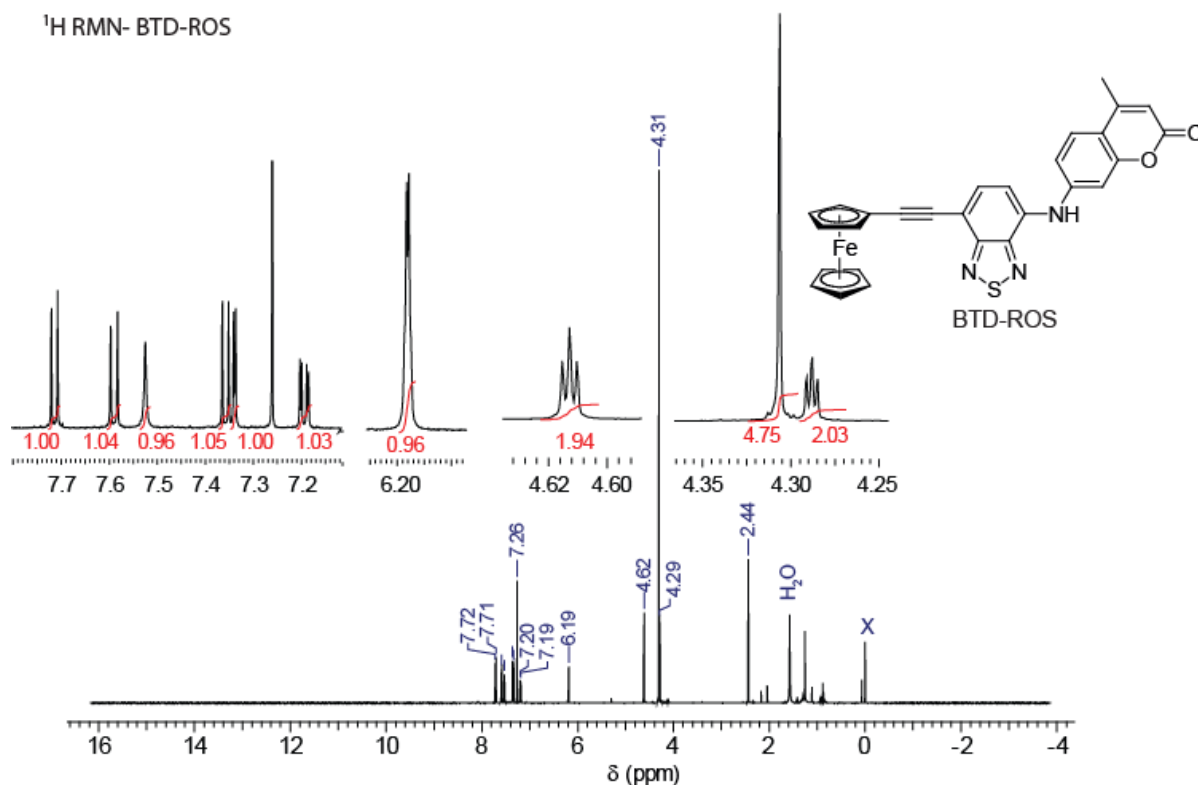


Figura 89. ¹H RMN (CDCl₃, 600 MHz) da molécula **BTD-ROS**.

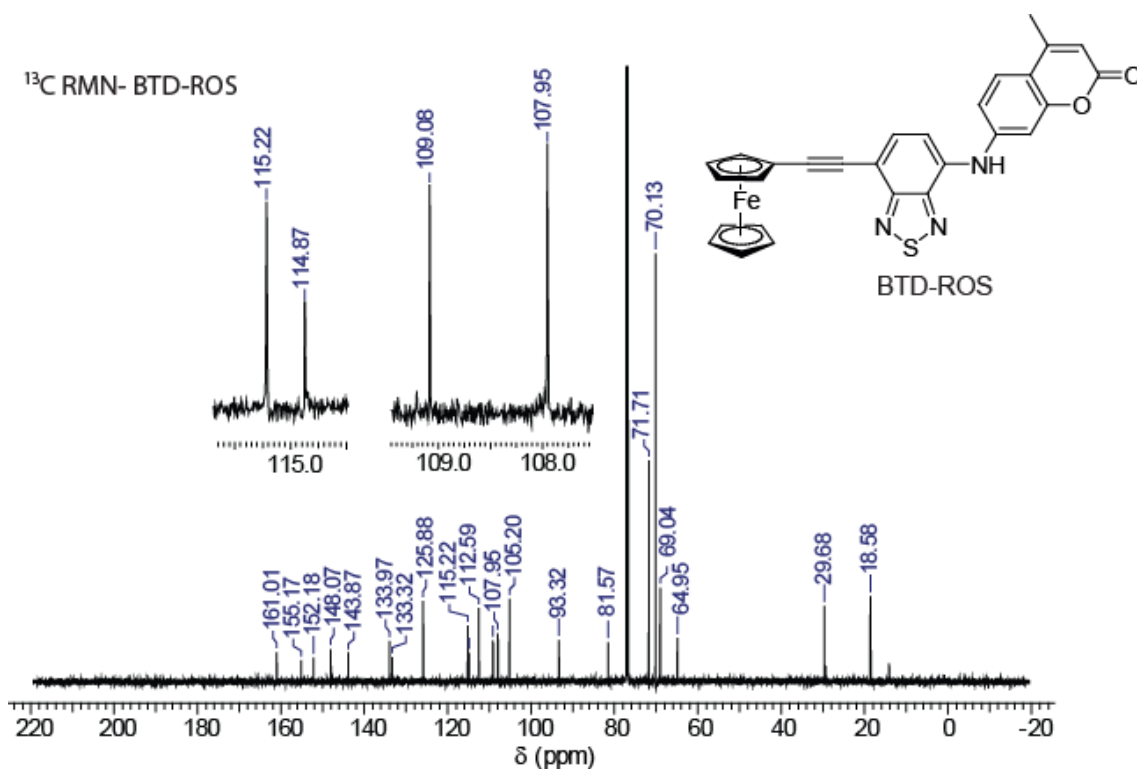


Figura 90. ¹³C RMN (CDCl₃, 600 MHz) da molécula **BTD-ROS**.

Não são observados nos espectros de ^{13}C -RMN todos os sinais do ferroceno, existindo apenas quatro sinais correspondentes à esta estrutura. Esta mesma quantidade de sinais para a estrutura do ferroceno já foi relatada no trabalho de Misra e colaboradores.¹⁵⁹ O sinal em 29,68 ppm não é um sinal esperado para a molécula, existindo a possibilidade deste sinal corresponder à degradação do ferroceno em uma espécie de Fe^{2+} e dois anéis ciclopentadienil, sendo um destes ligado à estrutura do fluoróforo.¹⁵⁵ A presença de água no solvente deuterado e o maior tempo necessário para aquisição do espectro de ^{13}C -RMN podem ter degradado uma pequena parte deste composto, sendo desta maneira o sinal em 29,68 ppm produto desta degradação.

Um ponto interessante a ser notado é a mudança de deslocamento dos hidrogênios do ferroceno ligado à BTD. Dois hidrogênios do ciclopentadieno ligado diretamente ao carbono *sp* sofrem um deslocamento para um campo mais alto com a conjugação da cumarina à molécula: 4,32ppm para Fe-BTD-Br à 4,29 ppm para a ROS. A cumarina assim como a BTD é um núcleo fluorescente retirador de elétrons, sendo esperado, caso houvesse alguma mudança nos sinais dos prótons do ferroceno, que esta fosse para campos mais baixos devido a maior exposição destes núcleos ao campo B_0 , uma vez que a densidade eletrônica desta parte da molécula estaria sendo doada.

Análise estrutural por raios-X

A **BTD-ROS** apresentou a formação de cristais bem definidos o que permitiu a análise de sua estrutura através da difração de raios-X. A representação desta molécula pode ser observada na **Figura 91**.^{xv}

^{xv} Esta análise de raios-X de monocristal foi realizada pelo grupo da Prof. Dr. Claudia Cristina Gatto, do Instituto de Química, da Universidade de Brasília. Esta estrutura foi depositada no CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Centre*).

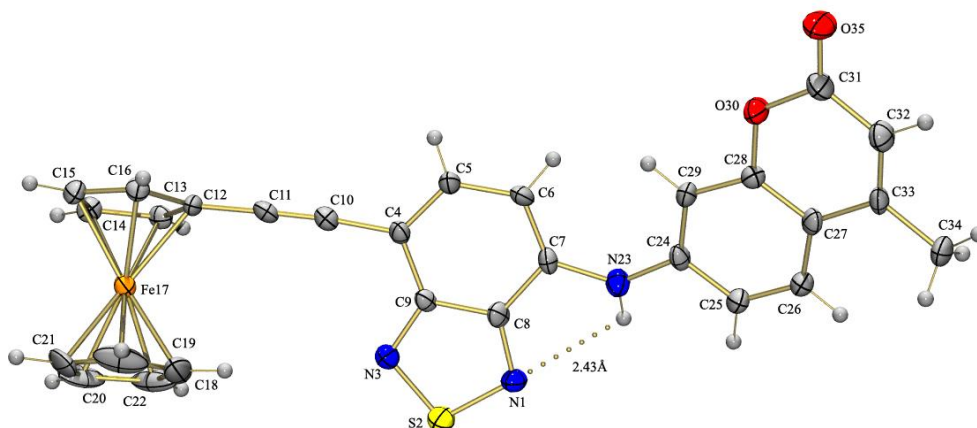


Figura 91. Representação da estrutura molecular da **BTD-ROS** com suas respectivas marcações cristalográficas.

A **Tabela 9** apresenta os dados utilizados para a o refinamento dos dados e dedução da estrutura molecular da análise por difração de raio-X de monocristal para a **BTD-ROS**.

Tabela 9. Dados obtidos por difração dBTDe raios-X e parâmetros refinados para a **BTD-ROS**

Fórmula química	C ₂₈ H ₁₉ N ₃ O ₂ SFe
M (g mol ⁻¹)	517.37
Sistema Cristalino	Ortorrombico
Grupo Espacial	<i>P2₁2₁2₁</i>
Cela Unitaria	
<i>a</i> (Å)	5.851(5)
<i>b</i> (Å)	10.921(9)
<i>c</i> (Å)	34.600(3)
<i>V</i> (Å ³)	2210.7(3)
<i>Z</i>	4
<i>D_c</i> /g cm ⁻³	1.554
Índices de Varredura	-5 ≤ <i>h</i> ≤ 7 -10 ≤ <i>k</i> ≤ 13 -31 ≤ <i>l</i> ≤ 43
Coeficientes de absorção /mm ⁻¹	0.811
Correção de absorção	multi-scan
Max/min transmissão	0.9515 / 0.7679
Reflexões medidas	11792
Reflexões independentes / <i>R_{int}</i>	4460 / 0.0724
Parâmetros refinados	317
<i>R</i> 1 (<i>F</i>) / <i>wR</i> 2 (<i>F</i> ²) (<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>))	0.0537 / 0.0705
Goof	0.969
Densidad eletrônica residual (eÅ ⁻³)	0.276 and -0.325
Número do depósito CCDC	1410644

Pelos resultados obtidos (**Figura 91** e **Tabela 9**) observa-se através desta estrutura a interação entre os átomos N23–H···N1(átomo da BTD). Esta ligação de hidrogênio aumenta a planaridade molecular do composto.

Outro ponto que pode ser destacado é que o núcleo cumarina presente no composto possui uma orientação inversa de quando realizados os desenhos da molécula, estando os oxigênios do anél pirano-2-ona direcionado em um sentido oposto ao anél BTD.

O ferroceno, com a molécula cristalizada, apresenta-se paralelo ao núcleo BTD.

Estudos fotofísicos

Após toda a caracterização da molécula por RMN, foram realizados os estudos fotofísicos para a **BTD-ROS**, a fim de se verificar o comportamento da absorção e emissão desta nova substância frente a mudança do solvente, a estabilidade do fluoróforo e informações sobre seu comportamento em solução contendo ROS.

O design desta molécula se baseou principalmente no forte efeito de *quencher* de fluorescência do ferroceno presente na estrutura molecular, sendo este efeito já relatado na literatura.¹⁵⁴ Após o acoplamento da molécula de etinilferroceno à BTD dibromada, observou-se que o produto reacional, a molécula Fe-BTD-Br, já não apresentava fluorescência quando irradiado a 330 nm,

Ao se adicionar o núcleo cumarina através da reação de aminação, gerando a **BTD-ROS**, continuou-se observando uma baixa fluorescência do composto formado, ou seja, mesmo havendo dois núcleos altamente fluorescentes conjugados o efeito de *quencher* do ferroceno ainda foi observado.

A primeira análise fotofísica realizada para a molécula **BTD-ROS** foi a espectrometria de UV-Vis, sendo estudados quais comprimentos de onda esta molécula apresentou absorção em diferentes tipos de solventes. Esta análise permitiu o cálculo da absorvividade molar em todos os solventes estudados. Seguida a esta análise, realizou-se o estudo da fluorescência com a irradiação

da molécula nos maiores comprimentos de onda observados no experimento de UV-Vis. Ambos os experimentos podem ser observados na **Figura 92**

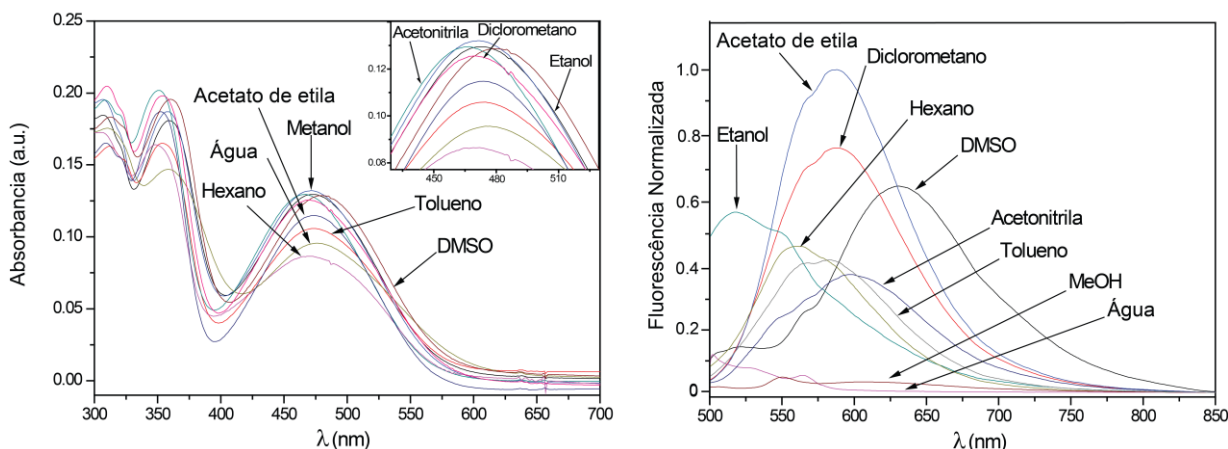


Figura 92. Espectros de absorção (UV-Vis, esquerda) e fluorescência (direita) da molécula de **BTD-ROS**.

Tabela 10. Dados de UV-Vis e emissão de fluorescência (em diferentes solventes) para a sonda **BTD-AO**. Todos os experimentos foram conduzidos em concentração de 10mM

Molécula	Solventes	λ_{\max} (abs)(nm)	$\log \epsilon$	λ_{\max} (em)(nm)	Desl. Stokes (nm)
BTD-ROS	DMSO	481	3.43	630	149
	Água	474	3.98	565	91
	Acetato de etila	474	4.06	588	114
	Diclorometano	470	4.10	587	117
	Tolueno	475	4.02	583	108
	Etanol	471	4.02	519	48
	Hexano	472	3.94	559	87
	Metanol	472	4.12	550	78
	Acetonitrila	467	4.11	598	131

Os comprimentos de onda de absorção da molécula não apresentaram grandes variações com a mudança do solvente, sendo todas as absorções da molécula próximas a 475 nm. Quando comparada com outros derivados de BTD com sistemas conjugados, já descritos na literatura,¹⁷ esta molécula apresenta um leve deslocamento batocrômico (em média 25 nm). A mudança de solvente também não altera a quantidade de moléculas deste cromóforo que absorve radiação, o que pode ser observado pela pequena variação da intensidade da

absorbância e pelos valores próximos do logaritmo da absorvitividade molar (ϵ). Através dos valores obtidos para o $\log \epsilon$, todos próximos a 4,00, pode-se considerar a molécula de **BTD-ROS** um bom cromóforo.

As medidas de fluorescência desta **BTD-ROS** foram normalizadas devido à baixa intensidade de fluorescência apresentada pelo composto. Esta fluorescência apresentou uma maior sensibilidade à variação do solvente quando comparada as absorções, sendo observada tanto uma variação da intensidade de fluorescência quanto da energia destas emissões. O solvente em que a molécula apresentou maior intensidade de emissão foi o acetato de etila, enquanto a menor emissão foi apresentada pela água, podendo esta emissão ser considerada virtualmente nula. Este resultado é extremamente satisfatório, uma vez que a proposta de criação desta molécula foi sua aplicação em células, que são estruturas formadas por cerca de 70% de água.¹¹⁷ A baixa fluorescência da molécula solvatada em meio aquoso indica que o ferroceno não sofre degradação em meio aquoso, o que impossibilitaria a utilização desta sonda para detecção das ROS.

Estes experimentos permitiram o cálculo do deslocamento de Stokes da molécula nos diferentes solventes, Tabela 10. Dados de UV-Vis e emissão de fluorescência (em diferentes solventes) para a sonda **BTD-AO**. Todos os experimentos foram conduzidos em concentração de 10mM, podendo-se estudar o efeito causado pela polaridade do solvente à estabilização do estado excitado, uma vez que uma maior estabilização do fluoróforo acarreta em menores energias de emissão e conseqüentemente maiores deslocamentos de Stokes. O estudo do efeito do solvente foi realizado através da plotagem dos dados de deslocamento de Stokes em um gráfico Lippert-Mataga⁶⁰ como pode ser observado na Figura 93.

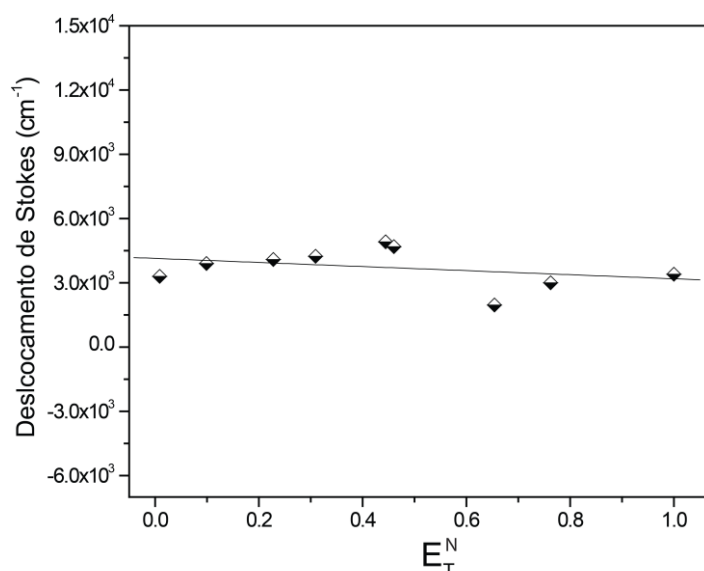


Figura 93. Plotagem da correlação de Lippert-Mataga com os deslocamentos obtidos.

Pelo gráfico observa-se que o aumento da polaridade do solvente leva a molécula a menores deslocamentos de Stokes, o que é indicado pela inclinação negativa da regressão linear destes pontos, não apresentando, porém, uma linearidade a este comportamento, como pode ser observado pelo baixo valor de $R^2 = 0,014$. Este valor também indica uma alta sensibilidade da molécula ao meio, sendo esta observação, provavelmente, decorrente da interação do ferroceno com estes solventes, levando mudanças ao momento dipolar desta molécula e conseqüentemente a variações no comprimento de onda de emissão. Como estudado no capítulo anterior, o núcleo cumarina também é altamente sensível mudanças de ambiente. Ambas as substituições, assim, colaboram para a observação de um baixo R^2 .

Os menores valores de deslocamentos de Stokes foram apresentados pelos solventes polares próticos, sendo a emissão em etanol a apresentar um maior comportamento hipsocrômico. Dentre estes solventes (polar prótico) a água apresentou um maior deslocamento de Stokes.

Para verificar a mudança de comportamento do fluoróforo (efeito de “turn on”) na presença de espécies reativas de oxigênio, preparou-se uma solução aquosa saturada de peróxido de benzoíla, sendo esta solução aquecida para formação de radicais livres. Adicionou-se então a **BTD-ROS** na solução

resultante, observando a fluorescência do composto. Para comparação, uma mesma quantidade do fluoróforo foi adicionada em solução aquosa sem o peróxido de benzoíla, não apresentando fluorescência quando irradiada, como pode ser observado na Figura 94.

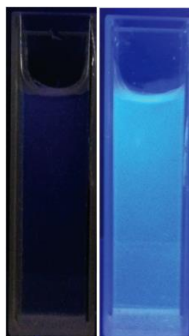


Figura 94. BTD-ROS sob luz branca (esquerda) e irradiação de luz UV ($\lambda_{ex} = 365\text{nm}$, direita)

Devido a existir relatos sobre a degradação do ferroceno em solução aquosa à temperatura e iluminação ambiente¹⁵⁵ foram também realizados testes de fotoestabilidade com esta molécula, uma vez que o processo de “*turn on*” através da degradação do ferroceno é buscado apenas na presença das ROS, evitando desta maneira resultados falso positivos para estas espécies durante a marcação celular. No teste de fotoestabilidade também foi verificado a estabilidade do fluoróforo quando sua fluorescência se encontra “ligada”. Este estudo foi realizado durante uma hora do fluoróforo em exposição à fonte de excitação, podendo ser visto na Figura 95

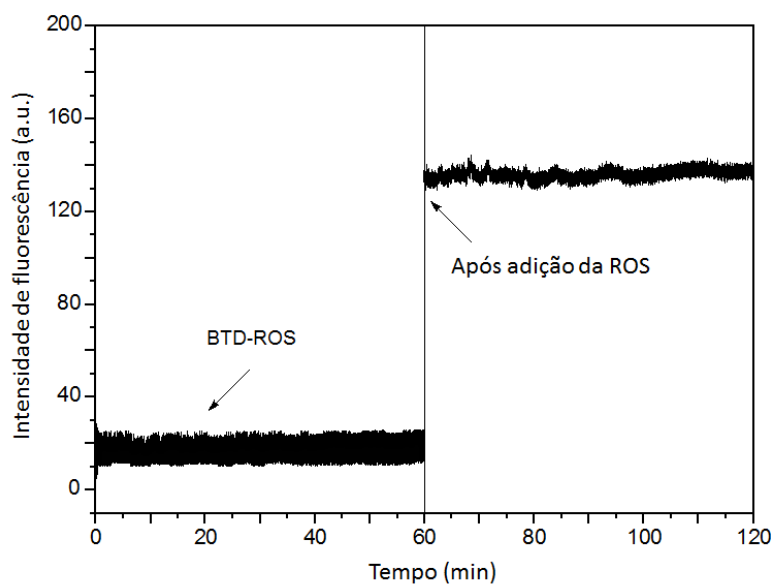


Figura 95. Fotoestabilidade da **BTD-ROS** ($100\ \mu\text{M}$) em solução aquosa a temperatura ambiente. A fonte de excitação foi mantida em $474\ \text{nm}$ sendo o detector ajustado para $565\ \text{nm}$. A intensidade da fluorescência dependente do tempo foi realizada com uma lâmpada de Xenônio ($400\ \text{W}$). Após 60 minutos adicionou-se $100\ \mu\text{L}$ de uma solução aquosa de peróxido de benzoíla (PhCOO^\cdot) previamente aquecida por 3 minutos a solução de $4\ \text{ml}$ contendo a **BTD-ROS** $100\ \mu\text{M}$ sendo a solução resultante monitorada por mais 60 minutos.

Para se conseguir realizar este teste com o fluoróforo não ativado pela presença de ROS, foi utilizada uma concentração dez vezes maior da qual foram realizados os estudos de absorção e fluorescência desta molécula. Em ambas as condições, “*turn on*” e “*turn off*”, não foram observadas mudanças na intensidade de fluorescência, ou seja, com a presença ou ausência do ferroceno, a estrutura molecular apresentou-se estável, o que é vantajoso para sua aplicação em experimentos de imageamento celular por microscopia de fluorescência, uma vez que ambas as estruturas deste marcador não tendem a sofrer fotodegradação pela fonte de excitação.

O último estudo fotofísico realizado com este fluoróforo foi o cálculo do rendimento quântico. Este mostra a proporção entre o número de fótons absorvidos e emitidos por determinada substância, sendo realizado através da comparação da fluorescência do composto estudado com uma solução de sulfato de quinina. (Figura 96)

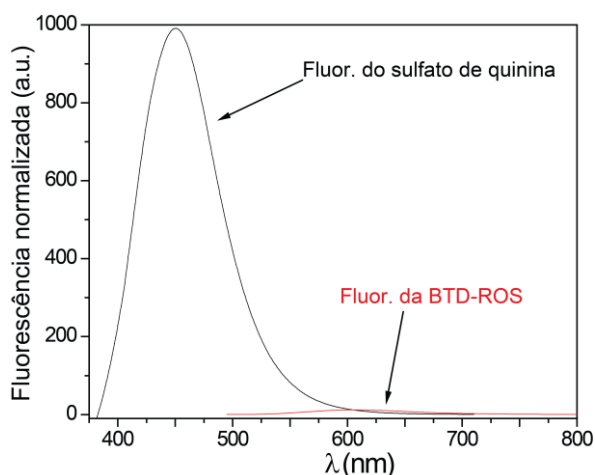


Figura 96. Gráfico das intensidades de fluorescência do sulfato de quinina e da **BTD-ROS** utilizado para o cálculo do rendimento quântico

A absorvitividade molar para o sulfato de quinina, utilizado como padrão, em uma concentração de 10 μM foi de 87157,705 enquanto para a **BTD-ROS** na mesma concentração foi de 1386,20. O rendimento quântico calculado para a **BTD-ROS** foi de 0,009. Um valor bastante baixo, como esperado.

Cálculos computacionais

Os cálculos computacionais para a molécula de **BTD-ROS** foram executados com os mesmos funcionais utilizados com os outros derivados de BTDs. A geometria da molécula foi otimizada com o funcional CAM-B3LYP e a função de base 6-311G(d), sendo os cálculos de energia deste composto realizado através do funcional PBE1PBE com a função de base 6-311+G(2d,p)

Como observado nos estudos fotofísicos, este composto não apresentou fotodegradação, sendo realizado os cálculos para uma maior compreensão dos processos envolvidos na estabilização deste fluoróforo.

Foi otimizada a geometria do composto em fase gasosa em com a molécula solvatada através do método de polarização contínua IEFPCM. Sendo estas geometrias observadas na Figura 97.

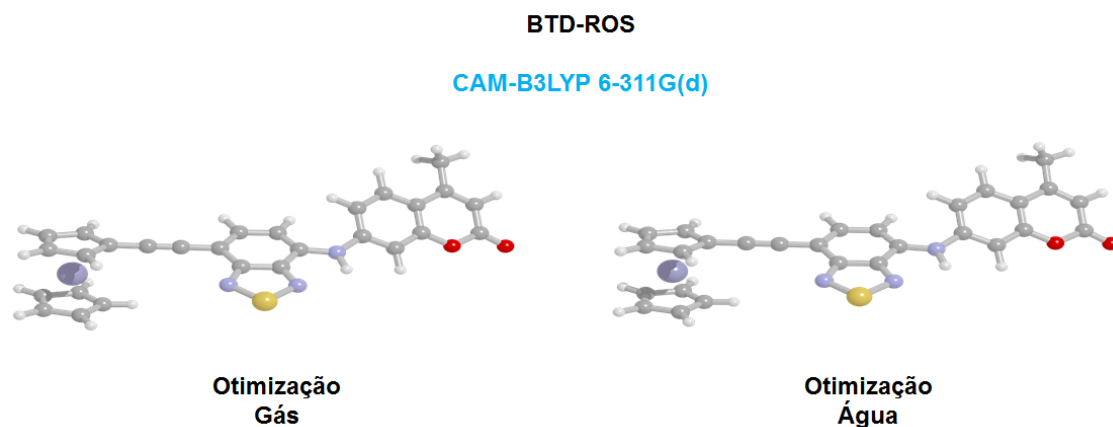


Figura 97. Geometrias otimizadas para a molécula de **BTD-ROS** em fase gasosa e solvatada em meio aquoso.

Não são observadas mudanças entre as geometrias otimizadas para o composto. O ângulo de diedro entre a cumarina e o núcleo BTD é de $14,38^\circ$ no estado gasoso e $14,52^\circ$ no estado líquido. O núcleo ferroceno também não apresenta nenhuma mudança em sua estrutura. Isso já indica certa estabilidade da molécula com a solvatação do meio.

Através do estudo de seu comportamento eletrônico com a excitação da molécula em ambas as condições, pode-se notar que o comportamento dos orbitais em ambos os estados são praticamente os mesmos. Como pode ser observado na Figura 98 e Figura 99.

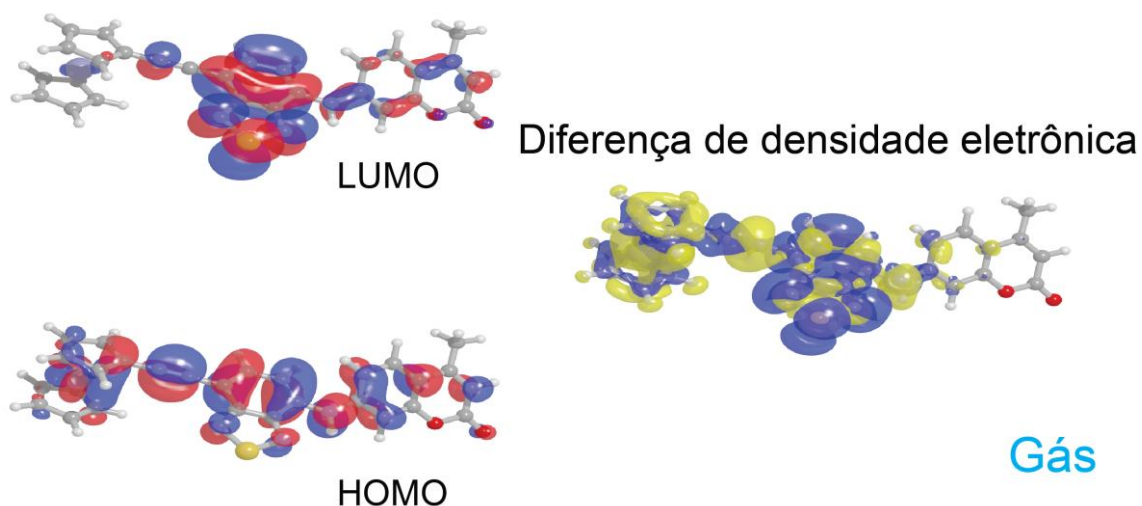


Figura 98. Geometria otimizada para a molécula **BTD-ROS** em fase gasosa com plot dos orbitais HOMO e LUMO (Esquerda). Diferença de densidade eletrônica nos estados S0 e S1. (direita).

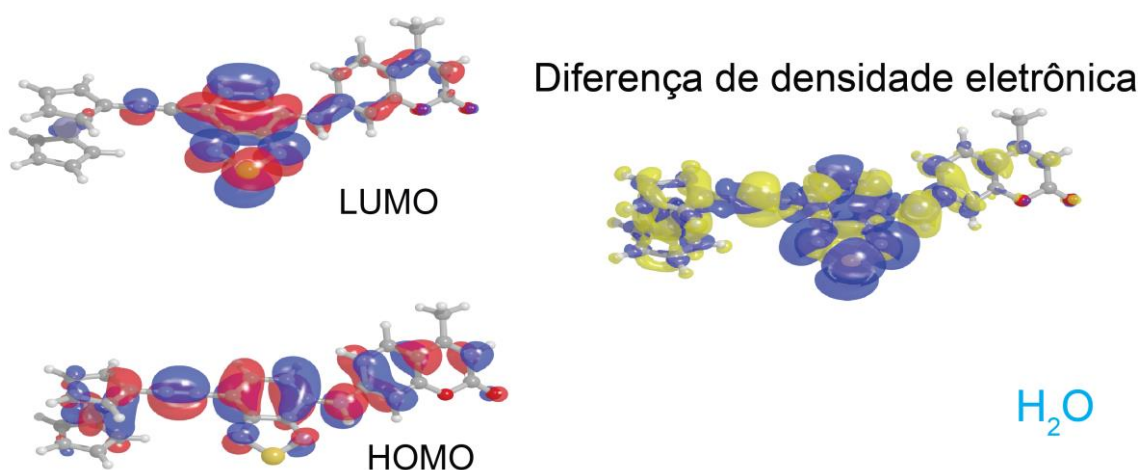


Figura 99. Geometria otimizada para a molécula **BTD-ROS** em fase gasosa com plot dos orbitais HOMO e LUMO (Esquerda). Diferença de densidade eletrônica nos estados S0 e S1. (direita).

De acordo com as superfícies orbitales calculadas, é observado tanto para o estado gasoso quanto para a molécula solvatada um forte caráter HOMO nos substituintes da BTD e um forte caráter LUMO no anél BTD, principalmente no anél 2,1,3-tiazola. Há uma grande superfície do orbital HOMO no ferroceno, bem como na tripla ligação utilizada no espaçador entre este núcleo.

Com a diferença de densidade eletrônica fica evidente o processo de ICT na molécula, ocorrendo uma diminuição de densidade eletrônica, mostrada principalmente no ferroceno e nos carbonos “sp” entre este núcleo e o anél BTD.. A tripla ligação nos carbonos atua como uma facilitadora do processo de ICT, uma vez que os orbitais “p” destes átomos não estão hibridizados o favorece a uma sobreposição orbitalar destes orbitais com os orbitais “p” da BTD e “d” do ferroceno. O aumento da densidade eletrônica no núcleo BTD também é bastante evidente em ambos os estados.

A última análise realizada foi a comparação entre as energias dos orbitais moleculares com a molécula em fase gasosa e solvatada em água, esta análise é mais facilmente realizada através do diagrama da Figura 100. Diagrama de energia dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula no estado S₀ e S₁ em meio gasoso e aquoso.

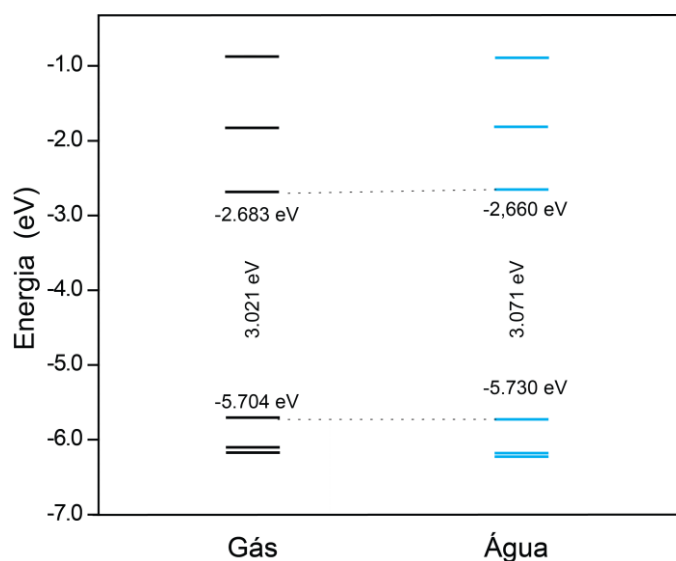


Figura 100. Diagrama de energia dos orbitais HOMO e LUMO para a molécula no estado S₀ e S₁ em meio gasoso e aquoso.

Observa-se apenas uma pequena variação de energia entre estes orbitais com a solvatação da molécula, com um aumento de apenas 0,050 eV de energia para o *gap energético* entre o HOMO e o LUMO no estado solvatado. Estes dados mostram que o efeito de solvatação na molécula não faz com que sejam alterados os es

Bioimageamento e análises biológicas.

Para os estudos de imageamento celular com a molécula de **BTD-ROS**, verificando-se sua aplicabilidade como marcador celular e seu comportamento em sistemas biológicos, utilizou-se um modelo de células macrófagas, adequadas para detecção das ROS. Foram cultivadas células RAW 264,7, sendo utilizadas para o controle positivo de ROS celular, células estimuladas a produzir estas espécies através da Menadiona, um indutor de ROS. O controle negativo foi realizado com células não estimuladas por esta substância. Para validação e controle de marcação, utilizou-se também sonda comercial fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), sendo as condições de aplicação da **BTD-ROS** idênticas a desta substância.

Os resultados obtidos através das análises de imageamento celular para as células estimuladas pela Menadiona podem ser observados na **Figura 101**

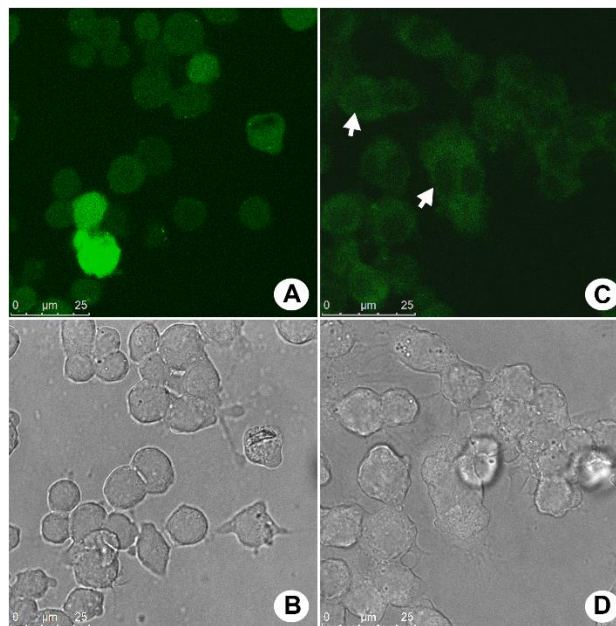


Figura 101. Células Raw 264.7 tratada com Menadiona. A detecção de ROS por DCFH é mostrada nas imagens A e a pela **BTD-ROS** é mostrada na imagem C. As setas indicam os núcleos das células nas amostras tratadas com a **BTD-ROS**, que produziu uma imagem de fluorescência mais detalhada da célula. As imagens C e D mostram a morfologia normal da célula através da microscopia de contraste de fase. Escala de referência em 25 µM.

As ROS detectadas pela sonda comercial DCFH-DA são mostradas na imagem A e as detectadas pela **BTD-ROS** são mostradas na imagem C. As imagens B e D mostram os aspectos morfológicos normais das células através do contraste de fase. A nova sonda fluorescente sintetizada foi permeável a membrana celular, e também apresentou sensibilidade às ROS, mostrando uma emissão de fluorescência verde frente a estas espécies. Além disso não houve marcação do núcleo celular por esta sonda, o que pode ser visto pela ausência de fluorescência em certas partes do citoplasma celular (indicado por setas na imagem C). O marcador DCFH-DA não apresenta esta especificidade, produzindo uma imagem fluorescente sólida sobre toda a célula. A não marcação nuclear permite que outros processos, envolvendo estudos e marcação do núcleo celular sejam realizados concomitantemente à marcação das ROS no meio, sendo assim uma vantagem deste novo marcador quando comparado ao marcador comercial já conhecido.

Os ensaios realizados com as células que não foram estimuladas a produzir às ROS (controle negativo à produção destas espécies) podem ser vistos na **Figura 102**.

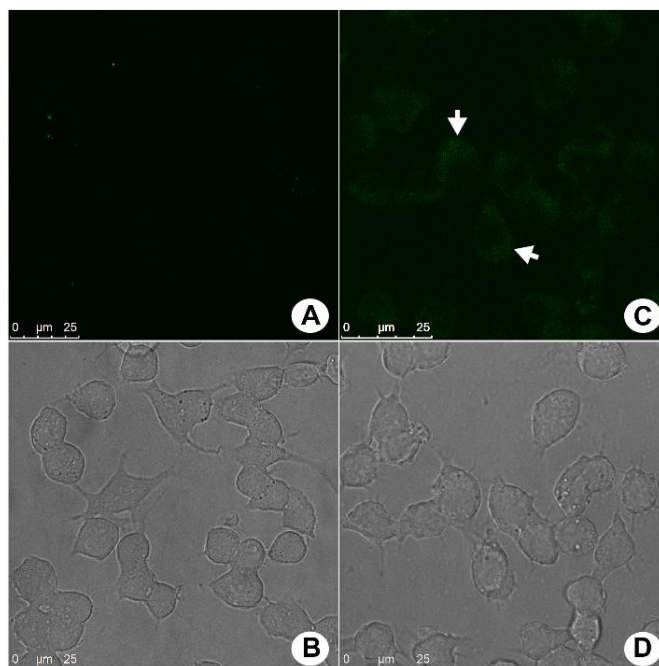


Figura 102. Células Raw 264.7 sob condições normais (controle negativo). Não há detecção de ROS pelo marcador DCFH-DA, como mostrado na imagem (A). A **BTD-ROS** foi capaz de detectar as ROS residuais da célula, como mostrado na imagem (C) (setas brancas). As imagens (C) e (D) mostram os aspectos normais das células pela microscopia de contraste de fase. Barra de escala em 25 μ M.

Não houve detecção de ROS pela sonda comercial DCFH-DA, como mostrado na imagem A, porém, nota-se uma baixa fluorescência pela sonda **BTD-ROS**, como indicado pelas setas na imagem C. Isto indica uma maior sensibilidade desta sonda, uma vez que as células, mesmo sem fatores indutivos, produzem ROS continuamente, porém em taxas bastante baixas.

Em ambos os experimentos, com as células induzidas a produzir ROS e no controle negativo, não foram observados efeitos citotóxicos causados pela aplicação de ambas as substâncias, o que é evidenciado pela morfologia normal destas células através das imagens B e D das Figura 101 Figura 102.

Tanto o marcador comercial quanto a **BTD-ROS** não apresentaram efeitos de degradação devido a exposição a fonte de radiação, *photobleaching*, corroborando com os estudos fotofísicos de fotoestabilidade, onde não foi observada a variação da intensidade de fluorescência mesmo com a molécula exposta a longos períodos de tempo a fonte de excitação.

Os resultados obtidos através destes ensaios mostraram que a **BTD-ROS** foi capaz de produzir imagens celulares de alta qualidade, além de não marcar o núcleo celular. Acredita-se que esta exclusão nuclear à marcação ocorra devido às propriedades do núcleo BTD, uma vez que outras sondas fluorescentes derivadas deste núcleo também já apresentaram resultados similares em outras aplicações.¹⁵⁷

A alta sensibilidade da nova sonda fluorescentes às ROS produzidas por uma célula em condições normais, também se mostrou vantajosa, uma vez que a falta de sensibilidade a estas espécies por outros marcadores pode levar ao entendimento de que em condições normais as ROS não são produzidas em meio celular.

Conclusão

Neste trabalho foi apresentada a síntese, caracterização e aplicação biológica de uma nova sonda fluorescente sensível à ROS. A síntese deste composto envolveu duas etapas reacionais, sendo este posteriormente caracterizado por análise de RMN, difração de raios-X e ponto de fusão.

Apesar das ROS serem extremamente importantes biologicamente, estando sua produção em meio celular diretamente ligada a inúmeros processos metabólicos celulares, existem poucos marcadores comerciais disponíveis comercialmente. Além disto, estes marcadores devem ser mantidos sob condições específicas de estoque, normalmente a baixas temperaturas, tornando difícil a manipulação destas espécies sem que ocorra sua degradação, (muitas vezes o processo de degelo para utilização destas substâncias prejudica a estabilidade das mesmas).

A **BTD-ROS** apresentou uma alta estabilidade às condições normais de temperatura e iluminação, não sofrendo qualquer tipo de degradação ao ser mantida a temperatura ambiente sob luz natural, com a molécula pura ou em solução.

Esta sonda apresentou uma alta permeabilidade à membrana celular, e também uma marcação às espécies de ROS somente no citoplasma celular, não adentrando o núcleo da célula. Esta característica é extremamente vantajosa

pois permite aplicações deste fluoróforo em estudos utilizando mais de uma sonda fluorescente.

Finalmente, este composto apresentou uma maior sensibilidade as ROS em meio celular, quando comparados a um fluoróforo comercialmente conhecidos, sendo detectadas concentrações destas espécies em células sob condições normais (ROS basal).

As aplicações de derivados do núcleo BTD em marcações celulares tem se mostrado cada vez mais eficientes, sendo estes derivados extremamente estáveis e com inúmeras vantagens frente as sondas derivadas de outros núcleos já conhecidos. A facilidade em modular as propriedades deste núcleo buscando diferentes tipos de marcação em meio celular tem se mostrado extremamente vantajosa e funcionado com bastante êxito, como pode ser visto nos inúmeros trabalhos publicados pelo grupo.

Este capítulo apresenta o primeiro derivado de BTD sensível a ROS em meio celular. Apesar da dificuldade na marcação destas espécies neste meio, devido a estas serem altamente reativas e conseqüentemente apresentarem baixos tempo de vida, a **BTD-ROS** provou ser eficiente na marcação destas espécies, obtendo-se através de sua aplicação resultados melhores que marcadores já consagrados na literatura.

Capítulo 6

Fotofísica teórica de sondas fluorescentes : um tutorial

Introdução

Em todos os capítulos presentes neste trabalho foram efetuados cálculos computacionais, sendo estudados os orbitais moleculares, diferenças de densidade eletrônica durante o estado excitado, absorções teóricas bem como as energias de *band gaps* entre os orbitais HOMO e LUMO da molécula. Estes cálculos permitiram uma análise pormenorizada das novas estruturas moleculares sintetizadas, sendo melhores compreendidos os processos envolvidos na estabilização destas moléculas, os sítios aceptores e doadores de elétrons na molécula bem como as transições eletrônicas durante estes processos.

Este capítulo se dedica a Química Computacional, sendo apresentado um tutorial para realização dos experimentos executados durante este trabalho (com exceção dos cálculos de barreira rotacional, realizados com a **BTDNHBT**D).

A Química Computacional surge no início dos anos 60 através de grupos de pesquisas que tentavam aplicar os métodos de resolução das equações de Schrödinger, como o método Hartree-Fock em computadores. A base desta área da Química é a Química Quântica, mais precisamente a Equação de Schrödinger. Esta equação, criada pelo Austríaco Erwin Schrödinger em 1925 é a equação fundamental da mecânica Quântica e segundo afirmado por Paul A.M. Dirac e o próprio criador da equação: Qualquer fenômeno físico ou químico poderia agora ser expresso por leis matemáticas, sendo o único e maior problema a complexidade das equações nas quais estas leis se apoiavam.³⁵ Desta maneira a resolução desta equação responderia a qualquer propriedade molecular de um sistema.

A complexidade destas equações, porém são tamanhas que se tornam desta maneira insolúveis, sendo necessárias assim aproximações para a resolução desta equação. Algumas aproximações já são, desta maneira bastante conhecidas como a aproximação de Born-Oppenheimer, a aproximação Hartree-Fock (HF) e a de Thomas-Fermi, e que posteriormente vem

a gerar a teoria funcional de densidade (“Density Functional Theory –DFT”), desenvolvida por Walter Kohn.

Na década de 70 a Química Computacional, começa a ganhar espaço, surgindo programas como o Gaussian-70. Desenvolvido por John Pople na década de 70, estes programas compilam inúmeras aproximações, simplificando os métodos teóricos e os tornando acessíveis à comunidade científica. O desenvolvimento da tecnologia também alavanca esta nova área da Química, tornando os antigos e gigantes computadores necessários para rodar estes cálculos em máquinas cada vez menores e usos individuais. Este ramo da Química se consolida então em 1998, com o Nobel de Química sendo dividido por John A Pople “pelo seu desenvolvimento de métodos computacionais na química quântica” e por Walter Kohn “pelo seu desenvolvimento da teoria funcional de densidade”. Atualmente a Química computacional é definida pela IUPAC como “A disciplina que utiliza métodos matemáticos para o cálculo de propriedades moleculares ou para a simulação de comportamentos moleculares”.¹⁶⁰

Basicamente existem três categorias de cálculos em que podem-se realizar estudos teóricos. A categoria dos métodos puramente quânticos, também chamados métodos ab-initio, onde todas as informações moleculares são obtidas matematicamente, através da mecânica quântica, os semi-empíricos, que são métodos que se utilizam também da resolução da equação de Schrödinger, porém incluindo arredondamentos, oriundos de dados obtidos experimentalmente e por último a categoria dos métodos clássicos, que se baseiam na mecânica Newtoniana.¹⁶¹ Para os cálculos deste trabalho, foram utilizados métodos ab-initio de cálculo, sendo todos os resultados apresentados puramente quânticos, ou seja, baseados apenas na resolução da equação de Schrödinger (ES), representada abaixo:

$$\hat{H} |\Psi\rangle = E |\Psi\rangle, \quad (01)$$

Nesta equação $|\Psi\rangle$ representa a função de onda no espaço de Hilbert, E representa a energia do sistema e \hat{H} representa o operador hamiltoniano.

Esta equação apesar de parecer simples à primeira vista, torna-se extremamente complexa ao ser aplicada em um sistema molecular. Isto ocorre porque na verdade \hat{H} é uma função das coordenadas espaciais eletrônicas e

nucleares para cada átomo presente em uma molécula, sendo sua representação na equação (01) apenas uma abreviação destas diversas coordenadas. Desta maneira, quando tratamos sistemas eletrônicos com mais de um elétron, termos de interação elétron-elétron presentes nesta equação crescem exponencialmente, tornando desta maneira a ES extremamente trabalhosa e muitas vezes sendo impraticável chegar a uma solução para o sistema estudado, não sendo esquecido que também deve-se levar em consideração as interações entre os elétrons e os núcleos atômicos presentes nesta molécula. Devido à complexidade das equações geradas nestas soluções, tornam-se necessárias inúmeras aproximações para a resolução das mesmas.

A primeira aproximação a ser realizada é a aproximação de *Born-Oppenheimer*. Nesta aproximação as posições nucleares são consideradas fixas em relação às movimentações eletrônicas. Outra aproximação já citada anteriormente, sendo uma das aproximações mais conhecidas na química quântica é a aproximação de Hartree-Fock (HF), criada em 1921 por D. Hartree,^{162,163} esta aproxima a função de onda total por uma soma de produtos de funções de ondas espaciais de um único elétron. V. Fock¹⁶⁴ introduziu o requerimento de assimetria para a função de onda de muitos elétrons, usando combinação linear antissimétrica de produtos de spin-orbitais, escrita como determinante de Slater. Estas funções não possuem uma solução analítica, porém já permitiam que a ES fosse resolvida numericamente. A partir do conceito de funções de base, introduzido por C. C. J. Roothaan em 1951,¹⁶⁵ foi apresentada uma formulação matricial para as equações de HF. Essa formulação possibilitou o uso de técnicas de álgebra matricial para resolver as chamadas equações de Hartree-Fock-Roothaan (HFR). Esse método tem sido muito utilizado para a obtenção de soluções aproximadas da ES, que servem como ponto de partida para cálculos mais sofisticados da estrutura eletrônica.

Uma outra metodologia, já consolidada na Química Quântica Computacional é a Teoria do funcional de densidade (*density functional theory*, DFT) A DFT, formulada por Hohenberg, Kohn e Sham^{52,166} é uma metodologia alternativa ao método de HF de obter energia eletrônica de um sistema atômico ou molecular. Na DFT os efeitos de correlação eletrônica, ou seja, a variação da energia cinética de um elétron pelos seus vizinhos, bem como a interação de troca, que ocorre devido aos spins eletrônicos são tratados de forma

aproximada, sendo os elétrons integrantes do sistema sujeitos a um potencial externo, por meio da densidade eletrônica. Esta metodologia é vantajosa em relação a metodologia HF pois pode-se descrever (N) elétrons em um sistema através de uma única função analítica da densidade eletrônica $\phi(\rho(\mathbf{r}))$, enquanto que no método HF é necessário uma função de onda para cada um dos (N) elétrons do sistema.

A DFT é fundamenta em dois princípios:

1 – O primeiro estabelece que a energia eletrônica de um sistema é função da densidade eletrônica. Logo, $E = E(\rho(\mathbf{r}))$.

2 – O segundo estabelece que a energia obtida através da densidade eletrônica obedece ao princípio variacional. Logo $E(\rho(\mathbf{r})) \geq E(\rho_0(\mathbf{r}))$, onde $\rho(\mathbf{r})$ é uma densidade eletrônica calculada ou obtida numericamente e $\rho_0(\mathbf{r})$ é a densidade eletrônica exata. ¹⁶⁶

A equação de Kohn-Shan (KS) pode ser dada por:

$$\hat{H}^{KS} \phi_i(\rho(\mathbf{r})) = \left[-\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_{ef}(\mathbf{r}) \right] \phi_i(\rho(\mathbf{r})) = \varepsilon_i \phi_i(\rho(\mathbf{r})), \quad (02)$$

sendo \hat{H}^{KS} é o Hamiltoniano de KS, $v(\mathbf{r})$ um potencial externo, ε_i os autovalores do operador de Kohn-Shan e $v_{ef}(\mathbf{r})$ um potencial externo efetivo que é dado por:

$$v_{ef}(\mathbf{r}) = v(\mathbf{r}) + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + v_{xc}(\rho(\mathbf{r})). \quad (03)$$

Através da DFT a energia total do sistema no seu estado fundamental pode ser escrita como:

$$E(\rho(\mathbf{r})) = T(\rho(\mathbf{r})) + \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}d\mathbf{r}', \quad (04)$$

onde $T(\rho(\mathbf{r}))$ a energia cinética dos elétrons.

Na aproximação de Kohn-Shan, $T(\rho(\mathbf{r}))$ é separada em duas componentes. Uma delas está associada ao sistema não interagente $T_s(\rho(\mathbf{r}))$ e a outra inclui as interações eletrônicas e a correção de energia cinética que está implícita em $E_{xc}(\rho(\mathbf{r}))$. Assim a Eq.(04) se torna:

$$E(\rho(\mathbf{r})) = T_s(\rho(\mathbf{r})) + \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}d\mathbf{r}' + E_{xc}(\rho(\mathbf{r})). \quad (05)$$

Isolando $v(\mathbf{r})$ na Eq.(03) equação substituindo na Eq. (05) inserindo o somatório dos autovalores ε_i do hamiltoniano de Kohn-Shan, obtemos que a energia total do estado fundamental na aproximação de Kohn-Shan é dada por

$$E(\rho(\mathbf{r})) = \sum_{i=1}^N \varepsilon_i - \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}d\mathbf{r}' + E_{xc}(\rho(\mathbf{r})) - \int \rho(\mathbf{r})v_{xc}(\mathbf{r})d\mathbf{r}, \quad (06)$$

sendo $v_{xc}(\mathbf{r})$ o potencial de troca e correlação, não possui expressão analítica definida mas sua definição formal vem da seguinte derivada funcional

$$v_{xc}(\mathbf{r}) = \frac{\partial E_{xc}(\rho(\mathbf{r}))}{\partial \rho(\mathbf{r})} \quad (07)$$

O potencial de correlação e troca possui um papel fundamental na DFT e um dos grandes desafios desta teoria é encontrar uma expressão que seja acurada para o valor deste potencial. Uma aproximação bastante utilizada é considerar esta energia de correlação e troca em um modelo hipotético eletronicamente neutro no quais os elétrons estão contínua e uniformemente distribuídos ao redor de uma carga positiva, esta aproximação é conhecida como “local density approximation” (LDA). Desta maneira há uma simplificação algébrica deste termo permitindo assim que o potencial de correlação e troca assume a forma:

$$V_{xc}(r) = \frac{\partial E_{xc}(\rho)}{\partial \rho} = -\frac{3}{2} (3/\pi) j_0 \rho(r)^{1/3} \quad (08)$$

Onde $j_0 = e^2/4\pi\varepsilon_0$

Além da aproximação supracitada, existem outras formas de aproximação ao valor de $v_{xc}(\mathbf{r})$. Estas diferenças de aproximação do valor de correlação e troca levam a diferentes tipos de funcionais para os cálculos a partir do método DFT.

Neste trabalho foram utilizados os funcionais B2PLYP,¹⁶⁷ B3LYP,¹⁶⁸ CAM-B3LYP,¹⁶⁹ M06-2X,¹⁶⁹ PBE1PBE¹⁷⁰ e ω B97XD.¹⁷¹ É importante destacar que

não há um funcional de correlação-troca que seja ideal para se calcular todas propriedades moleculares, fazendo-se necessário realizar diferentes estudos para se escolher o melhor funcional para o sistema molecular e propriedade de interesse. No entanto, há alguns artigos de revisões que relacionam os funcionais segundo à sua capacidade de predição de propriedades moleculares.¹⁷² Para simular as propriedades fotofísicas utilizando a DFT é necessário utilizar a sua vertente dependente do tempo (TD-DFT).⁵³

As funções de base

A expansão de um orbital atômico ou molecular em um conjunto de funções de base permitiu tratar as equações de HF através de álgebra matricial. Nos métodos de DFT pode-se, assim como os métodos de HFR, expandir os spin-orbitais de Kohn-Sham através da utilização de funções de base. Há inúmeras funções de base de orbitais incluindo das funções do tipo Slater e Gaussianas. Existem inúmeras funções de bases, construídas para inúmeros casos específicos ¹⁷³ sendo o desafio de qualquer cálculo computacional encontrar uma função de base mínima, porém eficiente para o problema estudado.

Nas primeiras aplicações do método HFR, as funções hidrogenóides foram primeira opção de escolha de funções de base para se usar em cálculos de propriedades eletrônicas, uma vez que eram obtidas como solução exata da ES não relativística para átomos de um elétron. Apesar destas funções representarem bem os sistemas hidrogenóides, para sistemas de vários elétrons, a aproximação dos orbitais moleculares por funções do tipo hidrogenóide não era bem descrita devido à simetria dos orbitais ocupados.

Devido as funções hidrogenóides serem impraticáveis computacionalmente com moléculas de três ou mais átomos, lembrando que estes químicos teóricos estavam no início do século XX, Em 1930, Slater¹⁷⁴ propôs uma forma para funções de base, que foram mais bem sucedidas que as funções hidrogenóides para o cálculo de integrais de energia. Embora forneçam uma melhor representação para os orbitais atômicos, os orbitais de Slater (*Slater-type orbitals*, STOs) tornam o cálculo das integrais de dois-elétrons numericamente difícil. Quando o sistema em estudo englobar muitos átomos,

aparecem no cálculo integrais que podem envolver produtos de duas, três e quatro funções de base, centradas em núcleos diferentes.

Trinta anos após a criação dos orbitais de Slater Samuel Francis Boys criam em 1950,¹⁷⁵ as chamadas “*gaussian type orbitals*” (GTO). O sucesso das funções de base criadas por Boys se deu devido a utilização de funções gaussianas centradas nos núcleos atômicos, assim o produto de duas gaussianas centradas em dois núcleos seria uma nova gaussiana, reduzindo assim, consideravelmente o número de integrais a serem resolvidas computacionalmente, tornando desta maneira o cálculo viável. Atualmente as funções do tipo GTO são as mais utilizadas para resolução de cálculos computacionais.

Uma base mínima, também conhecida como *single-zeta*, consiste em utilizar uma única função de base para representar um orbital atômico. Por exemplo, tanto para o átomo de hidrogênio ou de hélio, existiria apenas uma função descrevendo o orbital destes (1s). No caso de átomos como sódio, existiriam nove funções de base para este átomo sendo: (a) três funções representando os orbitais 1s, 2s e 3s e seis funções, (b) três para os orbitais 2p e mais (c) três para os orbitais 3p deste átomo. O termo “mínima” não é totalmente preciso uma vez que usualmente consideram-se cinco funções (1s, 2s e 2p) para construir um conjunto de base mínima para Li e Be, embora o orbital 2p não esteja ocupado nesses átomos. Estas funções de base mínimas para átomos também podem ser aplicadas para moléculas, entretanto, a utilização destas não costumam gerar bons resultados de cálculo.¹⁷⁶

Para moléculas eram necessárias aplicar mais funções de base a cada orbital atômico, obtendo-se com o aumento do número de funções, melhores resultados. Surgem desta maneira as bases mais elaboradas, contendo duas funções para cada orbital, chamadas bases *double zeta* ou até mesmo três funções por orbital, *triple zeta*. Isto causava um aumento de tempo para os cálculos computacionais, uma vez que o número de funções a ser resolvida aumentava consideravelmente. Para o exemplo do sódio citado acima, utilizando-se uma função *triple-zeta*, existiriam 27 funções ao invés de 9 como na *single-zeta*.

Surge desta maneira as bases do tipo “Split-valence” (SV). Estas funções são colocadas pela fórmula geral $m-npG$, no qual os elétrons de caroço são

representados por uma função gerada a partir da combinação linear de m gaussianas e cada orbital de valência do átomo é representado por duas funções, uma gerada pela combinação de n gaussianas e outra peça combinação de p gaussianas. Sendo os elétrons de valência nestas bases tratados com maior detalhe computacional. Isto melhorava consideravelmente as propriedades obtidas através dos cálculos, não aumentando tão consideravelmente porém, o número de funções aos átomos. Surgem também as “funções polarizadas” as quais levam em considerações as distorções causadas por átomos adjacentes quando uma ligação química é formada.

Um exemplo de base do tipo SV é a função de base 6-31G. Pode-se adicionar a estas bases uma função polarização do tipo “d”, representada pela forma $m-npG^*$ na qual passa-se a considerar os orbitais d no sistema. Pode-se também considerar uma função polarização para os orbitais p para os átomos leves (hidrogênio e hélio), sendo esta representada pela fórmula $m-npG^{**}$. Como exemplos pode-se citar as funções 6-31G* e 6-31G** ou seus sinônimos 6-31G(d) e 6-31G(d,p). As funções de polarização adicionam certa “flexibilidade” ao sistema permitindo aos orbitais moleculares uma maior assimetria em relação ao núcleo e levando em consideração, desta maneira, uma distorção de uma ligação através de um terceiro átomo.

Além de bases SV *double-zeta*, pode-se combinar também três funções para cada orbital de valência, sendo as bases *triple-zeta* representada pela fórmula $m-npqG$. As bases SV *double-zeta* e *triple-zeta* também podem ser aumentadas para as chamadas funções difusas, indicado pelo sinal de + para os átomos que não o hidrogênio ou ++ para adicionar estas também aos hidrogênios da molécula. As funções difusas são utilizadas em sistemas moleculares contendo ânions ou quando se pretende estudar interações fracas em sua composição, isto porque estas funções decaem mais lentamente com a distância que as funções não difusas. Pode-se além disso combinar funções polarização com funções difusas, sendo exemplo destas funções 6-311+G(d) ou 6-31++G(2d,p)

Existe desta maneira, para cada funcional utilizado, inúmeras combinações de funções de base.

Um tutorial para a execução dos cálculos

Uma maneira de simplificar algumas partes dos cálculos computacionais é adquirir informações experimentais que podem ser úteis a estes cálculos, como por exemplo, geometrias moleculares através de experimentos de difração de Raios-X. Porém existem sistemas cujas propriedades químicas ou físicas são de difícil determinação experimental, sendo necessário desta maneira a realização de cálculos afim de se encontrar as conformações e propriedades moleculares para somente então serem realizados cálculos de energia com a molécula. Desta maneira o primeiro passo para a realização de um cálculo teórico é a otimização da geometria molecular.

Na otimização da geometria molecular em um sistema, são calculadas as energias para pequenas mudanças de conformação, sendo buscada a geometria onde há um mínimo de energia e qualquer variação da posição dos átomos leve em um aumento desta. Existem, porém, inúmeras conformações moleculares apresentam as condições citadas, sendo apenas uma dentre todas, considerada um mínimo global. A estas geometrias diz-se que são estruturas de mínimo local. Assim para se confirmar que a estrutura encontrada é um mínimo global um passo fundamental é o cálculo das frequências vibracionais. Os valores das frequências estão relacionados aos autovalores da matriz Hessiana. Caso os autovalores sejam todos positivos, as frequências são reais e o ponto estacionário é um mínimo local. No entanto, caso um dos autovalores seja negativo (frequência imaginária), o ponto estacionário é uma estrutura de transição.

Quando o sistema molecular é relativamente grande, o primeiro passo para cálculos em Química Teórica é pré-otimizar a geometria da molécula com um nível de cálculo mais básico, sendo a geometria encontrada então refinada com um nível de maior complexidade, utilizando-se então métodos puramente quânticos. Esta pré-otimização é realizada através de métodos de mecânica molecular ou métodos semi-empíricos. Este procedimento é realizado para se diminuir os custos computacionais de cálculos, uma vez que métodos clássicos ou semi-empíricos encontram mais rapidamente as posições de mínimo conformacionais, o tempo para uma otimização inicial a partir de métodos

puramente quânticos é absurdamente maior que quando utilizada esta pré-otimização.

Para fins práticos, serão descritos neste trabalho apenas os passos metodológicos realizados com uma molécula sintetizada nos capítulos anteriores. Os cálculos computacionais de todas as BTDs apresentadas neste trabalho seguiram a mesma metodologia de cálculo que será descrita a seguir. A molécula escolhida para realização deste tutorial foi a **BTD-AO**¹⁷⁷

Primeiramente, faz-se uma pré-otimização em um método semi-empírico (PM6), para então ser realizado uma otimização das estruturas moleculares nos estados fundamental (S_0) e primeiro excitado (S_1) utilizando o um método ab-initio, o funcional de correlação e troca CAM-B3LYP combinado com o conjunto de funções de base 6-311G(d,p). Em geral, esta combinação apresenta um bom compromisso entre acurácia de custo computacional.

Para a simulação das propriedades fotofísicas, após termos as geometrias otimizadas dos estados S_0 e S_1 , é necessário testar diferentes funcionais de correlação e troca, em cálculos do tipo *single point* (geometria fixa), com o objetivo de melhor representar o comprimento de onda máximo de absorção (λ_{Max}) comparado aos resultados experimentais. Com esse intuito, utilizamos os funcionais de correlação e troca listados na Tabela 1. É importante entender do que se trata cada tipo de funcional bem como as suas diferenças, tais como a modificação do Becke por dois outros parâmetros α e β , ou como o funcional PBE1PBE tem um peso de correção de 25% de troca eletrônica e 75% de correlação.⁵⁰ Para os cálculos das propriedades fotofísicas, combinado com os funcionais descritos na Tabela 1, utilizamos um conjunto de função de base do tipo Pople mais extenso: 6-311+G(2d,p). Vale destacar que, naturalmente, outros funcionais de correlação e troca poderão ser testados com o objetivo de se alcançar uma melhor descrição da propriedade de interesse.

Tabela 11. Tabela com os Funcionais de Correlação e troca utilizados no trabalho. ^{178,179}

Funcionais	Descrição
B2PLYP	É um funcional híbrido de correlação e troca com correções perturbativas de segunda ordem.
B3LYP	(Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr) Um funcional híbrido de correlação, incluindo 3 parâmetros de Becke para a “troca” e termos locais e não-locais de Lee, Yang e Parr para a “correlação”.
CAM-B3LYP	Uma modificação do B3LYP, modificando os parâmetros de α Becke para dois parâmetros α e β .
M062X	Uma modificação do funcional M06, um funcional híbrido de Truhlar e Zhao.
PBE1PBE	(PBE0) Uma complementação do funcional de Perdew, Burke e Ernzerhof, que complementava apenas a “troca”, sendo expandido por Adamo para um funcional híbrido, contemplando um peso de 25% para a “troca” e 75% da “correlação”.
wB97XD	Um funcional híbrido de Head-Gordon, inclui uma modelo empírico de dispersão no algoritmo.

O primeiro passo está na “montagem” ou arquitetura da molécula, o que será descrita através do software GaussView© 5, ¹⁷⁸ Figura 103. Com o software aberto, clique no menu suspenso “File” e em seguida em “New” > “Create Molecule Group”, isso fará com que uma nova janela seja aberta, nesta nova janela, **Figura 104. Janela** para “montagem” da molécula de interesse, clique com o botão auxiliar do mouse (botão direito, no modo destro, ou botão esquerdo, no modo canhoto) e em seguida passe o ponteiro sobre a aba “Builder” clicando em “Element Fragments”. Uma aba com uma tabela periódica será aberta com as respectivas valências dos elementos para a escolha, tornando o trabalho de “montagem” da molécula bastante intuitivo.

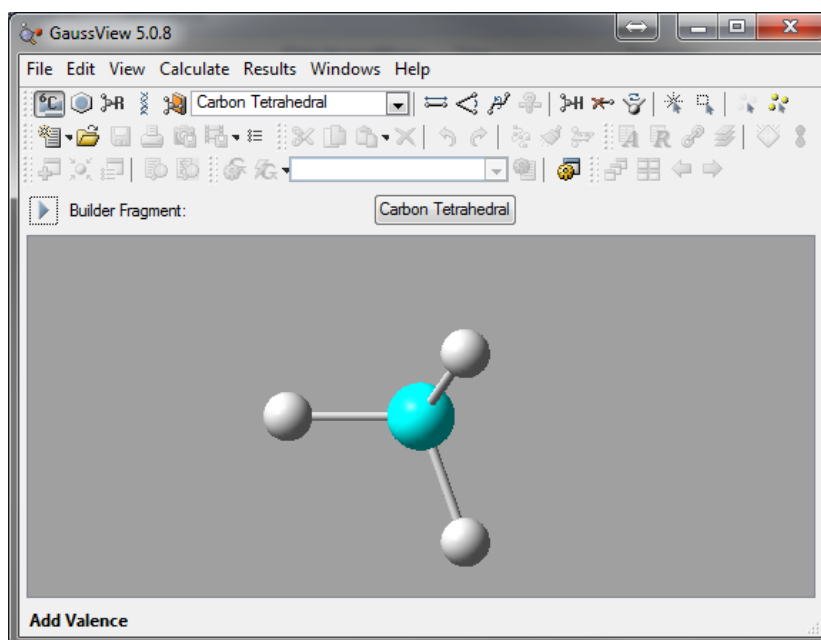


Figura 103. Layout do Software GaussView© 5.

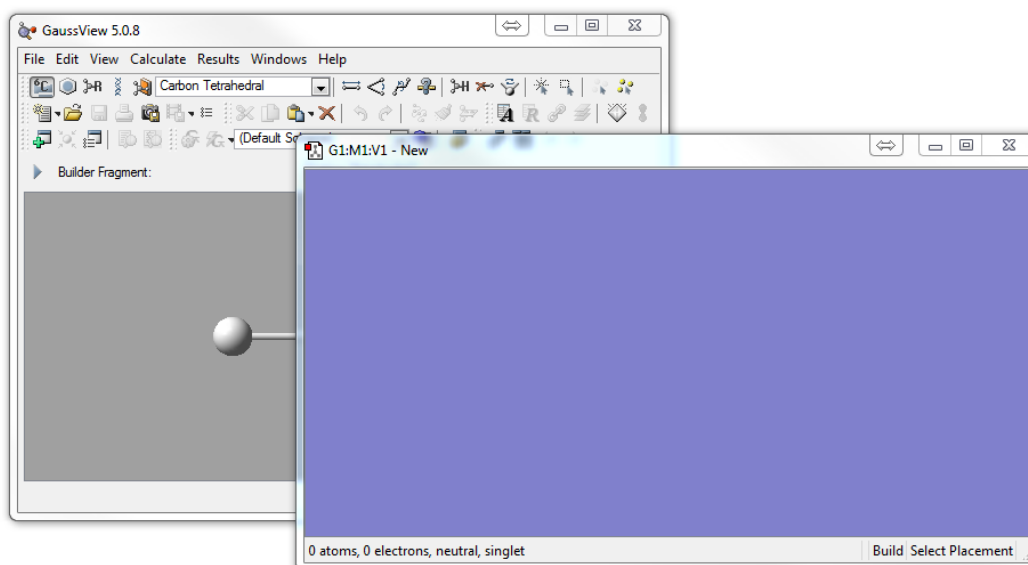


Figura 104. Janela para “montagem” da molécula de interesse

Com a estrutura molecular confeccionada, **Figura 105**, realiza-se uma pré-otimização da molécula através de um método Semiempírico, nesse caso em PM6. Para isso, deve-se editar as “keywords” (comandos gerados a partir de palavras chaves) necessárias. São estes comandos que irão fazer com que o software Gaussian® 09, responsável pelo mecanismo de cálculo molecular, gere

os resultados esperados. Para isso, na janela apresentada na **Figura 106**, clique com o botão auxiliar e, em seguida “Calculate” → “Gaussian Calculation Setup”.

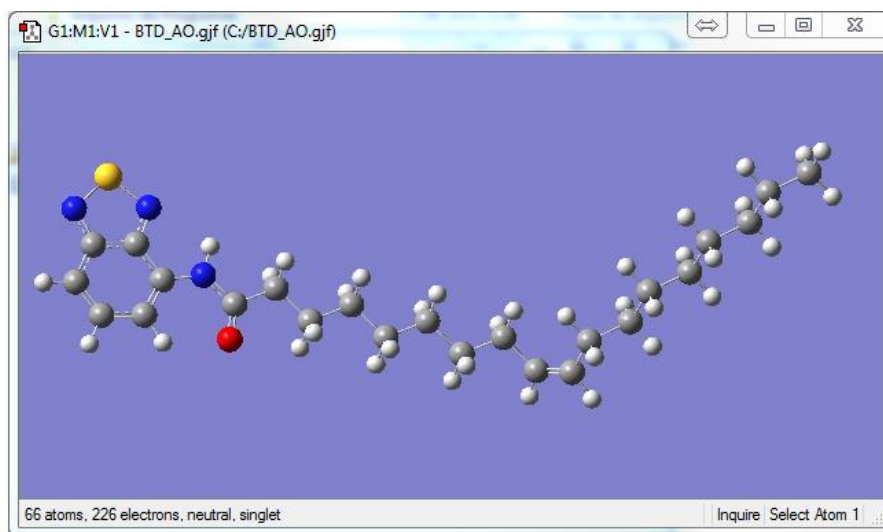


Figura 105. Molécula “montada” pronta para a submissão dos cálculos.

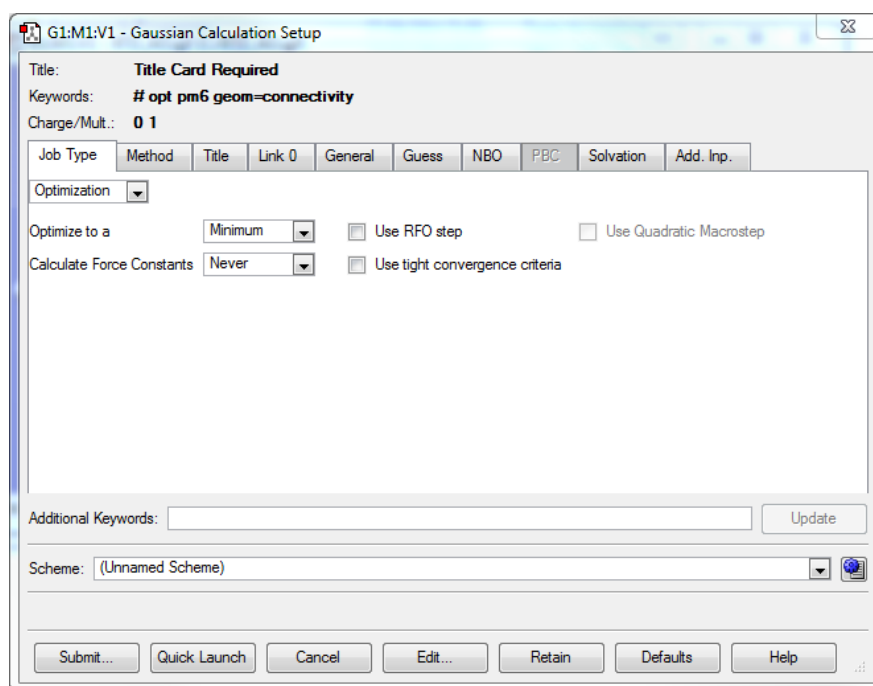


Figura 106. Janela de edição de parâmetros de cálculos do GaussView© 5.

Na aba “Job Type” há diversas opções para cálculos, escolha a opção “Optimization”, que procura o estado de menor energia para a estrutura de *input*, e informe “Optimize to a Minimum”. Na aba “Method” selecione “Ground State” que indica estado fundamental de excitação eletrônica, “Semi-empirical” que

indica um método do tipo semiempírico, “Default Spin” ou “Restricted” ou “Unrestricted” ou “Restricted-Open” para o método de tratamento dos *spin* eletrônicos, “PM6” indicando o tipo de cálculo semiempírico, “Charge”= 0 quando a molécula não for carregada e por último “Singlet” quanto à multiplicidade de spin. É importante notar que estes parâmetros devem ser ajustados de acordo com a molécula trabalhada, sendo os ajustes dos parâmetros acima eficientes para a molécula **BTD-AO** estudada.

Se o cálculo for feito na mesma máquina em que o GaussView está sendo executado, após a edição dos parâmetros, basta clicar em “Submit” e o software Gaussian será chamado à execução, realizando os cálculos necessários para se obter os resultados escolhidos através dos parâmetros descritos anteriormente. Se o cálculo não for realizado na mesma máquina ou se, executado via modo “*stand alone*” em um sistema operacional Linux, torna-se necessário mudar alguns detalhes no arquivo de *input*. Nesse caso, salve o arquivo com extensão “.gjf” ou “.com” e o edite com um gerenciador de texto, **Figura 107**. Quando realizado desta maneira torna-se necessário editar as quatro primeiras linhas do arquivo ¹⁸⁰

```
%chk=BTD_AO.chk
%mem=2000MB
%nprocshared=8
# B2PLYP/6-311+G(2d,p)

Título do Cálculo

0 1
O          -5.08595600   -1.71675200    1.06012600
C          -4.93310800   -0.75722400    0.33887200
C          -3.60180000   -0.39562500   -0.29657600
N          -5.94895600    0.11203800    0.01667000
C          -2.49341900   -1.37753400    0.05093300
C          -1.15894600   -1.00411500   -0.58534100
C          -0.03954900   -1.98209900   -0.24379500
C          1.29950600    -1.61543600   -0.87504900
C          2.41785900    -2.59370400   -0.53185500
C          3.76153700    -2.21966700   -1.16424000
C          4.83405000    -3.22758400   -0.87411300
C          5.95520300    -3.05671800   -0.18139800
C          6.46070700    -1.80359400    0.46993700
```

Figura 107. Modo texto do arquivo de input.

Na primeira linha do arquivo vem o caminho do arquivo *checkpoint*, é necessário incluir a *keyword* “%chk=” seguida do local em que o arquivo *checkpoint* será gravado. A segunda linha indica a quantidade de memória do computador que será designada para o cálculo a *keyword* “%mem=X” sendo X o tamanho da memória RAM que será alocada para o cálculo indica este

comando de cálculo. Na terceira linha é explicitado o número de cores que o processador utilizará para o cálculo, isto é indicado através da keyword “%nprocshared= Y” onde Y é o número desejado de cores (no exemplo acima escolheu-se quatro cores do processador). A quarta linha do *input*, desde que os parâmetros de cálculos anteriormente citados na aba “Gaussian Calculation Setup” sejam ajustados corretamente, não precisa ser modificada pois o método de cálculo, sua função de base e os parâmetros pedidos para serem calculados já estão corretamente organizados nesta.

A submissão em sistemas Linux, por *default*, pode ser realizada via terminal, com o comando “\$g09 ‘arquivo de entrada’ ‘arquivo de saída’”. Porém, em sistemas tipo *cluster* de computadores, o gerenciador do sistema pode criar um *script shell* para otimizar o gerenciamento de memória e processadores, o que modifica o comando de submissão.

Após o término dos cálculos da pré-otimização é criado, na pasta onde se escolheu salvar os arquivos do cálculos, um novo artigo com o mesmo nome do *input* porém com uma extensão diferente, “.log” ou “.out”. Este pode ser aberto através de um editor de texto podendo ser visualizado os cálculos executados computacionalmente. Cálculos executados perfeitamente pelo computador contem em sua penúltima linha a frase “Normal termination of Gaussian 09”. A existência desta frase garante que o cálculo terminou como esperado. A observação desta frase é importante para qualquer cálculo computacional executado através do Gaussian e foi realizado em todos os cálculos descritos neste artigo.

Confirmado o término da pré-otimização, este arquivo de saída deve ser aberto no programa GaussView novamente. Agora a geometria em que a molécula se encontra já é a otimizada pelo método semiempírico, podendo então passar para a próxima fase de cálculos; o tratamento mais refinado da geometria molecular. Para isso vá no “Gaussian Calculation Setup” novamente executando as seguintes modificações:

Na aba “Job Type” os parâmetros podem ser mantidos como anteriormente (Caso necessário calcular os estados vibracionais da molécula, pode-se nesta aba mudar o tipo de cálculo para “Opt+Freq”, colocando “No” na linha “Compute Raman”).

Na aba “Method” a opção “Ground State” deve ser mantida pois ainda estamos calculando a geometria molecular no seu estado eletrônico fundamental (S0 ou singleto fundamental). O método de cálculo deve agora ser alterado para “DFT” e o tratamento de spin mantido em “Default Spin” (caso as opções citadas não estejam já selecionadas basta alterá-las). O funcional escolhido para o ajuste da geometria molecular foi o “CAM-B3LYP” e o conjunto de funções de base para o cálculo foi o GTO - “6-311G(d,p)”, selecionado na linha “Basis Set” pela sequência “6-311G”/ “/“d”/“p”. (a escolha deste funcional, bem como sua função de base será comentada a seguir), como não foi alterada a carga da molécula estudada, esta foi mantida neutra (Carga 0) e sua multiplicidade em singleto. Submete-se novamente o cálculo para “rodar” e aguarde o término deste, sendo gerado, como no cálculo anterior um arquivo do tipo –log ou –out.

Como para os estudos fotofísicos da molécula utiliza-se também a geometria molecular, bem como seu comportamento eletrônico, no estado excitado, faz-se necessário o cálculo da geometria da molécula nesta condição. Para este cálculo, utiliza-se a geometria já calculada pelo método DFT- CAM-B3LYP/6-311G(d,p). (O cálculo foi realizado com a molécula em seu “Ground state”). A mudança que deve ser realizada agora é justamente na aba “Method” do “Gaussian Calculation Setup”, sendo trocado o “Ground State” por “TD-SCF”, a mudança deste comando coloca o cálculo da molécula para seu primeiro nível de excitação eletrônica (S1 ou singleto de primeira excitação). Ao mudar este parâmetro abre-se outras opções de parâmetros de cálculo como “States”, “Solve for more states” e “State of Interest”. O parâmetro States deve ser deixado na opção “Default” e as opções “Solve for More States” e “State of Interest” devem ser mantidas desativadas, como visualizado na **Figura 108**, mantendo assim o cálculo da molécula no estado excitado singleto.

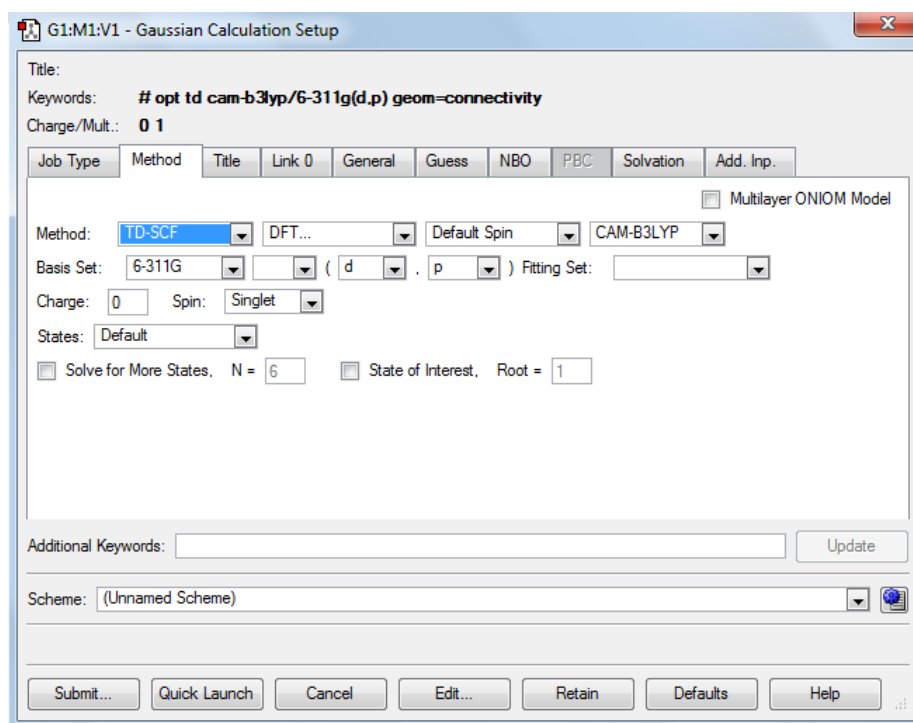


Figura 108. Janela de edição de parâmetros de cálculos do GaussView© 5. para otimização molecular do estado excitado por DFT

Com as geometrias do estado fundamental (S0) e excitado (S1) otimizados em CAM-B3LYP/6-311G(d,p), pode-se realizar os cálculos necessários para o estudo fotofísico da molécula **BTD-AO**, tais como cálculos de espectro UV-Vis, cálculos de orbitais e Diferença de Densidade Eletrônica entre estados.

Começaremos com os cálculos do tipo *single point*, em que os parâmetros energéticos da estrutura são computados sem a modificação de sua geometria. Para obtermos os dados de espectro de absorção (UV-Vis teórico) e emissão (Fluorescência teórica) da molécula deve-se realizar os seguintes procedimentos:

- Para o espectro de absorção, os procedimentos devem ser realizados com a estrutura otimizada em seu estado fundamental, S0,
- Se o espectro desejado for o de emissão, os mesmos devem ser realizados com a geometria otimizada em S1.

Ao abrir o arquivo de saída (-log ou -out) otimizado em CAM-B3LYP/6-311G(d,p) (estado fundamental) ou TD CAM-B3LYP/6-311G(d,p) (estado

excitado) no programa GaussView e abrir a janela “Gaussian Calculation Setup” é necessário mudar na aba “Job Type” o parâmetro que será calculado. Diferente dos cálculos realizados anteriormente, o que está sendo procurado é a energia relacionada aquela molécula, desta maneira deve se colocar nesta aba a opção “Energy”.

Um outro fator que irá ser alterado para o cálculo da energia molécula em ambos os estados (fundamental e excitado) é o método computacional, bem como sua função de base.

Para a escolha do método apropriado deve-se inicialmente realizar uma varredura de cálculo, utilizando para esta, diferentes funcionais e funções de base. Para fins didáticos será apresentado apenas o tratamento de um destes funcionais. Porém, seguindo a mesma sequência descrita, foram realizados os cálculos com os seguintes funcionais de correlação: dwB97XD, PBE1PBE, M062X, CAM-B3LYP, B3LYP e B2PLYP. Para todos estes utilizou-se a mesma função de base 6-311+g(2d,p). É montada então uma tabela (apresentada nos Resultados) com todos os valores calculados, sendo escolhido o método em que os resultados teóricos mais corroboram com os experimentais.

O funcional cujos resultados satisfizeram a condição descrita anteriormente foi o PBE1PBE combinado com o conjunto de função de base 6-311+G(2d,p). Nem sempre este método com esta função de base irá se mostrar o mais eficiente, sendo este escolhido por apresentar melhores resultados para o sistema molecular estudado.

Uma observação importante a ser feita é que alguns métodos suportados no Gaussian não estão presentes no GaussView, como o próprio método PBE1PBE. Quando isto ocorre deve-se colocar a primeira caixa de seleção (da aba “Method”) com a opção Custom. e digitar manualmente o funcional que se deseja trabalhar na janela seguinte, **Figura 109**, (Para métodos DFT, basta apenas escrever o funcional na caixa)

Um fato que não deve ser esquecido é que, para um espectro UV-Vis, é necessários cálculos do tipo *single point*, que apenas descreve o caráter energético da molécula de *input*, sem nenhuma otimização estrutural, portanto, não se deve esquecer de usar uma geometria já otimizada, Na prática, um cálculo de espectro de espectro UV-Vis de emissão e de absorção, difere apenas na geometria de entrada (otimizada em S0 ou S1). Para que o trabalho não fique

repetitivo, será mostrado apenas como se executam os cálculos para o estudo de emissão da molécula **BTD-AO**, Figura 10.

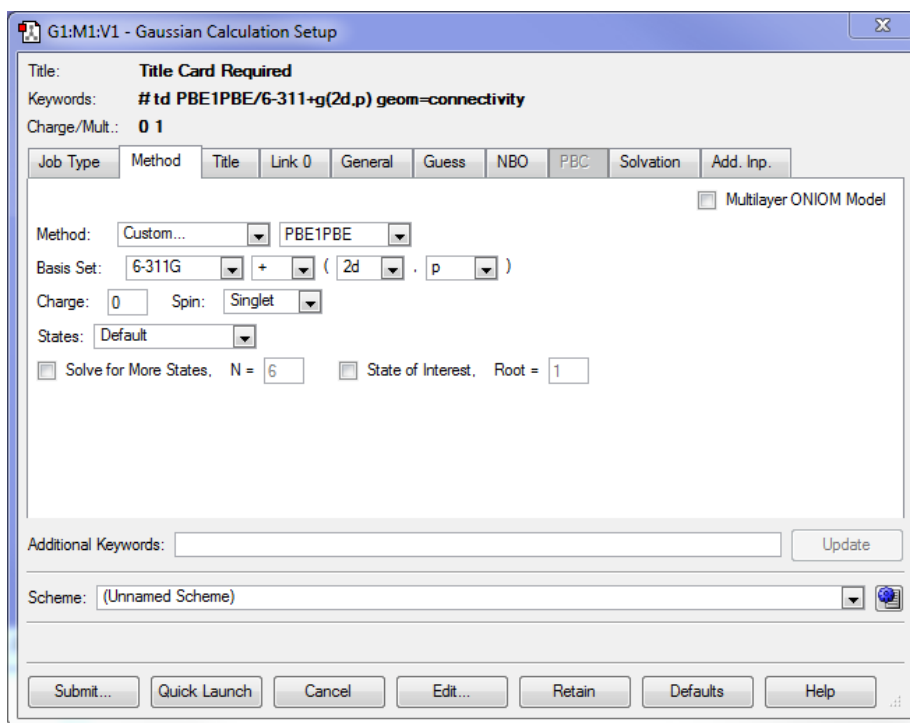


Figura 109. Janela de edição de métodos do GaussView© 5, para um cálculo single point excitado.

Com o cálculo *single point da molécula BTD-AO no estado* excitado finalizado (consequentemente com o arquivo de saída para este cálculo gerado), pode-se utilizar um simples editor de texto, Figura 110, para verificar as contribuições energéticas dos orbitais moleculares, bem como as energias de excitações e as devidas forças de osciladores presentes no sistema.

```
Excitation energies and oscillator strengths:

Excited state symmetry could not be determined.
Excited State 1: Singlet-?Sym 3.2600 eV 380.32 nm f=0.0894 <S**2>=0.000
113 -> 114 0.70177
This state for optimization and/or second-order correction.
Copying the excited state density for this state as the 1-particle RhoCI density.

Excited state symmetry could not be determined.
Excited State 2: Singlet-?Sym 4.1824 eV 296.44 nm f=0.0000 <S**2>=0.000
112 -> 114 0.70180

Excited state symmetry could not be determined.
Excited State 3: Singlet-?Sym 4.3365 eV 285.91 nm f=0.0000 <S**2>=0.000
110 -> 114 0.68027
110 -> 115 0.13561

Excited state symmetry could not be determined.
Excited State 4: Singlet-?Sym 4.5792 eV 270.75 nm f=0.1846 <S**2>=0.000
111 -> 114 0.64788
113 -> 117 0.25931

Excited state symmetry could not be determined.
Excited State 5: Singlet-?Sym 4.8403 eV 256.15 nm f=0.0000 <S**2>=0.000
105 -> 114 0.69342
```

Figura 110. Modo texto do cálculo single point excitado, visualizando as energias de excitações.

Por se tratar de um espectro teórico, apenas as forças dos osciladores e os comprimentos de onda de excitação são computados, deste modo, ao contrário de um espectro experimental, em que são observadas bandas de absorção (excitação), o espectro teórico mostra apenas o que seriam as intensidades máximas destas bandas, **Figura 111** Isto ocorre porque experimentalmente, um sistema molecular é composto por um número muito maior de moléculas e estas não se encontram todas na mesma condição energética, porém estatisticamente falando a maioria será encontrada no estado de equilíbrio (onde a geometria molecular possui uma energia mais baixa), assim o máximo de absorção do espectro teórico é semelhante aos valores dos picos encontrados teoricamente.

Porém é possível simular, a partir das forças dos osciladores gerados teoricamente, um espectro de UV-Vis. Para isso existem algumas técnicas matemáticas que conseguem calcular a forma de um espectro experimental, como por exemplo, o método utilizado pelo programa GaussView, Figura 112. Para a criação do espectro este programa utiliza uma série de convoluções de funções gaussianas, centradas em cada transição eletrônica. Uma outra opção seria a criação de um *script*, este realizaria o ajuste espectral a partir dos osciladores através de outras funções, podendo estas ser variadas de acordo com o método de ajuste. ¹⁸¹

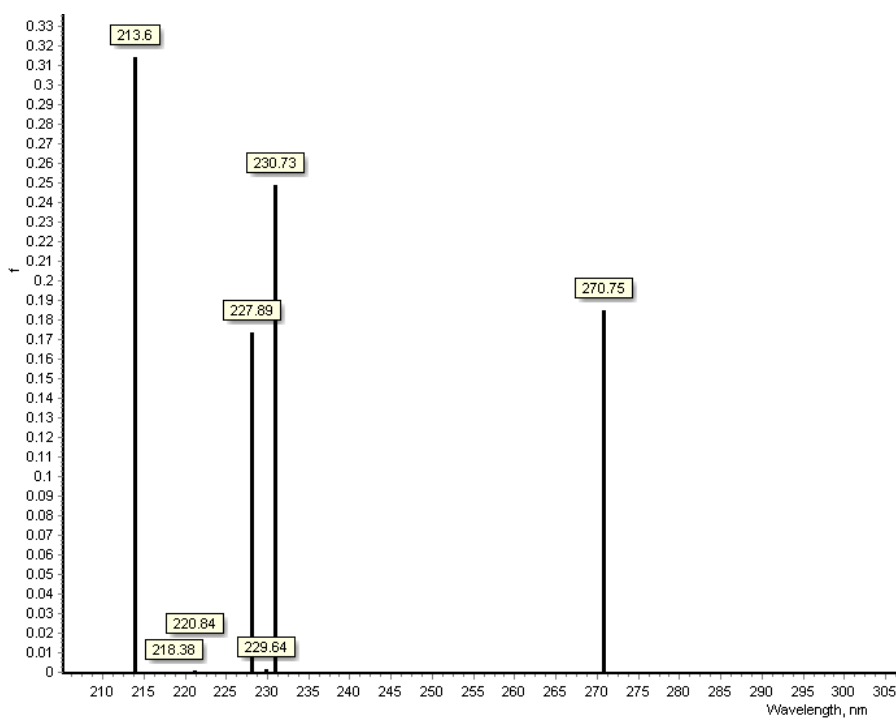


Figura 111. Comprimentos de onda de excitação com a suas respectivas forças de osciladores

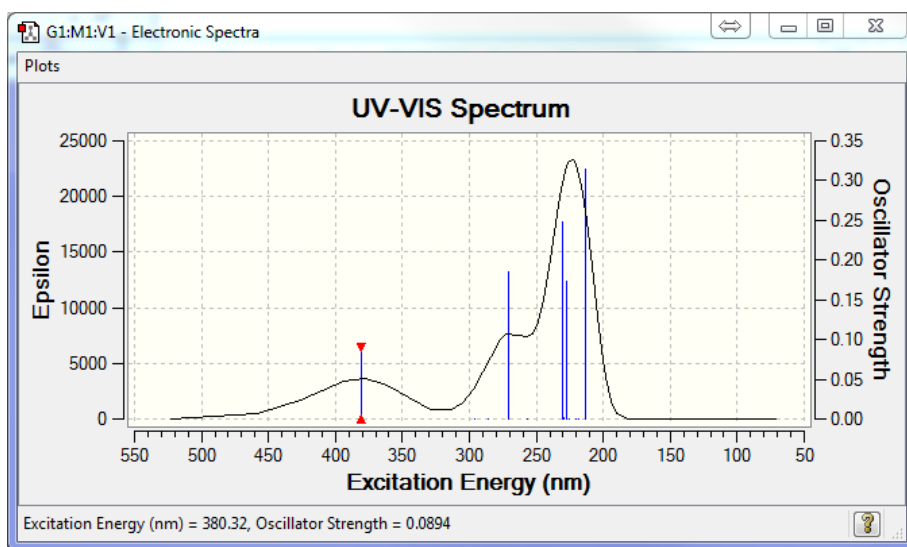


Figura 112. Espectro eletrônico com uma série de convoluções de gaussianas, extraído no GaussView.

Pode-se notar que apesar do espectro gerado no GaussView pela convolução das gaussianas, Figura 112, possuir uma maior semelhança com o espectro experimental quando comparado ao espectro da Figura 111, “Força do Oscilador x Comprimento de Onda”, pode-se retirar de ambos os espectros as mesmas informações. Deste modo, apesar do espectro gerado pela convolução possuir um maior apelo visual, já que experimentalmente o que se observa são espectros de absorção com este perfil, não há nesta nenhuma informação adicional que possa ser retirada deste, porém para comparação com espectros experimentais reais, este torna-se muito mais interessante.

Com todos os cálculos terminados, pode-se extrair os resultados de interesse, calculando-se as propriedades necessárias para o estudo fotofísico completo da molécula.

É interessante também a investigação da molécula quando esta se encontra solvatada. A solvatação de moléculas pode ser realizada através de cálculos computacionais em um tratamento implícito, através de métodos que utilizam modelos de polarização contínua (Polarizable Continuum Model- PCM).⁵⁷ Nestes métodos ao invés do solvente ser tratado como um conjunto de moléculas, este é considerado como um “contínuo polarizável”. Isto viabiliza os cálculos computacionais já que o tratamento de sistemas contendo um número muito grande de átomos torna-se inviável através de métodos ab-initio.

O solvente escolhido para a solvatação do derivado da BTD estudado foi a água. Esta escolha se justifica pelo fato de que a **BTD-AO** foi utilizada para marcação de organelas celulares e como já citado anteriormente uma célula possui mais de 50% de água em sua composição.

Para a realização dos cálculos da molécula solvatada deve-se seguir os seguintes procedimentos:

Será utilizado um método contínuo implícito de solvatação chamado “integral equation formalism variant polarization continuum model” (IEFPCM). Para isso deve-se novamente montar a molécula de **BTD-AO** sem nenhuma otimização de cálculo. Todos os passos de otimização e cálculo das energias (single point) realizados para a molécula sem solvatação devem ser repetidos, porém alterando-se esta última opção.

Para esta mudança deve-se realizar os seguintes comandos:

Na aba “Solvatation”, a opção “Model” seleciona o tipo de modelo de solvatação empregado, como já citado, utilizou-se o “IEFPCM” para a molécula de **BTD-AO**.

A escolha do solvente no qual os cálculos serão realizados é feita na linha “solvent”, como deseja-se observar o comportamento da molécula **BTD-AO** em meio aquoso, a opção “Water” foi escolhida, Figura 113. Esta mudança deve estar presente em todos os cálculos, incluindo os cálculos energéticos da molécula no estado fundamental e excitado.

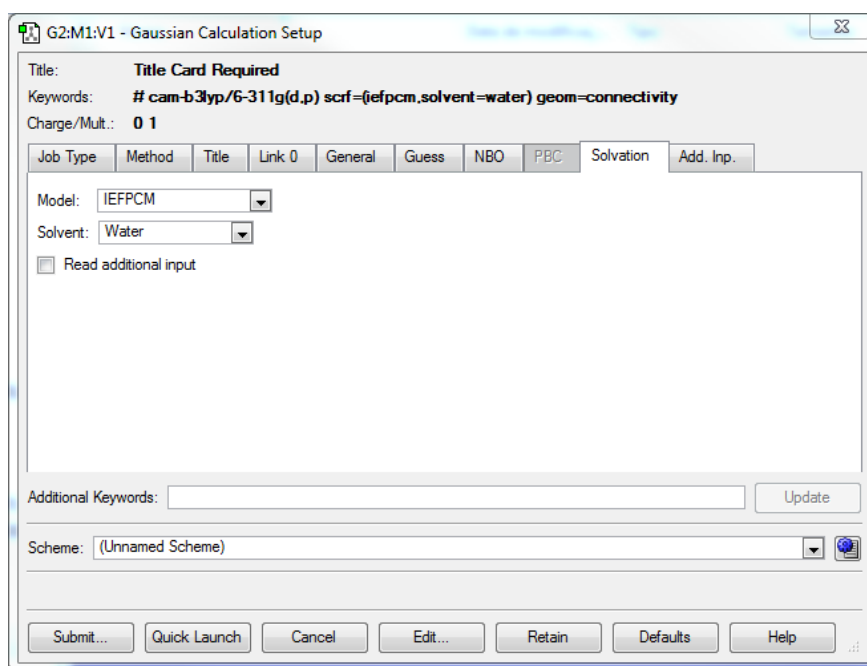


Figura 113. “Gaussian Calculation Setup” com edição dos parâmetros de solvatação no Software GaussView.

A visualização dos espectros, bem como as energias relacionadas à molécula são visualizadas da mesma maneira que os apresentados anteriormente, porém estes valores agora se referem ao sistema solvatados.

Não se comentou até agora sobre os resultados obtidos para os orbitais moleculares, bem como as imagens relacionados a estes orbitais e a densidade eletrônica da molécula.

Diversos softwares visualizam as energias e os preenchimentos dos orbitais moleculares das moléculas calculadas, inclusive no GaussView. Estes resultados podem ser observados através dos seguintes comandos:

Com o arquivo “.log” do cálculo *single point* acesse a aba “Edit” e abra a Janela “MOs”, Figura 114, nesta janela, pode-se observar o número dos orbitais moleculares, o preenchimento ou não deste e valor energético que cada orbital apresenta. Estes orbitais podem ser observados da mesma maneira para a molécula no estado fundamental e excitado e para o sistema gasoso (sem solvatação) ou solvatado em água.

É importante salientar que todos os cálculos executados no Gaussian apresentam seus valores em unidades atômicas, assim a unidade das energias moleculares encontradas pelos cálculos possui como unidade o Hartree, que pode ser facilmente convertido a eV, multiplicando o valor calculado pelo programa por $27,211 \text{ eV.Hartree}^{-1}$ ou para kJ.mol^{-1} , multiplicando por $2625,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$.¹⁸²

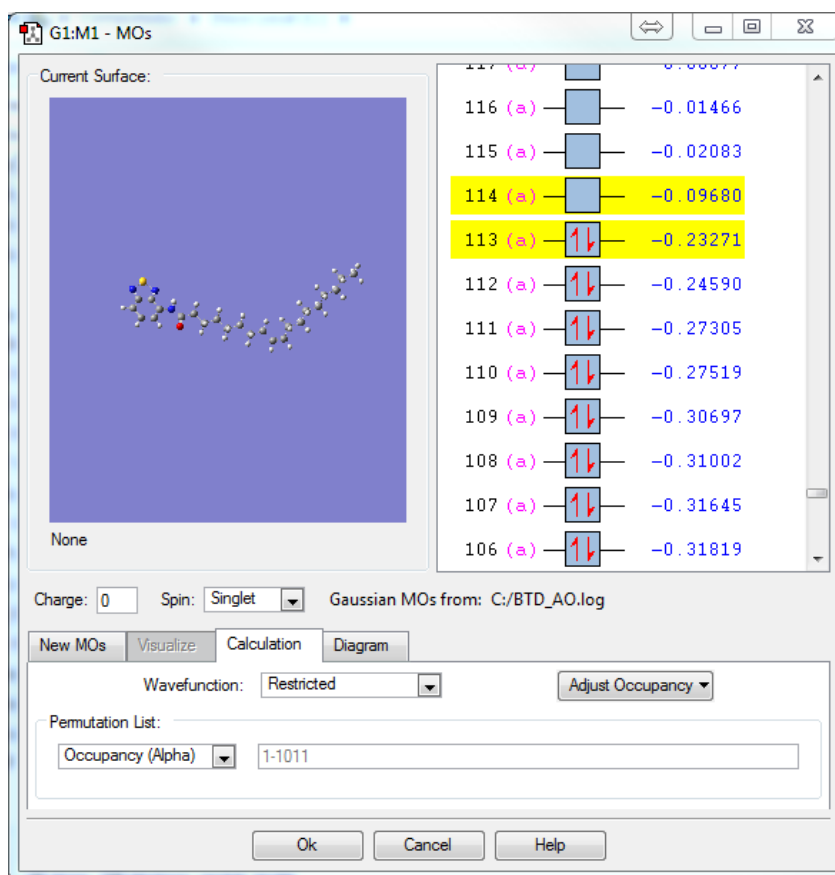


Figura 114. Janela do GaussView com os orbitais moleculares calculados.

A observação das densidades eletrônicas moleculares é realizada de modo diferente dos comandos executados até agora. Isso acontece porque para

esta deve-se trabalhar com os arquivos *checkpoint* (de extensão “.chk”), gerados juntamente com os arquivos de saída –log ou –out.

Há alguns pequenos programas dentro do diretório do Gaussian 09, Figura 115, dentre eles, “formchk.exe”, “cubegen.exe” e “cubman.exe”, os três pequenos aplicativos que serão usados para manipular e visualizar as densidades eletrônicas.

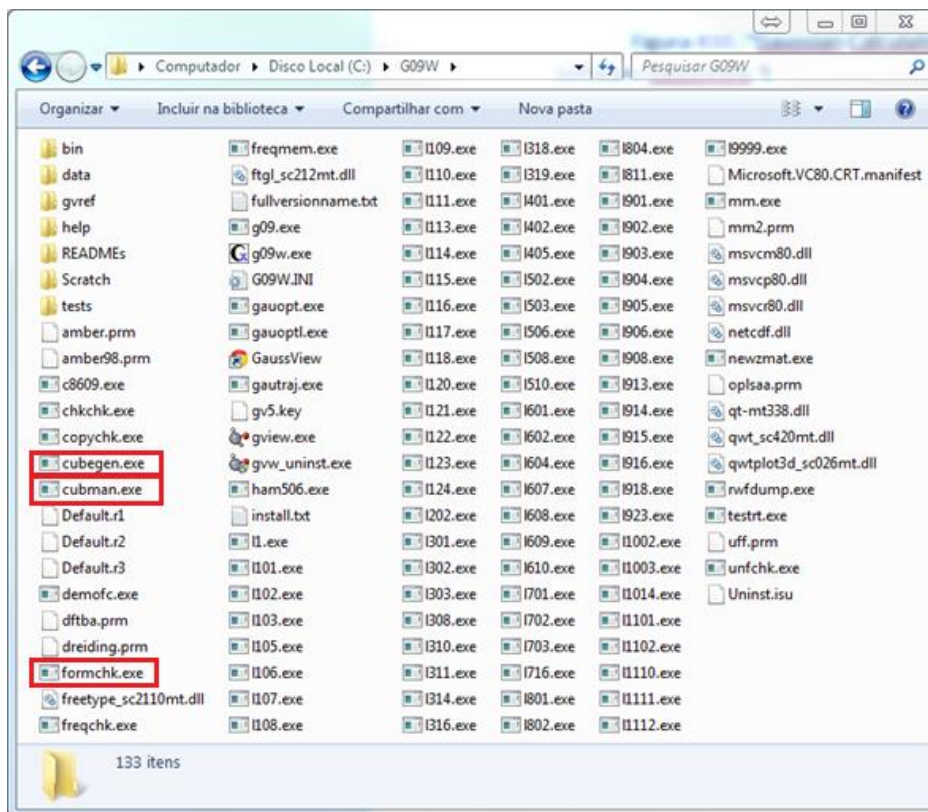


Figura 115. Diretório do Programa Gaussian em um Sistema Windows.

Por definição, em sistemas Unix (Linux) e MS-DOS (Windows), todo e qualquer script, quando executado, procura arquivos de entrada no mesmo diretório em que ele se encontra. Estando os arquivos de entrada em outro diretório faz-se necessário informar o caminho ao executar o script.^{183,184} Afim de se evitar este contratempo, é aconselhável que o usuário copie os três aplicativos (“formchk.exe”, “cubegen.exe” e “cubman.exe”) para o diretório em que estão os arquivos de saída dos cálculos de energia da molécula.

O arquivo *checkpoint* é um arquivo do tipo hexadecimal, para interpretá-los melhor, é necessário formatá-lo para um arquivo mais “legível” aos olhos humanos, ou seja, um arquivo de texto formatado, ou um arquivo *checkpoint*

formatado (“.fchk”). Para isso pode-se utilizar o aplicativo “formchk”, Figura 116.. Basta executar o “formchk” (o ícone deste executável deve estar mesma parte do arquivo de saída –chk) e informar o nome do arquivo checkpoint. Ao realizar esta etapa é criado um arquivo com o mesmo nome e extensão –fchk no diretório em que se está tabalhando. ¹⁷⁸ É importante a criação deste arquivo pois é através deste que se extrai todos os arquivos de superfície do Gaussian (arquivos de extensão “.cube”). É necessário porém, algumas etapas para a criação destes arquivos.

```
root@JaegerLMSC:/home/rvq# ./formchk
Checkpoint file? BTD_AO_S0.chk
Read checkpoint file BTD_AO_S0.chk
Write formatted file BTD_AO_S0.fchk
root@JaegerLMSC:/home/rvq# █
```

Figura 116. Modo terminal de execução do “formchk”.

Para a realização desta extração utiliza-se o aplicativo “cubegen” (também retirado do diretório do gaussian, como visto anteriormente). O “cubegen” é um *script* de execução que funciona tanto para o *prompt* de comando (Windows), **Figura 117**, quanto para o terminal (Linux), existindo apenas algumas diferenças de comandos na execução deste nos diferentes sistemas.

Para o sistema Linux é necessário executar o comando: “\$ cubegen memory kind fchkfile cubefile npts format” em que “memory” corresponde à memória que será alocada para a tarefa (se informar 0, ele usará o *default* da máquina), “kind” ao tipo de extração, que pode ser ‘MO=’ (para extrair a densidade de um orbital, ex. ‘MO=homo’ ou ‘MO=55’ para extrair a densidade do orbital HOMO ou do orbital 55) ou ‘Density=’ (para extrair a densidade eletrônica sobre a molécula, ex. ‘Density=scf’ para a densidade eletrônica da molécula em estado fundamental e ‘Density=ci’ para a molécula excitada), já a *keyword* “fchkfile” corresponde ao arquivo *checkpoint* formatado de entrada, “cubefile” o arquivo de superfície de saída, “npts” a resolução de pontos que terá sua superfície (coloque 0 para *default* que é de 80^3 pontos) e por último o “format” que aceita “h” e “n”, indicando se é desejado ou não um cabeçalho no arquivo

“.cube”. No *Prompt* de comando do Windows há todas essas opções, porém, ao invés de ser colocada no comando de execução elas são perguntadas via opções de entrada, **Figura 117**.¹⁷⁸ Com a execução deste, é criado no mesmo diretório os arquivos com extensão `-cube`, que são manipulados através do programa Gaussian.



```
C:\>cubegen
Property [Density]? density=scf
Formatted Checkpoint file? BTD_AO_S0.fchk
Cube file [ I? BTD_AO_S0_scf.cube
Approximate points per side [0]? 0
Header in cube file [H]? h
C:\>
```

Figura 117. Modo Prompt de comando do “cubegen”.

Para a manipulação dos arquivos de superfície no Gaussian, utiliza-se o aplicativo “cubman”, **Figura 118**. O “cubman”, ao contrário do “cubgen” funciona exatamente da mesma maneira em sistemas Unix e MS-DOS. Este executável realiza operações em arquivos de superfícies “.cube”.

A superfície da diferença de densidade eletrônica é calculada a partir da subtração da densidade eletrônica da molécula em seu estado fundamental pelo seu estado excitado. Para isso utiliza-se o executável “cubman”.

Quando este é executado, a primeira mensagem é uma pergunta ao tipo de ação (“Action”) que se deseja executar, como será realizado uma operação de subtração entre as superfícies a sigla “SU” (para subtração ou “Subtract”) deve ser colocada como resposta. O próximo passo é indicar o nome dos inputs que serão subtraídos (sempre deve-se responder com y (sim) as perguntas sobre formatação), e por último deve ser indicado o arquivo com extensão “.cube” de saída (deve-se criar um nome para o arquivo de saída devido a este ser gerado a partir de uma operação algébrica entre dois arquivos com nomes diferentes).

```

C:\>cubman.exe
Action [Add, Copy, Difference, Properties, Subtract, Scale, Square]? su
First input? BTD_A0_S0_scf.cube
Is it formatted [no,yes,old]? yes
Opened special file BTD_A0_S0_scf.cube.
Second input? BTD_A0_S1_scf.cube
Is it formatted [no,yes,old]? yes
Opened special file BTD_A0_S1_scf.cube.
Output file? BTD_A0_scf.cube
Should it be formatted [no,yes,old]? yes
Opened special file BTD_A0_scf.cube.
Input file titles:
otimizacao da chalcona A_pbe1pbe em S0 na fase gasosa density=scf
Electron density from Total SCF Density
Input file titles:
otimizacao da chalcona A_pbe1pbe em S0 na fase gasosa density=scf
Electron density from Total SCF Density

SumAP= 96.0063262296 SumAN= -0.0000117462 SumA= 96.0063144835
CAMax= 2.4083700000 XYZ= -3.4639930000 1.4411420000 0.4376920000
CAMin= -0.0000007846 XYZ= 16.9220870000 8.5453820000 -3.5777480000

SumBP= 96.0063262296 SumBN= -0.0000117462 SumB= 96.0063144835
CBMax= 2.4083700000 CBMin= -0.0000007846

SumOP= 0.0000000000 SumON= 0.0000000000 SumO= 0.0000000000
COMax= 0.0000000000 COMin= 0.0000000000

DipAE= -56.2239466420 -61.2597122934 2.0625944963
DipAN= 91.1217520000 90.6327190000 -2.6356750000
DipA= 34.8978053580 29.3730067066 -0.5730805037

DipBE= -56.2239466420 -61.2597122934 2.0625944963
DipBN= 91.1217520000 90.6327190000 -2.6356750000
DipB= 34.8978053580 29.3730067066 -0.5730805037

DipOE= 0.0000000000 0.0000000000 0.0000000000
DipON= 91.1217520000 90.6327190000 -2.6356750000
DipO= 91.1217520000 90.6327190000 -2.6356750000

C:\>
    
```

Figura 118. Modo Prompt de comando do “cubeman”

As densidades eletrônicas dos arquivos com extensão “.cube” (incluindo a diferença de densidade eletrônica gerada anteriormente), podem ser visualizadas pelo GaussView, para isto deve-se seguir o seguinte procedimento:

O arquivo com esta extensão deve inicialmente ser aberto no programa GaussView. Em seguida, deve-se clicar na aba “Results” e acessar a janela “Surfaces and Contours”. Com esta aberta, selecione a densidade eletrônica de interesse estas estão localizadas no primeiro no espaço da janela. Selecione então “Surface Actions” e em seguida “New Surfaces”. O programa irá ler a superfície plotando esta em cima da geometria molecular (que foi aberta junto com o arquivo .cube). Pode-se observar na Figura X15 como ficam os resultados destes plots, tanto para a diferença de densidade eletrônica molecular entre os estados S1 e S0, quanto para as densidades eletrônicas dos orbitais, **Figura 119**.

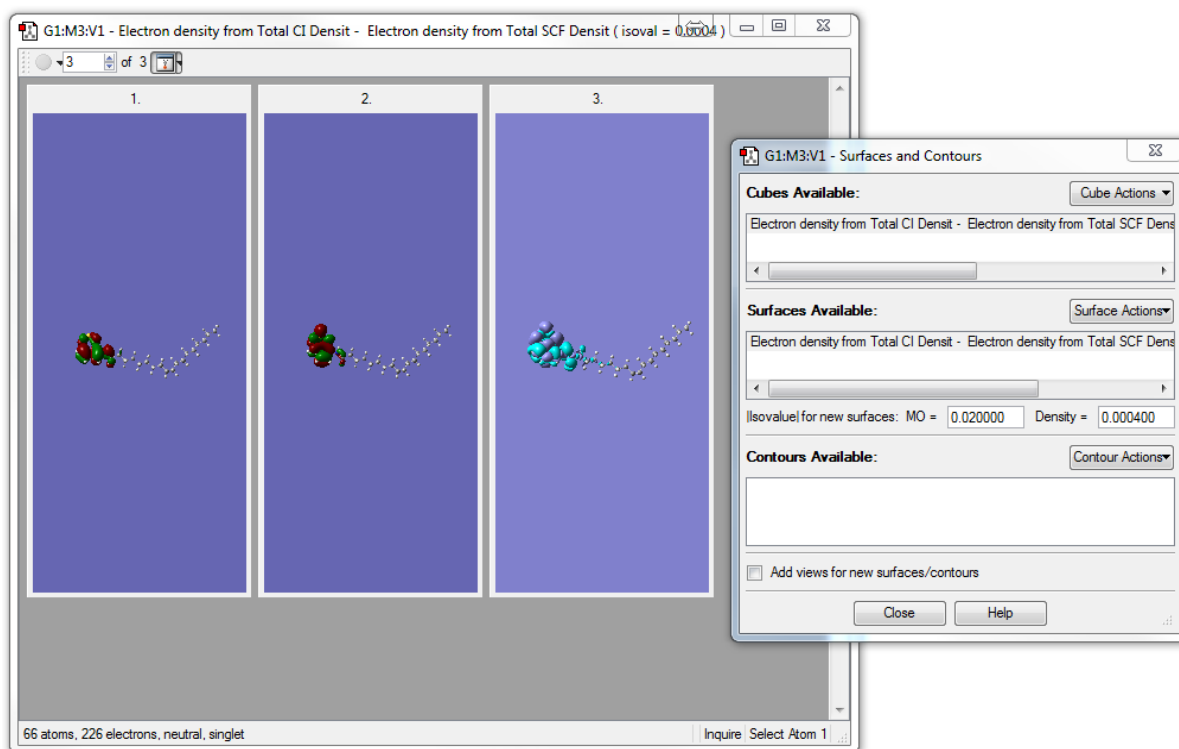


Figura 119. Janela de Visualização de Densidades Eletrônicas no GaussView.

Resultados e discussão

Apesar dos resultados³⁷ e da discussão sobre motivos e relação custo benefício entre Funcionais DFT e Funções de base¹⁸⁵ não serem inéditos, uma análise minuciosa acerca dos resultados de cada um dos funcionais, pode ser bastante significativa, na tentativa de generalizar para sistemas similares, dos quais não se dispõe de dados experimentais.

A escolha de um funcional CAM-B3LYP (uma modificação do B3LYP) é devido à sua grande precisão em estudos de excitação com transferência de carga, típica do sistema em estudo,⁵¹ já a escolha dos funcionais usados nos cálculos de fotofísica está associada aos bons resultados que o método PBE1PBE geram para sistemas conjugados,¹⁸⁵ os outros funcionais foram usados na tentativa de validação dos resultados de PBE1PBE.

A **Tabela 12**, mostra os resultados comparativos dos diversos Funcionais de Correlação e Troca, como momento de dipolo, níveis de energia HOMO e LUMO, bem como os níveis de *band gap* e absorção máxima UV-Vis. -Vis. Pode-

se observar que o único resultado em que, em meio aquoso, o pico máximo de absorção experimental (379 nm)¹⁷⁷ se aproxima do teórico é o obtido selecionando-se o método PBE1PBE, onde se obteve 380,32 nm. Desta forma a escolha do conjunto de cálculo PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311G(d,p) foi a mais apropriada para o sistema em estudo (**BTD-AO**).

Tabela 12. Resultados dos cálculos fotofísicos teóricos, das combinações de funcionais escolhidos com o conjunto de funções de base 6-311+G(2d,p) do marcador **BTD-AO** no estado fundamental e no excitado. Todas as moléculas foram pré-otimizadas em CAM-B3LYP/6-311G.

Funcionais	Estado	$\mu(D)$		HOMO(eV)		LUMO(eV)		$\Delta E_{HOMO-LUMO}$ (eV)		$\lambda_{abs}(nm)$	
		Gás	Água	Gás	Água	Gás	Água	Gás	Água	Gás	Água
B2PLYP	S0	1,9736	3,0491	-7,168	-7,209	-1,284	-1,310	5,886	5,899	341,7	343,1
	S1	2,4862	3,4578	-6,671	-6,730	-1,660	-1,715	5,010	5,014	-	-
B3LYP	S0	1,9368	3,0588	-6,332	-6,358	-2,634	-2,644	3,698	3,714	394,2	394,6
	S1	2,2225	3,3835	-5,960	-5,975	-2,971	-2,984	2,990	2,990	-	-
CAM-B3LYP	S0	1,9763	3,1089	-7,664	-7,696	-1,496	-1,510	6,168	6,186	347,5	347,6
	S1	2,2882	3,4559	-7,233	-7,249	-1,868	-1,895	5,364	5,355	-	-
M062X	S0	2,0647	3,2418	-7,526	-7,587	-1,701	-1,734	5,824	5,853	340,7	340,4
	S1	2,3759	3,5739	-7,079	-7,124	-2,078	-2,125	5,002	4,999	-	-
PBE1PBE	S0	1,9477	3,0554	-6,526	-6,575	-2,477	-2,508	4,049	4,066	380,3	380,6
	S1	4,8057	3,4053	-6,139	-6,177	-2,822	-2,860	3,316	3,317	-	-
wB97XD	S0	1,9684	3,0940	-8,202	-8,251	-0,863	-0,894	7,339	7,357	344,3	344,9
	S1	2,2852	3,4471	-7,775	-7,809	-1,233	-1,278	6,542	6,531	-	-

Os *plots* dos orbitais HOMO e LUMO (Plots dos orbitais HOMO e LUMO, diferença de densidade eletrônica entre os estados S₀ e S₁, assim como o diagrama de energias dos orbitais moleculares. Cálculos obtidos no nível PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311G(d,p).) demonstram uma característica orbitalar π bastante acentuada, com a densidade eletrônica do LUMO centrada no anel BTD. Já o mapa de diferença de densidade eletrônica mostra uma eficiência no processo de estabilização por ICT, uma vez que há um mudança significativa na mudança da densidade eletrônica, em especial no anel BTD, o que corrobora na estabilização da estrutura, durante o processo de

excitação eletrônica, prevenindo sua foto-decomposição. observa-se pelo diagrama de energias dos orbitais (Figura 120) que houve uma diminuição do *band gap* na fase aquosa, após a excitação, indicando um possível efeito de estabilização em solvente, pelo menos em solvente aquoso, durante o processo de excitação.

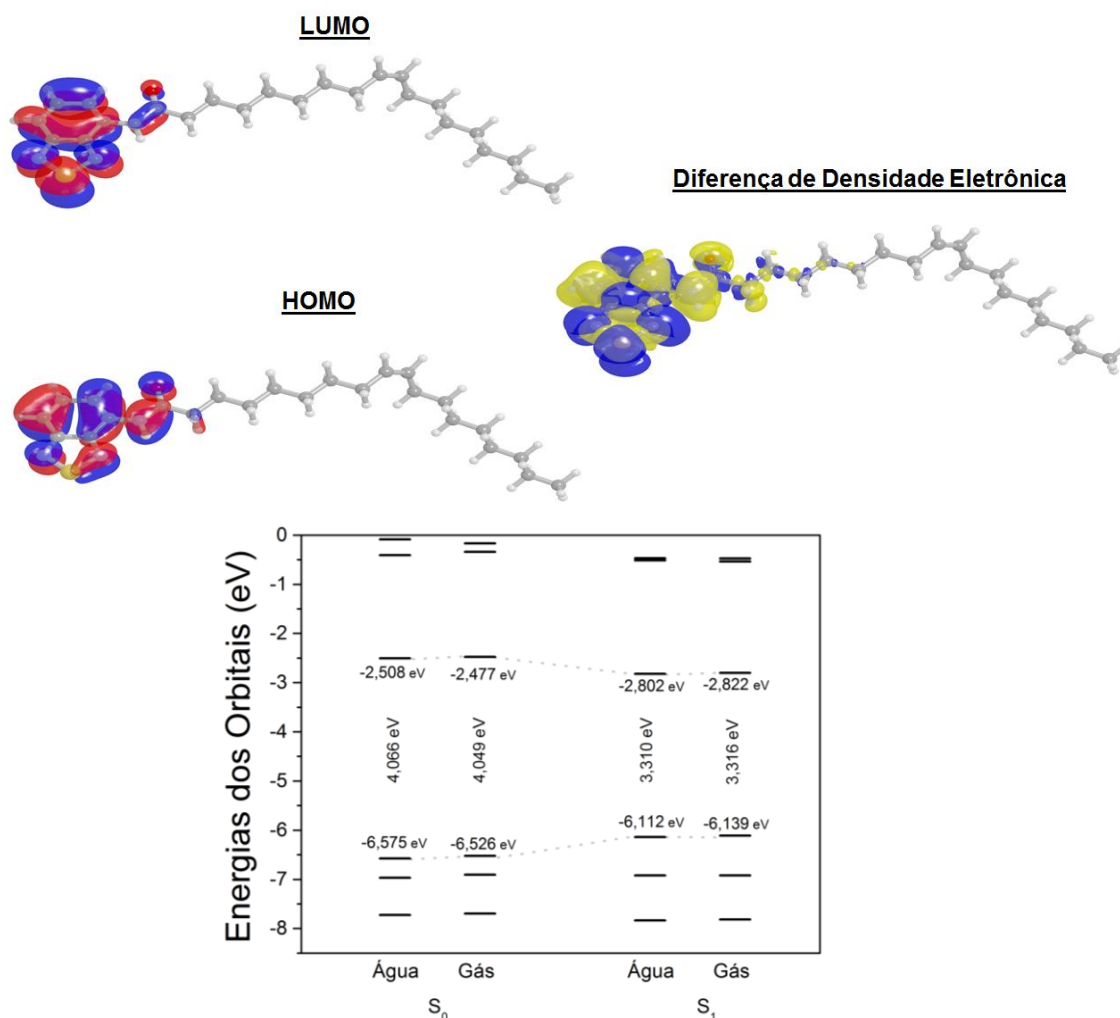


Figura 120. Plots dos orbitais HOMO e LUMO, diferença de densidade eletrônica entre os estados S_0 e S_1 , assim como o diagrama de energias dos orbitais moleculares. Cálculos obtidos no nível PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311G(d,p).

Para a comparação dos espectros UV-Vis de absorção, usaremos a otimização em solução aquosa para comparação com os resultados experimentais.¹⁷⁷ O método de cálculo em solvente usado nas otimizações em água foi o método PCM e o IEFPCM. Métodos contínuos são métodos que consideram modelos com funções de distribuição para descrever certas

características, no caso de solventes, são funções que mimetizam as características dielétricas dos solventes, logo, algumas características de solvatações são subestimadas, nesses métodos. Várias fontes de erros em relação ao espectro experimental devem ser consideradas, tais como, desconsideração de forças intermoleculares entre o solvente e o soluto e entre o soluto e o próprio soluto (esse cálculo teórico é feito apenas para uma molécula, ignorando a possibilidade de dímeros ou trímeros), a concentração efetiva da amostra, possíveis contaminantes, resolução do equipamento, e a extrapolação (convoluções de funções de ajustes) dos picos dos osciladores.

Na Comparação dos Espectros de Absorção Teórico (convolução de gaussianas de um cálculo PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311G(d,p)) com o espectro obtido experimentalmente. pode-se comparar a convolução de funções gaussianas, feitas no software GaussView[®] 5.0, do cálculo em (*single point* excitado em PBE1PBE/6-311+G(2d,p), pré-otimizado no estado fundamental em CAM-B3LYP/6-311G(d,p)) com o resultado experimental do espectro de absorção (10 μ M em um espectrômetro de absorção com uma cubeta de 1,0 cm). Nota-se que as formas dos espectros são bastantes semelhantes, diferindo apenas em valores globais de absortividade molar, o que, de certa, forma auxilia bastante na previsão de máximos de absorbância, o que colabora na preparação experimental.

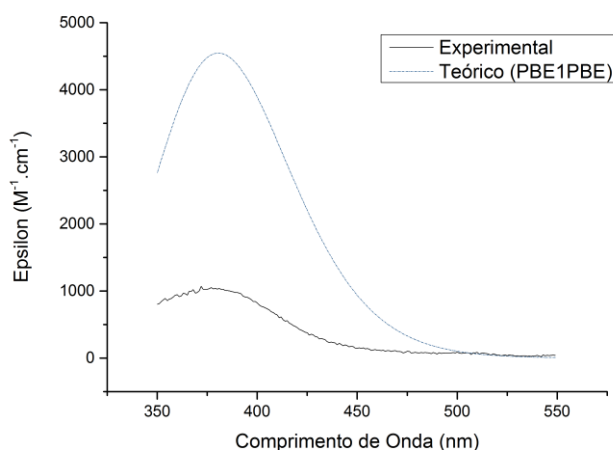


Figura 121. Comparação dos Espectros de Absorção Teórico (convolução de gaussianas de um cálculo PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311G(d,p)) com o espectro obtido experimentalmente.

Conclusão e perspectiva

Neste capítulo foi apresentado um tutorial para um experimento avançado de cálculos teóricos, mostrando como se realizar o estudo fotofísico do composto molecular **BTD-AO**.¹⁷⁷ Foram mostrados todos os passos computacionais necessários para obtenção de resultados teóricos sobre o sistema estudado podendo-se observar como são adquiridas as energias relativas a esta molécula e como são alterados nos cálculos, os parâmetros moleculares tais como a inserção de um solvente no sistema e o estado de excitação molecular. A mudança destes parâmetros é fundamental para a investigação do comportamento e estabilidade de um fluoróforos os quais são amplamente utilizados em Química Biológica e Medicinal.

A realização da metodologia experimental apresentada neste capítulo pode ser estendida para qualquer sistema molecular, sendo apenas tomadas as devidas precauções quanto a escolha de funcionais e funções de base adequados ao sistema.

A construção de superfícies contendo as densidades energéticas das moléculas mostradas em todos os capítulos desta tese ajuda a identificação visual de regiões de alta e baixa densidade eletrônica tornando assim, a interpretação de resultados mais intuitiva e lógica. A compreensão de processos de excitação eletrônica, fundamentais para uma otimização da fluorescência molecular, podem igualmente ser investigados em um nível microscópico, sendo por exemplo, identificadas regiões da molécula onde poderão ocorrer fenômenos de ICT ou ESIPT.¹⁴

Os estudos realizados pelas ferramentas da Química Computacional podem facilitar o desenvolvimento de novas moléculas com aplicação em biologia molecular e celular, uma vez que a síntese deste tipo de estruturas passa a ser realizada de uma maneira mais racional, podendo portanto, serem previstas as características de determinado sistema molecular antes mesmo de este ser sintetizado.

Este capítulo é desta maneira um guia básico para a realização de estudos fotofísicos através de métodos DFT. É importante ressaltar que para a realização deste trabalho é necessário um conhecimento básico acerca da

Química Computacional (características de determinados funcionais, onde estes falham e outros são eficientes, as funções de base mais utilizadas para determinado problema). Este conhecimento permite a otimização correta de parâmetros computacionais e a obtenção de resultados bastante próximos aos resultados experimentais.

Considerações finais, conclusão e perspectivas

Considerações Finais, Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho foram sintetizadas e estudadas novas sondas moleculares fluorescentes derivadas do núcleo BTB. Cada uma das moléculas sintetizadas apresentou propriedades e características únicas, se mostrando valiosas ferramentas para estudos celulares.

A Química computacional foi durante todo o trabalho uma poderosa aliada da Química Orgânica, sendo fundamental para o planejamento destes novos fluoróforos, sendo premeditadas as propriedades fotofísicas das substâncias planejadas. Mesmo após a síntese este ramo da Química apresentou grandes contribuições, ajudando na compreensão dos resultados experimentais obtidos.

A BTBNHBTB foi a primeira sonda contendo dois núcleos BTBs conjugados em sua estrutura molecular. Esta molécula apresentou uma alta estabilidade e aplicabilidade a ensaios biológicos, sendo possível a marcação do citoplasma celular por esta sonda. Além da aplicabilidade biológica esta molécula permitiu um estudo aprofundado de sua estrutura conformacional através da RMN e da Química computacional.

Foram sintetizadas neste trabalho as primeiras sondas lipofílicas fluorescentes derivadas do núcleo BTB. Atualmente existem poucos marcadores celulares que possuem afinidade a lipídios. Ambos os derivados sintetizados apresentaram uma boa estabilidade, e aplicações celulares que permitiram o estudo pormenorizado das vias de captação, estoque, mobilização e redistribuição destas substâncias em meio celular. Estas moléculas foram análogas a seus ácidos graxos de origem, seguindo os mecanismos naturais de captação destes ácidos graxos, abrindo assim uma nova janela de possibilidades para o estudo de dinâmica dos ácidos graxos em células vivas e organismos.

Neste trabalho também foi apresentada a primeira sonda celular fluorescente híbrida contendo o núcleo BTB. Foi escolhida para sua construção a cumarina, um núcleo altamente sensível a variações de ambiente. Esta molécula apresentou uma marcação lipídica em meio celular bastante precisa e além disso deslocamentos de Stokes bastante elevados, emitindo radiações em vermelho durante os experimentos de imageamento.

A última sonda foi planejada e desenvolvida com base no efeito de *quenching* de fluorescência produzido pelo ferroceno. Esta espécie mostrou uma fluorescência extremamente reduzida, sendo sensíveis as espécies reativas de oxigênio presentes no interior celular, ao reagirem com estas espécies o ferroceno é desligado do núcleo BTB, voltando então o efeito de fluorescência deste núcleo. A aplicação biológica desta sonda apresentou melhores resultados que núcleos comerciais já consolidados por estas marcações, mostrando uma sensibilidade às ROS basais existentes em células sob condições normais.

Todos os produtos finais apresentados neste trabalho mostraram resultados surpreendentes para aplicações biológicas, sendo principalmente todos permeáveis a membrana celular e extremamente estáveis

As propriedades fluorescentes destes núcleos foram estudadas através da química computacional e por métodos experimentais, levando a um entendimento profundo do comportamento eletrônico destas moléculas ao ser excitadas.

Por fim este trabalho traz um tutorial de como foram realizados os estudos computacionais com estas moléculas, sendo apresentado um passo a passo para execução dos cálculos das energias envolvidas no processo de excitação eletrônica dos núcleos fluorescentes.

Parte Experimental

Equipamentos e procedimentos gerais

➤ **^1H e ^{13}C RMN:** Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro *Bruker Avance III* de 14,1 T (600 MHz para ^1H e 152,8 MHz para ^{13}C , utilizando um sonda de diâmetro interno de 5 mm (ATB), como solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3) e como referência interna tetrametilsilano (TMS).

Espectrofotômetro de absorção: Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro *CaryWin 50 Varian*.

➤ **Espectrofotômetro de fluorescência:** Os espectros de fluorescência obtidos em um espectrofotômetro *Cary Eclipse Spectrophotometer Varian*. Sendo as medidas realizadas em velocidade média, com a voltagem fonte alta, e *slit* de excitação e emissão com abertura de 5 nm.

➤ **Espectrometria de massas.** Os experimentos de ESI-MS e ESI-MS/MS foram realizados em modo positivo (janela de m/z 50-2000) em um equipamento Waters Synapt HDMS (Manchester, UK). Este instrumento possui um sistema híbrido *quadrupole/ion mobility/orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF)* sendo utilizado no modo W, com células de mobilidades desligadas, operando apenas como guia de íons. Todas as amostras foram diluídas em metanol com 0,1% de ácido fórmico, formando soluções de 50 μM de **BTD-AO**, que foram diretamente injetadas na fonte de ESI com uma taxa de fluxo de 10-20 $\mu\text{L}/\text{min}$. As condições da fonte foram: *capillary voltage* 3,0 kV, *sample cone* 10 a 30 V, *extraction cone* 3 V. As energias do *Trap and Transfer cell collision* foram de 6 e 4 eV respectivamente. Utilizou-se argônio como gás de *CID* na produção dos espectros de íons. O instrumento foi externamente calibrado com oligômeros de ácido fosfórico (H_3PO_4 0,05% v/v em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 50:50) de m/z 90 até 1000.

➤ **Calculos DFT:** O tratamento teórico da dos núcleos fluorescentes foi realizado utilizando a Teoria do Funcional da Densidade com aproximações realizadas pela série de programa Gaussian 09.⁵⁰ As geometrias das moléculas no estado fundamental (S_0) e em seu primeiro estado excitado (S_1) (em fase gasosa e em água) foram estudadas através de uma função de base do tipo *Pople's split-valence* e um funcional de troca e correlação híbrido, sendo utilizado o *Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP)*.⁵¹ As geometrias otimizadas no

estado S_0 e S_1 foram utilizadas para os cálculos de *single point TD-DFT (Time Dependent Density Functional Theory)*⁸⁹, sendo testados quando necessidade diferente funcionais de correlação e troca (wB97XD, PBE1PBE, M062X, CAM-B3LYP e B2PLYP), todos combinados com a função de base 6-311+G(2d,p). Para moléculas que não sofreram varredura com estes funcionais utilizou-se o funcional PBE1PBE associado a função de base 6-311+G(2d,p). Para a inclusão dos efeitos de solvente nos resultados de mecânica quântica foi empregada a aproximação *self-consistent reactions field (SCRf)* com um modelo de polarização contínua (PCM),⁵⁷ onde a molécula do soluto se encontra envolta em uma cavidade embutida de um meio dielétrico.

- **Microscopia confocal de varredura a LASER:** As imagens celulares foram obtidas em microscópio confocal de varredura a LASER Leyca, modelo TCS SP5. (Leica, Microsystems- Wetzlar, Germany)

- **Experimentos de imageamento celular:** Todas as células foram cultivadas em lamelas em placa com 24 poços e mantidas em um meio adequado (DEMEM ou RPMI 1640) (SIGMA, MO- USA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂.

- **Procedimentos de fixação celular:** após o período de cultivo e incubação (células in vivo) os meios foram lavados três vezes com uma solução tampão de fosfato (*phosphate buffer saline*, PBS) a temperatura ambiente e fixadas em formalina 3,7% por 30 minutos também a temperatura ambiente. Posteriormente estas foram novamente lavadas três vezes em PBS e montadas em lâminas de vidro utilizando o reagente ProLong® Gold Antifade (Life Technologies, NY- US)

Ensaio Biológicos

BTD-DHA e BTD-AO.

➤ **Procedimentos de marcação:** As células foram separadas em oito amostras, todas as amostras foram incubadas com 10 μM de **BTD-AO**. Quatro amostras mantidas a 4 °C e quatro a 37 °C foram incubadas por 5, 15, 30 e 60 minutos para amostra (60 min apenas a 37 °C). Não foram realizados procedimentos de marcação nuclear para checagem de alguma afinidade da nova sonda fluorescente pelo núcleo. Além das aquisições das imagens regulares, foram também realizados um empilhamento de aquisição com 50 imagens sendo possível assim, a realização de uma projeção de imageamento celular em 3D e também análises ortogonais, de maneira a localizar a sonda internalizada. A análise ortogonal foi realizada com a amostra incubada por 60 minutos (**BTD-AO**) e 5 minutos (**BTD-DHA**). Todos os ensaios e teste foram realizados em triplicatas. O núcleo foi marcado com iodeto de propídio sendo utilizado métodos padrões. Resumidamente, após a incubação com as sondas as células MCF-7, MDA-MB-231, Caco-2 e HeLa foram equilibradas em um tampão de citrato de sódio 2X (0,3 M NaCl, 0,03 M de citrato de sódio – pH 7, 2X SSC), permeabilizadas em tampão 2X SSC com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase-free DNase e 0,1% Triton-X100 por 20 minutos a 37°C, sendo posteriormente lavadas três vezes (1 minuto cada) em 2X SSC. As amostras foram marcadas com iodeto de propídio (500 nM em 2X SSC) por 7 minutos a temperatura ambiente, lavadas três vezes com 2X SSC e as lâminas foram montadas com ProLong® Gold Antifade (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

➤ **Imageamento In vivo (BTD-DHA):** Foram realizados os procedimentos padrões utilizando-se frascos de plástico contendo o DHA, seu análogo fluorescente a **BTD-DHA**, uma solução de **BTD-DHA** em DMSO, uma solução contendo **BTD-DHA** diluída em meio de cultura, DMSO puro e uma amostra de água utilizada no experimento. Todas as imagens foram realizadas em um espectrômetro IVIS Lumina XR Series III system (Perkinelmer, CA, USA),

^{xvi} Todos os experimentos biológicos foram realizados pelo professor José Raimundo Corrêa e seu grupo de pesquisa no Laboratório de microscopia eletrônica no Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. IB-UnB.

Utilizando uma fonte de excitação ajustada para 575 nm. Para a análise in vivo um camundongo BALB/c com idade de 5 semanas foi anestesiado com ketamina e xylazina através de aplicação intraperitoneal e sua região intraperitoneal lavada 100 mL de uma **BTD-DHA** diluídos em meio de cultura DMEM foram injetados na cauda do animal. Seguido a aplicação, o camundongo foi imediatamente levado ao tomógrafo para análises de fluorescência. As imagens foram adquiridas com as mesmas condições descritas no procedimento de padronização exatamente 30 minutos após a injeção. Durante todo o experimento o animal foi mantido sedado em isoflurano. O Comitê Institucional de ética em pesquisa animal aprovou o conjunto de experiências realizadas com sondas fluorescentes em modelo animal

➤ **Análise da secreção de citocina (BTD-DHA):** monócitos humanos THP-1 foram estimulados com uma concentração de 50 mM do ácido graxo DHA (Sigma-Aldrich, MO, USA) e com a sonda fluorescente **BTD-DHA** a 37 °C. Após 24 horas o sobrenadante foi coletado e os níveis de IL-10 e TNF- α analisados pelo método ELISA segundo as recomendações do fabricante. (ELISA kit, Becton Dickinson).

➤ **Ensaio de viabilidade celular (BTD-AO):**^{xvii} Células de Caco-2, MCF-7, MDA-MB-231, HeLa ou HUVEC (3×10^3 /poço) foram plaqueadas em uma placa de 96 poços. Após a adesão a células foram lavadas duas vezes com PBS pré aquecido (37 °C) e incubadas no tampão por 10 minutos a 37°C. As amostras foram incubadas com 1mM de **BTD-AO** (diluídas em DMEM para Caco-2 e HeLa, RPMI para MCF-7 e HUVEC ou L15 para MDA-MB-231) em meio de cultura enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 25 μ g/ml de gentamicina por uma hora a 37°C. A citotoxicidade foi determinada utilizando o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilterazolio, conhecido como MTT (Molecular Probes – Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As leituras de absorbância foram realizadas através de um espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices-Sunnyvale, California, USA). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prims 5 e o teste de significância foi determinado por ANOVA com posterior

^{xvii} Todos os experimentos biológicos foram realizados pelo professor José Raimundo Corrêa e seu grupo de pesquisa no Laboratório de microscopia eletrônica no Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. IB-UnB.

comparação também com o teste de Bonferroni. Valores A P <0,05 foram considerados estatisticamente significantes (*P < 0,05, ** P < 0,01 e ***P < 0,001).

BTDNHBTD

➤ **Procedimentos de marcação:** Esta sonda foi aplicada em células vivas e fixadas. Após a lavagem as células de câncer de mama MCF-7 foram incubadas com 200 mM de **BTDNHBTD** em meio de cultura durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para as células fixadas realizou-se sua incubação em agentes fixantes antes do procedimento de marcação descrito acima.. O núcleo celular foi marcado com DAPI (Sigma-Aldrich, MO, USA). De acordo com os procedimentos do fabricante

BTD-LIP

➤ **Procedimentos de marcação^{xviii}** Após cultivo e lavagem as células foram separadas em três grupos (1) Células vivas e fixadas incubadas com a **BTD-LIP** (2) Células fixadas incubadas com o marcador comercial de lipídios BODIPY e (3) células incubadas com ambas as sondas. As células vivas foram incubadas com a **BTD-LIP** a 37° por 30 minutos sendo seguidos os procedimentos de lavagem e montagem de lâmina. Os procedimentos e fixação foram padrões, já descritos acima. Para controle negativo, foram realizados os mesmos processos descritos acima porém com DMSO por 30 minutos.

BTD-ROS

➤ **Procedimentos de marcação:** Após cultivo e lavagem as células de RAW 264,7 foram tratadas com 100 µM de Menadiona (M5625, Sigma-Aldrich,

^{xviii} Todos os experimentos biológicos foram realizados pelo professor José Raimundo Corrêa e seu grupo de pesquisa no Laboratório de microscopia eletrônica no Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. IB-UnB.

MO, USA) por 1 hora, sendo realizada 1 lavagem com PBS e incubadas durante 30 minutos com a **BTD-ROS** a 37 °C. Sendo seguidos posteriormente os procedimentos de lavagem e montagem de lâmina. Para validação e controle, outro grupo celular foi pré incubado com 20 µM de diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (uma sonda comercial sensível a ROS) por 45 minutos a 37°C em seguida tratada com 100 µM de Menadiona (M5625, Sigma-Aldrich, MO, USA por 1 hora. Células sem estímulo com Menadiona foram utilizadas como controle negativo de ROS, sendo seguidos os mesmos procedimentos descritos

Síntese dos compostos

BTD-AO: 0,07 mol de cloreto de tionila (5 mL) foram adicionados a 1,45 mmol (410mg) do ácido oleico recém destilado sob atmosfera inerte. A amostra foi aquecida a 80 °C pelo período de 1 h. Retirou-se o cloreto de tionila em excesso por destilação, sendo então adicionado 1,45 mmol (219 mg) de 4-amino-2,1,3-benzotiazol. A mistura foi aquecida a 130 °C e após o período de 30 min o aquecimento foi interrompido e a mistura resfriada a temperatura ambiente. Adicionou-se a esta mistura 25 ml de éter sulfúrico, a solução resultante foi filtrada, evaporada e a a mistura reacional purificada em coluna cromatográfica com 20% de acetato de etila em hexano. O composto foi obtido com um rendimento de 61%. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8,50 (dd, *J* = 7,3 Hz e 0,9 Hz, 1H); 8,46 (sinal largo, 1H); 7,67 (dd, *J* = 8,5 e 1,2 Hz, 1H); 7,62-7,55 (m, 1H); 5,34 (m, 2H); 2,53 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 2,01 (m, 4H); 1,80 (qui, *J* = 7,4 Hz, 2H); 1,36 (m, 20H), 0,87 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H). **¹³C RMN (APT)** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 171,8; 154,7; 147,7; 131,1; 130,0; 129,9; 129,7; 115,6; 114,8; 89,8; 37,9; 31,8; 29,7; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 29,1(9); 29,1(0); 27,2; 27,1; 25,5; 22,6; 14,1.



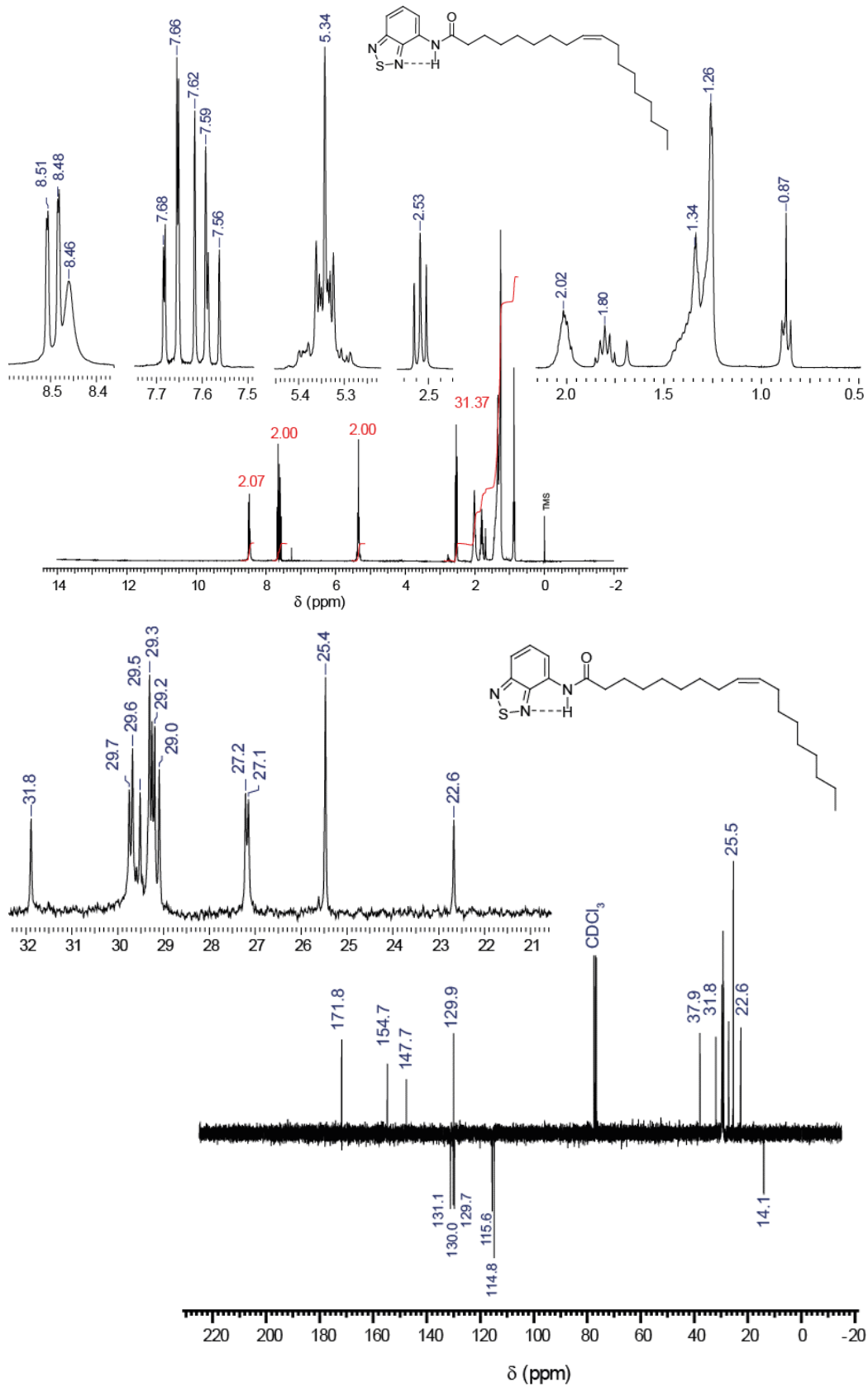


Figura 122. ¹H RMN e ¹³C RMN APT (CDCl₃, 300MHz) da sonda fluorescente BTD-AO.

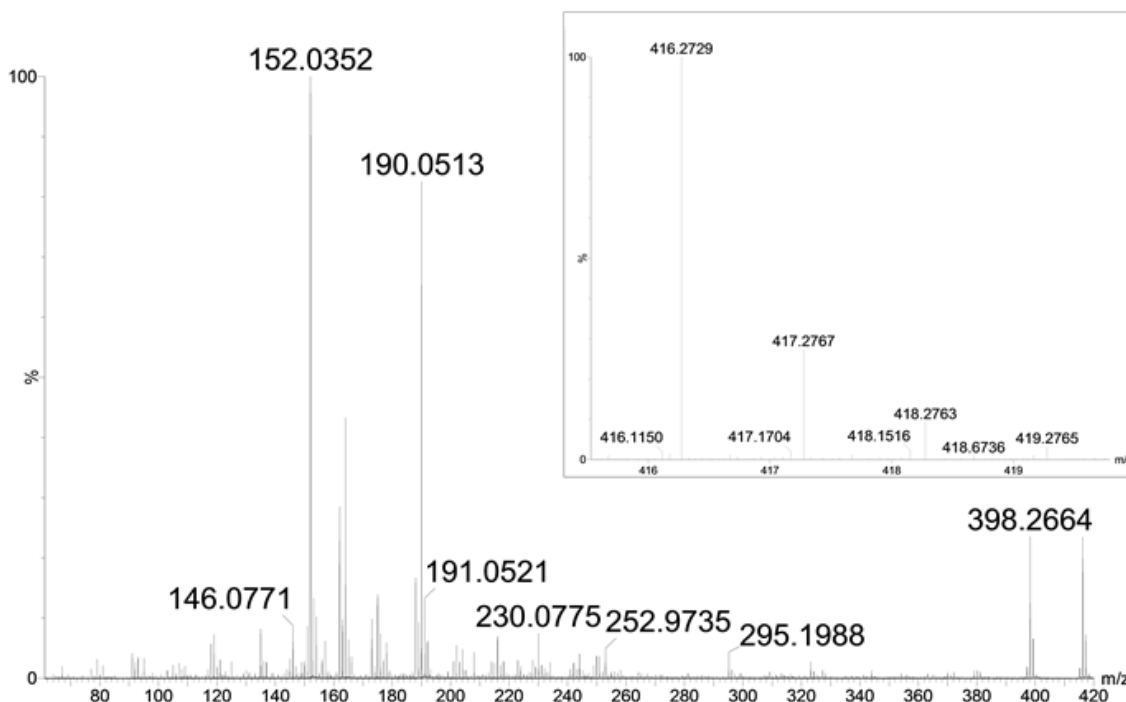


Figura 123. ESI(+)-MS da molécula BTD-AO. Inserido o espectro de ESI(+)-MS/MS em alta resolução com seleção mono-isotopológica do composto BTD-AO protonado. Massa exata calculada para o composto $[C_{24}H_{37}N_3OS+H]^+$ 416,2730 Da. Massa encontrada de 416,2729 Da (erro: -0,24 ppm)

➤ **BTD-DHA:** 0,07 mol de cloreto de tionila (5 mL) foram adicionados a 1,30 mmol (427mg) do ácido oleico recém destilado sob atmosfera inerte. A amostra foi aquecida a 80 °C pelo período de 1 h. Retirou-se o cloreto de tionila em excesso por destilação, sendo então adicionado 1,37 mmol (220 mg) de 4-amino-2,1,3-benzotiazol. A mistura foi aquecida a 100 °C e após o período de 30 min foi adicionado 3 mL de trietilamina a mistura, sendo a temperatura baixada para 90 °C e a reação sendo mantida por mais 1 hora. O aquecimento é então interrompido e a mistura resfriada a temperatura ambiente. Adicionou-se a esta mistura 25 ml de éter sulfúrico, a solução resultante foi filtrada, evaporada e a mistura reacional purificada em coluna cromatográfica com 5% de acetato de etila em hexano. O composto foi obtido com um rendimento de 61%. **¹H RMN** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8,50 (sinal largo, 1H), 8,49 (d, 5,6 Hz 1H), 7,67 (dd, 8,8, 0,7 Hz, 1H), 7,59 (dd, 8,8, 7,3 Hz, 1H), 5,52-5,46 (m, 2H), 5,42-5,27 (m, 10H), 2,92- 2,78 (m, 10 H) 2,63-2,55 (m, 4 H) 2,10-2,04 (m, 2 H), 0,97 (t, 7,70 Hz, 3H); **¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃)** δ 171,1; 154,7; 147,6; 132,0; 131,1; 130,0; 129,8

128,5; 128,3; 128,2; 128,0; 127,9; 127,8; 127,6; 126,9; 115,6; 114,9; 37,58; 25,6;
25,6; 25,6; 25,5; 23,1; 20,52; 14,25;

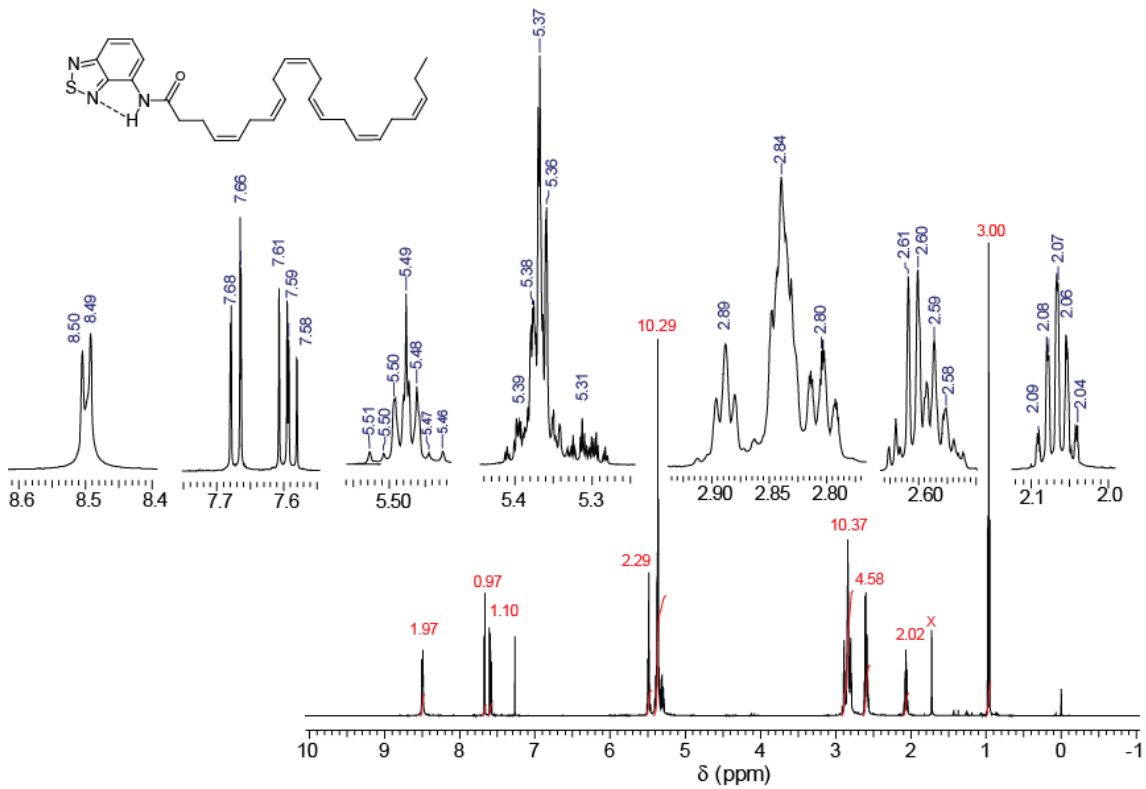


Figura 124. ^1H RMN (CDCl_3 , 600MHz) do composto BT-DHA

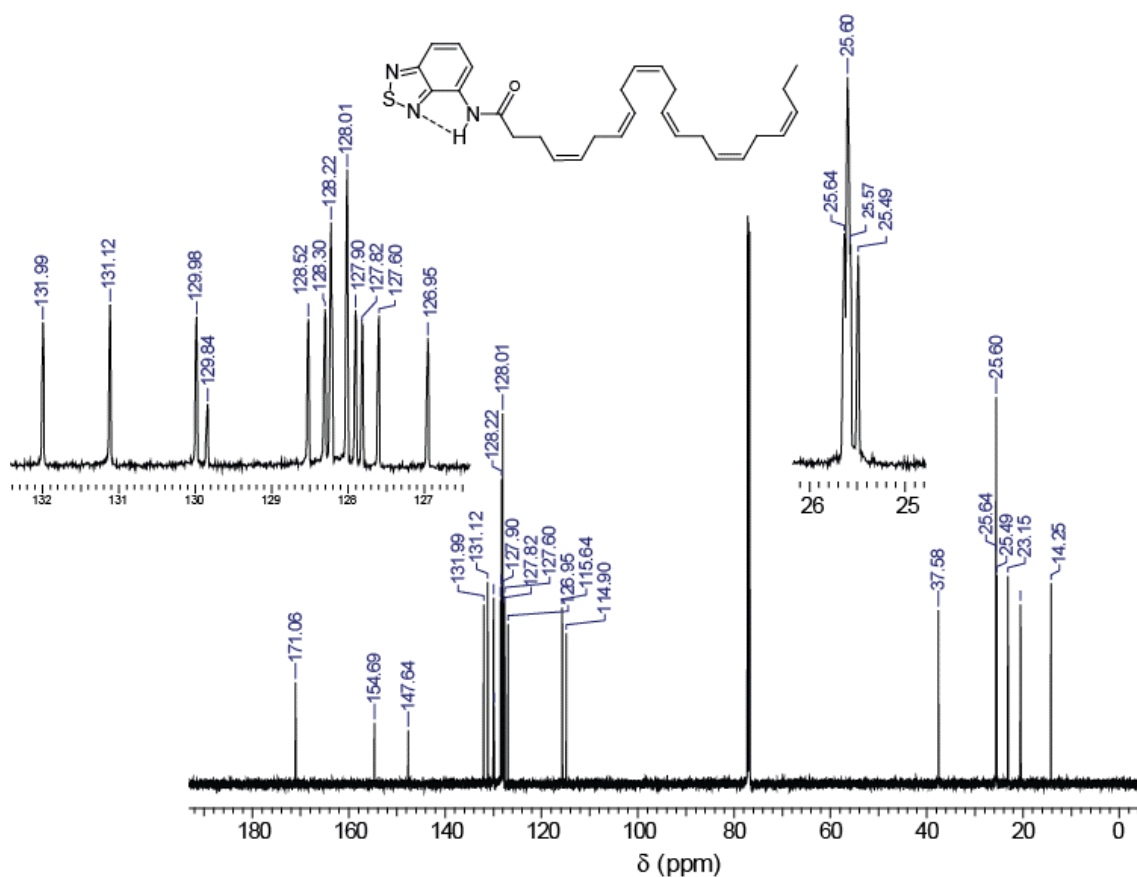


Figura 125. ^{13}C RMN (CDCl_3 , 150MHz) do composto BTD-DHA

➤ **BTDNHBTD:** Misturou-se 290 mg (1,00 mmol) de BTD-Br com 180 mg (1,0 mmol) de 7-amino-4-metilcumarina, 5 mol% de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,05 mmol, ca. 11,5 mg), 10 mol% de PPh_3 (0,1 mmol ca. 23 mg) e 200 mmol% de t-BuOK (2,0 mmol ca.56 mg) em um schlenck, sendo utilizado como solvente aproximadamente 4 ml de tolueno seco. A mistura foi mantida sob agitação a 100°C por 72 horas, sendo posteriormente purificada em uma coluna cromatográfica de hexano/acetato 2:1. O produto desejado foi obtido com um rendimento de 40%. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8,69 (sinal largo, 1H); 8,63 (sinal largo, 1H); 7,80 (d, $J = 8,0\text{Hz}$, 1H), 7,65- 7,45 (m, 7H), 7,43 (d $J = 7,7$ Hz, 1H) ^{13}C RMN (APT) (75 MHz, CDCl_3) 155,5; 155,5; 153,5; 148,86; 148,80; 148,49; 133,55; 133,23; 133,20; 133,06; 130,91; 130,77; 108,87; 108,85; 113,71; 113,14; 108,85; 108,29; 103,37. Fusão: 152°C

BTD-LIP: 1º etapa- BTDOMeBr: Foram misturados em 0,3 mmol (100mg) de 4,7-dibromo-BTD a 1,0 mmol (150 mg) do ácido 4-metoxifenil borônico, 5 mol% de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,01 mmol, ca. 4 mg), 10mol% de PPh_3 (0,02 mmol, ca. 8 mg), 103

mg de Na₂CO₃ de uma solução 2 M em água e 5 ml de tolueno. Esta mistura foi aquecida a 100 °C e mantida sob agitação em atmosfera inerte por 12 horas. A mistura é separada cromatografia em 3:1 Hexano-acetato, com 60% de rendimento. **2º etapa- BTD-LIP-** Misturou-se 160 mg (0,5 mmol) da BTDOMeBr com 88 mg (0,5 mmol) de 7-amino-4-metilcumarina, 5 mmol% de Pd(OAc)₂ (0,025 mmol, ca. 5,75 mg), 100 mmol% de PPh₃ (0,5 mmol ca. 13,1 mg) e 200 mmol% de t-BuOK (1,0 mmol ca.28,05 mg) em um schlenck, sendo utilizado como solvente aproximadamente 5 ml de tolueno seco. A mistura foi mantida sob agitação a 100°C por 72 horas, sendo posteriormente purificada em uma colina cromatográfica de hexano/acetato 3:1. O produto desejado foi obtido com um rendimento de 30%. **¹H RMN** (600 MHz, CDCl₃) 7,89 (d, 9,17 Hz, 2H), 7,64 (d, 7,70 Hz, 1H) 7,57 (d, 8,80 Hz, 1H), 7,49 (d, 7,70 Hz, 1H) 7,45 (sinal largo, 1H) 7,36 (d, 2,20 Hz, 1H) 7,18 (dd, 9,17; 2,36 Hz, 1H) 7,08 (d, 8,80 Hz, 2H) 6,17 (s, 1H) 3,89 (s, 3H), 2,44 (s, 3H); **¹³C RMN** (150 MHz, CDCl₃) δ 174,0; 161,2; 159,4; 155,3; 154,0; 152,3; 149,1; 144,6; 132,1; 129,9; 128,3; 126,3; 125,8; 114,8; 114,2; 112,2; 109,3; 104,4; 55,4; 18,6; **Ponto de Fusão 182 °C**

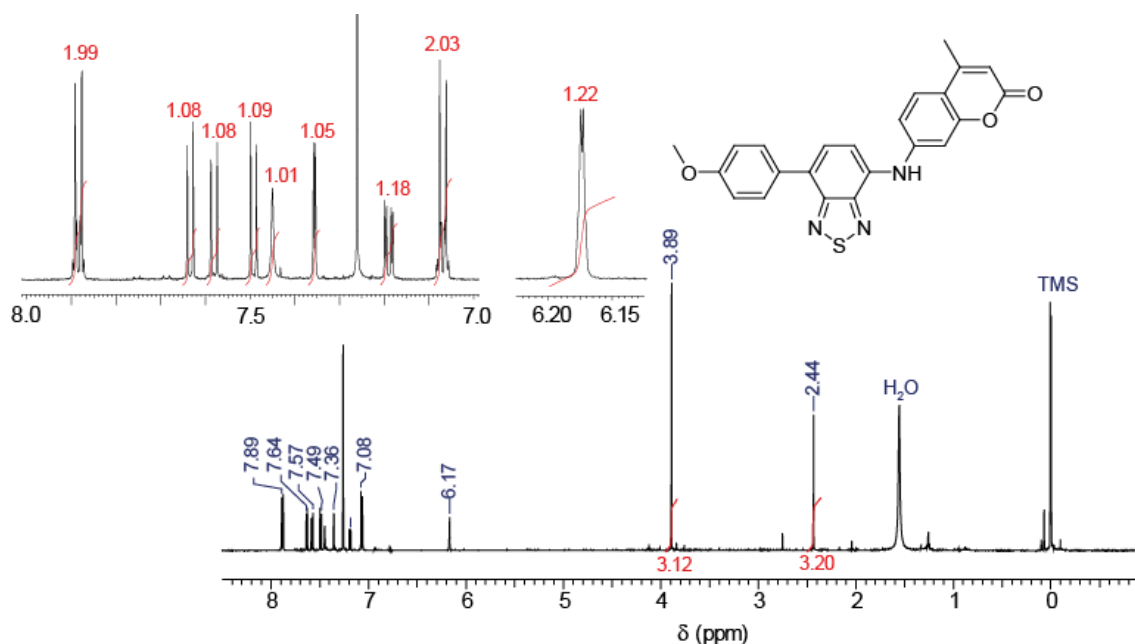


Figura 126. ¹H RMN (CDCl₃, 600MHz) do composto BTD-LIP

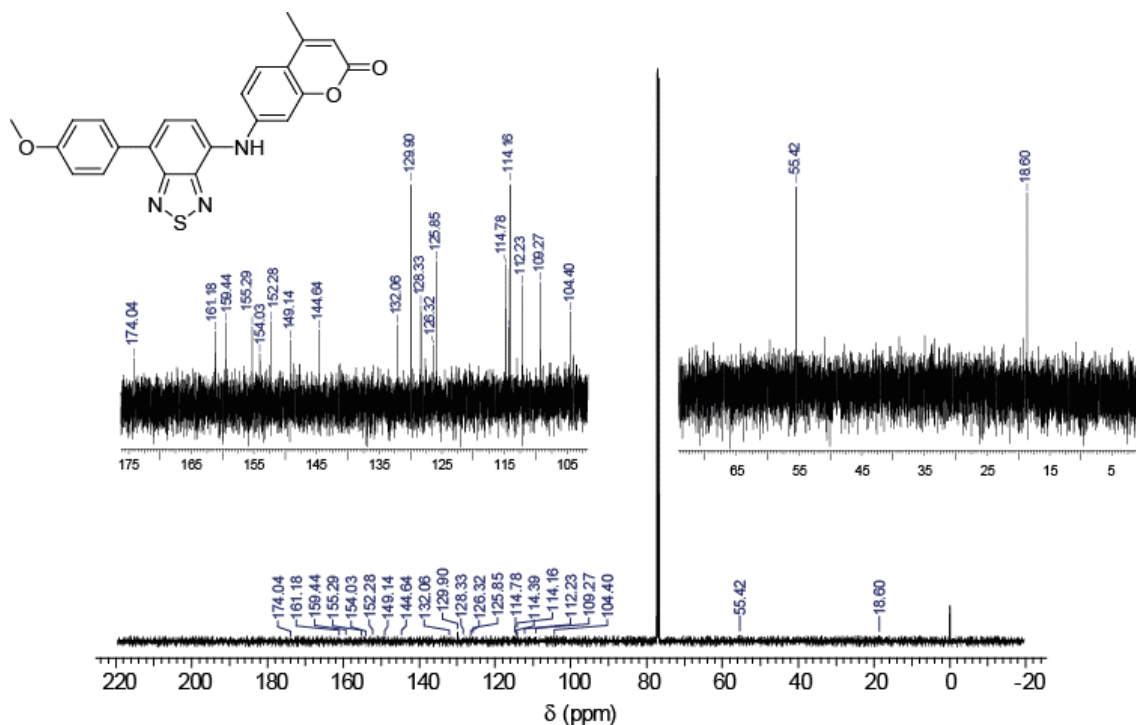


Figura 127. ^{13}C RMN (CDCl_3 , 150MHz) do composto **BTD-LIP**

BTD-ROS: 1 Etapa: Fe-BTD-Br - Misturou-se 411 mg (1,5 mmol) da **BTDBrBr** com 210 mg (1,0 mmol) de etinilferroceno, 2 mmol% de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0,02 mmol, ca. 14mg), 4 mmol% de PPh_3 (0,04 mmol ca. 11,1 mg) e 2 mmol% de CuI (0,02 mmol ca.4,15g) em um schlenck, sendo utilizado como solvente 4 ml de uma solução de Et_3N -THF 1:1 seco. A mistura foi mantida sob agitação a 80°C por 6 horas sob atmosfera inerte, sendo posteriormente purificada em uma colina cromatográfica de hexano/diclorometano 1:3 com rendimento de 50% **2ª Etapa: BTD-ROS**: Misturou-se 210 mg (0,5 mmol) da **BTDFeBr** com 86,9 mg (0,5 mmol) de 7-amino-4-metilcumarina, 5 mmol% de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,025 mmol, ca. 5,75 mg), 100 mmol% de PPh_3 (0,5 mmol ca. 13,1 mg) e 200 mmol% de $t\text{-BuOK}$ (1,0 mmol ca.28,05 mg) em um schlenck, sendo utilizado como solvente aproximadamente 4 ml de tolueno seco. A mistura foi mantida sob agitação a 100°C por 72 horas, sendo posteriormente purificada em uma colina cromatográfica de hexano/acetato 2:1. O produto desejado foi obtido com um rendimento de 32%. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,71 (d, $J = 7,70$ Hz, 1H, BTD); 7,59 (d, $J = 8,80$ Hz, 1H, Ar-Cumarina); 7,53 (*banda larga*, 1H, NH); 7,36 (d, $J = 7,70$ Hz, 1H); 7,34 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H); 7,19(dd, $J = 8,4$ e $2,6$ Hz, 1H); 6,19 (d, $J = 1,1$ Hz, 1H);

4,62 (t, $J = 1,8$ Hz, 2H); 4,31 (s, *banda larga*, 5H); 4,29 (t, $J = 1,8$ Hz, 2H); 2,44 (d, $J = 1,1$ Hz, 3H, CH₃); ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 161,01; 155,19; 155,18 (BTD); 152,18; 148,07; 143,87; 133,97; 133,32; 125,88; 115,22; 114,87; 112,59; 109,08; 107,95; 105,20; 93,32; 81,57; 71,71; 70,13; 69,04; 64,95; 18,58 Degradação. .220°C Anal. Calcd para C₂₈H₁₉FeN₃O₂S C, 65.00; H, 3.70; N, 7.68. Encontrada C, 65.09; H, 3.78; N, 7.79.

Docking molecular

Todas as imagens obtidas a partir dos dados cristalográficos e cálculos de docking molecular foram geradas pelo grupo de pesquisa BIOMAT, da Prof. Dr. Thereza Amelia Soares da Silva (dQF-UFPE), o procedimento experimental apresentado neste trabalho tem como finalidade, portanto, como foram realizados estes cálculos, não ficando desta maneira esta parte em falta no trabalho.

A estrutura cristalina da albumina (PDB ID 1BJ5)⁵⁰ e a estrutura por RMN da FAPB (*fatty acid protein bound*, PDB ID 2FLJ)⁵⁶ foram utilizadas como coordenadas iniciais para os cálculos iniciais de docking molecular da nova sonda fluorescente **BTD-AO**. Cinco moléculas do ácido mirístico ligadas à albumina foram removidas antes dos cálculos serem realizados, da mesma maneira a molécula de ácido oleico ligada a FABP também foi removida. Durante a busca conformacional, os ligantes foram totalmente flexíveis a respeito de seus graus de translações, orientações e conformações no que diz respeito a estrutura da proteína, que foi mantida rígida. Cada conformação foi avaliada e ranqueada de acordo com uma função empírica de energia. Os *grid maps* com 126 X 126 X 126 pontos de dimensão foram calculados utilizando o programa AutoGrid4.¹⁸⁶ O ajuste grosso (espaço de *grid-point* de 0,25 Å) e fino (espaço de *grid-point* de 0,14 Å) destes *grid maps* foram utilizados durante as simulações de *docking* afim de se provar a estrutura de toda proteína e garantir estimativas precisas das energias de interação *host-guest*. Os sítios de protonação foram atribuídos de acordo com o pH 7. Os valores das cargas parciais dos átomos das proteínas foram retirados do campo de força AMBER *all atoms force field*.¹⁸⁷ O algoritmo

Todas as imagens obtidas a partir dos dados cristalográficos e cálculos de docking molecular foram geradas pelo grupo de pesquisa BIOMAT, da Prof. Dr. Thereza Amelia Soares da Silva (dQF-UFPE),

genético de Lamarckian foi implementado com o programa AutoDock4⁵⁷ sendo utilizado os seguintes parâmetros: uma população inicial de 100 indivíduos, um número máximo de $1,5 \times 10^6$ estimativas de energias, um número máximo de 27000 gerações com taxas de mutação e cruzamento 0,02 e 0,08 respectivamente. Um parâmetro opcional de elitismo igual a 1 foi também aplicado, o qual determina o número de melhores indivíduos que irão sobreviver a próxima geração. Uma busca de no máximo de 300 interações por local foi permitida. A probabilidade de se realizar uma pesquisa local sobre um indivíduo foi 0,06 enquanto o número máximo de sucessos consecutivos ou falhas antes de se dobrar ou reduzir pela metade o número de passos foi 4. As conformações do ligante apresentando as ligações mais energeticamente favoráveis foram selecionadas em cada passo da simulação, de tal forma que, no final do cálculo, as coordenadas atômicas dos 200 conformeros que melhor se ajustaram ao sítio de ligação foram selecionadas. Estes conformeros foram estruturalmente comparados através de seus RMSDs (*root-mean-square deviation*), e agrupados em grupos de conformações similares. Uma tolerância de 2Å para o RMSD foi utilizada para agrupar os conformeros em um mesmo grupo

Referências Bibliográficas

- (1) Diaspro, A. *Optical Fluorescent Microscopy*; Springs: Genova, 2011.
- (2) Hibbs, A. R. *Confocal Microscopy for Biologists*; Springer: Melbourne, 2004.
- (3) Neto, B. A. D.; Correa, J. R.; Silva, R. G. *RSC Advances* 2013, 3, 5291.
- (4) Boldyrev, I. A.; Zhai, X.; Momsen, M. M.; Brockman, H. L.; Brown, R. E.; Molotkovsky, J. G. *Journal of Lipid Research* 2007, 48, 1518.
- (5) Johnson, I. *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition*; Life Technologies Corporation, 2010.
- (6) Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chemical Biology* 2008, 3, 142.
- (7) DiDonato, D.; Brasaemle, D. L. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2003, 51, 773.
- (8) Melo, R. C. N.; D'Avila, H.; Wan, H.-C.; Bozza, P. T.; Dvorak, A. M.; Weller, P. F. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2011, 59, 540.
- (9) Dutta-Roy, A. K. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2000, 57, 1360.
- (10) Nakamura, M. T.; Yudell, B. E.; Loor, J. J. *Progress in Lipid Research* 2014, 53, 124.
- (11) Tan, M. C.; Matsuoka, S.; Ano, H.; Ishida, H.; Hirose, M.; Sato, F.; Sugiyama, S.; Murata, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2014, 22, 1804.
- (12) Nadler, A.; Schultz, C. *Angewandte Chemie International Edition* 2013, 52, 2408.
- (13) Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *Chem. Rev.* 2010, 110, 2620.
- (14) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Gatto, C. C.; Ramos, L. M.; Vasconcelos, N. M. d.; Correa, J. R.; Costa, M. B.; de Oliveira, H. C. B.; Silva, R. G. *RSC Advances* 2012, 2, 1524.
- (15) D. Neto, B. A.; Corrêa, J. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; Oliveira, H. C. B. d.; Fasciotti, M.; Eberlin, M. N.; Silva Jr., E. N. d. *J. Braz. Chem. Soc.* 2012, 23, 770.

- (16) Oliveira, F. F. D.; Santos, D. C. B. D.; Lapis, A. A. M.; Corrêa, J. R.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; Moreira Jr, P. F.; de Oliveira, V. C.; Quina, F. H.; Neto, B. A. D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010, 20, 6001.
- (17) Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; De Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Neto, B. A. D. *Chemistry – A European Journal* 2014, 20, 15360.
- (18) Laurent, A. D.; Houari, Y.; Carvalho, P. H. P. R.; Neto, B. A. D.; Jacquemin, D. *RSC Advances* 2014, 4, 14189.
- (19) Neto, B. A. D. S., Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- (20) Kim, D. Y.; Lee, S. K.; Kim, J. L.; Kim, J. K.; Lee, H.; Cho, H. N.; Hong, S. I.; Kim, C. Y. *Synthetic Metals* 2001, 121, 1707.
- (21) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; da Silva Júnior, E. N.; Dupont, J. *European Journal of Organic Chemistry* 2013, 2013, 228.
- (22) Zou, Q.; Tian, H. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2010, 149, 20.
- (23) Häussler, M.; King, S. P.; Eng, M. P.; Haque, S. A.; Bilic, A.; Watkins, S. E.; Wilson, G. J.; Chen, M.; Scully, A. D. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2011, 220, 102.
- (24) Pu, K.-Y.; Liu, B. *The Journal of Physical Chemistry B* 2010, 114, 3077.
- (25) Pilgram, K.; Zupan, M.; Skiles, R. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 1970, 7, 629.
- (26) da Cruz, E. H. G.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Silva, D. A. C.; Diogo, E. B. T.; de Souza Filho, J. D.; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; de Oliveira, H. C. B.; Guido, B. C.; da Silva Filho, D. A.; Neto, B. A. D.; da Silva Junior, E. N. *New J. Chem.* 2014, 38, 2569.
- (27) Mikroyannidis, J. A.; Stylianakis, M. M.; Suresh, P.; Balraju, P.; Sharma, G. D. *Organic Electronics* 2009, 10, 1320.
- (28) Akhtaruzzaman, M.; Kamata, N.; Nishida, J.-i.; Ando, S.; Tada, H.; Tomura, M.; Yamashita, Y. *Chem. Commun.* 2005, 3183.
- (29) Moro, A. V.; Ferreira, P. C.; Migowski, P.; Rodembusch, F. S.; Dupont, J.; Lüdtke, D. S. *Tetrahedron* 2013, 69, 201.
- (30) Lopes, T. O.; da Silva Filho, D. A.; Lapis, A. A. M.; de Oliveira, H. C. B.; Neto, B. A. D. *J. Phys. Org. Chem.* 2014, 27, 303.
- (31) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; Mancilha, F. S.; Vasconcelos, I. B.; Thum, C.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Dupont, J. *Organic Letters* 2007, 9, 4001.

- (32) Chi, C.; Mikhailovsky, A.; Bazan, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129*, 11134.
- (33) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; Mancilha, F. S.; Batista Jr, E. L.; Netz, P. A.; Rominger, F.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Dupont, J. *Molecular BioSystems* 2010, *6*, 967.
- (34) Silva, M. N. d.; Ferreira, V. F.; Souza, M. C. B. V. d. *Química Nova* 2003, *26*, 407.
- (35) Freitas, L. C. G. *Química Nova na escola* 1998, *3*.
- (36) Sun, W.; Li, S.; Hu, R.; Qian, Y.; Wang, S.; Yang, G. *The Journal of Physical Chemistry A* 2009, *113*, 5888.
- (37) Mota, A. A. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Guido, B. C.; de Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Correa, J. R.; Neto, B. A. D. *Chemical Science* 2014, *5*, 3995.
- (38) Chen, J.; Liu, W.; Zhou, B.; Niu, G.; Zhang, H.; Wu, J.; Wang, Y.; Ju, W.; Wang, P. *The Journal of Organic Chemistry* 2013, *78*, 6121.
- (39) Bochkov, A. Y.; Akchurin, I. O.; Dyachenko, O. A.; Traven, V. F. *Chem. Commun.* 2013, *49*, 11653.
- (40) Takakusa, H.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. *Chemistry – A European Journal* 2003, *9*, 1479.
- (41) Long, L.; Lin, W.; Chen, B.; Gao, W.; Yuan, L. *Chem. Commun.* 2011, *47*, 893.
- (42) Pullela, P. K.; Chiku, T.; Carvan Iii, M. J.; Sem, D. S. *Analytical Biochemistry* 2006, *352*, 265.
- (43) Mirloup, A.; Leclerc, N.; Rihn, S.; Bura, T.; Bechara, R.; Hebraud, A.; Leveque, P.; Heiser, T.; Ziessel, R. *New J. Chem.* 2014, *38*, 3644.
- (44) Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chemical Biology* 2014, *9*, 855.
- (45) Liu, X.; Xu, Z.; Cole, J. M. *The Journal of Physical Chemistry C* 2013, *117*, 16584.
- (46) Sakurai, H.; Ritonga, M. T. S.; Shibatani, H.; Hirao, T. *The Journal of Organic Chemistry* 2005, *70*, 2754.
- (47) Steiner, T. *Angewandte Chemie International Edition* 2002, *41*, 48.
- (48) Akhtaruzzaman, M.; Tomura, M.; Nishida, J.-i.; Yamashita, Y. *The Journal of Organic Chemistry* 2004, *69*, 2953.
- (49) Pretsch, E.; Bühlmann, P. *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*, Springer, Germany, 2009.

- (50) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, M. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09, Revision D.01*; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2009.
- (51) Yanai, T.; Tew, D. P.; Handy, N. C. *Chem. Phys. Lett.* 2004, 393, 51.
- (52) Kohn, W.; Sham, L. J. *Physical Review* 1965, 140, A1133.
- (53) Runge, E.; Gross, E. K. U. *Physical Review Letters* 1984, 52, 997.
- (54) Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Physical Review Letters* 1996, 77, 3865.
- (55) Adamo, C.; Barone, V. *The Journal of Chemical Physics* 1999, 110, 6158.
- (56) Fonseca, T. L.; de Oliveira, H. C. B.; Castro, M. A. *Chem. Phys. Lett.* 2008, 457, 119.
- (57) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* 2005, 105, 2999.
- (58) Mahmood, K.; Hussain, M.; Aminuddin, M. *J. Chem. Soc. Pak.* 2001, 23, 205.
- (59) Paul, B. K.; Samanta, A.; Guchhait, N. *Journal of Fluorescence* 2011, 21, 1265.
- (60) Mataga, N.; Torihashi, Y.; Ezumi, K. *Theoretica chimica acta* 1964, 2, 158.
- (61) Reichardt, C. *Chemical Reviews* 1994, 94, 2319.
- (62) Kus, M. M. M., Universidade de São Paulo, 2009.
- (63) Gómez, M. E. d. L. D. B., Universidade de São Paulo, 2003.
- (64) Curi, R.; Pompéia, C.; Miya-Saka, C. K.; Procopio, J. *Entendendo a gordura: os ácidos graxos*; Manole: Barueri, 2002.
- (65) Schacker, R. L., Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

- (66) Wahrburg, U. *Eur J Nutr* 2004, 43, i6.
- (67) Calder, P. C. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75, 197.
- (68) Garg, A. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1998, 67, 577S.
- (69) Burr, G. O.; Burr, M. M. *Journal of Biological Chemistry* 1929, 82, 345.
- (70) Burr, G. O.; Burr, M. M. *Journal of Biological Chemistry* 1930, 86, 587.
- (71) Moreira, N. X.; Curi, R.; Filho, J. M. *J. Brazilian Soc. Food Nutr.* 2002, 24, 105.
- (72) Woutersen, R. A.; Appel, M. J.; van Garderen-Hoetmer, A.; Wijnands, M. V. W. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 1999, 443, 111.
- (73) Schenkel, L.; Bakovic, M. *Lipids* 2014, 49, 731.
- (74) Schmitz, G.; Grandl, M. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2009, 29, 1718.
- (75) Goldstein, J. L.; Brown, M. S.; Anderson, R. G. W.; Russell, D. W.; Schneider, W. J. *Annual Review of Cell Biology* 1985, 1, 1.
- (76) Doherty, G. J.; McMahon, H. T. *Annual Review of Biochemistry* 2009, 78, 857.
- (77) Tomoda, H.; Kishimoto, Y.; Lee, Y. C. *Journal of Biological Chemistry* 1989, 264, 15445.
- (78) Iwasa, A.; Akita, H.; Khalil, I.; Kogure, K.; Futaki, S.; Harashima, H. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2006, 1758, 713.
- (79) Levine, Michael N.; Hoang, Trish T.; Raines, Ronald T. *Chemistry & Biology*, 20, 614.
- (80) Garcia, L.; Lazzaretti, M.; Diguët, A.; Mussi, F.; Bisceglie, F.; Xie, J.; Pelosi, G.; Buschini, A.; Baigl, D.; Policar, C. *New Journal of Chemistry* 2013, 37, 3030.
- (81) Jiang, Q.; Zhang, Z.; Lu, J.; Huang, Y.; Lu, Z.; Tan, Y.; Jiang, Q. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013, 21, 7735.
- (82) Soler-Argilaga, C.; Infante, R.; Polonovski, J. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1973, 326, 167.
- (83) Terés, S.; Barceló-Coblijn, G.; Benet, M.; Álvarez, R.; Bressani, R.; Halver, J. E.; Escribá, P. V. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, 105, 13811.

- (84) Menendez, J. A.; Lupu, R. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2006, 7, 495.
- (85) Sofi, F.; Cesari, F.; Abbate, R.; Gensini, G. F.; Casini, A. *Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis*, 2008; Vol. 337.
- (86) Knoops, K. B.; de Groot, L. M.; Kromhout, D.; et al. *JAMA* 2004, 292, 1433.
- (87) Förster, T. *Angewandte Chemie International Edition in English* 1969, 8, 333.
- (88) Reichardt, C.; Welton, T. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry* Wiley-VCH: Germany, 2003.
- (89) Jacquemin, D.; Planchat, A.; Adamo, C.; Mennucci, B. *Journal of Chemical Theory and Computation* 2012, 8, 2359.
- (90) Tozer, D. J. *The Journal of Chemical Physics* 2003, 119, 12697.
- (91) Dreuw, A.; Head-Gordon, M. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126, 4007.
- (92) Lin, M.-H.; Khnykin, D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2014, 1841, 362.
- (93) Glatz, J. F. C.; Luiken, J. J. F. P.; Bonen, A. *Membrane Fatty Acid Transporters as Regulators of Lipid Metabolism: Implications for Metabolic Disease*, 2010; Vol. 90.
- (94) Hanebutt, F. L.; Demmelmair, H.; Schiessl, B.; Larqué, E.; Koletzko, B. *Clinical Nutrition*, 27, 685.
- (95) Armelin, P. R. G., Universidade Federal de São Carlos 2010.
- (96) Curry, S.; Mandelkow, H.; Brick, P.; Franks, N. *Nat Struct Mol Biol* 1998, 5, 827.
- (97) Lücke, C.; Qiao, Y.; van Moerkerk, H. T. B.; Veerkamp, J. H.; Hamilton, J. A. *Biochemistry* 2006, 45, 6296.
- (98) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *Journal of Computational Chemistry* 1998, 19, 1639.
- (99) Soares, T. A.; Lins, R. D.; Straatsma, T. P.; Briggs, J. M. *Biopolymers* 2002, 65, 313.
- (100) Kim, R.; Lou, K.; Kraft, M. L. *Journal of Lipid Research* 2013, 54, 265.
- (101) Mozaffarian, D.; Wu, J. H. Y. *Journal of the American College of Cardiology* 2011, 58, 2047.

- (102) SanGiovanni, J. P.; Chew, E. Y. *Progress in Retinal and Eye Research* 2005, 24, 87.
- (103) Safarinejad, M. R. *The Journal of Sexual Medicine* 2009, 6, 1743.
- (104) Dyllal, S. C.; Michael-Titus, A. T. *Neuromol Med* 2008, 10, 219.
- (105) Mayurasakorn, K.; Williams, J. J.; Ten, V. S.; Deckelbaum, R. J. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2011, 14, 158.
- (106) Sallis, H.; Steer, C.; Paternoster, L.; Davey Smith, G.; Evans, J. *Journal of Affective Disorders*, 166, 124.
- (107) Lassek, W. D.; Gaulin, S. J. C. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 91, 195.
- (108) Perini, J. Â. D. L.; Stevanato, F. B.; Sargi, S. C.; Visentainer, J. E. L.; Dalalio, M. M. D. O.; Matshushita, M.; Souza, N. E. D.; Visentainer, J. V. *Revista de Nutrição* 2010, 23, 1075.
- (109) Ander, B. P.; Dupasquier, C. M. C.; Prociuk, M. A.; Pierce, G. N. *Experimental & Clinical Cardiology* 2003, 8, 164.
- (110) Guesnet, P.; Alessandri, J.-M. *Biochimie* 2011, 93, 7.
- (111) Franekova, V.; Angin, Y.; Hoebbers, N. T. H.; Coumans, W. A.; Simons, P. J.; Glatz, J. F. C.; Luiken, J. J. F. P.; Larsen, T. S. *Marine omega-3 fatty acids prevent myocardial insulin resistance and metabolic remodeling as induced experimentally by high insulin exposure*, 2015; Vol. 308.
- (112) Silvers, K. M.; Scott, K. M. *Public Health Nutrition* 2002, 5, 427.
- (113) Dutta-Roy, A. K. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2000, 57, 1360.
- (114) Levine, M. N.; Hoang, T. T.; Raines, R. T. *Chemistry & biology* 2013, 20, 614.
- (115) Gibson, R. A.; Makrides, M. *Acta Pædiatrica* 1998, 87, 1017.
- (116) Janssen, C. I. F.; Kiliaan, A. J. *Progress in Lipid Research* 2014, 53, 1.
- (117) Carvalho, P. H. P. R., Universidade de Brasília, 2014.
- (118) Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; De Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Neto, B. A. D. *Chemistry a European Journal* 2014, ASAP.
- (119) Casali, B. T.; Corona, A. W.; Mariani, M. M.; Karlo, J. C.; Ghosal, K.; Landreth, G. E. *The Journal of Neuroscience* 2015, 35, 9173.
- (120) Mocellin, M. C.; Camargo, C. Q.; Nunes, E. A.; Fiates, G. M. R.; Trindade, E. B. S. M. *Clinical Nutrition*.

- (121) Pourmoghaddas, A.; Dormiani-Tabatabaei, M.; Sadeghi, M.; Kermani-Alghoraishi, M.; Golshahi, J.; Shokouh, P. *ARYA Atherosclerosis* 2015, 11, 36.
- (122) Hwang, L.; Wohland, T. *Cell Biochem Biophys* 2007, 49, 1.
- (123) Justin Thomas, K. R.; Lin, J. T.; Velusamy, M.; Tao, Y. T.; Chuen, C. H. *Advanced Functional Materials* 2004, 14, 83.
- (124) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence*; 3a. ed.; Springer: Maryland, 2010.
- (125) Richard, J.-A.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Organic Letters* 2008, 10, 4175.
- (126) Xiao, Y.; Liu, F.; Qian, X.; Cui, J. *Chemical Communications* 2005, 239.
- (127) Murale, D. P.; Lee, K. M.; Kim, K.; Churchill, D. G. *Chemical Communications* 2011, 47, 12512.
- (128) Musa, M. A., Rhodes University, 2002.
- (129) Song, P.-S.; Gordon, W. H. *The Journal of Physical Chemistry* 1970, 74, 4234.
- (130) Atkins, R. L.; Bliss, D. E. *The Journal of Organic Chemistry* 1978, 43, 1975.
- (131) Patalakha, N. S.; Yufit, D. S.; Kirpichenok, M. A.; Gordeeva, N. A.; Struchkov, Y. T.; Grandberg, I. I. *Chem Heterocycl Compd* 1991, 27, 32.
- (132) Taneja, L.; Sharma, A. K.; Singh, R. D. *Journal of Luminescence* 1995, 63, 203.
- (133) Królicki, R.; Jarzęba, W.; Mostafavi, M.; Lampre, I. *The Journal of Physical Chemistry A* 2002, 106, 1708.
- (134) Wagner, B. *Molecules* 2009, 14, 210.
- (135) Dahiya, P.; Kumbhakar, M.; Mukherjee, T.; Pal, H. *Chem. Phys. Lett.* 2005, 414, 148.
- (136) Melo, R. C. N.; Weller, P. F. *Journal of Leukocyte Biology* 2014.
- (137) Held, P. In *BioTek White Paper*; BioTek Instruments, Inc: Winooski, Vermont, USA, 2014.
- (138) Kelkka, T., University of Turku, 2013.
- (139) Hancock, J. T.; Desikan, R.; Neill, S. J. *Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways*, 2001; Vol. 29.
- (140) Sena, L. A.; Chandel, N. S. *Molecular Cell* 2012, 48, 158.
- (141) Finkel, T. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1998, 10, 248.

- (142) Scherz-Shouval, R.; Shvets, E.; Fass, E.; Shorer, H.; Gil, L.; Elazar, Z. *Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4*, 2007; Vol. 26.
- (143) Tormos, Kathryn V.; Anso, E.; Hamanaka, Robert B.; Eisenbart, J.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B.; Chandel, Navdeep S. *Cell Metabolism* 2011, 14, 537.
- (144) Hekimi, S.; Lapointe, J.; Wen, Y. *Trends in Cell Biology* 2011, 21, 569.
- (145) Kohen, R.; Nyska, A. *Toxicologic Pathology* 2002, 30, 620.
- (146) Brand, M. D. *Exp. Gerontol.* 2010, 45, 466.
- (147) Brookes, P. S.; Yoon, Y.; Robotham, J. L.; Anders, M. W.; Sheu, S.-S. *Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle*, 2004; Vol. 287.
- (148) Brown, G. C.; Borutaite, V. *Mitochondrion* 2012, 12, 1.
- (149) Cao, Y. L.; Guo, P.; Xu, Y. C.; Zhao, B. L. In *Nitric Oxide, Pt E*; Packer, L., Cadenas, E., Eds. 2005; Vol. 396, p 77.
- (150) Dikalov, S.; Griending, K. K.; Harrison, D. G. *Hypertension* 2007, 49, 717.
- (151) Maghzal, G. J.; Krause, K.-H.; Stocker, R.; Jaquet, V. *Free Radical Biology and Medicine* 2012, 53, 1903.
- (152) Maeda, H.; Yamamoto, K.; Nomura, Y.; Kohno, I.; Hafsi, L.; Ueda, N.; Yoshida, S.; Fukuda, M.; Fukuyasu, Y.; Yamauchi, Y.; Itoh, N. *Journal of the American Chemical Society* 2005, 127, 68.
- (153) Soh, N.; Sakawaki, O.; Makihara, K.; Odo, Y.; Fukaminato, T.; Kawai, T.; Irie, M.; Imato, T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005, 13, 1131.
- (154) Fery-Forgues, S.; Delavaux-Nicot, B. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2000, 132, 137.
- (155) Chen, S.; Chen, W.; Shi, W.; Ma, H. *Chemistry – A European Journal* 2012, 18, 925.
- (156) Chen, S.; Lu, J.; Sun, C.; Ma, H. *Analyst* 2010, 135, 577.
- (157) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R. *Accounts of Chemical Research* 2015, 48, 1560.
- (158) Kitamura, C.; Saito, K.; Ouchi, M.; Yoneda, A.; Yamashita, Y. *Journal of Chemical Research* 2002, 2002, 511.
- (159) Misra, R.; Gautam, P.; Jadhav, T.; Mobin, S. M. *The Journal of Organic Chemistry* 2013, 78, 4940.

- (160) Waterbeemd, H. V. d.; Carter, R. E.; Grassy, G.; Kubinyi, H.; Y.C.Martin; Tute, M. S.; P.Willett *Pure and applied Chemistry* 1997, 69, 1137.
- (161) Coelho, L. W.; Junqueira, G. M. A.; Herrera, J. O. M.; Machado, S. D.; Machado, B. D. *Química Nova* 1999, 22, 396.
- (162) Hartree, D. R. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* 1928, 24, 111.
- (163) Hartree, D. R. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* 1929, 25, 225.
- (164) Fock, V. *Zeitschrift für Physik* 1930, 61, 126.
- (165) Roothaan, C. C. J. *Reviews of Modern Physics* 1951, 23, 69.
- (166) Hohenberg, P.; Kohn, W. *Physical Review* 1964, 136, B864.
- (167) Grimme, S. *The Journal of Chemical Physics* 2006, 124, 034108.
- (168) Becke, A. D. *The Journal of Chemical Physics* 1993, 98, 5648.
- (169) Yanai, T.; Tew, D. P.; Handy, N. C. *Chemical Physics Letters* 2004, 393, 51.
- (170) Adamo, C.; Barone, V. *The Journal of Chemical Physics* 1999, 110, 6158.
- (171) Grimme, S. *Journal of Computational Chemistry* 2006, 27, 1787.
- (172) Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *Journal of Physical Chemistry A* 2007, 111, 10439.
- (173) Alcácer, L. *Introdução à Química Quântica Computacional*; Instituto Superior Técnico: Lisboa, Portugal, 2007.
- (174) Slater, J. C. *Physical Review* 1930, 36, 57.
- (175) Boys, S. F. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 1950, 200, 542.
- (176) Atkins, P.; Paula, J. d.; Friedman, R. *Quanta, Matter, and Change: A molecular approach to physical chemistry*; W.H. Freeman and Company: New York, 2009.
- (177) Mota, A. A. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Guido, B. C.; de Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Correa, J. R.; Neto, B. A. D. *Chem. Sci.* 2014, 5, 3995.
- (178) Gaussian *Gaus Citation* 2009, 1, 1.
- (179) Zhang, Y.; Xu, X.; Goddard, W. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, 106, 4963.
- (180) GAMES, G. *Pag da Gamess* <http://www.cfs.dl.ac.uk/gamess-uk/citation.shtml> 1980.

- (181) O'Boyle, N. M.; Tenderholt, A. L.; Langner, K. M. 2008, - 29.
- (182) Technologies, N. I. o. S. a. In *CCCBDB Units and Tutorials*; NIST: <http://cccbdb.nist.gov/hartree.asp>, 2014; Vol. 2014.
- (183) Duncan, R. *Advanced MS-DOS: the Microsoft guide for assembly language and C programmers*; Microsoft Press: Washington, 1986.
- (184) Srengan, K. *Understanding Unix*; Prentice-Hall of India: New Delhi, 1999.
- (185) Charaf-Eddin, A.; Planchat, A.; Mennucci, B.; Adamo, C.; Jacquemin, D. *Journal of Chemical Theory and Computation* 2013, 9, 2749.
- (186) Marana, N. L.; Longo, V. M.; Longo, E.; Martins, J. B. L.; Sambrano, J. R. *The Journal of Physical Chemistry A* 2008, 112, 8958.
- (187) Miertuš, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. *Chemical Physics* 1981, 55, 117.