

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

ALEXANDRE VIEIRA SILVA

**Novos Derivados da Riboflavina e Novos Complexos de
Rutênio (II) Poliazaaromáticos com Potencial Uso em
Tratamento e Diagnóstico de Leishmaniose**

Tese de doutorado

Versão Corrigida

Orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

Co-orientador: Prof. Dr. Guillermo Orellana

São Paulo

Data do Depósito da Versão Original na SPG:

12/06/2013

ALEXANDRE VIEIRA SILVA

**Novos Derivados da Riboflavina e Novos Complexos de
Rutênio (II) Poliazaaromáticos com Potencial Uso em
Tratamento e Diagnóstico de Leishmaniose**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

Co-orientador: Prof. Dr. Guillermo Orellana

São Paulo

2013



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“Novos derivados da riboflavina e novos complexos de rutênio
(II) poliazaaromáticos com pontencial uso em tratamento e
diagnóstico de Leishmaniose”**

ALEXANDRE VIEIRA SILVA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa:
Química.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. ~~Maurício da Silva~~ Baptista
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader
IQ - USP

Prof. Dr. Cassius Vinícius Stevani
IQ - USP

Prof. Dr. Noboru Hioka
UEM

Prof. Dr. Alvaro Takeo Omori
UFABC

SÃO PAULO
23 de agosto de 2013

Dedicatória:

Dedicado aos meus pais.

Obrigado pelas duas maiores heranças: honestidade e humildade!

Dedico este trabalho também à Nazinha, Saulo e Samira: minha vida certamente foi melhor tendo vocês ao meu lado!

AGRADECIMENTOS:

Ao Prof. Dr. Mauricio Baptista pelo apoio e orientação.

Ao co-orientador Prof. Dr. Guillermo Orellana. “He aprendido mucho en vuestro laboratorio. Gracias por todo!”

Ao Dr. Luis Rivas e sua aluna Almudena López-Sánchez pela colaboração com os experimentos com *Leishmania*.

Aos Professores Dr. Josef Wilhelm Baader e Dr. Massuo Jorge Kato pela participação na banca de qualificação.

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação do IQ-USP pela ajuda de todas as horas.

Aos amigos de laboratório do grupo do Mauricio: Orlando, Nayra, Dani, Patrícia, Alice, Cleidi, Décio, Alan, Isabel, Natália, Helena, Christiane, Gabriel, Tayana, Walesca, André e Suellen. Um agradecimento especial a Dayane Tada, Divinomar e Adjaci pelas ajudas de sempre.

“A los amigos del grupo GSOLFA y de la UCM en general: Bruno, André, Javier Lucas, Irene, Rahma, Fátima, Gloria Hernandez, Irene Izquierdo, Ana Belén, David, Nuria, Raquel, Clara, María Moreno, Francesca, Fernando, Cristina, Cristina Hernanz, Sergio, Victoria, Prof. Fernando, Juan, Elena y Profa. M^a Cruz.”
“Muchas gracias por hablamos de química en la universidad pero más que esto, muchas gracias por no hablarnos de química en Museo Del Jamón y en los otros sitios. Echo de menos a todos!”

Ao Prof. Dr. Leandro Andrade e a todos de seu grupo (LQFB): Lidiane, Joel, Leandro Piovan, Taís, Thiago, Eliane, Patrícia, Mônica, Felipe, Edna, Adriana, Dayvson e Lya. Um agradecimento especial a Priscila Milani e Jasquer.

Aos amigos do instituto de química em geral: Guillermo Splinter, Caterina, Vitor Zamarion, Bernardo, Nídia, Daniel (batera), Silvinha Oliveira, Ludmila Fidale, Tico, Márcio, Giovana... São tantos nomes que certamente me esquecerei de muita gente importante.

Aos meus amigos que dividiram apartamento comigo no Brasil: Camila, Rodrigo, Vinicius, Fafar, Airton e Adam. E em Madrid: Fernando, Esther, Chris, Marcel e Claudia.

“A special thanks to my friends that I’ve met in Madrid that are not from Spain: Lisa, Vessie, Jennie. Thanks for The moments!”

Um agradecimento especial ao Marcelo Zanin e Mariane pela ajuda nessa etapa final.

Também agradeço aos meus pais, irmãos, TODA a minha família e amigos.

À FAPESP e ao CNPq pelo financiamento da bolsa no Brasil.

À Airbus Military e a Força Aérea Brasileira pela bolsa concedida para realizar uma parte desse projeto em Madri (Espanha).

”Avalia-se a inteligência de um indivíduo pela quantidade de incertezas que ele é capaz de suportar.”

Immanuel Kant (1724-1804)

RESUMO

Silva, A. V. **Novos Derivados da Riboflavina e Novos Complexos de Rutênio (II) Poliazaaromáticos com Potencial Uso no Tratamento e no Diagnóstico de Leishmaniose.** 2013. 185p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A leishmaniose pertence à classe de doenças infecciosas e é causada por parasitas do gênero *Leishmania*. Essa enfermidade se manifesta nas formas visceral ou cutânea e o tratamento de ambas consiste em quimioterapia utilizando fármacos à base de antimônio. A aplicação desses medicamentos, no entanto, apresenta diversas desvantagens, como o surgimento de efeitos colaterais severos e a disseminação de parasitas resistentes aos fármacos convencionais. Dessa forma, há uma grande necessidade de se desenvolver novos medicamentos, bem como, novas técnicas de tratamento e diagnóstico. Neste trabalho foram sintetizados novos fotossensibilizadores derivados da riboflavina (vitamina B₂) com potencial aplicação no tratamento de leishmaniose cutânea (através de terapia fotodinâmica) e foram sintetizados novos complexos de Ru (II) com potencial uso como sensores luminescentes de antimônio.

Os derivados da riboflavina foram obtidos utilizando a vitamina B₂ como material de partida e as transformações químicas estudadas fizeram uso de reações de acilação das hidroxilas da cadeia ribitol e de alquilações do nitrogênio 3 do sistema de anéis isoaloxazina. Essas modificações estruturais permitiram a construção de uma biblioteca de fotossensibilizadores que contém partes hidrofílicas, hidrofóbicas, anfifílicas e iônicas, que possibilitaram estudos da relação estrutura atividade. Com a

otimização dessas rotas sintéticas foram obtidos dois derivados flavínicos-catiônicos inéditos na literatura com rendimentos de até 68%. Foi mostrado que as transformações químicas estudadas não afetaram significativamente as propriedades fotofísicas dos derivados flavínicos, sendo todos eles fluorescentes e capazes de fotossensibilizar a produção de oxigênio singlete com rendimento quântico semelhante ao da riboflavina ($\phi_{\Delta} \approx 0,5$). Por outro lado, as modificações estruturais na riboflavina alteraram as propriedades físico-químicas em termos de solubilidade e coeficiente de partição. Os derivados sintetizados foram testados contra promastigotas de *Leishmania major* utilizando LED azul (470 nm). Os fotossensibilizadores apresentaram baixa toxicidade no escuro (CE_{50} (concentração efetiva 50%) > 100 μM para todos os compostos) e todos os derivados testados apresentaram maior fototoxicidade (CE_{50} de até 5 μM) que a riboflavina (CE_{50} de 50 μM). Foi observado que a fototoxicidade dos derivados da riboflavina está fortemente associada à lipofilicidade do fotossensibilizador.

Um complexo de Ru (II) que responde à presença de antimônio foi preparado a partir do bis-complexo $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{Cl}_2$ e do ligante derivado da fenantrolina contendo o grupo bitiofeno (bitiofeno-imidazo-fen). Esse complexo apresenta potencial na construção de sensores luminescentes de antimônio. Foi mostrado que o novo complexo sintetizado $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})^{2+}]$ apresenta baixa luminescência na região do vermelho devido à auto-supressão causada pelo grupo bitiofeno. No entanto, estudos preliminares mostraram que a adição de SbCl_3 ou tartarato de antimônio ao meio intensifica significativamente a emissão nessa região do espectro. Devido à formação do complexo Sb-bitiofeno, ocorre o aumento percentual da espécie eletronicamente excitada e a mesma é auto-suprimida com menos eficiência.

Palavras-chave: Riboflavina; Complexo de Rutênio; Fotossensibilizadores; Terapia Fotodinâmica; Sensores Luminescentes; Leishmaniose.

ABSTRACT

Silva, A. V. **Novel Riboflavin Derivatives and Novel Ruthenium (II) Polyazaaromatic Complexes with Potential Application in the Treatment and Diagnosis of Leishmaniasis.** 2013. 185p.

PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The leishmaniasis belong to a group of infectious diseases caused by a parasite of the genus *Leishmania*. This disease manifests as the visceral or the cutaneous forms and the treatment of both types is based on chemotherapies with antimony drugs. The application of these drugs, however, presents drawbacks like several side effects and dissemination of parasites resistant to this conventional treatment. Thus, there is a growing need to develop new drugs, as well as new modalities of treatment and diagnosis. In this work, novel photosensitizers derived from riboflavin (vitamin B₂) with potential application in the treatment of cutaneous leishmaniasis (by photodynamic therapy) were synthesized. Also, novel Ru (II) complexes with potential usage as luminescent sensors of antimony were synthesized.

The riboflavin derivatives were obtained by using vitamin B₂ as the starting material, and the chemical transformations were based on acylation of the hydroxyl groups from the ribityl side chain and alkylation of nitrogen 3 of the isoalloxazine ring system. These structural modifications yielded a library of photosensitizers containing hydrophilic, hydrophobic, amphiphilic or ionic moieties, which provide molecules for a study of the structure-activity relationship. By optimizing these synthetic routes, two novel cationic riboflavin derivatives were obtained in good yield (up to 68%). It has

been shown that the chemical modifications performed have not significantly affected the photophysical properties of the riboflavin derivatives. All compounds are fluorescent and able to photosensitize singlet oxygen in yields similar to riboflavin itself ($\phi_{\Delta} \approx 0,5$). On the other hand, these structural modifications varied the physic-chemical properties related to solubility and partition coefficient of the derivatives. The obtained derivatives were tested against promastigotes of *Leishmania major* using blue LED (470 nm). The photosensitizers displayed low dark toxicity (EC_{50} (Effective Concentration 50%) $> 100 \mu\text{M}$ for all the studied compounds) and all derivatives showed greater phototoxicity (EC_{50} up to $5\mu\text{M}$) when compared to riboflavin ($EC_{50} = 50\mu\text{M}$). It was observed that the phototoxicity of the riboflavin derivatives is strongly associated with the lipophilicity of photosensitizer.

A Ru (II) complex that responds in the presence of antimony was prepared from $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{Cl}_2$ and a phenanthroline ligand containing a bithiophene group (bithiophen-imidazo-phen). This complex can be potentially applied in the construction of luminescent sensors of antimony. It has been demonstrated that the novel complex $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})^{2+}]$ displays low red luminescence due to the self-quenching promoted by the bithiophen moiety. However, preliminary studies have evidenced that, upon addition of SbCl_3 or antimony tartrate to the media, the emission intensifies in the red region of the spectrum. Due to the formation of the chelate Sb-bithiophene, the self-quenching of the electronic excited species occurs less efficiently.

Keywords: Riboflavin; Ruthenium Complexes; Photosensitizers; Photodynamic therapy; Luminescent Sensors; Leishmaniasis.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	26
1.1 – Leishmanioses.....	26
1.2 – Terapia Fotodinâmica (PDT).....	30
1.3 – Riboflavina.....	35
<i>1.3.1 – Aspectos gerais da riboflavina.....</i>	<i>36</i>
<i>1.3.2 – Síntese de flavinas.....</i>	<i>40</i>
<i>1.3.3 – Aplicações dos derivados sintéticos das flavinas.....</i>	<i>49</i>
<i>1.3.4 – Aspectos fotoquímicos e fotofísicos da riboflavina.....</i>	<i>50</i>
<i>1.3.5 – Riboflavina em terapia fotodinâmica.....</i>	<i>53</i>
1.4 – Sensores luminescentes baseados em complexos de Ru (II) polipiridinas.....	55
2-OBJETIVOS.....	62
2.1 - Gerais.....	62
2.2 – Específicos.....	62
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
3.1 - Procedimentos gerais.....	63
3.2 - Equipamentos e dispositivos.....	63
<i>3.2.1 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....</i>	<i>63</i>
<i>3.2.2 - Espectrometria na região do Infravermelho (IV).....</i>	<i>64</i>
<i>3.2.3 - Espectrometria de massas (EM).....</i>	<i>64</i>
<i>3.2.4 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</i>	<i>64</i>
<i>3.2.5 - Espectros de absorvância e luminescência.....</i>	<i>65</i>
3.3 – Métodos.....	66
<i>3.3.2 - Síntese da acetal-riboflavina.....</i>	<i>66</i>

3.3.3 - Síntese da 2',3',4',5'-tetracetil-riboflavina (TARF).....	66
3.3.4 - Acetilação da riboflavina mediada por lipase.....	67
3.3.5 – Funcionalização da riboflavina com anidrido succínico.....	67
3.3.6 - Síntese da 2',3',4',5'-tetrapalmitoil-riboflavina (TPRF).....	68
3.3.7 – Síntese da TARF-Me	69
3.3.8 – Hidrólise da TARF-Me	70
3.3.9 - Síntese da 2',3',4',5'-tetraacetil-N(3)-tert-butoxicarbonilmetilriboflavina (TARF-Éster).....	70
3.3.10 - Síntese da 2',3',4',5'-tetraacetil-N(3)-carboximetilriboflavina (TARF-Ácido).....	71
3.3.11 - Síntese da TARF-Catiônica e da TARF-Catiônica-2	72
3.3.12 - Síntese do hexaflúorofosfato de (2-bromoetil)-trimetil-amônio.....	74
3.3.13 - Determinação da absorvidade molar.....	74
3.3.14 - Rendimento quântico de Emissão de Fluorescência.....	75
3.3.15 - Eficiência de geração de oxigênio singlete.....	76
3.3.16 - Partição n-octanol / água.....	76
3.3.17 – Actinometria química (aberchrome 540).....	77
3.3.18 – Ensaio de PDT in vitro em <i>Leishmania major</i>	79
3.3.19 - Síntese da 2,2'-bipirazina.....	80
3.3.20 - Síntese do complexo cis-bis(bipirazina)(cloro) rutênio (II).....	81
3.3.21 - Síntese do composto hidrazida tióctica.....	81
3.3.22 - Síntese da 5,6-diona-fenantrolina.....	82
3.3.23 - Síntese do ligante bitiofeno-imidazo-fenantrolina.....	82
3.3.24 - Síntese do complexo heteroléptico [Ru(bpz) ₂ (bitiofeno-imidazo-fen)].....	83
3.3.25 - Estudo de luminescência dos fluoróforos na presença de sais de antimônio....	84

4 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	85
4.1 - Derivados da riboflavina como fotossensibilizadores em PDT.....	85
4.1.1 - Preparação dos Fs derivados da riboflavina.....	85
4.1.1.1 - <i>Síntese da acetal-riboflavina.....</i>	87
4.1.1.2 - <i>Síntese da 2',3',4',5'-tetracetil-riboflavina (TARF).....</i>	90
4.1.1.3 - <i>Acetilação da riboflavina mediada por lipase.....</i>	93
4.1.1.4 - <i>Funcionalização da riboflavina com anidrido succínico.....</i>	95
4.1.1.5 - <i>Síntese das 2',3',4',5'-tetrapalmitoil-riboflavina (TPRF).....</i>	102
4.1.1.6 - <i>Metilação na posição N-3 do sistema de anéis isoaloxazina.....</i>	105
4.1.1.7 - <i>Síntese da 2',3',4',5'-tetraacetil-N(3)-tert-butoxicarbonilmetilriboflavina (TARF-Éster).....</i>	108
4.1.1.8 - <i>Síntese da 2',3',4',5'-tetraacetil-N(3)-carboximetilriboflavina (TARF-Ácido).....</i>	110
4.1.1.9 - <i>Derivatização na posição N3 do sistema de anéis isoaloxazina com sais alquil-trimetilamônio.....</i>	111
4.1.2 - Propriedades fotoquímicas e fotofísicas.....	121
4.1.2.1 - <i>Espectros UV-visível e Coeficiente de Extinção Molar (ϵ) dos derivados da riboflavina.....</i>	122
4.1.2.2 - <i>Espectro de fluorescência e rendimento quântico (ϕ_F).....</i>	126
4.1.2.3 - <i>Geração e rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_Δ).....</i>	129
4.1.3 - Avaliação do coeficiente de partição <i>n</i>-octanol/água.....	133
4.1.4 - Atividade fotodinâmica dos derivados da riboflavina para uso no tratamento de leishmaniose.....	135
4.2 - SENSORES DE ANTIMÔNIO BASEADOS EM COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) POLIPIRIDINA.....	143

4.2.1 - Síntese de ligantes e complexos de Ru (II).....	143
4.2.1. - <i>Síntese da 2,2'-bipirazina.....</i>	<i>145</i>
4.2.1.2 - <i>Síntese do complexo cis-bis(bipirazina)(cloro) rutênio (II).....</i>	<i>146</i>
4.2.1.3 - <i>Tentativa de conjugar o ácido tióctico com ligantes derivados do fen e bip.....</i>	<i>147</i>
4.2.1.4 - <i>Tentativa de introduzir grupos di-tiol-vicinal em ligantes derivados da fenantrolina.....</i>	<i>150</i>
4.2.1. - <i>Síntese do ligante bitiofeno-imidazo-fenantrolina.....</i>	<i>154</i>
4.2.1.6 - <i>Síntese do complexo heteroléptico de Ru (II) empregando os ligantes bpz e bitiofeno-imidazo-fen.....</i>	<i>156</i>
4.2.2 – Estudos de luminescência do complexo [Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)].(CF₃COO)₂ na presença de sais de antimônio.....	159
4.3 – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA TARF-Catiônica-2.....	171
5- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	178
CURRICULUMVITAE.....	182
ANEXOS.....	A

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Comprimento de onda e ϵ relacionado para os máximos de absorção de cada derivado da riboflavina.....	125
Tabela 4.2: Máximo de fluorescência dos derivados da riboflavina em meio aquoso (excitação em 445 nm).....	128
Tabela 4.3: Rendimento quântico de fluorescência de derivados da RF em solução metanólica com absorvância de 0,01 (excitação em 445 nm).....	129
Tabela 4.4: Rendimento quântico de produção de $^1\text{O}_2$ fotossensibilizado pelos derivados da riboflavina em metanol.....	132
Tabela 4.5: Coeficiente de partição (P) <i>n</i> -octanol/tampão de Hanks para os derivados da riboflavina.....	134
Tabela 4.6. Toxicidade (CE_{50}) contra promastigotas de <i>Leishmania major</i> na presença de luz e no escuro após 3 horas de irradiação (470 nm; $65 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).....	139
Tabela 4.7: Inibição da proliferação de promastigotas de <i>Leishmania major</i> (CE_{50}) na presença de luz e no escuro após 72 horas de irradiação (470 nm; $65 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).....	141
Tabela 4.8: tempo de vida da emissão do complexo $\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazofen})](\text{CF}_3\text{COO})_2$ em $\text{CHCl}_3/\text{acetonitrilo}$ (8,5:1,5) na presença de diferentes concentrações de SbCl_3	166

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i> (figura adaptada de Reithinger <i>et al.</i>).....	27
Figura 1.2: Correlação entre os tipos de leishmaniose e a espécie de <i>Leishmania</i> (adaptado de Hepburn <i>et al.</i>).....	28
Figura 1.3: Estrutura química da riboflavina.....	36
Figura 1.4: Modificações na região periférica do sistema de anéis isoaloxazina da riboflavina já efetuadas.....	44
Figura 1.5: Espectros de absorção e emissão da riboflavina em etanol (temperatura ambiente; 0,5 mM).....	51
Figura 1.6: Diagrama simplificado dos orbitais moleculares de complexos de Ru (II) polipiridinas. ^a Luminescência é o fenômeno pela qual uma molécula absorve luz (UV, visível ou infravermelho) promovendo um elétron para o orbital de maior energia gerando uma nova espécie eletronicamente excitada que decai para o estado fundamental através da emissão de um fóton de luz (com comprimento de onda específico). Processos luminescentes são divididos em fluorescência (espécie emissora singlete) e fosforescência (espécie emissora triplete).....	56
Figura 1.7: Mecanismo geral do funcionamento de sensores luminescentes.....	57
Figura 1.8: Sensor luminescente baseado na química do complexo de Ru (II) polipiridina funcionalizado com poliamina macrocíclica.	60
Figura 2.1: Derivados da RF como possíveis Fs para aplicação no tratamento de leishmaniose.....	62
Figura 3.1: Cálculos e equações utilizadas no estudo de actinometria. ^a relação entre ϕ e λ estabelecida na referência. ^b valor de ϵ encontrado para tolueno (extrapolamos o mesmo valor para etanol).....	78
Figura 4.1: Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> (operando no modo positivo) do produto bruto da reação da riboflavina com acetona.....	89
Figura 4.2: Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> (operando no modo positivo) do produto bruto da acetilação enzimática mediada pela PCL.....	94
Figura 4.3: Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> (operando no modo positivo) do produto da reação entre a riboflavina e o anidrido succínico na presença de DMAP.....	97

Figura 4.4: Mistura de produtos obtidos na reação entre a riboflavina e o anidrido succínico na presença de DMAP.....	98
Figura 4.5: Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> (operando no modo positivo) da reação entre a riboflavina e o anidrido succínico na presença de trietilamina.....	99
Figura 4.6: (a) espectro de massas tipo MS ₂ do sinal 878 m/z observado no produto bruto da reação da roboflavina e anidrido acético na presença de trietilamina; (b) espectro de massas tipo MS ₃ do fragmento 777 m/z obtido da primeira fragmentação do sinal 878 m/z de (a).....	100
Figura 4.7: (a) Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> (operando no modo positivo) da reação entre a riboflavina e o cloreto de palmitoíla na presença de trietilamina; (b) espectro de massas tipo MS ₂ do sinal 1569 m/z observado no produto bruto da reação da riboflavina e cloreto de palmitoíla na presença de trietilamina.....	103
Figura 4.8: Produto majoritário na reação entre a riboflavina e o cloreto de acila na presença de trietilamina.....	104
Figura 4.9: (a) Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> (operando no modo positivo) da reação entre a RF e o brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio na presença de NaH e KI _(catl.) ; (b) espectro de massas tipo MS ₂ do sinal 462 m/z observado no produto bruto da reação da a RF e o brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio na presença de NaH e KI _(catl.)	113
Figura 4.10: (a) Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> (operando no modo positivo) da reação entre a TARF e o brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio na presença de Cs ₂ CO ₃ e KI _(catl.) ; (b) espectro de massas tipo MS ₂ do sinal 630 m/z observado no produto bruto da reação da a TARF e o brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio na presença de Cs ₂ CO ₃ e KI _(catl.)	114
Figura 4.11: Compostos utilizados nos estudos fotofísicos.....	121
Figura 4.12: Espectro de absorção da riboflavina em metanol na concentração de 5 µM.....	122
Figura 4.13: Espectros de absorção dos derivados TARF (12 µM), TARF-Me (10 µM), TARF-Ácida (15 µM), TARF-Éster (5 µM) em DMF e TPRF (5 µM) em acetato de etila.....	124
Figura 4.14: Espectro de absorção dos derivados catiônicos da riboflavina: a) TARF-Catiônica (5 µM) em metanol; b) TARF-Catiônica-2 (5 µM) em água.....	125

Figura 4.15: Espectro de fluorescência para os derivados da riboflavina obtido por excitação em 445 nm, com fendas de 5 mm em solução aquosa (o valores de absorbância das amostras foi normalizados para 0,01).....	127
Figura 4.16: Transiente de decaimento da emissão do $^1\text{O}_2$ em 1270 nm fotossensibilizado pela fenalenona em solução metanólica (Abs = 0,01). Obtido por excitação em 355 nm com 2,2 mJ/pulso, 10 pulsos/segundos.....	130
Figura 4.17: Espectro de emissão do $^1\text{O}_2$ a 1270 nm resolvido no tempo, fotossensibilizado pela TARF-Catiônica-2 em solução metanólica. Obtido por excitação em 355 nm com 2,2 mJ/pulso, 10 pulsos/segundos.....	131
Figura 4.18: Iluminador produzido para irradiar células em placa de cultura de 96 poços. O dispositivo contém 96 LEDs (470 nm) acoplados a uma placa de alumínio.....	135
Figura 4.19: Porcentagem da viabilidade celular de promastigotas de <i>Leishmania major</i> determinado pelo método MTT. Barras negras representam a viabilidade celular de promastigotas incubados por 4 h com os Fs no escuro. Barras azuis representam a viabilidade celular de promastigotas após 30 minutos de incubação com os Fs, seguido de 30 minutos de iluminação sob luz azul (470 nm; $65 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e mais 3 h de incubação no escuro. Concentração de Fs de $12 \mu\text{M}$. Células por poço de $2,4 \cdot 10^6$. Controle indica ausência de Fs. As porcentagens de viabilidade celular mostradas são a média de três ensaios.....	138
Figura 4.20: Comparação dos valores de CE_{50} (fototoxicidade contra promastigotas de <i>Leishmania major</i>) dos derivados da riboflavina.....	140
Figura 4.21: Comparação dos valores de CE_{50} (inibição da proliferação de promastigotas de <i>Leishmania major</i> na presença de luz) dos derivados da riboflavina.....	142
Figura 4.22: Possível intermediário formado na reação entre a NH_2 -fen e o ácido tióctico.....	148
Figura 4.23: Análise de RMN (em CDCl_3 ; 300 MHz) da alíquota da reação entre a epóxi fen e KSCN em PEG-400 a $120 \text{ }^\circ\text{C}$. a) região entre 3 e 10 ppm; b) região entre 4,75 e 4,4 ppm.....	153
Figura 4.24: Espectro de absorção UV-vis da alíquota da reação de síntese do complexo heteroléptico $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})]$ após 6 h (solvente DMF).....	158

Figura 4.25: Espectro de absorção UV-vis do complexo heteroléptico [Ru(bpz) ₂ (bitiofeno-imidazo-fen)] (solvente acetonitrila; concentração 1 μM; temperatura ambiente).....	160
Figura 4.26: Espectro de luminescência do complexo [Ru(bpz) ₂ (bitiofeno-imidazo-fen)].(CF ₃ COO) ₂ na concentração de 5 μM, obtido por excitação em 440 nm em CHCl ₃ /acetonitrilo (17:3); t.a.....	161
Figura 4.27: Espectro de luminescência do complexo [Ru(bpz) ₂ (bitiofeno-imidazo-fen)].(CF ₃ COO) ₂ na concentração de 5 μM, obtido em CHCl ₃ /acetonitrilo (17:3) na presença de diferentes concentrações de SbCl ₃ (em μM); t.a.. <i>a</i>) intensidade de emissão <i>versus</i> comprimento de onda; excitação em 440 nm; <i>b</i>) tempo de vida (τ) determinado por SPT; excitação em 463 nm, emissão 690 nm.....	162
Figura 4.28: Espectro de luminescência do formil-bitiofeno na concentração de 5 μM, obtido em CHCl ₃ /acetonitrilo (17:3) na presença de diferentes concentrações de SbCl ₃ (em μM) e t.a.. Excitação em 330 nm.....	164
Figura 4.29: Diagrama de Jablonski proposto para o complexo [Ru(bpz) ₂ (bitiofeno-imidazo-fen)].....	167
Figura 4.30: Espectro de luminescência do complexo [Ru(bpz) ₂ (bitiofeno-imidazo-fen)].(CF ₃ COO) ₂ na concentração de 5 μM, obtido em água/DMSO (1:1) na presença de diferentes concentrações (em μM) de tartarato duplo de antimônio e potássio.....	170
Figura 4.31: Espectro de RMN de ¹ H (700 MHz) da TARF-Catiônica-2 em D ₂ O....	172
Figura 4.32: Espectro de RMN de ¹ H (700 MHz) da TARF-Catiônica-2 em D ₂ O (deslocamentos entre 5,6 e 4,1 ppm).....	174
Figura 4.33: Deslocamentos químicos (em ppm) dos ¹ H da TARF-Catiônica-2 obtidos por RMN em D ₂ O (700 MHz).....	176
Figura 4.34: Deslocamentos químicos (em ppm) dos ¹³ C da TARF-Catiônica-2 obtidos por RMN em D ₂ O (700 MHz).....	176
Figura 4.35: Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> (operando no modo positivo) da TARF-Catiônica-2	177

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1: Mecanismos genéricos dos danos celulares causados pela PDT.....	31
Esquema 1.2: Possibilidades reacionais das flavinas em células. <i>a)</i> reações enzimáticas no estado fundamental. <i>b)</i> reações no estado eletronicamente excitado que podem provocar danos às células.....	33
Esquema 1.3: Principais estruturas químicas das flavinas que participam dos processos biológicos.....	37
Esquema 1.4: Dano causado pela luz UVB (280-315 nm) nos anéis pirimidíneos da molécula de DNA e reparo através de fotolises (adaptado de Heelis <i>et al.</i>).....	38
Esquema 1.5: Reações metabólicas que fazem uso de flavinas. <i>a)</i> oxidação da acil-CoA através de flavoquinonas; <i>b)</i> reações da flavohidroquinona com oxigênio.....	39
Esquema 1.6: Síntese da riboflavina descrita por Kuhn <i>et al.</i> em 1934.....	41
Esquema 1.7: Síntese da riboflavina através da condensação de di-aminas aromáticas com derivados clorados do ácido barbitúrico.....	42
Esquema 1.8: Síntese de N5-óxido riboflavina através da condensação de anilinas substituídas com 6-Cl-uracila.....	43
Esquema 1.9: Síntese da 8-mercapto-riboflavina utilizando a 2,4-dicloro-5-nitrotolueno como material de partida (protocolo adaptado de Lambooy <i>et al.</i> e Moore <i>et al.</i>).....	45
Esquema 1.10: Síntese da 1-deazariboflavina utilizando a 4,5-dimetilbenzeno-1,2-diamina como material de partida (adaptado de Mansurova <i>et al.</i>).....	46
Esquema 1.11: Esterificação dos grupos hidroxilas da riboflavina.....	47
Esquema 1.12: Introdução de grupo acetil no nitrogênio 3 do sistema de anéis isoaloxazina.....	48
Esquema 1.13: Equilíbrio entre espécies da riboflavina (flavoquinona) em meio aquoso.....	52
Esquema 4.1: Proposta geral de retro síntese dos derivados flavínicos utilizando a riboflavina como reagente de partida.....	86
Esquema 4.2: Reação da riboflavina com acetona na presença de H ₂ SO ₄ (catl.).....	87
Esquema 4.3: Mecanismo da catálise nucleofílica pela piridina entre o anidrido acético e um nucleófilo.....	91
Esquema 4.4: Síntese da TARF utilizando anidrido acético e DMAP.....	92
Esquema 4.5: Acetilação da riboflavina mediada por lipase.....	93

Esquema 4.6: Derivatização da riboflavina com anidrido succínico.....	96
Esquema 4.7: Mecanismo de acilação do <i>N</i> -3 da riboflavina na presença de trietilamina.....	101
Esquema 4.8: Derivatização da riboflavina com cloreto de palmitoíla.....	102
Esquema 4.9: (a) Síntese da <i>N</i> (3)-Metilriboflavina (RF-Me); (b) Síntese da <i>N</i> (3)-Metil-tetraacetil-riboflavina (TARF-Me).....	106
Esquema 4.10: tentativas de hidrólise da TARF-Me	107
Esquema 4.11: Síntese do derivado 1',3',4',5'-tetraacetil- <i>N</i> (3)- <i>tert</i> -butoxi-carbonil-metilriboflavina (TARF-Éster).....	108
Esquema 4.12: Mecanismo de catálise nucleofílica do iodeto em reação S _N 2.....	109
Esquema 4.13: Síntese do derivado 2',3',4',5'-tetraacetil- <i>N</i> (3)-carboximetilriboflavina (TARF-Ácido).....	110
Esquema 4.14: Mecanismo de transesterificação da TARF-Éster na presença de ácido trifluoracético.....	110
Esquema 4.15: (a) Alquilação da RF com brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio; (b) Alquilação da TARF com brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio.....	112
Esquema 4.16: Síntese da TARF-Catiônica utilizando catálise por transferência de fase.....	116
Esquema 4.17: Reação de entre o brometo de (2-bromoetil)-trimetilamônio e o hexafluorofosfato de amônio em meio aquoso.....	116
Esquema 4.18: (a) Alquilação da TARF com brometo de (2-bromopentil)-trimetilamônio na presença de Cs ₂ CO ₃ e KI em quantidade estequiométrica. (b) Alquilação da TARF com brometo de (2-bromopentil)-trimetilamônio na presença de Cs ₂ CO ₃ e LiI em quantidade estequiométrica.....	118
Esquema 4.19: Mecanismo de catálise electrofílica do cátion Li em reações de S _N 2.....	119
Esquema 4.20: Mecanismo de catálise electrofílica do cátion Li em reações de eliminação do tipo E2.....	120
Esquema 4.21: Ciclização fotoquímica do <i>aberchrome</i> 540.....	137
Esquema 4.22: Análise retro-sintética de sensores luminescentes baseados em complexos de Ru (II) poliazaaromáticos contendo enxofre que podem servir como agentes receptores de antimônio.....	144
Esquema 4.23: Síntese da 2,2'-bipirazina e mecanismo da reação de acoplamento da 2-cloropirazina catalisada por paládio.....	145

Esquema 4.24: Síntese do complexo Ru (II) <i>cis</i> -bis(bipirazina).....	146
Esquema 4.25: Grupos ativadores utilizados na tentativa de conjugar a NH ₂ -fen com o ácido tióctico.....	147
Esquema 4.26: a) Síntese do composto hidrazida tióctica; b) tentativa de conjugar a hidrazida tióctica com o ligante di-carbóxi-bip.....	149
Esquema 4.27: Tentativas de conjugar o composto BAL-protégido com a epóxi-fen.....	150
Esquema 4.28: Tentativa de síntese de um ligante contendo a função orgânica di-tiol vicinal.....	151
Esquema 4.29: Mecanismo geral da reação entre a epóxi-fen e KSCN ou tiouréia.....	154
Esquema 4.30: Síntese da 5,6-diona-fen a partir da fenantrolina.....	155
Esquema 4.31: Síntese do ligante bitiofeno-imidazo-fenantrolina a partir da 5,6-diona-fen.....	155
Esquema 4.32: Mecanismo da síntese do ligante bitiofeno-imidazo-fenantrolina.....	156
Esquema 4.33: Síntese do complexo heteroléptico [Ru(bpz) ₂ (bitiofeno-imidazo-fen)].....	157
Esquema 4.34: Complexação do bitiofeno com antimônio.....	164
Esquema 4.35: Resumo das estruturas de ressonância envolvidas no processo de supressão redutiva.....	168
Esquema 4.36: Processos envolvidos no estado excitado ³ MLCT na presença de antimônio.....	169
Esquema 4.37: Estruturas de ressonância existentes para a estrutura da TARF-Catiônica-2	173

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs-Absorbância
Ac - Acetato
BAL – *british anti lewisite*
Bip – 2,2'-bipiridina
Boc – *tert*-butiloxicarbonila
Bpz - 2,2'-bipirazina
cat. – catalítico
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
CDI - 1,1'-carbonildiimidazol
CE₅₀ – Concentração Efetiva 50
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCC - *N,N*-diciclohexilcarbodiimida
DMAP – 4-(dimetilamino)piridina
DMF – *N,N*-dimetilaminoformamida
DMSO - dimetilsulfóxido
EM – Espectrometria de Massas
EMAR – Espectrometria de Massas de Alta Resolução
ESI – *electronspray ionization*
FAD – dinucleotídeo de flavina e adenina
Fen - fenantrolina
FMN – mononucleotídeo de flavina
Fs – Fotossensibilizador(es)
ILCT – Transferência de carga entre-ligantes
ISC – *intersystem crossing*
IV - Infravermelho
J – constante de acoplamento dada em Hz
LC – leishmaniose cutânea
LC – *transferência de carga ligante-centrada*
LCD – leishmaniose cutânea difusa
LCM – leishmaniose cutâneo-mucosa
LDA – diisopropilamida de lítio

LV – leishmaniose visceral
MALDI – *Matrix-assisted Laser Ionization*
MLCT – transferência de carga metal-ligante
NAD⁺ - forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH - forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo
PDT – *Photodynamic Therapy*
RF - riboflavina
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
ROS – *Reactive Oxygen Species*
sat – saturada(o)
SPT – *Single Photon Timing*
Subs – substrato
t.a. – temperatura ambiente
TARF - 2',3',4',5'-tetracetil-riboflavina
TARF-Ácida - 2',3',4',5'-tetraacetil-*N*(3)-carboximetilriboflavina
TARF-Catiônica - 2',3',4',5'-tetraacetil-*N*(3)-(etil)-trimetilamônioriboflavina
TARF-Catiônica-2 - 2',3',4',5'-tetraacetil-*N*(3)-(pentil)-trimetilamônioriboflavina
TARF-Éster - 2',3',4',5'-tetraacetil-*N*(3)-tert-butoxicarbonilmetilriboflavina
TARF-Me - 2',3',4',5'-tetraacetil-*N*(3)-metilriboflavina
THF – tetrahidrofurano
TMS – tetrametil silano
TPRF - 2',3',4',5'-tetrapalmitoil-riboflavina
UVA - luz ultravioleta com comprimento de onda entre 315-400 cm⁻¹
UVB - luz ultravioleta com comprimento de onda entre 280-315 cm⁻¹
UVC – luz ultravioleta com comprimento de onda entre 200-280 cm⁻¹
UV-Vis – luz Ultravioleta e Visível
δ – deslocamento químico (ppm)
ε – Coeficiente de extinção molar
¹O₂ – oxigênio singlete
φ_F – rendimento quântico de fluorescência
φ_Δ – rendimento quântico de geração de oxigênio singlete
λ_{max} – comprimento de onda de máxima absorção
τ – tempo de vida

1-INTRODUÇÃO

1.1 - Leishmanioses

A leishmaniose é uma doença parasitária negligenciada causada pelo protozoário pertencente ao gênero *Leishmania*. As leishmanioses (Leishmaniose cutânea (LC); Leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM); Leishmaniose visceral (LV) e Leishmaniose cutâneo difusa (LCD)) são endêmicas em 88 países, incluindo o Brasil, com uma estimativa de 12 milhões de casos no mundo.¹

Essa doença é transmitida através da picada do mosquito hematófago infectado, denominado flebótomo. O agente etiológico da leishmaniose em seu ciclo evolutivo apresenta basicamente duas formas: uma promastigota (extracelular) e a outra amastigota, que é intracelular obrigatória. O ciclo da *Leishmania* (figura 1.1) tem início quando o vetor realiza o repasto sanguíneo em um mamífero infectado e ingere, junto

¹http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html, acessada em maio de 2013.

com o sangue, células do sistema fagocitário contendo formas amastigotas do parasita.

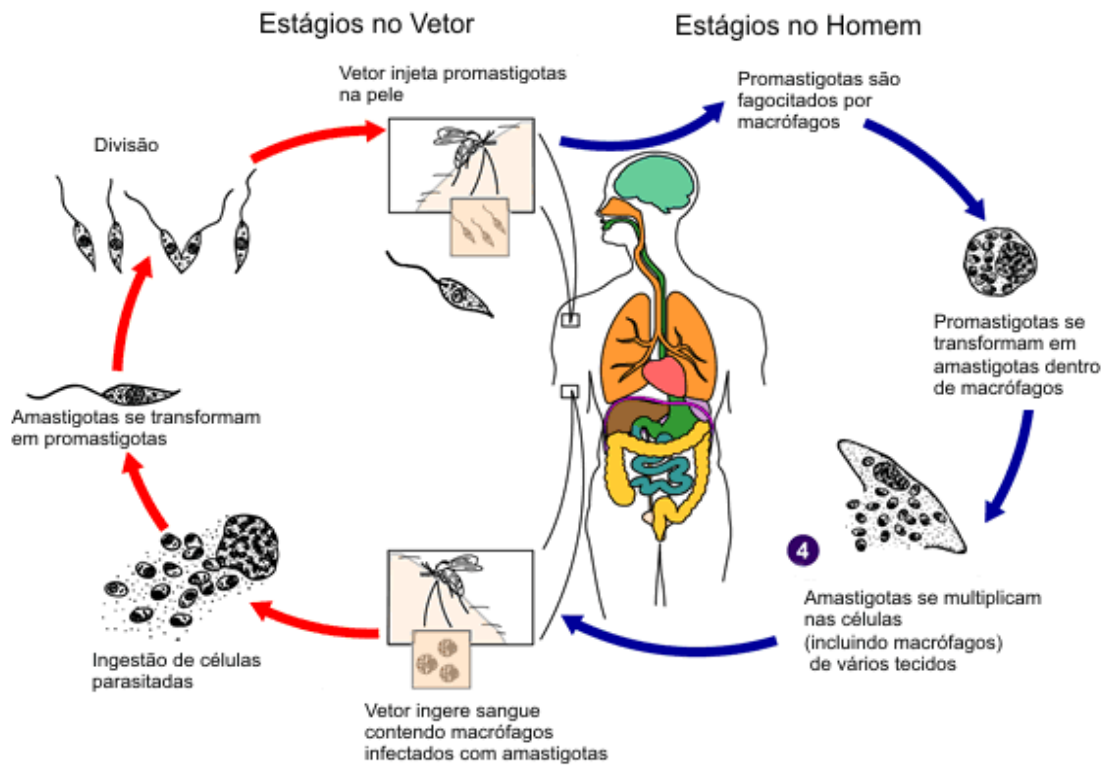


Figura 1.1: Ciclo de vida do parasita *Leishmania* (figura adaptada de Reithinger *et al.*).²

Uma vez dentro do flebótomo, a forma amastigota se transforma em promastigota onde, através de um novo repasto sanguíneo do vetor para o hospedeiro, ocorre a inoculação dos parasitas na forma promastigota que serão fagocitadas pelo sistema imunológico e se transformarão em amastigotas. Os tecidos onde ocorrem as manifestações clínicas das leishmanioses dão nome às doenças: LC, forma que produz lesões cutâneas; LCM, forma com lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe; LV, forma visceral em que os parasitas apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides; e LCD, forma cutânea que acomete indivíduos anérgicos (indivíduos que não possuem resposta imune contra a *Leishmania*) ou pacientes que já foram tratados de LV.³ A síndrome resultante da doença depende de diversos fatores que incluem desde a espécie do

² Reithinger, R.; Dujardin, J-C; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, *Lancet Infect. Dis.* **2007**, 7, 581.

³ Rey, L. **Bases da Parasitologia Médica**, 2ª Ed, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001. p. 349.

parasita até o status genético e imunológico do hospedeiro.⁴ No entanto, de um modo geral, existe uma correlação entre os tipos de leishmaniose e as espécies de *Leishmania*, como mostrado na figura 1.2.

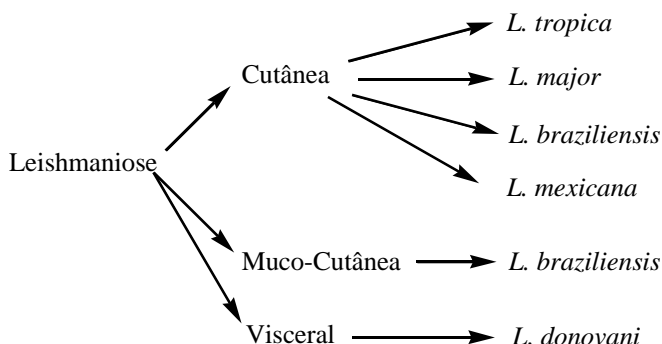


Figura 1.2: Correlação entre os tipos de leishmaniose e a espécie de *Leishmania* (adaptado de Hepburn *et al.*).⁴

Os tratamentos para as leishmanioses fazem uso de quimioterápicos à base de compostos orgânicos de antimônio (V) tais como *pentostam* ou *glucantime*, e de outros fármacos como, por exemplo, o antifúngico *amphotericin B* (*AmB*) e, mais recentemente, *miltefosina* com aplicação oral.⁵ Outras terapias têm menor frequência de uso, sendo utilizadas como tratamento de segunda escolha, e fazem uso de *pentamidina* e *alopurinol*.⁵ Esses fármacos são em geral utilizados quando o paciente não responde à medicação de primeira escolha. A aplicação desses medicamentos apresentam diversas desvantagens, como o surgimento de efeitos colaterais severos e a disseminação de parasitas resistentes aos fármacos convencionais.^{5,6}

Há muita controvérsia na comunidade científica quanto ao mecanismo molecular de seleção dos parasitas resistentes aos fármacos à base de antimônio (V).⁷ São postulados três modelos de mecanismo de ação dos compostos antimoniais:¹¹ (i) o modelo pró-droga, que postula que o Sb(V) é reduzido por ação enzimática dentro do

⁴ Hepburn, N. C. *Clin. Exp. Dermatol.* **2000**, 25, 363.

⁵ P. J. Myler, N. Fasel (Eds.), In: *Leishmania: After The Genome*, Caister Academic Press, Hethersett, Norwich, UK, **2008**.

⁶ Aït-Oudhia, K.; Gazanion, E.; Vergnes, B.; Oury, B.; Sereno, D. *Parasitol Res.* **2011**, 109, 1225.

⁷ Decuypere, S.; Vanaerschot, M.; Bruncker, K.; Imamura, H.; Müller, S.; Khanal, B.; Rijal, S.; Dujardin, J-C.; Coombs, G. H. *Heterogeneity of Drug Resistant Leishmania* **2012**, 6, 1514.

parasita produzindo Sb(III) que, por sua vez, apresenta a atividade anti-leishmania, perturbando o balanço-redox das células do parasita;⁸ (ii) o modelo atividade anti-leishmania intrínseca, que postula a existência da atividade anti-leishmania de Sb(V) através da inibição da bio-síntese de macromoléculas pelos parasitas⁹; e (iii) o modelo ativação imune do hospedeiro, que postula que os compostos antimoniais, Sb(V), ativam o sistema imunológico do hospedeiro fazendo com que os macrófagos infectados imponham estresse oxidativo aos parasitas.¹⁰ É importante ressaltar, também, que para esses fármacos ainda não é claro se a espécie ativa de antimônio nos parasitas é Sb(V) ou Sb(III).¹¹

O principal motivo que leva à disseminação de parasitas resistentes é o mau uso dos fármacos antimoniais.¹¹ Acredita-se que os mecanismos de resistência aos fármacos de antimônio variam para cada espécie de *Leishmania* e envolvem, principalmente, o aumento de metabólitos redutores (baseados na química dos grupos tiois, por exemplo, cisteína e glutathione)¹² na célula e a capacidade do parasita de realizar o efluxo da droga ativa.¹¹

Frente à problemática terapêutica da leishmaniose e para tentar minimizar a disseminação de parasitas resistentes, é essencial o desenvolvimento de métodos capazes de determinar variações nos níveis da droga ativa nos parasitas.¹¹ É importante também caracterizar, em nível molecular, alterações nos alvos farmacológicos das células.

O desenvolvimento de novos medicamentos e, também, novas técnicas de tratamento são fundamentais para combater o problema dos parasitas resistentes.¹¹ Novas terapias, que tem alvos celulares múltiplos, tem se mostrado

⁸ Baiocco, P.; Colotti, G.; Franceschini, S.; Ilari, A. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2603.

⁹ Berman, J. D.; Waddel, D.; Hanson, B. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 916.

¹⁰ Mookerjee B. J.; Mookerjee, A.; Sen, P.; Bhaumik, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1788.

¹¹ Haldar, A. K.; Sen, P.; Roy, S. *Mol. Biol Int.* **2011**, *23*.

¹² Legaré, D.; Papadopoulou, B.; Roy, G. *Experimen. Parasitol.* **1997**, *3*, 275.

promissores¹³, mas o desenvolvimento de novos tratamentos eficazes e de baixo custo são, ainda, de suma importância.

1.2 – Terapia Fotodinâmica (PDT)

A Terapia Fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) refere-se à destruição de um tecido vivo de rápida multiplicação (câncer ou infecções) por energia luminosa em presença de um fotossensibilizador (Fs) e oxigênio. A PDT é considerada uma técnica inovadora e não invasiva no tratamento de células tumorais, e de doenças infecciosas e lesões pré-cancerígenas.¹⁴ Essa metodologia vem sendo aplicada no tratamento de câncer de pulmão, câncer de esôfago, degeneração macular da retina, destruição de infestações bacterianas resistentes a tratamentos tradicionais à base de antibióticos, entre outras enfermidades.¹⁵

A Terapia Fotodinâmica vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisa como uma técnica alternativa no tratamento da leishmaniose cutânea.¹⁶ Foi mostrado que fotossensibilizadores catiônicos são bastante eficazes no tratamento contra *Leishmania*.¹⁷ Dentre os Fs testados com êxito podem ser citados compostos fenotiazínicos¹⁸ e porfirínicos¹⁹, o azul de metileno²⁰ e o ácido aminolevunílico²¹ (como pró-droga). A PDT mostra-se promissora no tratamento de leishmaniose cutânea, no

¹³(a) Gil, E. S.; Cunha, L. C.; Paula, J. R.; Bezerra, J. C. B.; Aguiar, F. A. *Vita et Sanitas* **2007**, *1*, 1. (b) Silva-López, R. E. *Quím. Nova*, **2010**, *33*, 1541.

¹⁴ (a) Bonnet, R. **Chemical Aspects of Photodynamic Therapy**; Gordon and Breach Science: Amsterdam, **2000**. (b) Bonnet, R.; Martinez, G. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9513.

¹⁵ Machado, A. E. H. *Quím. Nova*, **2000**, *23*, 237.

¹⁶ Baptista, M.S.; Wainwright, M. *Baz. J. Biol. Res.* **2011**, *44*, 1-10.

¹⁷ Akilov, O. E.; Sharma, N. L.; *J. Dermatol. Treat.* **2006**, *13*, 839.

¹⁸ Akilov, O. E.; Kosaka, S.; O’Riordan, K.; Hasan, T. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 1067.

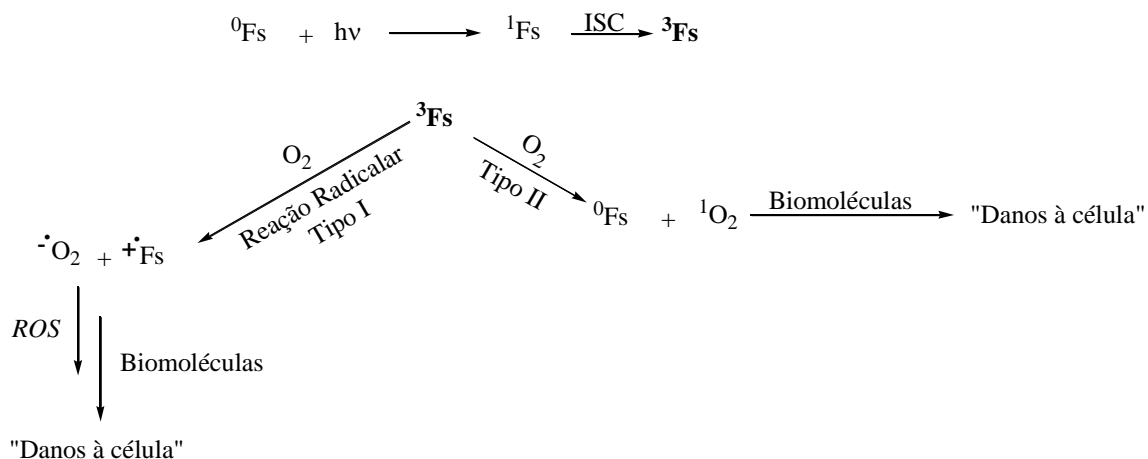
¹⁹ Bristow, C. A.; Harold, R.; Paget, T. A.; Boyle, R. W. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2006**, *3*, 162.

²⁰(a) Peloi, L. S.; Biondo, C. E. G.; Kimura, E. Politi, M. J.; Lonardonni, M. V. C.; Aristides, S. M. A.; Dorea, R. C. C.; Hioka, N.; Silveira, T. G. V. *Exp. Parasitol.* **2011**, *128*, 353. (b) Song, D.; Lindoso, J. A. L.; Oyafuso, L. K.; Kanashiro, E. H. Y.; Cardoso, J. L.; Uchoa, A. F.; Tardivo, J. P.; Baptista, M. S. *Photomed. Laser Surg.* **2011**, *29*, 711.

²¹ Akilov, O. E.; Kosaka, S.; O’Riordan, K.; Hasan, T. *Exp. Dermatol.* **2007**, *16*, 651.

entanto faz-se necessário desenvolver novos Fs de baixo custo e elevada eficiência no tratamento.

O mecanismo do dano celular causado pela PDT ocorre a partir de um fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular, como mostrado no esquema 1.1.



Esquema 1.1: Mecanismos genéricos dos danos celulares causados pela PDT.

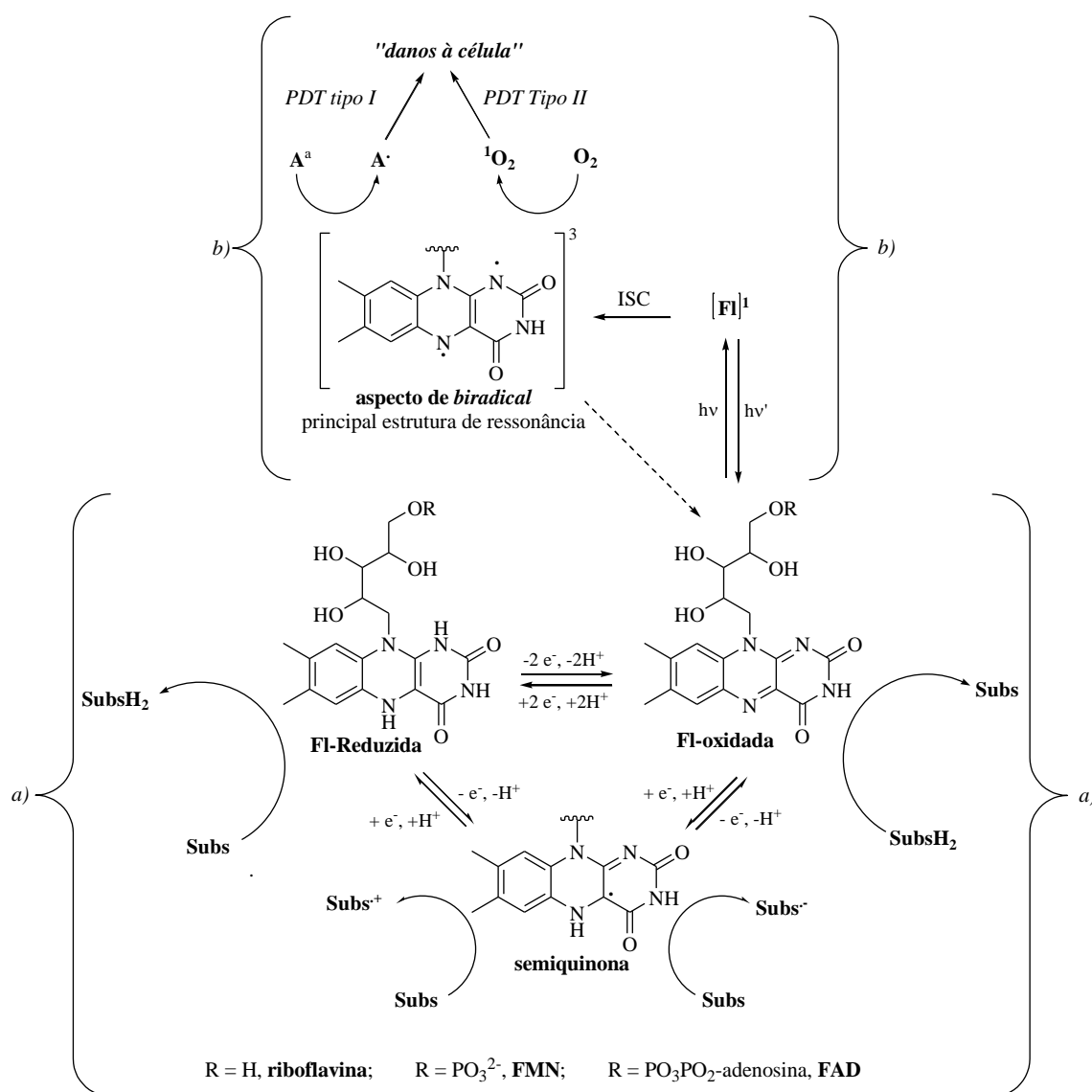
O Fs absorve energia luminosa e forma a espécie eletronicamente excitada singlete (${}^1\text{Fs}$). Através do processo de cruzamento intersistema (do inglês *intersystem crossing*, ISC), no qual se dá a inversão do spin no estado excitado, forma-se a espécie triplete (${}^3\text{Fs}$). Uma vez formada, o ${}^3\text{Fs}$ pode reagir ou dissipar essa energia por decaimento não radioativo (calor). Os mecanismos em que o ${}^3\text{Fs}$ pode reagir são divididos em dois tipos principais. O mecanismo tipo I, onde a energia do triplete é transferida para uma biomolécula (ou oxigênio molecular) por transferência de elétrons, gerando íons radicais, que culmina em danos diretos às biomoléculas (mecanismo tipo I). E o mecanismo tipo II, onde a energia de excitação é transferida do triplete para o oxigênio, levando à formação de uma espécie altamente reativa denominada oxigênio singlete (${}^1\text{O}_2$). O oxigênio singlete refere-se às espécies eletronicamente excitadas

imediatamente superiores ao oxigênio no seu estado fundamental.²² O $^1\text{O}_2$ é um intermediário muito reativo com características eletrofílicas. Conseqüentemente, é uma espécie citotóxica de curto tempo de vida.²² Por ser um forte eletrófilo, o $^1\text{O}_2$ pode causar danos em membranas, proteínas e DNA.

Através de processos semelhantes àqueles que ocorrem na PDT, o fotoenvelhecimento e o câncer de pele são geralmente causados por fotossensibilizadores endógenos tais como as flavinas.²³ No caso da exposição solar, através da incidência da luz UVA e visível, as flavinas podem reagir seguindo os mecanismos tipo I e II.^{42a,58,59} No esquema 1.2 estão ilustradas as diferentes possibilidades reacionais das flavinas nas células que podem ocasionar em dano celular.

²²(a) Ogilby, P. R.; Foot, C. S.; *J. Am. Chem. Soc.***1983**, *105*, 3413. (b) Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B.; *J. Phy. Chem. Ref. Data***1995**, *24*, 663. (c) Weldon, D.; Poulsen, T. D.; Mikkelsen, K. V.; Ogilby, P. R. *Photochem. Photobiol.***1999**, *70*, 371.

²³(a) Wondrak, G. T.; Jacobson, M. K.; Jacobson, E. L. *Photochem. Photobiol.Sci.***2005**, *2*, 215. (b) Baier, J. Maisch, T.; Meier, M; Engel, E.; Landthaler, M.; Bäuml, W. *Biophys. J.***2006**, *91*, 1452.



Esquema 1.2: Possibilidades reacionais das flavinas em células. *a)* reações enzimáticas no estado fundamental. *b)* reações no estado eletronicamente excitado que podem provocar danos às células.

Como será discutido posteriormente, em células as flavinas se encontram nas forma oxidada, reduzida e semireduzida (semiquinona). Em relação aos danos fotoinduzidos através das flavinas, a espécie oxidada é a responsável por interagir eficientemente com luz, formando a espécie eletronicamente excitada triplete. A flavina no estado triplete é muito reativa e se assemelha a uma espécie biradicalar, como mostrado no esquema 1.2.²⁴ Através da colisão da espécie triplete com outras moléculas (inclusive oxigênio), pode-se formar espécies radicalares que causam danos à célula

²⁴Martin, C. B.; Tsao, M-L.; Hadad, C. M.; Platz, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7226.

pelo mecanismo tipo I. Por outro lado, a energia do estado triplete da flavina pode ser transferida para o oxigênio formando a espécie $^1\text{O}_2$ e provocando danos às células através do mecanismo tipo II.

O tempo de vida do oxigênio singlete em meio biológico é extremamente curto ($< 0,04 \mu\text{s}$).¹⁵ Por não ter tempo de se difundir na célula, essa espécie causa danos principalmente nas organelas em que o Fs é incorporado. É comprovado que a cito-localização do Fs apresenta grande influência no tipo de morte celular provocado.²⁵ É relatado, também, que a formação de $^1\text{O}_2$ em determinadas organelas favorece a morte celular por apoptose.²⁵ A apoptose, por ser um processo natural do organismo, não causa efeitos colaterais significativos. Sendo assim, busca-se em PDT fotossensibilizadores que provoquem a morte celular fotoinduzida principalmente por apoptose. No entanto, as propriedades de um Fs que influenciam na sua cito-localização e no tipo de morte celular fotoinduzida (apoptose, ou outros) é, ainda, objeto de investigação científica.

As principais características que um Fs deve apresentar para ser aplicado em PDT são: (i) absorvância intensa localizada preferencialmente na região do espectro penetrante nos tecidos biológicos (700-900 nm); (ii) elevada eficiência na produção de oxigênio singlete; (iii) baixa toxicidade no escuro; (iv) boa solubilidade nos meios biológicos; (v) afinidade pelas células-alvo.¹⁴

A presença de determinados grupos orgânicos podem tornar o Fs mais solúvel em meios biológicos, bem como, influenciar sua porcentagem de incorporação em células. Uma determinada cito-localização pode ser, também, favorecida de acordo com a estrutura química do Fs. Para diversos fotossensibilizadores utilizados em PDT, é

²⁵ (a) Oliveira, C. S.; Turchiello, R.; Kowaltowski, A. J.; Indig, G. L.; Baptista, M. S. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 824. (b) Kochevar, I. E.; Lynch, M. C. Zhuang, S.; Lambert, C. R. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 548. (c) Kessel, D.; Luo, Y. J. *Photochem. Photobiol. B*: **1998**, *42*, 89.

conhecido que fatores de lipo, hidro e anfifilicidade afetam a cito-localização e, conseqüentemente, a eficiência do Fs.

Compostos relativamente anfifílicos e pouco hidrofóbicos se ligam primariamente à albumina. Substâncias anfifílicas também são inseridas nos fosfolípídeos externos das lipoproteínas e compostos hidrofóbicos se localizam principalmente no núcleo lipídico interno de lipoproteínas.²⁶ Fs catiônicos podem se acumular em mitocôndrias, pois o potencial interno da membrana mitocondrial é negativo em mitocôndrias funcionantes, atraindo compostos carregados positivamente.²⁷ Sendo assim, os grupos periféricos ligados ao cromóforo dos Fs desempenham papel importante na eficiência da PDT, pois podem favorecer a internalização celular e a acumulação do Fs em determinadas organelas.

Uma das propostas desse trabalho é sintetizar diversos Fs de modo a formar uma biblioteca química com esses novos compostos, onde os grupos periféricos de uma mesma estrutura fotossensibilizadora central sejam modificados. Dessa forma, os parâmetros de hidro, lipo e anfifilicidade dos Fs podem ser controlados e estudados em sistemas modelo e em parasitas de *Leishmania*.

1.3 – Riboflavina

A riboflavina (**RF**) é um Fs endógeno com características interessantes que a torna promissora para diversas aplicações em saúde humana, incluindo esterilização de derivados de sangue e tratamento de enfermidades cutâneas por terapia fotodinâmica.²⁸ Por ser funcionalizável em diferentes pontos da molécula, o uso de metodologias sintéticas que utilizam a própria riboflavina como material de partida permite que

²⁶Castano, A. P.; Deminova, T. N.; Hamblin, M. R. *Photodiag. Photodyn.Ther.***2005**, 2, 91.

²⁷ Ribeiro, A. O.; Belisle, E.; Severino, D.; Kowaltowski, A. J.; Baptista, M. S. *Photochem. Photobiol.***2004**, 79, 459.

²⁸Heaselgrave, W.; Kilvington, S. *Appl. Environ. Microbiol.***2010**, 76, 6010.

diversos grupamentos químicos sejam inseridos na molécula. Parâmetros como solubilidade, coeficiente de partição e afinidade por membranas biológicas podem ser controlados através dessas modificações estruturais utilizadas. Outra característica importante é que, por serem derivados de um composto endógeno, espera-se baixa toxicidade no escuro para esses compostos flavínicos. Essa classe de substâncias apresenta múltiplas funções nos organismos e estão envolvidas em diversos processos químicos e fotoquímicos. Portanto, serão discutidos os aspectos gerais, fotoquímicos e fotofísicos dessa classe de compostos para contextualizar a importância dos mesmos como fotossensibilizadores.

1.3.1 – Aspectos gerais da riboflavina

A riboflavina, também conhecida como vitamina B₂, é um fotossensibilizador endógeno e desempenha papéis essenciais nos organismos aeróbicos.²⁹ Sua estrutura química apresenta uma cadeia ribitol ligada ao sistema de anéis isoaloxazina, conforme representado na figura 1.3.

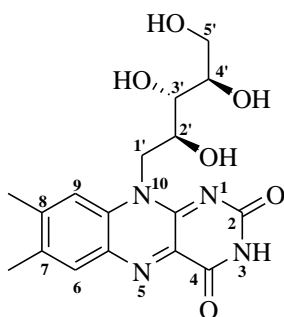


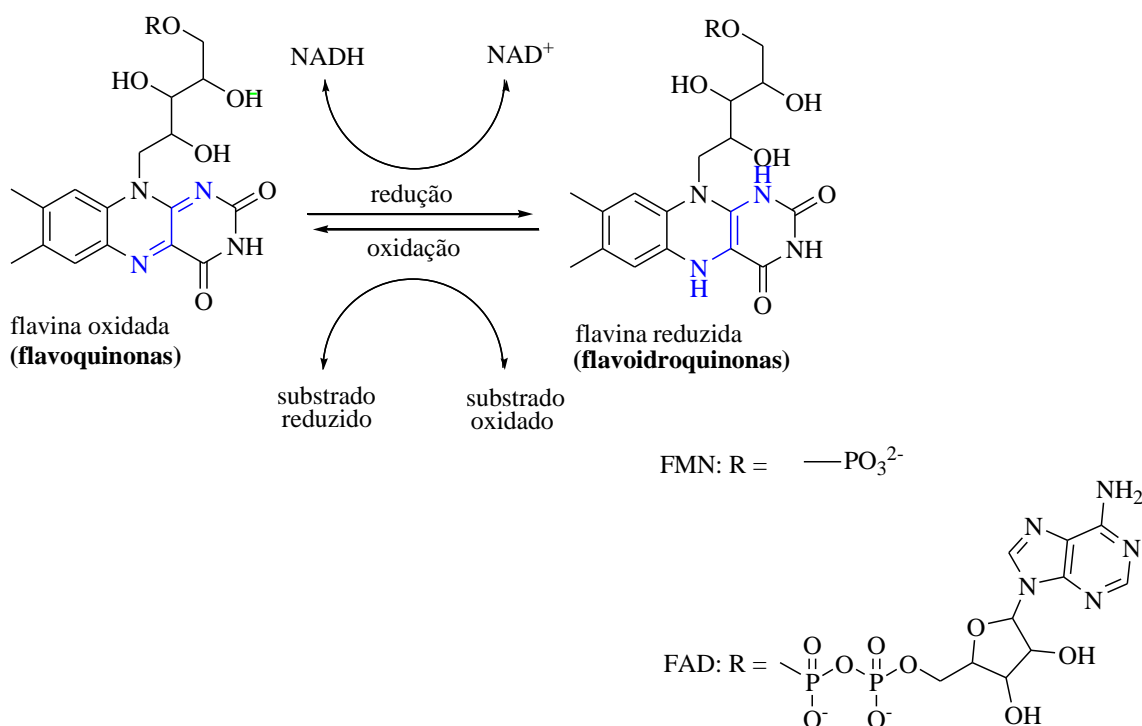
Figura 1.3: Estrutura química da riboflavina.

Essa substância é precursora na biossíntese de coenzimas flavinas, tais como flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina dinucleotídeo (FAD).³⁰ As flavinas são fundamentais em diversas reações bioquímicas necessárias para a sobrevivência e a

²⁹ Müller, F. In: **Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes**, vol.1, CRC Press, Boca Raton, FL, **1991**.

³⁰ Massey, V. *Biochem.Soc. Trans.* **2000**, 28, 283.

manutenção dos seres vivos. Dessa forma, integra a maioria das vias metabólicas promovendo reações de oxi-redução, além de exercer papel fundamental na fotossíntese, na redução do oxigênio molecular da cadeia respiratória e nos processos fotoinduzidos como a recuperação de danos causados ao DNA.^{30,31} Essas funções metabólicas das flavinas ocorrem através do equilíbrio existente entre as espécies reduzidas (flavoidroquinonas) e oxidadas (flavoquinonas), como representada no esquema 1.3.



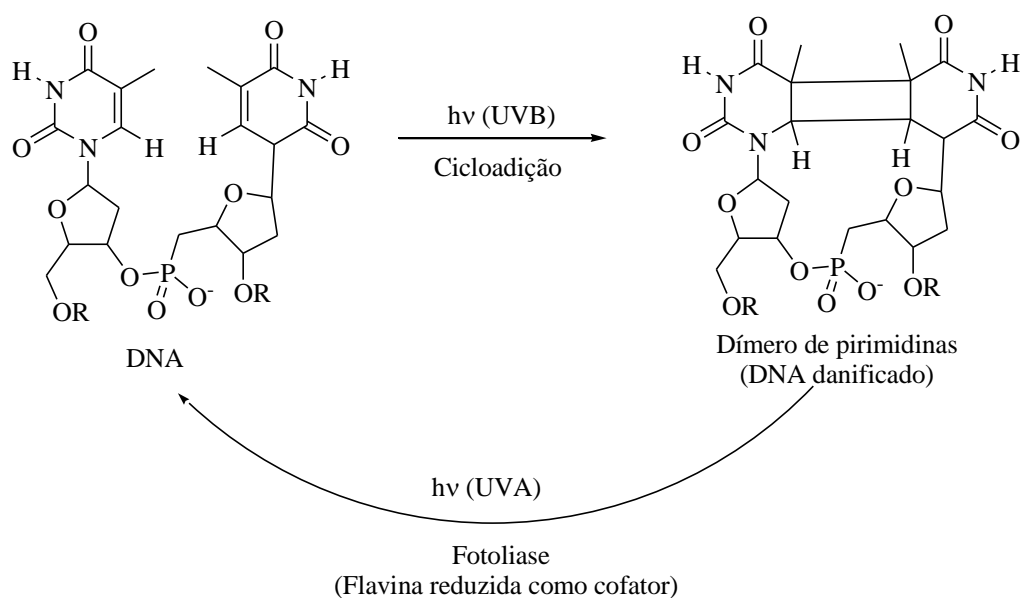
Esquema 1.3: Principais estruturas químicas das flavinas que participam dos processos biológicos.

Na maioria dos casos, a flavina se encontra ligada covalentemente à enzima que faz uso de cofatores como o NAD⁺ e o NADH para regenerar, respectivamente, as espécies flavoidroquinonas e flavoquinonas (esquema 1.3).^{30,31} É importante mencionar que além dessas duas formas, as flavinas atuam cataliticamente através da espécie radicalar, semireduzida, flavo-semiquinona.^{30,31}

Essas propriedades redox das flavinas têm relação também com as suas atividades fisiológicas na presença de luz. Como exemplo, pode-se mencionar a

³¹Souza, A. C. S.; Ferreira, C. V.; Jucá, M. B.; Aoyama, H. *Quim. Nova* **2005**, 28, 887.

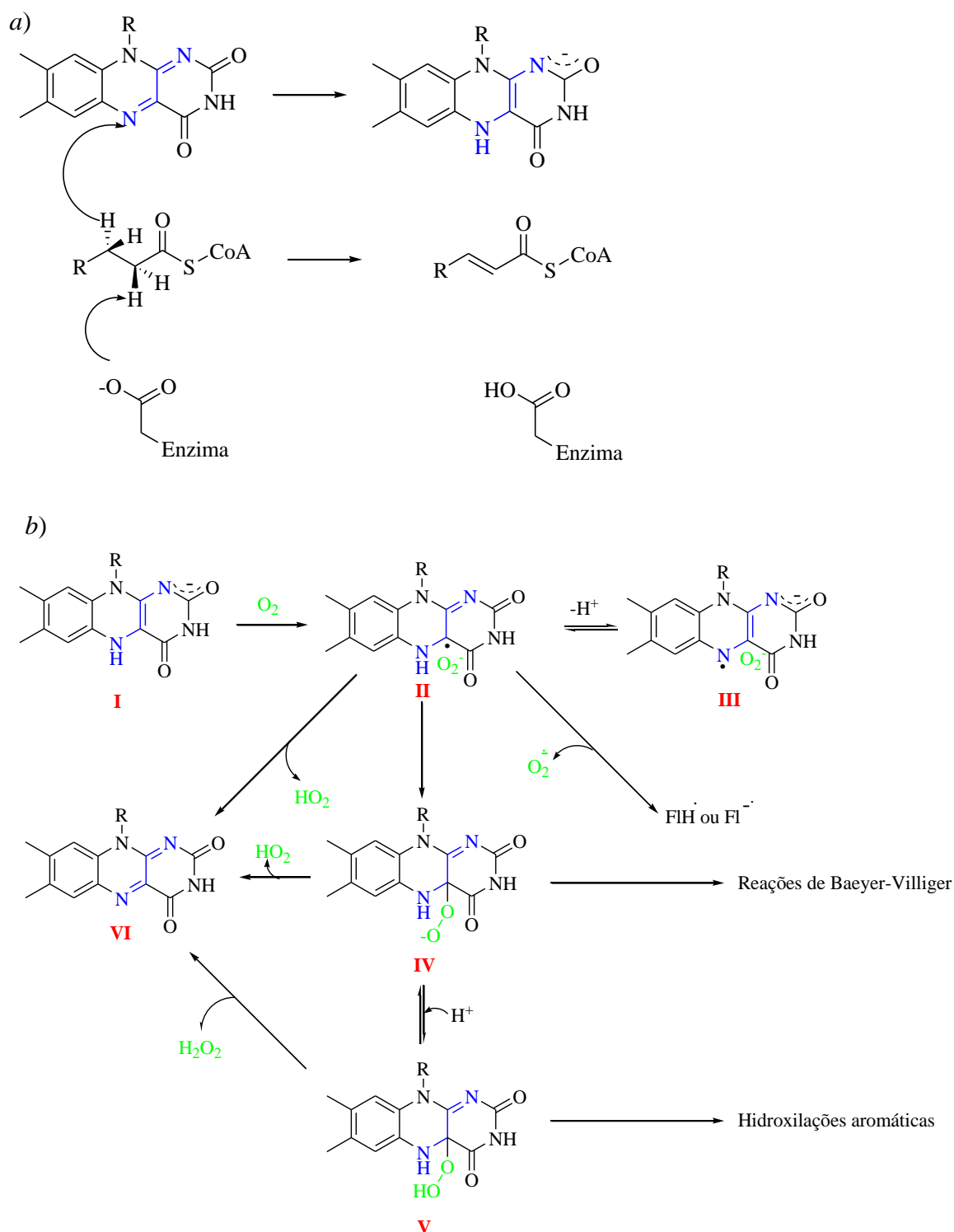
atividade da enzima fotoliase, que possui flavina como cofator e atua como mecanismo de defesa do organismo removendo dímeros de pirimidina.³² Dímeros de pirimidina são formados, principalmente, pela exposição do DNA à luz UVB. Esses dímeros não se encaixam bem na dupla-hélice do DNA, o que ocasiona problemas na replicação e expressão gênica. A enzima fotoliase reconhece e se liga ao dímero de pirimidina. Após a absorção luminosa da fotoliase e subsequente ativação da flavina, ocorre a transferência de um elétron da flavina (na forma hidroquinona) para o dímero, iniciando uma reação radicalar que repara o dano causado ao DNA através da sua reconversão em monômeros (esquema 1.4).³²



Esquema 1.4: Dano causado pela luz UVB (280-315 nm) nos anéis pirimidíneos da molécula de DNA e reparo através de fotolases (adaptado de Heelis *et al.*³²).

As flavoidroquinona e flavoquinona participam do metabolismo envolvendo-se em reações químicas com mecanismos distintos. Essas reações enzimáticas ocorrem através da reação direta do cofator com o substrato ou por intermediação do oxigênio molecular, como mostrado no esquema 1.5.³⁰

³² Heelis, P. F. *Chem. Soc Rev.* **1995**, 289.



Esquema 1.5: Reações metabólicas que fazem uso de flavinas. a) oxidação da acil-CoA através de flavoquinonas; b) reações da flavoidroquinona com oxigênio.

De acordo com o esquema 1.5a, a redução da Acil-CoA ocorre através da doação de um hidreto do substrato para o N-5 da flavoquinona (assistida por um resíduo básico da enzima), levando à formação da flavohidroquinona e do substrato oxidado. No

mecanismo mostrado no esquema 1.5b, no sítio ativo da enzima, ocorre primeiramente a reação entre a flavoidroquinona e o oxigênio molecular, levando à formação das espécies peroxirriboflavina (IV) ou hidroperóxido (V). Esses intermediários (IV e V) são instáveis em meio aquoso, mas no sítio ativo das flavoenzimas, como por exemplo, nas monooxidases, apresentam elevada estabilidade. As monooxidases fazem uso desses intermediários (peróxidos) para catalisar reações metabólicas de oxidação, como por exemplo, oxidações de Baeyer-Villiger e hidroxilações aromáticas.

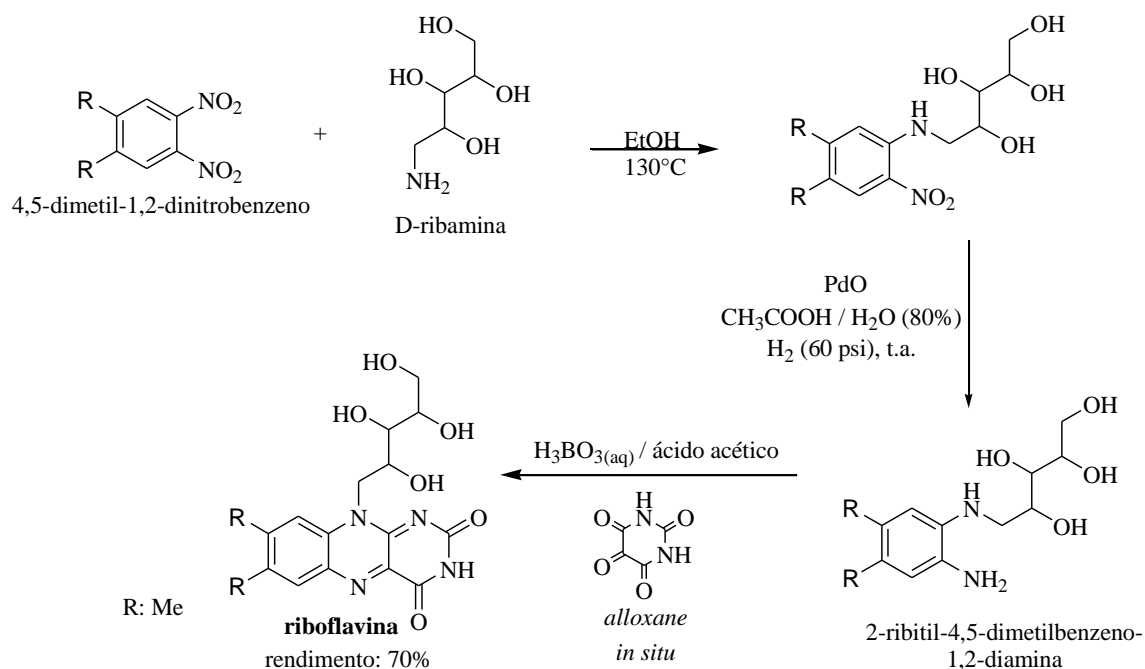
De um modo geral, através da interconversão entre a flavoquinona e a flavoidroquinona, formam-se agentes redutores e oxidantes (respectivamente) utilizados no meio celular em reações metabólicas de oxido-redução. As flavinas se envolvem nesses processos redox através da doação ou da recepção de 2 prótons e 2 elétrons. A redução da flavoquinona ocorre em duas etapas: ao receber 1 próton e 1 elétron se transforma em flavosemiquinonas (uma espécie radicalar), que ao reagir com outro próton e outro elétron origina flavoidroquinonas.

Devido aos diferentes tipos de reações químicas e fotoquímicas que as flavinas estão envolvidas (reações de oxidação, de redução, de foto-oxidação, radicalar), diversos grupos de pesquisa vêm sintetizando derivados flavínicos para diferentes aplicações.

1.3.2 – Síntese de flavinas

A riboflavina foi primeiramente sintetizada por Kuhn *et al.* em 1934.³³ Essa metodologia é muito versátil e é, na atualidade, considerada como um método genérico para a síntese de aloxazinas e isoaloxazinas com diferentes substituintes (esquema 1.6).

³³Kuhn *et al.* *Ber.* **1934**, 67, 1460.

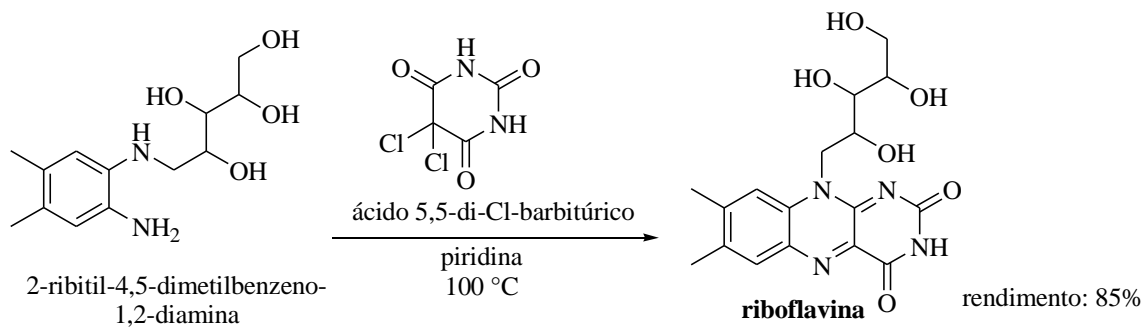


Esquema 1.6: Síntese da riboflavina descrita por Kuhn *et al.* em 1934.³³

De acordo com o esquema 1.6, na primeira etapa do protocolo, pode-se variar também a cadeia ribitol do derivado. Por exemplo, a inversão dos centros quirais da riboflavina pode ser realizada através da introdução da L-ribamina na primeira etapa da síntese mostrada no esquema 1.6. A etapa chave na formação da riboflavina consiste na reação de condensação entre a diamina (contendo o grupo ribitol) com o *alloxane*.

Kuhn *et al.* estudaram diferentes metodologias de formação de flavinas e estes autores afirmaram em meados de 1930 que o método mostrado no esquema 1.6 era o único método “genérico” para se obter flavinas.³⁴ Dentre as metodologias estudadas por esses autores, pode-se citar a reação entre a *orto*-benzeno-diamina e o ácido 5,5-di-Br-babitérico. No entanto, em 1945, ao contrário do afirmado por Kuhn *et al.*, Tishler *et al.* mostraram que aloxazinas e isoaloxazinas podem ser preparadas através de reações entre *orto*-benzeno-diaminas e ácidos barbitúricos halogenados como mostrados no esquema 1.7.³⁴

³⁴Tishler, M.; Wellman, J. W.; Ladenburg, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 2105.



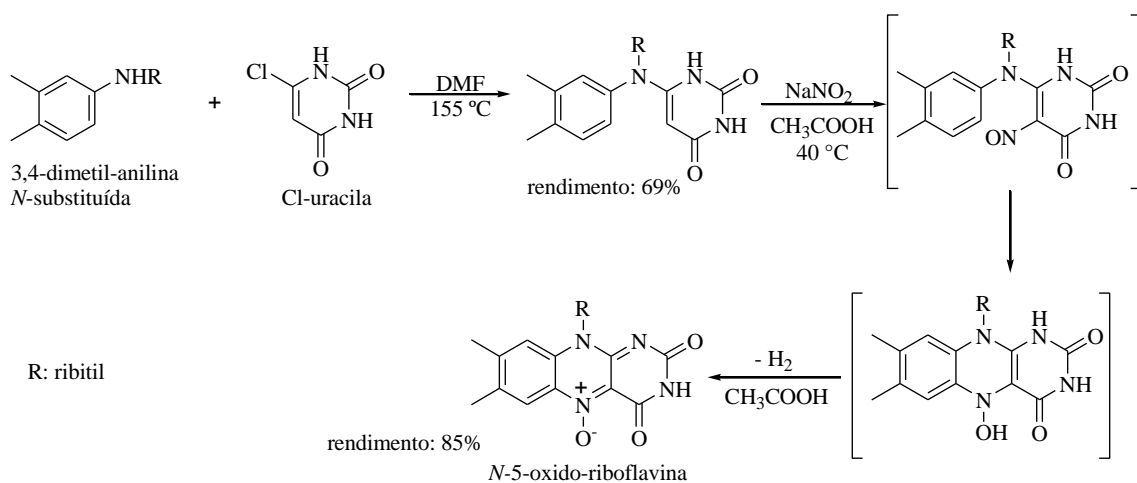
Esquema 1.7: Síntese da riboflavina através da condensação de di-aminas aromáticas com derivados clorados do ácido barbitúrico.

O composto 2-ribitol-4,5-dimetilbenzeno-1,2 diamina pode ser obtido de acordo com o esquema 1.6. De um modo semelhante ao mostrado no esquema 1.6, ocorre a condensação entre a diamina e o ácido 5,5-di-Cl-barbitúrico. Tishler *et al.* explicam que quando testaram a metodologia com os mesmos reagentes utilizados por Kuhn *et al.* (ácidos barbitúricos bromados), foi obtido apenas traços do produto.³⁴ Por outro lado, quando realizaram a reação utilizando o ácido 5-di-Cl-barbitúrico a formação das flavinas ocorreu com excelentes rendimentos.³⁴ Foi relatado também que grupos metilas ligados ao anel aromático da *orto*-benzeno-diaminas aumentam os rendimentos dessas reações. Os autores deste trabalho atribuem o baixo rendimento obtido por Kuhn *et al.*, devido ao diferente mecanismo reacional seguido pelos ácidos barbitúricos bromados que, nesse caso, reagem preferencialmente por bromação da *orto*-benzeno-diamina.³⁴

Diversas metodologias para sintetizar derivados flavínicos foram desenvolvidas baseadas em reações de condensação. Dentre esses protocolos pode-se mencionar a condensação (i) de anilinas com ácido violúrico, (ii) de *orto*-benzoquinonas com 5,6-diaminopirimidinas, (iii), de biacetil diméricos com diaminouracilas, (iv) de quinoxalinas com guanidinas e (v) de anilinas com 6-haleto-uracilas.³⁵ Yoneda *et al.* desenvolveram uma metodologia para sintetizar isoalloxazinas *N*-5-óxido

³⁵Lambooy, J. P. *Heterocycl. Compd.* **1967**, 9, 118.

substituídas a partir de *N*-alquil-anilinas e 6-alquil-amino-uracilas de acordo com o esquema 1.8.³⁶



Esquema 1.8: Síntese de *N*-5-oxido riboflavina através da condensação de anilinas substituídas com 6-Cl-uracila.

A síntese da *N*-5-oxido-riboflavina inicia-se com a condensação de uma anilina com a uracila halo-substituída. O produto de condensação formado na primeira etapa sofre nitrosilação levando à formação do intermediário substituído com o grupo nitroso. Esse intermediário rapidamente sofre reação de ciclização e com posterior perda de gás hidrogênio leva à formação da *N*-5-oxido-riboflavina. É importante mencionar que ao tratar o produto *N*-5-oxido-riboflavina com NaS₂O₄ a própria riboflavina é obtida.

Atualmente, os protocolos sintéticos para se obter flavinas, baseiam-se nas metodologias comentadas anteriormente. No entanto, são dois os principais métodos utilizados: o da condensação entre uma diamina aromática com *alloxane*;³⁷ e o da condensação entre uma amina aromática com 6-Cl-uracila.³⁸ De forma geral, a escolha do método de síntese depende dos substituintes de interesse a ser incorporado nas flavinas.

³⁶Yoneda, F.; Sakuma, Y.; Ichiba, M.; Shinomura, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 830.

³⁷(a) Chen, S.; Hossain, M. S.; Foss Jr., F. W. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2806. (b) Singh, R.; Geetanjali, *J. serb. Chem. Soc.* **2006**, *71*, 575. (c) Choy, N.; Russell, K. C.; Alvarez, J. C.; Fider, A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1515. (d) Singh, G. R.; Chauhan, S. M. S. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 421.

³⁸(a) Dadvá *et al.* *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1066. (b) Ju, S-Y.; Papadimitrakopoulos, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 655. (c) Frier, C.; Décout, J-L.; Fontecave, M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3520.

Modificações estruturais nas porções periféricas do sistema de anéis isoaloxazinas foram, também, largamente estudadas e os análogos obtidos podem ser resumidos na figura 1.4 (adaptada de Massey *et al.*).³⁰

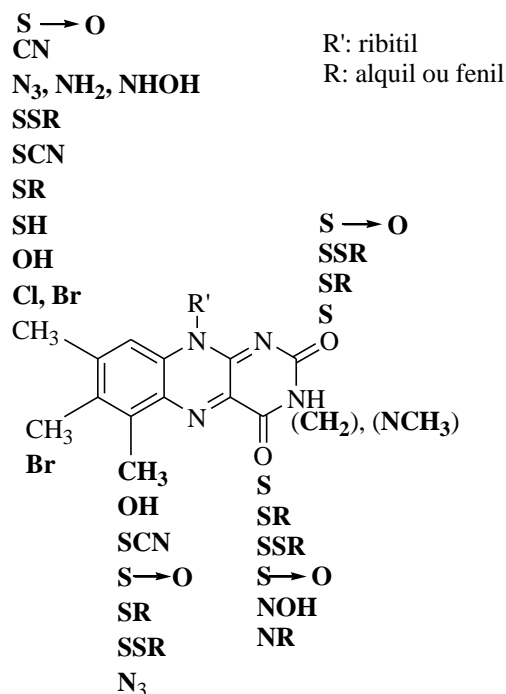
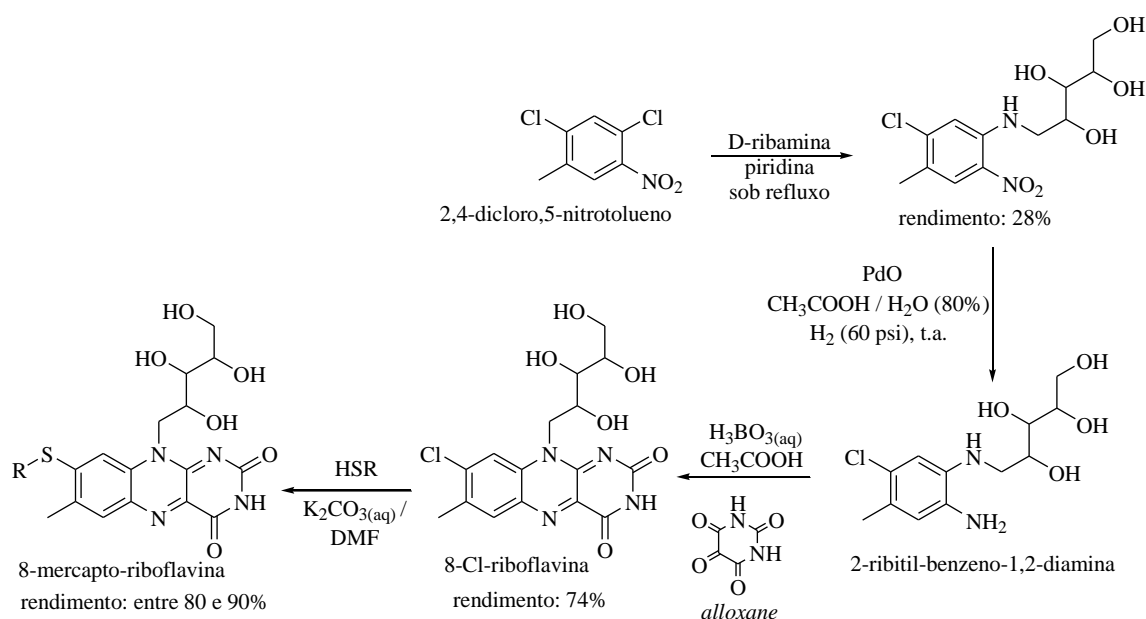


Figura 1.4: Modificações na região periférica do sistema de anéis isoaloxazina da riboflavina já efetuadas.³⁰

De acordo com Massey *et al.*, os derivados mostrados na figura 1.4 apresentam propriedades catalíticas semelhante às flavinas.³⁰ Essas modificações estruturais fazem uso de diversas etapas reacionais e geralmente envolvem a completa formação do sistema de anéis isoaloxazina. A título de exemplo vamos discutir a rota sintética para obter o derivado da riboflavina que contém o grupo mercapto (SR) na posição 8. Essa síntese se baseia na reação de condensação de orto-benzeno-diaminas com o composto *alloxane*.



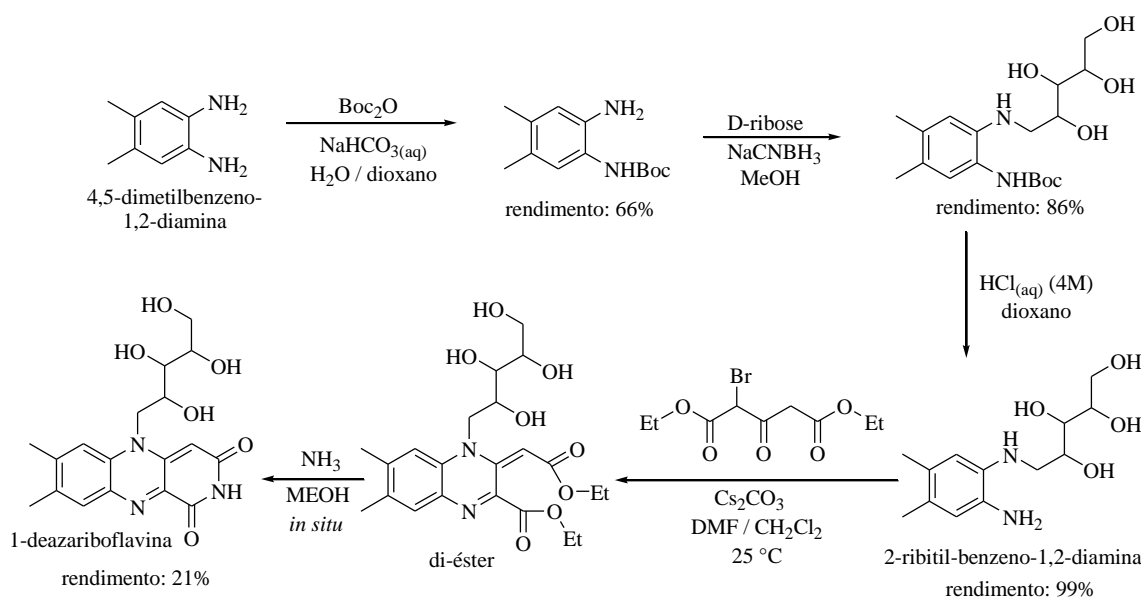
Esquema 1.9: Síntese da 8-mercapto-riboflavina utilizando a 2,4-dicloro-5-nitrotolueno como material de partida (protocolo adaptado de Lambooy *et al.*³⁹ e Moore *et al.*⁴⁵).

Essa metodologia sintética é bastante versátil, pois, variando os substituintes do material de partida (5-nitrotolueno), podem-se variar os grupos funcionais da flavina obtida. É importante mencionar que a própria riboflavina pode ser sintetizada por essa rota partindo da 2-metil,4-cloro,5-nitrotolueno (semelhante ao método de Kuhn).³³ A formação da 8-Cl-riboflavina é realizada através da formação do anel entre a 2-ribitol-benzeno-1,2-diamina e o *alloxane*. O derivado obtido (substituído com cloro) é bastante reativo ao ataque de nucleófilos como tióis e, através da substituição nucleofílica aromática, é obtido o derivado 8-mercapto-riboflavina.

Outra classe de derivados sintéticos da riboflavina comumente encontrados na literatura são as deazaflavinas.⁴³ Esses compostos apresentam um grupo metileno no lugar dos heteroátomos (*N*) do anel isoaloxazina. Mansurova *et al.* sintetizaram esses análogos contendo variações nos heteroátomos *N*-5 e *N*-1.³⁹ Nesse trabalho, foram introduzidos grupos metilenos nas posições *N*-5 e *N*-1 do sistema de anéis isoaloxazina

³⁹(a) Mansurova, M.; Koay, M. S.; Gärtner, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5401. (b) Lambooy, J. P. *Methods Enzymol.* **1971**, 18B, 437.

com a finalidade de estudar o comportamento eletroquímico dessas deazariboflavinas. Esses autores observaram que as propriedades redox dos derivados foram fortemente afetadas com essas variações. O potencial de redução das deazaflavinas no estado fundamental foi determinado como sendo -265 mV (*vs.* Ag/AgCl) para a 1-deazariboflavina e -247 mV (*vs.* Ag/AgCl) para a 5-deazariboflavina.³⁹ Esses valores são significativamente mais negativos que o mesmo valor determinado para a riboflavina (-208 mV, *vs.* Ag/AgCl).⁴⁰ As sínteses dos derivados deazariboflavina envolvem várias etapas reacionais, incluindo a reconstrução do sistema de anéis. A título de exemplo, mostramos no esquema 1.10 uma rota sintética para se obter a 1-deazariboflavina.



Esquema 1.10: Síntese da 1-deazariboflavina utilizando a 4,5-dimetilbenzeno-1,2-diamina como material de partida (adaptado de Mansurova *et al.*³⁹).

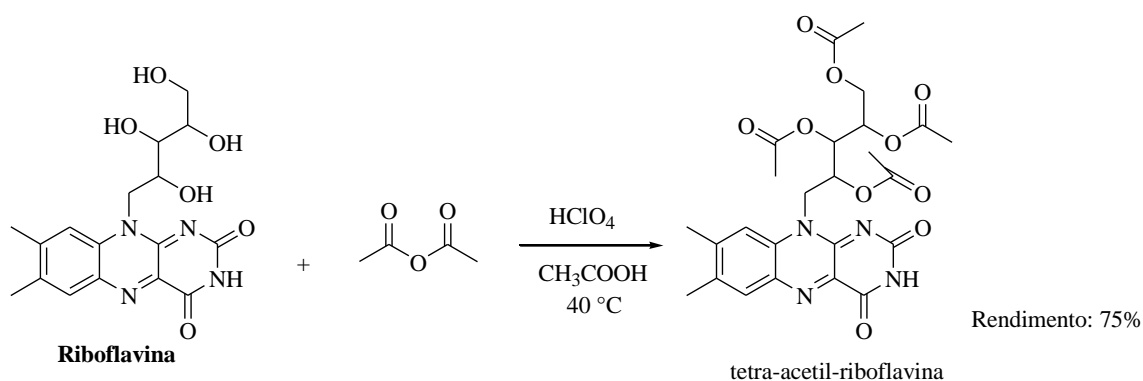
De modo oposto ao utilizado para se obter o derivado 2-Cl-riboflavina, a cadeia ribitil é introduzida na molécula benzeno-diamina (contendo os substituintes desejados) a partir da ribose. Após a desproteção do grupo amina, é obtido o composto 2-ribitil-benzeno-1,2-diamina. Através da reação dessa diamina com o alquilante bromado (alfa

⁴⁰Edmondson, D. E.; Ghisla, S. *Methods in Mol. Biol.* **1999**, 131, 157.

a um grupo carbonila) o composto di-éster é formado. A reação dos grupos di-ésteres com amônia leva à formação da 1-deazariboflavina.

Outras transformações na estrutura química da riboflavina, que envolvem a formação do núcleo isoaloxazina, são também comumente encontradas na literatura, tais como a introdução de substituintes nos *N*-3 e *N*-10 e as substituições nas posições 7 e 8.⁴¹

Uma maneira simplificada de se obter derivados da riboflavina é através da derivatização direta de sua estrutura química. Técnicas de derivatização da riboflavina são de amplo interesse, pois não envolvem multi-etapas reacionais e a riboflavina é um material de partida comercialmente disponível. As modificações dos grupos hidroxilas da cadeia ribitol da riboflavina são realizadas principalmente para aumentar a lipofilicidade do derivado.⁴² Dessa forma, Edwardset *al.* sintetizaram análogos riboflavínicos através da acilação das funções alcoóis (esquema 1.11).^{42a} Através de catálise ácida, as hidroxilas foram transformadas em ésteres em apenas uma etapa reacional com bom rendimento.^{42a} O produto éster obtido apresenta maior solubilidade em meio orgânico.

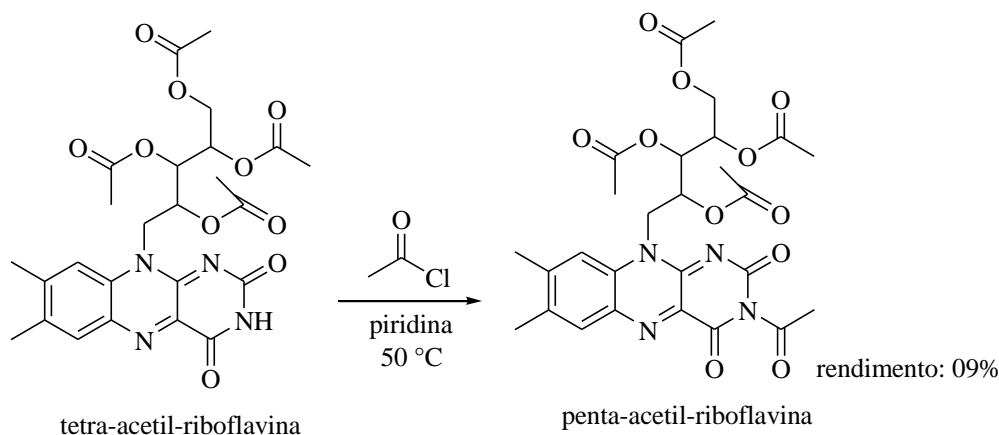


Esquema 1.11: Esterificação dos grupos hidroxilas da riboflavina.

⁴¹ (a) Cowden, W. B.; Halladay, P. K.; Cunningham, R. B. Hunt, N. H.; Clark, I. A. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1818. (b) Bruce, T. C.; Chan, T. W.; Taulane, J. P.; Yokoe, I.; Elliott, D. L.; Williams, R. F.; Novak, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6713.

⁴²(a) Edwards, A. M.; Bueno, C.; Saldaño, A.; Silva, E.; Kassab, K.; Polo, L.; Jori, G. *J. Photochem. Photobiol. B* **1999**, *48*, 36. (b) Scola-Nagelschneider, G.; Hemmerich, P. *Eur. J. BioChem.* **1976**, *66*, 567.

Outras transformações químicas que fazem uso da riboflavina como material de partida é a funcionalização do nitrogênio 3. Hemmerich *et al.* derivatizaram anéis isoaloxazina através da acilação do N-3.



Esquema 1.12: Introdução de grupo acetil no nitrogênio 3 do sistema de anéis isoaloxazina.

Devido à baixa solubilidade da riboflavina em solventes orgânicos é necessária a esterificação previa das hidroxilas antes da acilação do nitrogênio. A reação consiste em tratar a flavina com uma base na presença de um agente acilante. Essa derivatização é frequentemente realizada para aumentar a biodisponibilidade do derivado flavínico⁴³ ou para permitir conjugar outras moléculas ou grupos funcionais.⁴⁴ É importante ressaltar que as flavinas se ligam com o sítio ativo das flavoenzimas, entre outros modos, através de ligações de hidrogênio nessa porção da molécula (nitrogênio 3).⁴³

A abordagem sintética para se obter compostos flavínicos depende da aplicação, bem como, das características físicas e químicas finais do derivado. Embora o arsenal de protocolos para obtenção dessa substância seja vasto, é de interesse para a comunidade científica ampliar essas rotas e também aprimorar os métodos já existentes.

⁴³Ghisla, S.; Massey, V. *Biochem. J.* **1986**, 239, 1.

⁴⁴Banekovich, C.; Ott, I.; Koch, T.; Matuszczak, B.; Gust, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 683.

1.3.3 – Aplicações dos derivados sintéticos das flavinas

As aplicações das flavinas sintéticas são geralmente em catálise de reações orgânicas,⁴⁷ em estudos de mecanismos enzimáticos que envolvem as flavinas artificiais como sondas,^{30,45} e em processos fotodinâmicos⁴⁶. Para muitos casos, a riboflavina não pode ser diretamente aplicada em um determinado processo devido a sua baixa solubilidade tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico. A pouca solubilidade dessa vitamina é reconhecida como um problema genérico na aplicação da mesma em distintos ramos da ciência. Essa molécula endógena foi selecionada na evolução para agir ligada em proteínas e o uso em outros ambientes requer modificações, principalmente, da cadeia ribitol.

A aplicação dos derivados flavínicos em organocatálise vem sendo explorada recentemente,⁴⁷ e as principais reações catalisadas pelas flavinas são do tipo redox, dentre as quais podemos destacar a redução de duplas ligações carbono-carbono (mediadas por hidrazina e oxigênio)⁴⁸ e as reações de oxidações, como oxidação de Dakin.³⁷ Foi desenvolvido por Bäckvall *et al.* um método brando de síntese de *N*-óxido aminas catalisadas por um derivado da riboflavina.⁴⁹ Murray *et al.* sintetizaram, também, um derivadocatiônico da riboflavina com atividades catalíticas frente à oxidação de aldeídos na presença de peróxido de hidrogênio.⁵⁰ É importante ressaltar que, devido à alta reatividade, o derivado catiônico da riboflavina mencionados acima é instável em meio aquoso. Derivados da riboflavina também foram utilizados como

⁴⁵ Moore, E. G.; Ghisla, S. Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 8173.

⁴⁶ Muñoz, M. A.; Pacheco, A.; Becker, M. I.; Silva, E.; Ebensperger, R.; Garcia, A. M.; De Loannes, A. E.; Edwards, A. M. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2011**, 103, 57.

⁴⁷ (a) Gelalcha, F. G. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3338. (b) Imada, Y.; Naota, T. *The Chem. Rec.* **2007**, 7, 354.

⁴⁸ Smit, C.; Fraaije, M. W.; Minnaard, A. J. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 9482.

⁴⁹ Bergstad, K.; Bäckvall, J-E. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6650.

⁵⁰ Murray, A. T.; Matton, P.; Fairhurst, N. W. G.; John, M. P.; Carbery, D. R. *Org. Lett.* **2012**, 14, 3646.

catalisadores em reações mediadas por luz, por exemplo, na foto-oxidação de metilbenzenos, estirenos e entre outras substâncias.⁵¹

Além das aplicações em outras áreas, a riboflavina vem sendo aplicada na área biomédica como Fs em diversos protocolos de terapia fotodinâmica.³¹ Outras aplicações em processos fotodinâmicos como por exemplo, a fotodegradação de resíduos contendo alcoóis benzílicos⁵² ou no tratamento de resíduos aquosos⁵³ vem, também, sendo exploradas. A aplicação da riboflavina em PDT será discutida no item 1.3.5.

1.3.4 – Aspectos fotoquímicos e fotofísicos da riboflavina

O sistema de anéis isoaloxazina é responsável pelas propriedades fotofísicas e fotoquímicas da riboflavina. Essa substância interage eficientemente com energia luminosa, gerando espécies eletronicamente excitadas com características físico-químicas diferentes daquelas encontradas em seu estado fundamental. O espectro de absorção da riboflavina (flavoquinona) tem três máximos principais nas regiões espectrais do UVB (267 nm), com coeficiente de absortividade molar (ϵ) de $33,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; do UVA (345 nm) com ϵ de $10500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; e na região do visível (442 nm) com ϵ de $10850 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (figura 1.5).⁵⁴ A riboflavina apresenta também um espectro de fluorescência importante com máximo em 532 nm com rendimento quântico de 0.28 em água (figura 1.5).⁵⁵

⁵¹Lechner, R. Kümmel, S.; König, B. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, 9, 1367.

⁵²Tatsumi, K.; Ichikawa, H.; Wada, S. *J. Contam. Hydrol.* **1992**, 9, 207.

⁵³(a) Remucal, C. K.; McNeill, K. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45, 5230. (b) Larson, R. A.; Stackhouse, P. L.; Crowley, T. O. *Environ. Sci. Technol.* **1992**, 26, 1792.

⁵⁴(a) Du, H.; Fuh, R. A.; Li, J.; Corkan, A.; Lindsey, J. S. *Photochem. Photobiol.* **1998**, 68, 141. (b) Koziol, J. *Photochem. Photobiol.* **1966**, 5, 41.

⁵⁵Drossler, P.; Holzr, W.; Penzkofer, A.; Hegemann, P. *Chem. Phys.* **2003**, 286, 409.

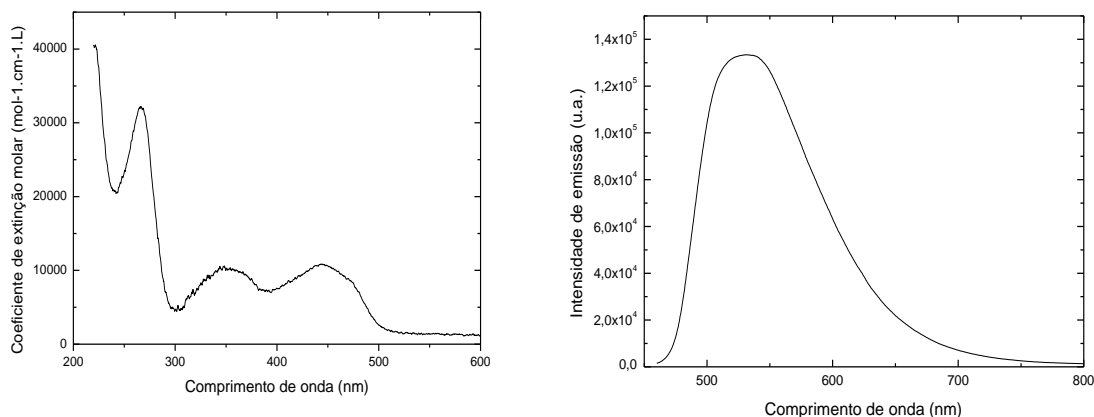
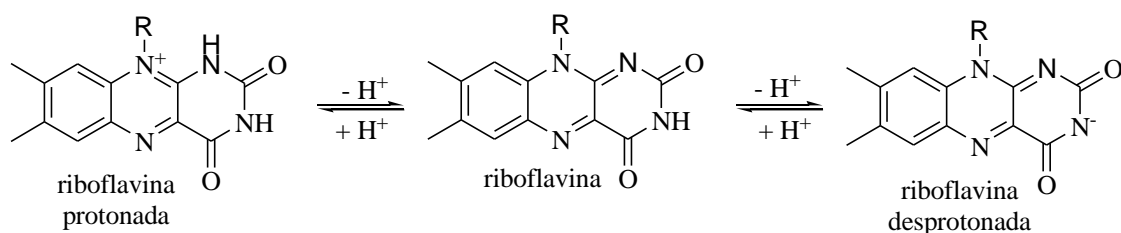


Figura 1.5: Espectros de absorção e emissão da riboflavina em água (temperatura ambiente; 0,1 mM).

É importante mencionar que o espectro de absorção e emissão das flavinas variam significativamente de acordo com o estado de oxidação em que o sistema de anéis isoaloxazinas se encontra (flavoquinona, semiquinona e hidroquinona).³⁰ Por exemplo, a riboflavina na forma flavoidroquinona apresenta reduzido valor de ϵ no visível (442 nm).³⁰ Por outro lado, a forma flavosemiquinona (da **RF**) apresenta absorvância no visível com máximo em torno de 600 nm.³⁰ Os espectros de absorção e emissão das flavinas são também afetados de acordo com o pH do meio, que essas substâncias se encontram.

Drössler *et al.* estudaram os espectros de absorção e emissão da forma flavoquinona da riboflavina em soluções aquosas com valores de pH entre -1,09 e 13,35.⁵⁶ Dependendo do valor do pH do meio, a espécie flavoquinona pode existir através de um equilíbrio de três espécies (esquema 1.13).

⁵⁶Drössler, P.; Holzer, W.; Penzkofer, A.; Hegemann, P. *Chem. Phys.* **2002**, 282, 429.



Esquema 1.13: Equilíbrio entre espécies da riboflavina (flavoquinona) em meio aquoso.

Em solução aquosa essas três formas estão em equilíbrio. Em pH menor que 0,4 a forma protonada da riboflavina é predominante. A forma neutra é predominante entre os valores 0,4 e 9,75 de pH.⁵⁶ A forma desprotonada é predominante em pH maior que 9,75. As formas neutras e a desprotonada da riboflavina apresentam espectros de absorção semelhantes entre si. Por outro lado, a espécie protonada (na região entre o UVA e visível) apresenta apenas um máximo de absorção situado próximo de 400 nm.⁵⁶ As variações na fluorescência da riboflavina de acordo com o pH são melhor resumidas através do equilíbrio mostrado no esquema 1.13. A título de exemplo o valor do rendimento quântico de fluorescência da riboflavina em pH 1 é de 0,013. Esse valor, em pH 7, aumenta para 0,27 e, em valores de pH acima de 13, a eficiência de emissão (ϕ_F) diminui para 0,0018.⁵⁶

Após a absorção luminosa, o estado excitado da riboflavina sofre cruzamento entre sistemas (ISC), formando a espécie eletronicamente excitada triplete (3RF). No caso de riboflavina em água, o rendimento quântico de formação de triplete é de 0,67, indicando que uma importante fração das moléculas (~70%) que absorvem fótons sofre ISC, formando tripletes.⁵⁷ Uma vez formadas, essas espécies tripletes podem fotossensibilizar a produção de oxigênio singlete ($\phi_\Delta = 0,50$ em água),⁵⁸ bem como, a

⁵⁷ Grodowski, M. S. B. *Photochem. Photobiol.* **1977**, 26, 341.

⁵⁸ Song, P. S.; Moore, T. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 6507.

formação de outras espécies radicalares.⁵⁹ Devido a essas características fotoquímicas, e por estarem presentes em seres vivos de forma geral, as flavinas são peças fundamentais no entendimento de processos foto-oxidativos envolvidos em diversos ramos da atividade humana, desde a produção e estocagem de alimentos⁶⁰ até os danos na pele induzidos pela exposição ao sol.²³ Portanto, apesar de sua importância como cofator, as flavinas são fotossensibilizadores endógenos que estão relacionados com o foto-envelhecimento e o câncer de pele.²³ Além disso, podem ser muito úteis como Fs para terapia fotodinâmica.

1.3.5 – Riboflavina em terapia fotodinâmica

A habilidade da **RF** de formar espécies reativas de oxigênio ROS (*reactive oxygen species*) em meio celular vem sendo aplicada, por vários grupos de pesquisa, no tratamento de diversas enfermidades por terapia fotodinâmica. Sato *et al.* utilizaram a riboflavina como fotossensibilizador para tratar a doença de pele “*Blue Nevus*”.⁶¹ Bouellaguet *et al.* aplicaram a riboflavina como fotossensibilizador para curar infecções causadas por bactérias em canais dentários.⁶² Queiroset *al.* têm demonstrado em diversas publicações a possível aplicação da riboflavina como fotossensibilizadora na indução de morte de células tumorais e na sinalização celular envolvida.⁶³ Foi demonstrado que células tumorais murinas NOS/2 e H-L60 morrem quando expostas à irradiação UVA na presença de **RF**.^{42a}

⁵⁹ (a) Kim, H.; Kirschenbaum, L. J.; Rosenthal, L.; Riesz, P. *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 777. (b) Gutiérrez, I.; Criado, S.; Bertolotti, S.; García, N. A. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2001**, *62*, 133.

⁶⁰ Kim, T. S.; Decker, E. A.; Lee, J. *Food Chem.* **2012**, *133*, 68.

⁶¹ Sato, K.; Sakakibara, N.; Hasegawa, K.; Minami, H.; Tsuji, T. *J. Dermatol. Sci.* **2000**, *23*, 22.

⁶² Bouillaguet, S.; Owenb, B.; Watahac, J. C.; Campod, M. A.; Langed, N.; Schrenzel, J. *Dent. Mat.* **2008**, *24*, 1070.

⁶³ Queiros, S.; K. C.; Zambuzzi, W. F.; Souza, A. C. S.; da Silva, R. A. Machado, D.; Justo, G. Z.; Carvalho, H. F.; Peppelenbosch, M. P. Ferreira, C. V. *Cancer Lett.* **2007**, *258*, 126.

A riboflavina também pode ser utilizada como fotossensibilizador para desinfecção de bolsas de sangue.⁶⁴ Inclusive, em relação à desinfecção do sangue, foi demonstrado que, na presença de luz, a riboflavina eliminou os parasitas da leishmaniose com elevada eficiência em bolsas para doação de sangue.⁶⁵

Apesar dessas aplicações da riboflavina, a utilização desses compostos como fotossensibilizador apresenta diversas desvantagens, tais como baixa solubilidade em meio aquoso e orgânico, pronunciada foto-instabilidade e baixa afinidade por tecidos celulares. Além disso, as flavinas naturais estão normalmente ligadas em proteínas e outras estruturas celulares, tornando difícil o controle de localização celular. Por isso há uma elevada importância em se preparar séries de derivados da riboflavina onde as propriedades físico-químicas e de citolocalização possam ser controladas.

Um estudo que correlacione eficiência de morte celular fotoinduzida com a estrutura química dos derivados sintéticos da riboflavina é de suma importância para entender fenômenos fotodinâmicos e tornar essa classe de substância fotossensibilizadores de elevada eficiência. É importante mencionar também, o elevado potencial que esses Fs endógenos apresentam no tratamento de leishmaniose cutânea por PDT. Como comentado anteriormente, espera-se baixa toxicidade no escuro para esses Fs e, de acordo com as transformações químicas realizadas na estrutura da riboflavina, pode-se aumentar a afinidade dos mesmos pela *Leishmania*.

Em relação à necessidade de desenvolver métodos capazes de dosar níveis de antimônio em *Leishmania* para monitorar a seleção de parasitas antimônio-resistentes, faz-se necessária a introdução de uma nova classe de compostos. Isso ocorre porque as flavinas não apresentam características atrativas como sensores moleculares, principalmente, devido ao curto tempo de vida de fluorescência (ordem de poucos ns)

⁶⁴Wainwright, M. *Chem. Soc. Rev.***2002**, *31*, 128.

⁶⁵Cardo, L. J.; Rentas, F. J.; Ketchum, L.; Salata, J.; Harman, R.; Melvin, W.; Weina, P. J.; Mendez, J.; Reddy, H.; Goodrich, R. *Vox. Sang.***2006**, *90*, 85.

desses compostos. Com a finalidade de criar novos sensores químicos de antimônio, torna-se necessário explorar a química de compostos luminescentes com elevado tempo de vida, como por exemplo, os complexos de Ru (II). Nesse contexto, foi traçado a segunda proposta deste trabalho que consiste na utilização de complexos de Rutênio (II) como sensores luminescentes de antimônio.

1.4 – Sensores luminescentes baseados em complexos de Ru (II) polipiridinas

Complexos de Ru (II) polipiridinas são pigmentos que apresentam um íon rutênio (II) central coordenado a ligantes polipiridinas. O Ru^{2+} é um íon metálico que apresenta o orbital d de maior energia semi-preenchido. Os ligantes polipiridinas são compostos geralmente incolores que apresentam orbitais σ e π (ligantes e antiligantes). Em um diagrama de orbitais moleculares (Figura 1.6), estão representados os tipos de transições eletrônicas que podem ocorrer após a interação do complexo de Ru (II) com luz.⁶⁶

⁶⁶Balzani, V.; Campagna, S. In: *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I*, Springer, Leipzig, Germany, 2007.

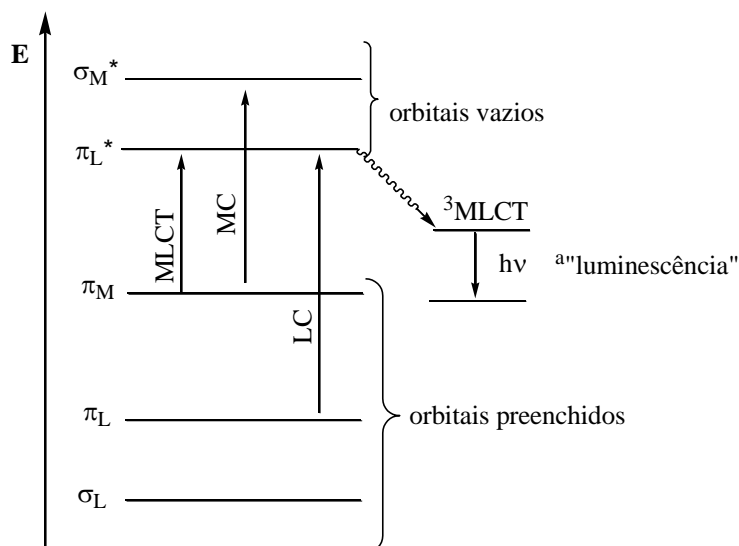


Figura 1.6: Diagrama simplificado dos orbitais moleculares de complexos de Ru (II) polipiridinas.^{66a} Luminescência é o fenômeno pela qual uma molécula absorve luz (UV, visível) promovendo um elétron para o orbital de maior energia gerando uma nova espécie eletronicamente excitada que decai para o estado fundamental através da emissão de um fóton de luz (com comprimento de onda específico).⁶⁷ Processos luminescentes são divididos em fluorescência (espécie emissora singlete) e fosforescência (espécie emissora tripleto).

Esses complexos absorvem luz no visível promovendo um elétron do orbital do metal (π_M) para o orbital π^* do ligante (π_L^*) levando à formação da espécie excitada $^1\text{MLCT}$ (transferência de carga metal-ligante) que pode sofrer ISC e formar a espécie excitada de menor energia $^3\text{MLCT}$. Uma vez formada o tripleto, pode ocorrer a desativação dessa espécie excitada de forma radioativa (emissão) ou não-radioativa (calor); ou a espécie $^3\text{MLCT}$ pode promover reações de oxirredução. A promoção do elétron π do metal (π_M) para σ_M^* leva a formação do estado excitado MC (metal-centrado). O estado excitado LC (ligante-centrado) é formado através da promoção de um elétron π do ligante (π_L) para o π_L^* . Todos os estados excitados mencionados podem formar tripletes e, para a maioria dos complexos de Ru (II) polipiridina, o estado

⁶⁷Settle, F. In: **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**, Prentice-Hall, New Jersey, USA, 2004.

eletronicamente excitado de menor energia é o $^3\text{MLCT}$ e essa espécie apresenta largo tempo de vida e intensa luminescência.

Os sensores luminescentes se destacam dentre os outros métodos analíticos pela simplicidade das análises e pelo baixo limite de detecção atingido.⁶⁸ Outras vantagens podem ser destacadas como o rápido tempo de resposta das análises e as possibilidades de desenvolver aplicações biológicas e médicas.⁶⁹ Como não é uma técnica invasiva, ela permite gerar imagens em tempo real de células e tecidos biológicos.⁶⁹ A parte central dessa modalidade de sensores consiste de moléculas que contém grupos luminóforos que sofrem perturbações na presença de substâncias que se deseja quantificar (analito) (figura 1.7).

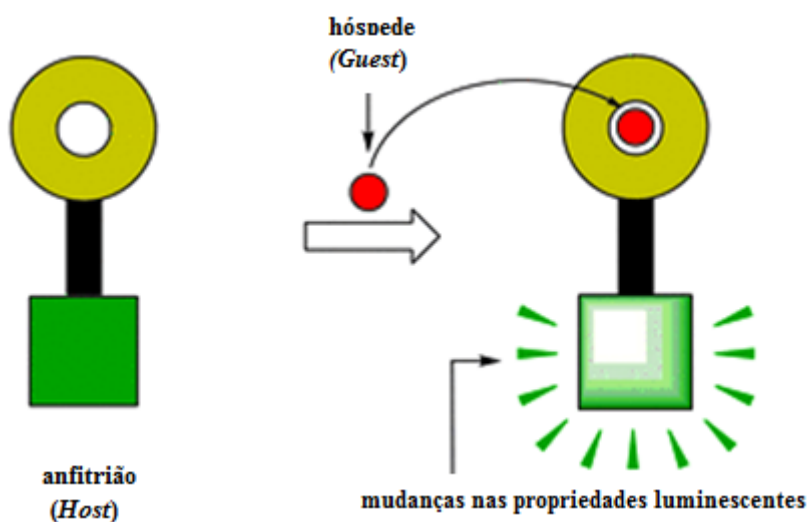


Figura 1.7: Mecanismo geral do funcionamento de sensores luminescentes

De acordo com a figura 1.7, o sensor químico, também chamado de anfitrião (do inglês *host*), interage com o analito, denominado hóspede (do inglês *guest*), de modo que o produto dessa interação leva a variações nas propriedades luminescentes do sensor que podem ser mensuradas. Os sensores luminescentes podem ser

⁶⁸ (a) Kim, H. N.; Lee, M. H.; Kim, H. J.; Kim, J. S.; Yoon, J.; *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1465. (b) Ji, H. F.; Brown, G. M.; Dabestani, *Chem. Comm.* **1999**, 609. (c) Beer, P. D. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 71.

⁶⁹ (a) Aslan, K.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Matveeva, E.; Lakowicz J. R.; Geddes, C. D. *Curr. Opin. Biotech.* **2005**, *55*, 16. (b) Aslan, K.; Lakowicz J. R.; Geddes, C. D. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 926.

classificados em três tipos:⁷⁰ (i) tipo 1, onde o luminóforo sofre supressão da emissão através da colisão com o analito (por exemplo O₂); (ii) tipo 2, onde o luminóforo se liga ao analito de forma reversível levando à supressão da emissão ou a um aumento na luminescência provocado por essa interação; (iii) tipo 3, onde o luminóforo está conectado com uma unidade receptora do analito e essa unidade, ao interagir com o analito, causa perturbações fotoinduzidas ao luminóforo. Os principais mecanismos que levam a variações na luminescência dos sensores são:⁷¹ (i) transferência de elétron fotoinduzido (do inglês *Photoinduced Electron Transfer*, PET); (ii) transferência de próton no estado excitado (do inglês, *excited state proton transfer*); (iii) transferência de energia no estado excitado (do inglês, *excited state energy transfer*); (iv) formação de excímeros e exciplex (do inglês, *excimer and exciplex formation*); (v) transferência de carga fotoinduzida (do inglês, *Photoinduced Charge Transfer*, PCT).

Dentro das inúmeras classes de sensores luminescentes, complexos de Ru (II) poliazaaromáticos são provavelmente as que mais apareceram em destaque na última década.⁷² Desde 1959, quando o complexo luminescente tris(2,2'-bipiridina)rutênio(II) ([Ru(bip)₃]²⁺) foi descrito na literatura pela primeira vez,⁷³ essa classe de substância tem sido estudada e aplicada em diversos ramos da atividade humana. Como exemplo pode-se mencionar aplicações como reagentes analíticos quimio-luminescentes,⁷⁴ sensores ópticos,⁷² agentes terapêuticos⁷⁵ entre outras.⁷⁶ Esse grande interesse por complexos de Ru (II) poliazaaromáticos ocorre devido às suas propriedades únicas em termos de

⁷⁰ Valeur, B. In: **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**, Wiley VCH, Weinheim, Germany, 2001.

⁷¹ Lakowicz, J. R. In: **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 3^a ed., Springer, 2006.

⁷² (a) Orellana, G.; García-Fresnadillo, D. In: **Optical Sensors: Industrial, Environmental and Diagnostic Applications**; Narayanaswamy, R.; Wolfbeis, O. S. Eds. Springer Series on Chemical Sensor and Biosensors; Springer: Berlin-Heidelberg, 2004; vol. 1, p. 309-357. (b) Vos, J. G.; Kelly, J. M. *Dalton Trans.* 2006, 41, 4869. (c) Zhao, Q.; Li, F.; Huang, C. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 3007.

⁷³ Paris, J. P.; Brandt, W. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, 5001.

⁷⁴ Gerardi, R. D.; Barnett, N. W.; Lewis, S. W. *Anal. Chim. Acta*, 1999, 378, 1.

⁷⁵ Erkkila, K. E.; Odom, D. T.; Barton, J. K. *Chem. Rev.* 1999, 99, 2777.

⁷⁶ (a) Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Kelly, J. M. *J. Photochem. Photobiol. B* 1997, 40, 91.

estabilidade química e fotoquímica; de reatividade dos estados eletronicamente excitados e das propriedades redox.⁷⁷

Como comentado, esses complexos absorvem luz com alta eficiência na região do visível, exibem relativamente intensa emissão com largo tempo de vida (por exemplo, 523 ns para $[\text{Ru}(\text{fen})_3]^{2+}$ em acetonitrila)⁷⁸ e apresentam comportamento redox reversível tanto no estado eletrônico fundamental quanto excitado.⁷⁷ As propriedades espectroscópicas, fotofísicas e fotoquímicas desses complexos de Ru (II) podem ser elegantemente ajustadas através da escolha dos ligantes poliazaaromáticos que coordenam ao redor do metal.^{72a,77} Além disso, a introdução de ligantes de diferentes naturezas ao redor do mesmo metal, os denominados complexos heterolépticos (complexos coordenados com 3 ligantes sendo ao menos 1 de diferente estrutura química), fornece um ajuste adicional nas propriedades do complexo.^{72a,77,79}

Através dos complexos heterolépticos, torna-se possível a introdução de grupamentos químicos adequados que permitem a conexão por ligações covalentes do complexo com suportes sólidos funcionalizados ou a introdução de unidades quelantes para reconhecimento de um determinado analito. Como exemplo, podemos citar a derivatização do ligante bip com poliaminas macrocíclicas que funciona como unidade receptora de cátions (figura 1.8).⁸⁰

⁷⁷ Juris, A.; Balzani, V.; Barigelletti, F.; Campagna, S. Belsler, P.; Von Zelewsky, A. *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *84*, 85.

⁷⁸ Ackermann, M. N.; Interrante, L. V.; *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 3904.

⁷⁹ Kirsch-De Mesmaeker, A.; Orellana, G.; Barton, J. K.; Turro, N. J. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 461.

⁸⁰ Lodeiro, C.; Pina, F.; Parola, A. J.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Bazzicalupi, C. Ciattini, S.; Giorgi, C.; Masotti, A.; Valtancoli, B.; Melo, J. S. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6813.

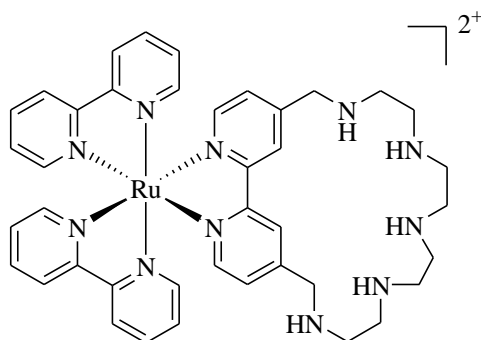


Figura 1.8: Sensor luminescente baseado na química do complexo de Ru (II) polipiridina funcionalizado com poliamina macrocíclica.

O complexo de rutênio mostrado na figura 1.8 é capaz de coordenar com substratos catiônicos e até aniônicos, dependendo do nível de protonação das aminas. A luminescência desse complexo é suprimida na presença de metais, por exemplo, cobre. Utilizando essa estratégia, diversos complexos heteroléticos de Ru (II) coordenados com ligantes contendo unidades receptoras foram sintetizados com a finalidade de serem aplicados como sensores luminescentes.^{72c}

As funcionalizações escolhidas dependem da natureza do analito a ser analisado. Como exemplo, pode-se mencionar que sensores de mercúrio foram obtidos através da síntese de complexos de Ru (II) funcionalizados com ligantes contendo grupos tióis.⁸¹ Complexos heteroléticos de Ru (II) contendo o grupo fenol conjugado ao ligante foram utilizados como sensores de íons fluoreto.⁸² Sensores de acetato, dihidrogenofosfato e fluoreto foram obtidos através de complexos heteroléticos contendo a porção uréia em sua estrutura química.⁸³

Com a finalidade de introduzir unidades receptoras, as derivatizações nos ligantes polipiridinas são amplamente aplicadas e as transformações químicas

⁸¹Hamid, A.; Al-Khateeb, M.; Tahat, Z. A.; Qudah, M.; Obeidat, S. M.; Rawashdeh, A. M. *Int. J. Inorg.Chem.* **2011**, 6, 1.

⁸²Jose, D. A.; Kar, P.; Koley, D.; Ganguly, B.; Thiel, W.; Ghosh, H. N.; Das, A. *Inorg.Chem.* **2007**, 46, 5576.

⁸³Ghosh, A.; Ganguly, B.; Das, A. *Inorg.Chem.* **2007**, 46, 9912.

encontradas na literatura consistem na introdução dos grupos químicos que variam de pirróis,⁸⁴ imidazóis,⁸⁵ ácidos benzóicos,⁸⁶ hidrazonas,⁸⁷ entre outros.^{72c}

Apesar da vasta aplicação desses compostos como sensores luminescentes de diversas substâncias, a aplicação de complexos de Ru (II) como sensores específicos de antimônio, foi muito pouco explorada. As técnicas mais utilizadas para determinar esse semimetal (Sb) fazem uso principalmente de métodos eletroanalíticos⁸⁸ e espectrometria de absorção atômica.⁸⁹ A determinação desse analito por essas técnicas apresenta várias desvantagens quando comparada com a sua aferição por sensores luminescentes. Como exemplo desses inconvenientes pode-se mencionar que os métodos eletroanalíticos e por espectrometria de absorção atômica envolvem tratamento e ou derivatizações da amostra e, conseqüentemente, esses métodos não são compatíveis com análises *in situ* e em tempo real. A síntese de sensores luminescentes à base de complexos heterolépticos de Ru (II) poliazaaromáticos contendo unidades receptoras de antimônio possibilitaria o monitoramento de fármacos à base de antimônio em células de *Leishmania*.

⁸⁴ Plitt, P.; Gross, D. E.; Lynch, V. M.; Sessler, J. L. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1374.

⁸⁵ Zhao, Q.; Liu, S. J.; Shi, M.; Li, F. Y.; Jing, H.; Yi, T.; Huang, C. H.; *Organometallics* **2007**, *26*, 5922.

⁸⁶ Higgins, B.; DeGraff, B. A.; Demas, J. N. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 6662.

⁸⁷ Lin, Z. H.; Ou, S. J.; Duan, C. Y.; Zhang, B. G.; Bai, Z. P. *Chem. Commun.* **2006**, 624.

⁸⁸ Toghiani, K. E.; Lu, M.; Compton, R. G. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2011**, 3057.

⁸⁹ Dessuy, M. B.; Jesus, R. M.; Brandao, G. C.; Ferreira, S. L. C.; Vale, M. G. R.; Welz, B. *Food Add. Contam.* **2013**, *33*, 202.

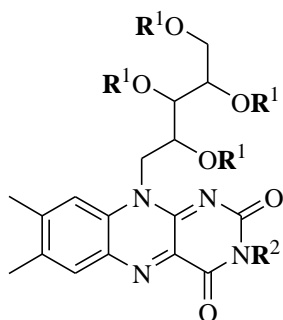
2-OBJETIVOS

2.1 – Gerais

Sintetizar fotossensibilizadores derivados da riboflavina para possível aplicação no tratamento de leishmaniose (por PDT), e sintetizar novos complexos de Ru (II) poliazaaromáticos com possível aplicação como sensores luminescentes de antimônio.

2.2 – Específicos

1- Estudar e desenvolver rotas sintéticas de derivatização da riboflavina através de transformações químicas na cadeia ribitol e alquilação do N-3 do sistema de anéis isoaloxazinas, conforme mostrado na figura 2.1.



Para $R^2 = H$; $R^1 =$ Acetil; **Palmitoil**; $-(CH_2)_2COOH$; **acetal cíclico**

Para $R^1 =$ Acetil; $R^2 = -H$; $-CH_3$; $-CH_2COOH$; $-CH_2Boc$
 $-(CH_2)_2N^+(CH_3)_3 \cdot Cl^-$; $-(CH_2)_5N^+(CH_3)_3 \cdot Cl^-$

Figura 2.1: Derivados da **RF** como possíveis Fs para aplicação no tratamento de leishmaniose.

2- Determinar os parâmetros fotofísicos dos derivados da riboflavina sintetizados.

3- Realizar ensaios de terapia fotodinâmica *in vitro* dos derivados sintetizados contra promastigotas de *Leishmania major*.

4 – Preparar ligantes bipyridinas conectados com grupos receptores de antimônio: di-tiol vicinal, ácido tióctico e bitiofeno.

5 - Sintetizar complexos heterolépticos de Ru (II) poliazaaromáticos contendo ligantes com grupos receptores de antimônio.

6 – Investigar as propriedades luminescentes dos complexos de Ru (II) obtidos na presença de sais de antimônio em meios aquoso e orgânico.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Procedimentos gerais

Os reagentes comerciais e solventes foram secos e purificados, quando necessário, conforme procedimentos descritos na literatura.⁹⁰ As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de alumínio contendo sílica-gel em sua superfície (GF₂₅₄ Merck, 0,25 mm) e os cromatogramas foram revelados em câmara de irradiação com lâmpada UV (254 e 355 nm). As colunas cromatográficas foram realizadas utilizando sílica-gel (0,035-0,070 mm) da marca Acros. As colunas de troca iônica foram realizadas utilizando SP SephadexTM C-25 (GE Healthcare). Os solventes foram removidos das soluções orgânicas através de evaporadores rotatórios operando a pressão reduzida.

3.2 - Equipamentos e dispositivos

3.2.1 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram registrados em espectrômetros Bruker DPX 500, DPX 300 ou Bruker AVIII 700 MHz. Os solventes usados foram: CDCl₃, CD₃OD, DMSO (d⁶) ou D₂O, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Para RMN de ¹H (instrumento operando a 700, 500 ou 300 MHz) os deslocamentos químicos (δ) são referenciados em relação ao padrão interno TMS (0 ppm) e para RMN de ¹³C (instrumento operando a 175, 125 ou 75 MHz) os valores de δ são referenciados em relação: ao CDCl₃ (77,0 ppm) em CDCl₃, ao CD₃OD (49 ppm) em CD₃OD; ao TMS (0 ppm) em D₂O. Os deslocamentos químicos são dados em ppm e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (s = singleto, d = dubleto, dd = duplo dubleto, t = triplete, quart. = quadripleto, quint. = quintupletto, m = multipletto). As análises de

⁹⁰Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R. In: **Purification of Laboratory Chemicals**, 2^a ed. Pergamon Press: Oxford, 1980, ISBN 0-08-022961-1.

RMN de ^1H (operando a 500 e 300 MHz), bem como as análises de RMN de ^{13}C (operando a 125 e 75 MHz) foram efetuadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP. As análises de RMN de ^1H (operando a 700 MHz), bem como as análises de RMN de ^{13}C (operando a 175 MHz) foram efetuadas no Centro de Auxílio à Investigação da Universidade Complutense de Madri (UCM).

3.2.2 Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Bomem MB 100 em pastilhas de KBr e as absorções estão expressas em cm^{-1} . As análises foram efetuadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

3.2.3 Espectrometria de massas (EM)

Os espectros de massa de alta resolução (EMAR) foram obtidos em um aparelho Bruker Daltonics Micro TOF com analisador do tipo TOF (*time of flight*). As ionizações das amostras foram feitas por ESI (*electron spray ionization*) e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Ionization*) operando em modo positivo ou negativo. Essas análises foram efetuadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

3.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Purificou-se os compostos através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala semi-preparativa. As análises foram efetuadas em um cromatógrafo, SPD-10AV Shimadzu, usando a coluna semi-preparativa ZORBAX eclipse XDB-C18 (9,4 mm x 250 mm, 5-micron). O detector, UV-Visível, do cromatógrafo operava no comprimento de onda de 440, 350, ou 280 nm.

- Para a **TARF-Catiônica-2**, usou-se como eluente uma mistura de água/acetonitrila nas proporções de 7:3 (v/v) ambos os solventes contendo 0,01% de ácido trifluoracético (modo isocrático) e o fluxo de 3,0 mL/min. Concentração da amostra injetada (1 mg/mL de eluente). Volume de cada injeção: 700 µL Tempo de Retenção: 20,86 minutos.
- Para o complexo heteroléptico **[Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)](PF₆)₂**, usou-se como eluente uma mistura de água/acetonitrila nas proporções de 3:2 (v/v) ambos os solventes contendo 0,01% de ácido trifluoracético (modo isocrático) e o fluxo de 5,0 mL/min. Concentração da amostra injetada (1 mg/mL de eluente). Volume de cada injeção: 900 µL. Tempo de Retenção: 14,23 minutos.

3.2.5 - Espectros de absorvância e luminescência

Todos os espectros de absorvância e luminescência foram obtidos em cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm a temperatura ambiente.

- Os espectros de absorção dos compostos foram obtidos em um espectrofotômetro de UV-Vis Varian Cary 3Bio.
- Os espectros de luminescência foram obtidos em um espectrofluorímetro HORIBA Jobin Yvon Fluoromax-4.
- O oxigênio singlete foi determinado através da detecção da sua característica emissão, resolvida no tempo (em 1270 nm), utilizando um fluorímetro Edinburgh (UK) LP-900 equipado com um detector Hamamatsu H10330-45 NIR PMT. Um filtro de interferência (1270 nm) foi interposto entre o detector e a amostra para minimizar espalhamento de luz do laser e luminescência do Fs.
- Espectros de tempo de vida de luminescência através de *Single Photon Timing* (SPT) foram realizados em um espectrofluorímetro HORIBA Jobin Yvon Fluoromax-4 equipado com TCSPC (*Time Correlated Single Photon Counting*) e um laser de diodo

(NanoLED) com emissão pulsada com fonte de excitação (463 nm). Parâmetros utilizados: Taxa de repetição = 250 KHz; Intervalo de tempo = 3,2 μ s; Emissão = 690 nm; Fendas = 9 mm; Contagem de fótons = 30000.

3.3 Métodos

3.3.2 - Síntese da acetal-riboflavina

Em um balão com duas bocas contendo riboflavina (0,27 mmol) foi adicionado acetona (2 mL), DMF (2 mL), H₂SO₄ (50 μ L) e MgSO₄ (150 mg). Deixou-se em agitação magnética durante o tempo de 30 minutos ou 3 h ou 24 h e, após esse período, a mistura reacional foi filtrada, lavada com acetona (10 mL) e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto final foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetona (1:1).

3.3.3 - Síntese da 2',3',4',5'-tetracetil-riboflavina (TARF)

Em um balão com duas bocas contendo riboflavina (5,3 mmol), foi adicionado, sob atmosfera de argônio, anidrido acético (20 mL) e DMAP (21,3 mmol). Deixou-se em agitação magnética por 24 horas a 40 °C e, após esse período, o meio reacional foi diluído com clorofórmio (60 mL) seguido da transferência da solução orgânica resultante a um funil de extração. Ao funil de extração foi adicionada solução saturada de NH₄Cl_(aq) (40 mL) e após mistura e separação das fases, a fase aquosa foi lavada com clorofórmio (2 x 60 mL). Juntou-se as fases orgânicas e as mesmas foram secas com MgSO₄, filtrada e o solvente removido por rota-evaporação. O produto final foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando-se como eluente acetato de etila.

Rendimento: 75%. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.12 (br s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.51(s, 1H), 5.59 (br d, $J = 9$ Hz, 1H), 5.40-5.39 (m, 1H), 5.35-5.32 (m, 1H), 4.85 (br s, 2H), 4.36 (dd, $J_1 = 12$; $J_2 = 3$ Hz, 1H), 4.18 (dd, $J_1 = 12$; $J_2 = 6$ Hz, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.68 (br s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 170.60, 170.28, 169.83, 169.69, 159.34, 154.85, 150.55, 148.11, 137.03, 135.93, 134.56, 132.76, 131.14, 115.55, 70.37, 69.35, 68.94, 61.81, 21.41, 20.99, 20.75, 20.63, 20.27, 18.38. IV (KBr) cm^{-1} : 3036, 1749, 1662, 1538, 1212. EMAR [ESI(+)] : Calculado para $(\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_{10} + \text{H})^+$: 545.1884, medido: 545.1881.

3.3.4 - Acetilação da riboflavina mediada por lipase

Em um microtubo tipo *Eppendorf* a riboflavina (0,027 mmol ou 10 mg) foi solubilizada em DMF (2 mL) e posteriormente foram adicionados o acetato de vinila (0,53 mmol ou 50 μL) e a lipase (30 mg). A solução foi colocada em agitador magnético (130 r.p.m.) na temperatura de 30°C. As reações foram acompanhadas por CCD [eluente: acetonitrila: água: $\text{KNO}_{3(\text{aq})}$ saturado (44:5:1, v/v)] e por espectrometria de massas com ionização por *electrospray*.

3.3.5 – Funcionalização da riboflavina com anidrido succínico

Em um balão com duas bocas contendo riboflavina (0,067 mmol ou 25,33 g), foi adicionado, sob atmosfera de argônio, anidrido succínico (1,3 mmol), Et_3N (0,15 mmol), DMAP (0,15 mmol) e DMF (2 mL). Deixou-se em agitação magnética por 6 horas e, após esse período, o solvente da reação foi removido sob pressão reduzida. O produto final foi purificado através da lavagem com acetato de etila (3x 1 mL). O excesso de acetato de etila foi removido em bomba de vácuo. O sólido amarelo obtido foi purificado por precipitação seletiva solubilizando o composto em isopropanol a quente

(temperatura de ebulição), seguida da diminuição da temperatura (-5°C). O precipitado foi coletado por filtração e seco em estufa sob vácuo.

Rendimento: 30%. RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) δ : 8.00 (d, $J = 5$ Hz, 0.54H (DMAP)); 7.79 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 6.88 (d, $J = 5$ Hz, 0.54H(DMAP)); 5.68-5.65 (m, 1H), 5.58-5.57 (m, 1H); 5.54-5.51 (m, 1H); 4.99 (br s, 2H), 4.56 (d, $J = 11$, 1H), 4.36 (dd, $J_1 = 12$; $J_2 = 6$ Hz, 1H), 3.20 (s, 2.12H(DMAP)), 2.57 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.93-2.70 (m, 22-16H). IV (KBr) cm^{-1} : 1763, 1546, 1401, 1213, 1176. EMAR [ESI(+)] : Calculado para $(\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{18} - \text{H})^-$: 775.1947 , medido: 775.1938.

3.3.6 - Síntese da 2',3',4',5'-tetrapalmitoil-riboflavina (**TPRF**)

Em um balão com duas bocas contendo riboflavina (0,66 mmol), foi adicionado DMAP (2,64 mmol) e DMF anidro (4 mL), sob banho de gelo (0 °C) e atmosfera de argônio. Deixou-se em agitação magnética por 15 minutos e após esse período uma solução contendo cloreto de palmitoíla (2,64) em DMF anidro (4 mL) foi adicionada ao meio. A solução resultante foi agitada por mais 12 h a 40 °C e transcorrido esse período, uma segunda solução contendo cloreto de palmitoíla (2,64) e DMF anidro (4 mL) foi adicionada ao meio. A solução foi agitada por mais 12 h a 40 °C. Após esse período, o meio reacional foi diluído com diclorometano (50 mL) seguido da transferência da solução orgânica resultante a um funil de extração. Ao funil de extração foi adicionado solução saturada de $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{aq})}$ (30 mL) e após agitação e separação das fases, a fase aquosa foi lavada com diclorometano (2 x 30 mL). Juntou-se as fase orgânicas e o meio orgânico resultante foi seco com MgSO_4 , filtrado e o solvente removido por rota-
evaporação. O produto final foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila (1:1).

Rendimento: 67%. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.31 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 5.62 (br s, 1H), 5.42-5.32 (m, 2H), 4.87 (br s, 2H), 4.39 (dd, $J_1 = 12$; $J_2 = 3$ Hz, 1H), 4.13 (dd, $J_1 = 12$; $J_2 = 6$ Hz, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.40-2.35 (m, 6H), 2.26-2.21 (m, 3H), 2.05-1.94 (m, 2H), 1.62-1.47 (m, 16H), 1.18 (br s, 80H), 0.81 (br t, $J = 6$, 20H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 173.33, 173.02, 172.53, 172.42, 159.26, 154.24, 150.70, 147.94, 136.84, 136.08, 134.64, 132.98, 131.36, 115.66, 70.39, 68.97, 63.11, 61.82, 44.94, 34.16, 34.09, 33.98, 33.69, 32.81, 31.92, 29.70 (br), 29.66, 29.63, 29.54, 29.51, 29.42, 29.41, 29.38, 29.36, 29.32, 29.29, 29.19, 29.14, 29.12, 29.09, 28.92, 25.73, 24.86, 24.81, 24.78, 24.28, 22.67, 21.40, 19.41, 14.09, 0.99. IV (KBr) cm^{-1} : 3453, 2917, 2850, 1743, 1547, 1468, 1160, 722. EMAR [ESI(+)] : Calculado para $(\text{C}_{81}\text{H}_{140}\text{N}_4\text{O}_{10} + \text{H})^+$: 1300.0648, medido: 1300.0597.

3.3.7 – Síntese da **TARF-Me**

Em um balão com duas bocas contendo **TARF** (0,2 mmol), foi adicionado, sob atmosfera de argônio, DMF (5 mL) e Cs_2CO_3 (0,4 mmol). Deixou-se em agitação magnética, a temperatura ambiente, por 15 minutos e depois foi adicionado ao meio reacional excesso de iodeto de metila (0,5 mL) e a solução resultante foi agitada por 24 h a 40 °C. Após esse período, o meio reacional foi diluído com diclorometano (20 mL) seguido da transferência da solução orgânica resultante a um funil de extração. Ao funil de extração foi adicionada água destilada (20 mL) e após agitação e separação das fases, a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi lavada com água destilada (2 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e o solvente removido por rota-
evaporação. O produto final foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (1:4).

Rendimento: 51%. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.05 (s, 1H), 7.54(s, 1H), 5.70-5.66 (m, 1H), 5.47 (br t, $J = 5$ Hz, 1H), 5.43-5.40 (m, 1H), 4.91 (br s, 2H), 4.44 (dd, $J_1 = 12$; $J_2 = 3$ Hz, 1H), 4.25 (dd, $J_1 = 12$; $J_2 = 6$ Hz, 1H), 3.50 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.74 (br s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ :170.60, 170.29, 169.85, 169.66, 159.92, 155.32, 149.13, 147.44, 136.51, 135.66, 134.68, 132.97, 131.17, 115.33, 70.49, 69.40, 69.07, 61.88, 44.53, 28.67, 21.38, 21.03, 20.78, 20.68, 20.32, 19.40. IV (KBr) cm^{-1} : 3473, 1748, 1550, 1372, 1222, 1048. HRMS [ESI(+)] : Calculado para $(\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{10} + \text{Na})^+$: 581.1860, medido: 581.1861.

3.3.8 – Hidrólise da **TARF-Me**

Em um balão com duas bocas foi adicionado a **TARF-Me** (0,016 mmol ou 10 mg) e etanol (5 mL). Posteriormente, foi adicionada 3 mL de uma solução aquosa de $\text{NaHCO}_{3(\text{sat})}$ ou $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{sat})}$ ou NaOH (2M) ou HCl (1M). Deixou-se reagir à temperatura ambiente por 24 horas. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD). As placas de CCD foram eluídas com CHCl_3 :Metanol (7:1).

3.3.9 - Síntese da 2',3',4',5'-tetraacetil-N(3)-tert-butoxicarbonilmetilriboflavina (**TARF-Éster**)

Em um balão com duas bocas contendo **TARF** (0,1 mmol), foi adicionado, sob atmosfera de argônio, DMF (1 mL) e K_2CO_3 (0,12 mmol) e KI em quantidades catalíticas (20 mol%). Deixou-se em agitação magnética a temperatura ambiente por 30 minutos e depois foi adicionado ao meio reacional uma solução contendo 2-bromoacetato de *t*-butila (0,69 mmol) em DMF anidro (1 mL). A solução resultante foi agitada por 20 h a 40 °C. Após esse período, o meio reacional foi diluído com diclorometano (5 mL) seguido da transferência da solução orgânica resultante a um

funil de extração. Ao funil de extração foi adicionada água destilada (20 mL) e após agitação e separação das fases, a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi lavada com água destilada (2 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido por rota-evaporação. O produto final foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando-se como eluente uma mistura de diclorometano e acetato de etila (1:1).

Rendimento: 85%. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.96 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 5.58 (br d, *J* = 9 Hz, 1H), 5.40-5.31 (m, 2H), 4.80 (br s, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.36 (dd, *J*₁ = 12; *J*₂ = 3 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J*₁ = 12; *J*₂ = 6 Hz, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.40 (br s, 9H). RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 170.59, 170.26, 169.89, 169.71, 166.76, 159.43, 154.43, 149.45, 147.77, 136.67, 135.50, 134.74, 132.95, 131.16, 115.36, 82.15, 70.39, 69.49, 68.91, 61.83, 44.63, 43.45, 27.99, 21.41, 21.03, 20.78, 20.68, 20.28, 19.41. IV (KBr) cm⁻¹: 2980, 1749, 1669, 1587, 1550, 1371, 1225, 1155, 1048, 936, 854. EMAR [ESI(+)]: Calculado para (C₃₁H₃₈N₄O₁₂ + Na)⁺: 681.2384, medido: 681.2383.

3.3.10 - Síntese da 2',3',4',5'-tetraacetil-N(3)-carboximetilriboflavina (**TARF-Ácido**)

Em um balão com duas bocas contendo **TARF-Éster** (0,07 mmol) e diclorometano (1 mL), foi adicionado lentamente sob agitação o ácido trifluor acético (0,2 mL). A adição foi feita sob atmosfera de argônio e sob banho de gelo. Após esse procedimento, o meio reacional foi aquecido a 50 °C e agitado por 5 h. Após esse período, a reação foi colocada sob banho de gelo e uma solução saturada de NaHCO_{3(aq)} foi adicionada mediante agitação até o pH da solução aquosa apresentar o valor de 5. Após a separação das fases, a fase orgânica foi separada e fase aquosa lavada com diclorometano (2 x 5 mL). A fase aquosa foi descartada e as fases orgânicas foram

reunidas. A fase orgânica resultante foi seca com MgSO_4 , filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica utilizando como eluente acetato de etila / etanol (1:1). Rendimento: 50%. RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) δ : 7.84 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 5.67-5.62 (m, 1H), 5.541 (br t, $J = 6$, 1H), 5.49-4.44 (m, 1H), 5.09 (br s, 2H), 4.53 (s, 2H), 4.52 (dd, $J_1 = 12$; $J_2 = 3$ Hz, 1H), 4.37 (dd, $J_1 = 12$; $J_2 = 6$ Hz, 1H), 2.57 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.70 (s, 3H). RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ : 175.39, 172.33, 171.82, 171.50, 171.43, 161.65, 157.28, 150.95, 149.11, 138.37, 137.15, 135.99, 133.07, 132.72, 117.65, 71.62, 70.78, 70.74, 62.99, 45.71, 45.67, 21.32, 21.03, 20.70, 20.57, 20.36, 19.29. IV (KBr) cm^{-1} : 3447, 1746, 1653, 1586, 1549, 1378, 1231, 1052. EMAR [ESI(+)]]: Calculado para $(\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{12} + \text{H})^+$: 603.1939, medido: 603.1937.

3.3.11 - Síntese da **TARF-Catiônica** e da **TARF-Catiônica-2**

Em um balão com duas bocas, sob atmosfera de argônio, foram adicionado a **TARF** (0,5 mmol), o Cs_2CO_3 (0,55 mmol), o KI (0,5 mmol) e o DMF anidro (8 mL). Após esse procedimento, a mistura foi agitada a 0 °C por 30 minutos. Após esse período, uma solução do alquilante (0,55 mmol) (hexaflúorofosfato de (2-bromoetil)-trimetil-amônio para sintetizar a **TARF-Catiônica** ou brometo de (2-bromopentil)-trimetil-amônio para sintetizar a **TARF-Catiônica-2**) em DMF anidro (2 mL) foi adicionada e agitada por 4 h a 50 °C. Após esse período, deixou-se o meio reacional atingir a temperatura ambiente e adicionou-se uma solução heterogênea de Sephadex (3 g) em água destilada (15 mL). A solução resultante foi agitada por 1 h, a temperatura ambiente, e vertida em uma coluna cromatográfica previamente empacotada com Sephadex. O produto **TARF-Catiônica** ou **TARF-Catiônica-2** foi eluído com solução aquosa de NaCl seguindo gradiente de concentração. O produto foi eluído quando a

solução de NaCl_(aq) na concentração de 10⁻² M foi utilizada. As soluções aquosas amarelo-alaranjadas eluidas foram reunidas e a água foi removida sob pressão reduzida. O sólido resultante foi extraído com metanol (2 x 5 mL) na temperatura de 0 °C. Após esse período o metanol foi removido à pressão reduzida e o novo sólido resultante foi extraído com clorofórmio (3 x 5 mL) a temperatura ambiente. Após a remoção da fase clorofórmica sob pressão reduzida os derivados catiônicos da riboflavina foram caracterizados:

- TARF-Catiônica:

Rendimento: 15%. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.95 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 5.60-5.55 (m, 1H), 5.42-5.31 (m, 2H), 4.94 (b s, 2H), 4.47 (br t, *J* = 6, 2H), 4.40 (dd, *J*₁ = 12; *J*₂ = 3 Hz, 1H), 4.16 (dd, *J*₁ = 12; *J*₂ = 5 Hz, 1H), 3.88 (br t, *J* = 6, 2H), 3.49 (s, 9H), 2.50 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.64 (s, 3H). RMN de ¹³C (125 MHz, D₂O) δ: 174.03, 173.19, 173.97, 172.96, 161.50, 156.52, 151.23, 149.50, 139.74, 135.47, 134.38, 131.95, 131.42, 116.63, 71.02, 70.14, 69.97, 62.53, 62.49, 53.74, 45.14, 36.08, 21.24, 20.77, 20.55, 20.44, 20.01, 18.96. IV (KBr) cm⁻¹: 1743, 1687, 1549, 1232, 1206, 1131, 1049, 802. EMAR [ESI(+)]: Calculado para (C₃₀H₄₀N₅O₁₀)⁺: 630.2775, medido: 630.2782.

- TARF-Catiônica-2:

Seguindo essa metodologia, o composto **TARF-Catiônica-2** foi obtido com pureza de 90%. Esse composto catiônico foi purificado por CLAE-preparativa (ver item 3.2.4) de modo a obter o derivado com pureza maior que 99% .

Rendimento: 68%. ¹H NMR (700 MHz, D₂O) δ: 7.74 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 5.51-5.48 (m, 1H), 5.39 (t, *J* = 5 Hz, 1H), 5.31-5.28 (m, 1H), 4.96 (b s, 2H), 4.36 (br d, *J* = 12, 1H), 4.21 (dd, *J*₁ = 6; *J*₂ = 12 Hz, 1H), 3.88 (dq_{int.}, *J*₁ = 3; *J*₂ = 7 Hz, 2H), 3.18 (m, 2H), 2.96 (s, 9H), 2.43 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.90 (s, 3H),

1.73 (quint., $J = 4$, 2H), 1.61 (quint., $J = 8$ Hz, 2H), 1.56 (s, 3H), 1.29 (quint., $J = 8$, 2H). RMN de ^{13}C (175 MHz, D_2O) δ : 173.54, 172.71, 172.59, 172.55, 161.23, 156.93, 150.40, 148.79, 139.05, 134.84, 134.14, 131.35, 130.93, 116.08, 70.53, 69.70, 69.52, 66.36, 62.01, 52.75, 44.50, 41.51, 26.29, 22.77, 21.83, 20.77, 20.32, 20.11, 19.99, 19.59, 18.51. IV (KBr) cm^{-1} : 1746, 1655, 1586, 1550, 1229, 1051. EMAR [ESI(+)]:
Calculado para $(\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_{10})^+$: 672.3245, medido: 672.3248.

3.3.12 - Síntese do hexaflúorofosfato de (2-bromoetil)-trimetil-amônio

Em um Erlenmeyer, a temperatura ambiente, foi solubilizado o alquilante brometo de (2-bromoetil)-trimetil-amônio (0,81 mmol) em água destilada (2 mL). Sob baixa agitação, gotas de uma solução saturada de $\text{NH}_4\text{PF}_6(\text{aq})$ foi adicionada até a formação de um precipitado branco não ser mais observada. O sólido foi transferido para um filtro e lavado com água destilada gelada (3 x 1mL). O sólido foi seco em estufa sob vácuo.

Rendimento: 82%. RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.89-3.85 (m, 2H, 3.79-3.74 (m, 2H), 3.09 (s, 9H).

3.3.13 - Determinação da absorvidade molar.

Os coeficientes de extinção molar (ϵ) foram determinados através das curvas de concentração *versus* absorvância, no comprimento de onda de cada banda, utilizando a lei de Lambert-Beer. A massa estabelecida, pesada em balança analítica (4 casas decimais), foi solubilizada em um volume preciso (em balão volumétrico) do solvente de interesse. Desta solução foram retiradas alíquotas de volumes conhecidos transferindo-as para outros balões volumétricos. Os balões foram completados com o solvente desejado de modo que fossem obtidas soluções de concentrações conhecidas

com exatidão analítica. O espectro de UV-vis para estes compostos foi determinado em cubeta de quartzo (caminho ótico de 1 cm). As bandas de interesse, e utilizadas no cálculo de ϵ , apresentaram absorvância entre 0,05 e 1. A partir dos dados obtidos, foram estabelecidas as curvas de absorvância *versus* concentração no máximo de cada banda. O ϵ foi determinado através da lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon.b.c$). Onde A é a absorção, ϵ é o coeficiente de absorção molar ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$), b é o caminho ótico (cm) e c é a concentração molar ($mol.L^{-1}$). Os dados foram analisados utilizando o programa *Origin 7.0*.

3.3.14 - *Rendimento quântico de Emissão de Fluorescência.*

O rendimento de fluorescência foi calculado através da comparação direta do analito com a amostra de riboflavina como padrão. As absorvâncias foram ajustadas para 0,1 no comprimento de onda de excitação de 445 nm. A emissão foi registrada (integrada) desde 475 a 800 nm e o rendimento foi determinado de acordo com a equação abaixo:

$$A_a/A_p = \phi_a/\phi_p$$

A_a - área sob a curva do espectro de emissão da amostra

A_p - área sob a curva do espectro de emissão do padrão

ϕ_a - Rendimento quântico de fluorescência da amostra

ϕ_p - Rendimento quântico de fluorescência do padrão

3.3.15 - Eficiência de geração de oxigênio singlete

A quantificação de oxigênio singlete foi realizada a partir da comparação da intensidade de emissão em 1270 nm, obtidos após o pulso do LASER, dos derivados da riboflavina com um Fs padrão. A fenalenona foi tomada como referência ($\phi_{\Delta} = 0,97$), sendo que os transientes de emissão de oxigênio singlete foram obtidos nas mesmas condições: solvente: metanol (para a **TPRF** clorofórmio) e absorvância das amostras de 0,10 para o padrão e os derivados flavínicos. A amostra foi excitada utilizando a terceira harmônica (355 nm, 2,2 mJ/pulso) de um LASER Nd:YAG (Subelite II, Continuum, CA).

O rendimento quântico foi determinado de acordo com a equação abaixo:

$$I_a/I_p = \phi_a/\phi_p$$

I_a – Intensidade de emissão do oxigênio singlete da amostra

I_p – Intensidade de emissão do oxigênio singlete do padrão

ϕ_a - Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete da amostra

ϕ_p - Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete do padrão

3.3.16 - Partição *n*-octanol / água

Iguais volumes de *n*-octanol e solução salina de Hanks (pH = 6,7) foram misturados e agitados vigorosamente por 20 minutos. Feito isso, os solventes (saturados) foram separados. Foram preparadas soluções aquosas (utilizando a fase aquosa saturada com *n*-octanol) dos derivados riboflavínicos com concentrações conhecidas (Abs = 0,5). No caso da **TPRF**, essa solução foi preparada com *on*-octanol saturado com solução aquosa. Misturou-se 1 mL da solução aquosa contendo as flavinas com 1 mL de solução de *n*-octanol saturada (exceto no caso da **TPRF**, onde adicionou-se 1 mL de solução aquosa saturada com *n*-octanol na solução orgânica contendo a

TPRF). Agitou-se as soluções por 30 minutos em um agitador vórtex. Decorrido esse período, permitiu-se às fases serem separadas por centrifugação (5000 r.p.m.). Determinou-se a intensidade de emissão (500-700 nm) com excitação em 440 nm da fase aquosa após a partição (I_{depois}). Feito isso, analisou-se a absorção das amostras padrões antes da partição (I_{antes}). O valor de partição foi determinado através da equação: $P = I_{n\text{-octanol.depois}} / I_{\text{água.depois}}$. Onde: $I_{n\text{-octanol.depois}} = I_{\text{água.antes}} - I_{\text{água.depois}}$.

Obs: antes = Antes da partição e depois = Depois da partição.

Para o composto **TPRF**: $I_{\text{água.depois}} = I_{n\text{-octanol.antes}} - I_{n\text{-octanol.depois}}$.

3.3.17 – Actinometria química (aberchrome 540)

Em um Becker, 2 mg de *aberchrome 540* foi solubilizado em etanol e irradiado com luz UV (355 nm) por 30 min até a solução adquirir uma coloração vermelha intensa. Essa solução foi transferida para os 96 poços da placa de cultura, 200 μL por poço, e os valores de Abs (em 490 nm) de todos os poços foram medidos em um leitor de placas TECAN. Após a determinação do valor inicial de Abs da amostra (valor médio obtido de Abs = 0,7), a mesma foi irradiada por 15 segundos com luz azul (sistema de iluminação fabricado pela UCM) e imediatamente após este período a absorbância dos poços foram analisadas por TECAN novamente. Esse procedimento foi repetido quatro vezes de modo a acompanhar a diminuição no valor de Abs (em 490 nm) dos poços na placa de cultura. O fluxo fotônico foi calculado através da média da variação de Abs (em 490 nm) das amostras após os primeiros 15 s de irradiação ($\Delta\text{Abs}_{490} = 0,207$). A densidade do fluxo fotônico foi calculada através das equações mostrada na figura 3.1 (Densidade de fluxo fotônico de $64,5 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Equação 1: Moles de *abberchrome* absorvido / 15 s = fluxo fotônico

Equação 2: Moles de *abberchrome* absorvido / 15 s = $\frac{\text{Moles de } abberchrome \text{ convertidos} / 15 \text{ s}}{\text{rendimento quantico}}$

^aSabe-se que: rendimento quantico varia com o λ_{irra} de acordo com: $\phi = 0,210 - 3,06 \times 10^{-4} \times \lambda_{\text{irra}}$

$$\lambda_{\text{irra}} = 470 \text{ nm}$$

Equação 3: Moles de *abberchrome* convertidos / 15 s = $\Delta\text{Abs}_{490} / 15 \text{ s}$

onde: $\Delta\text{Abs}_{490} / 15 \text{ s} = [\epsilon_{490} \times L \times (C_i - C_f)] / 15 \text{ s}$; $C_i - C_f = \text{concentração inicial - final} = \Delta n/V$

$$\text{logo: } \Delta n / 15 \text{ s} = \left[\frac{\Delta\text{Abs}_{490} \times V}{\epsilon_{490} \times L} \right] / 15 \text{ s}$$

Da **equação 1** $\Delta n / 15 \text{ s} = \text{fluxo fotônico}$

Colocando a **equação 3** na **equação 2** temos

$$\frac{\text{fluxo fotônico} / 15 \text{ s} = \left[\frac{\Delta\text{Abs}_{490} \times V}{\epsilon_{490} \times L} \right] / 15 \text{ s}}{\text{rendimento quantico}} = \frac{\left[\frac{\Delta\text{Abs}_{490} \times V}{\epsilon_{490} \times L} \right] / 15 \text{ s}}{0,210 - 3,06 \times 10^{-4} \times 470}$$

Sabe-se que $V = 200 \text{ uL}$; $L = 0,633 \text{ cm}$ e $\Delta\text{Abs}_{490} = 0,207$

^bDa literatura sabe-se que: $\epsilon_{490} = 8038 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Resolvendo a equação, fluxo fotônico = **$8,15 \times 10^{-9}$ Einstein / s** ou mol / s

Para transformar a medida de Einstein / s para J / s:

E do fóton = $(h \times c) / \lambda$ Sendo: $h = \text{constante de Planck} = 6,63 \times 10^{-34}$
 $c = \text{velocidade da luz no vácuo} = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$
 $\lambda \text{ da luz de irradiação } 470 \text{ nm ou } 470 \times 10^{-9} \text{ m}$

$$\mathbf{E}_{470 \text{ nm}} = 4,2 \times 10^{-19} \text{ J / fóton ou } 2,5 \times 10^5 \text{ J / mol } (6,02 \times 10^{23} \times 4,2 \times 10^{-19})$$

E em einsten por segundo x **E** por mol da luz em 470 nm = **E total**

$$\mathbf{E \text{ total}} = 2,5 \times 10^5 \text{ J / mol} \times 8,15 \times 10^{-9} \text{ mol / s} = \mathbf{2,04 \times 10^{-3} \text{ J / s}}$$

Resultado por área irradiada ($A = 3,16 \times 10^{-5} \text{ m}^2$):

$$(2,04 \times 10^{-3}) / 3,16 \times 10^{-5} = \mathbf{64,5 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}}$$

Figura 3.1: Cálculos e equações utilizadas no estudo de actinometria. ^a relação entre ϕ e λ estabelecida na referência 132. ^b valor de ϵ encontrado para tolueno na referência 133 (extrapolamos o mesmo valor para etanol).

3.3.18 – Ensaio de PDT *in vitro* em *Leishmania major*

Promastigotas de *Leishmania major* foram cultivadas a 26 °C em meio RPMI 1640, o meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) contendo 2 mM de L-glutamina. Na fase de crescimento exponencial tardia, os parasitas foram lavados em meio Hanks contendo 10 mM de D-glucose, re-suspendidos no mesmo meio na densidade final de 2×10^7 parasitas/mL e transferidos (120 µL/poço) para os 96 poços da placa de cultura. Soluções dos compostos flavínicos em DMSO foram diluídos no meio Hank contendo os parasitas de modo a atingir a concentração de interesse (exceto no caso das amostras controle onde não havia Fs). O volume total final dos poços foi ajustado para 200 µL com meio Hanks. Após este procedimento, os parasitas foram incubados por 30 minutos no escuro e depois irradiados, por um tempo de 30 minutos (exceto no caso dos controles no escuro), no comprimento de onda de 470 nm e $65 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de fluxo fotônico. Após a irradiação:

- (i) Para determinar a toxicidade: os parasitas foram incubados por mais 3 h no escuro e transcorrido este período, 100 µL da suspensão de parasitas foram lavadas em solução de Hanks, re-suspendidas em 90 µL da mesma solução e incubadas com MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazolio] numa concentração de 0,5 mg/mL, por 2 h a 26 °C. O formazan resultante foi solubilizado através da adição de 100 µL de dodecil fosfato de sódio 10% m/v. Após essa solubilização, a absorbância dos poços foram medidos em um leitor de micro-placas (680 Bio-Rad) usando um filtro de 595 nm. As amostras foram feitas em triplicata e os experimentos repetidos três vezes. Parasitas incubados na ausência de Fs foram considerados como controles.

- (ii) inibição da proliferação dos parasitas: os parasitas foram incubados por mais 3 h no escuro e transcorrido este período, 20 µL da suspensão de parasitas foram transferidos para uma microplaca de 96 poços na presença de 180 µL do meio de

cultura. Os parasitas sobreviventes foram deixados proliferar por 72 h no escuro. Transcorrido este período, 100 µL da suspensão de parasitas foram lavadas em solução de Hanks, re-suspendidas em 90 µL da mesma solução e incubadas com MTT [brometo de (3-(4, 5-Dimetiltiazol-2-il) - 2,5 difenil tetrazolio] numa concentração de 0,5 mg/mL, por 2 h a 26 °C. O formazan resultante foi solubilizado através da adição de 100 µL de dodecil fosfato de sódio 10% m/v. Após essa solubilização, a absorbância dos poços foram medidos em um leitor de micro-placas (680 Bio-Rad) usando um filtro de 595 nm. As amostras foram feitas em triplicata e os experimentos repetidos três vezes. Parasitas incubados na ausência de Fs foram considerados como controles.

Valores de CE₅₀ (concentração efetiva 50%) foram calculados através da aplicação estatística do software SIGMA Plot 9.0.

3.3.19 - Síntese da 2,2'-bipirazina

Em um balão com duas bocas munido de um condensador de refluxo, sob atmosfera de argônio, foram adicionados di-isopropiletilamina (8 mmol ou 1,4 mL), acetato de paládio (0,4 mmol), brometo de tetra-*n*-butilamônio (8 mmol), e uma solução de 2-cloro-pirazina (8 mmol) em tolueno (2 mL). A mistura foi agitada e aquecida até atingir refluxo e isopropanol foi adicionado (8 mmol). A temperatura foi mantida em 105 °C por 24 h. Após esse período, deixou-se a reação atingir a temperatura ambiente e o meio reacional foi transferido a um funil de extração. Feito isso, água (5 mL) e dietil éter (5 mL) foram adicionados. Após agitação e separação das fases, a fase orgânica foi separada e o meio orgânico foi lavado com água destilada (5mL). A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido por rota-evaporação. O produto final foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando-se como eluente acetato de etila.

Rendimento = 20%. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃): δ = 9,54 (d, *J* = 3 Hz, 2H); 8,60 (s, 4H).

3.3.20 - Síntese do complexo *cis-bis(bipirazina)(cloro) rutênio (II)*

Em um balão com duas bocas, munido com um agitador magnético e um condensador de refluxo, foram adicionados tricloreto de rutênio hidratado (1,57 mmol), 2,2'-bipirazina (3,16 mmol) e cloreto de lítio (10,21 mmol). Sob atmosfera de argônio, essa mistura foi diluída com DMF anidro (15 mL) e o sistema foi aquecido a 120 °C por 6 h. Após este período o solvente foi removido por rota-evaporação e o produto foi re-cristalizado utilizando DMF e acetona. O precipitado roxo foi filtrado e utilizado nas próximas etapas reacionais.

Rendimento = quantitativo. Máximos de absorvância ($\lambda_{\text{máx}}$) em DMF: 515 nm; 400 nm.

3.3.21 - Síntese do composto hidrazida tióctica

Em um balão com duas bocas, sob atmosfera de argônio e a temperatura ambiente, foram adicionados, ácido tióctica (0,20 mmol), carbonil-di-imidazol (CDI) (0,20 mmol) e THF anidro (0,4 mL). A mistura foi agitada por 15 minutos e após este período hidrazina hidratada (1 mmol) foi adicionada ao meio reacional. Deixou-se reagir à temperatura ambiente por mais 30 minutos e passado este período o meio reacional foi vertido em uma coluna cromatográfica contendo sílica, previamente empacotada com clorofórmio. Após eluição com clorofórmio, o solvente foi removido por rota-evaporação levando à obtenção do composto de interesse.

Rendimento = 67%. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.65 (br s, xH); 3.50 (q, *J* = 6 Hz, 1H); 3.16-3.01 (m, 2H); 2.40 (sext., *J* = 6 Hz, 1H); 2.10 (t, *J* = 9 Hz, 2H); 1.85 (sext., *J* = 6 Hz, 1H); 1.67-1.56 (m, 4H); 1.58-1.33 (m, 2H).

3.3.22 - Síntese da 5,6-diona-fenantrolina

Em um balão com duas bocas foram adicionados fenantrolina (23 mmol) e KBr (33 mmol). O balão foi resfriado com banho de gelo e, sob agitação magnética, uma solução contendo ácido sulfúrico e $\text{HNO}_{3(\text{aq})}$ saturado, na proporção 2:1 respectivamente, foi adicionada gota a gota (60 mL). Após 15 minutos, adicionou-se um condensador de refluxo ao balão e a reação foi aquecida a refluxo por 4 h. Após esse período, o meio reacional foi colocado em banho de gelo e o pH do meio reacional foi ajustado para 6 através da adição de $\text{NaHCO}_{3(\text{sat})}$. O meio aquoso (pH = 6) foi extraído com diclorometano (500 mL). A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica seca com MgSO_4 , filtrada e o solvente removido por rota-evaporação. O sólido amarelo obtido foi re-cristalizado com etanol levando ao produto de interesse.

Rendimento = 39%. **RMN ^1H** (300 MHz, DMSO): δ = 8.98 (s, 2H); 8.39 (d, J = 6 Hz, 2H); 7.67 (dd, J_1 = 6 Hz, J_2 = 3 Hz, 2H).

3.3.23 - Síntese do ligante bitiofeno-imidazo-fenantrolina

Em um balão com duas bocas, munido com um agitador magnético e um condensador de refluxo, foram adicionados o formil-bitiofeno (1,2 mmol), o acetato de amônio (20 mmol), a 5,6-diona-fen (1 mmol) e o ácido acético glacial (20 mL). A solução foi mantida sob agitação magnética e aquecida sob refluxo por 4 h. Após esse período, deixou-se a solução atingir a temperatura ambiente e o produto foi precipitado mediante neutralização do meio com $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq})}$ (5 M). O precipitado foi filtrado e lavado com água (3 x 10 mL) e dietil éter (3 x 10 mL) e posteriormente re-cristalizado com metanol. O precipitado foi filtrado e seco em estufa de alto vácuo a 50 °C.

Rendimento = 45%. **RMN ¹H** (300 MHz, DMSO): δ = 13.92 (br s, 1H); 9.09-9.04 (m, 2H); 8.85 (d, J = 9 Hz, 2H); 7.86-7.82 (m, 3H); 7.62 (d, J = 6 Hz, 1H); 7.50-7.47 (m, 2H); 7.19-7.16 (m, 1H).

3.3.24 - Síntese do complexo heteroléptico [Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)]

Em um balão com duas bocas, munido com um agitador magnético e um condensador de refluxo, foram adicionados o Ru(bpz)₂Cl₂(0,05 mmol) e o ligante bitiofeno-imidazo-fenantrolina (0,049 mmol). Ao balão foi adicionado etileno glicol (3 mL) e a solução foi aquecida, sob refluxo e sob atmosfera de argônio por 6 h. Transcorrido este período, deixou-se o meio reacional atingir a temperatura ambiente e adicionou-se água destilada ao meio (2 mL). NH₄PF_{6(aq)} saturado foi adicionado lentamente até não ser observado mais a formação de um precipitado. O precipitado foi filtrado, lavado com água gelada (2 x 2 mL) e dietil éter (2 x 2 mL). Após estes processos o sólido obtido foi colocado sob vácuo em uma estufa a 50 °C. Esse procedimento levou a obtenção do complexo [Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)](PF₆)₂ com uma pureza de 70% (analisada por CLAE). Esse produto foi purificado por CLAE em escala semi-preparativa levando a obtenção do complexo [Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)](CF₃COO)₂ com 9% de rendimento e pureza maior que 99%.

Rendimento = 9%. **RMN ¹H** (300 MHz, CD₃OD): δ = 9.91 (s, 2H); 9.10 (d, J = 9 Hz, 2H); 8.99 (d, J = 9 Hz, 2H); 8.43 (d, J = 6 Hz, 2H); 8.19 (d, J = 6 Hz, 2H); 7.90-7.81 (m, 9H); 7.68-7.64 (m, 2H); 7.37 (d, J = 6 Hz, 2H); 7.31 (d, J = 6 Hz, 4H); 7.04-7.01 (m, 2H). EMAR *MALDI-TOF* (m/z): calculado para (M + 2(CF₃COO) + 1H)⁺: 1029.0511, obtido: 1028.974; calculado para (M + 2(CF₃COO) - 1bpz)⁺: 869.9840, obtido: 869.929.

3.3.25 - *Estudo de luminescência dos fluoróforos na presença de sais de antimônio*

Solução estoque dos sais de antimônio (SbCl_3 ou tartarato de antimônio e potássio) foram preparadas através da solubilização dos mesmos nas misturas de solvente de interesse (CHCl_3 /acetonitrila (17:3) ou água/DMSO (1:1)). Uma solução estoque ($10 \mu\text{M}$) do fluoróforo (complexos de Ru (II) ou formil-bi-tiofeno) foi preparada através da solubilização de uma massa conhecida do mesmo na mistura de solvente de interesse. Imediatamente antes da medida de luminescência, 1,5 mL da solução do fluoróforo foi transferida para uma cubeta de quartzo. Logo após esse procedimento, a quantidade de antimônio de interesse foi transferida para a cubeta através da adição de alíquotas da solução estoque do analito (sal de Sb), através de um pipetador automático devidamente calibrado. Posteriormente, o volume de solvente total da cubeta foi ajustado para 3 mL através da adição da solução estoque dos solventes (CHCl_3 /acetonitrila ou água/DMSO), sendo essa adição sempre igual a 1,5 mL menos o volume de solução de antimônio adicionado. Para cada análise de luminescência o procedimento mencionado a cima foi repetido. As regiões de excitação das amostras, para cada experimento, estão descritas no item 4.2.2. Todas as medidas de luminescência em estado estacionário foram realizadas com feixes de 5 mm. Nas medidas de SPT foram utilizados feixes de 9 mm.

4 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A apresentação e discussão dos resultados foram divididas em três partes. A primeira está relacionada com a síntese e a utilização de derivados da riboflavina como fotossensibilizador (Fs) em terapia fotodinâmica. A segunda parte da tese concerne à síntese e aplicação de complexos de rutênio como sensores de antimônio. A última diz respeito às atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) no espectro de RMN para a **TARF-Catiônica-2**.

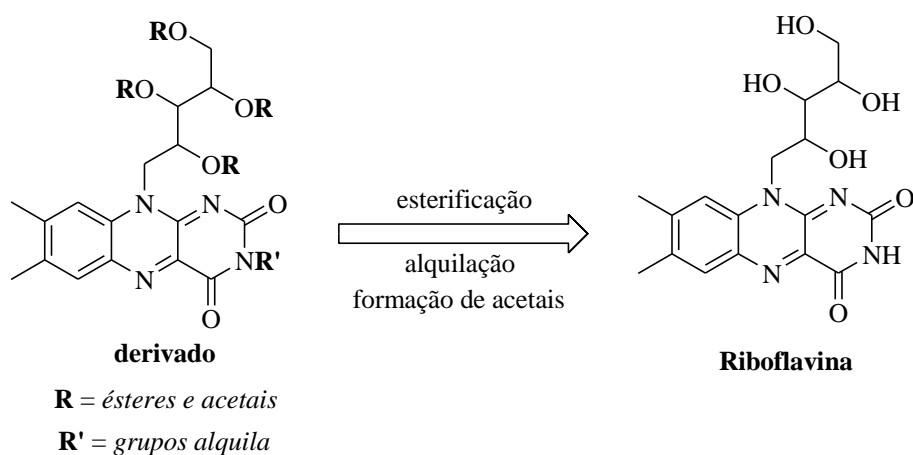
4.1 Derivados da riboflavina como fotossensibilizadores em PDT

Neste item serão discutidos todos os processos que envolvem a obtenção e a caracterização de novos fotossensibilizadores, incluindo: síntese, purificação e confirmação estrutural dos fotossensibilizadores flavinínicos; determinação dos seus parâmetros fotoquímicos e fotofísicos; avaliação do coeficiente de partição *n*-octanol/água e estudo comparativo desses Fs na eficiência de morte celular fotoinduzida de promastigotas de *Leishmania major*.

4.1.1 Preparação dos Fs derivados da riboflavina

As transformações químicas desenvolvidas tiveram por finalidade obter fotossensibilizadores com características fotoquímicas e fotofísicas semelhantes às da riboflavina, porém com propriedades físico-químicas variadas, tais como solubilidade, coeficiente de partição, permeabilidade celular e citolocalização (ver figura 2.1). Dessa forma, pode-se aperfeiçoar o efeito fotodinâmico dessa classe de compostos além de possibilitar um estudo detalhado que correlacione eficiência de morte celular fotoinduzida com as estruturas químicas dos Fs.

Um dos principais problemas da riboflavina diz respeito à sua solubilidade, que se apresenta baixa tanto em solvente aquoso quanto orgânico, uma vez que sua estrutura apresenta partes polares (grupos hidroxilas) e apolares (sistemas de anéis isoloxazinas). Portanto, as funções orgânicas escolhidas para serem funcionalizadas foram aquelas que promovem grandes variações na polaridade geral da molécula, como por exemplo, a transformação dos grupos alcoóis da cadeia ribitol e do nitrogênio 3 do sistema de anéis isoaloxazina. Foram propostas sínteses de simples execução (poucas etapas reacionais) e que utilizam a própria riboflavina como material de partida. Através dessas técnicas de derivatização direta da riboflavina, foram desenvolvidas sínteses de derivados lipofílicos e hidrofílicos, e de compostos catiônicos, aniônicos e neutros (ver figura 2.1). As ferramentas sintéticas utilizadas variaram entre formações de acetais e reações de acilação da cadeia ribitol; e a alquilação do sistema de anéis isoaloxazina (esquema 4.1).



Esquema 4.1: Proposta geral de retro síntese dos derivados flavínicos utilizando a riboflavina como reagente de partida.

Como mencionado no capítulo introdutório, funcionalizações nos grupos alcoóis da cadeia ribitol da riboflavina e alquilações do N-3, mostradas no esquema 4.1, levam à formação de produtos mais lipofílicos do que o material de partida e não afetam de maneira significativa os parâmetros fotofísicos e fotoquímicos dos mesmos.^{42a}

A formação de acetais cíclicos ocorre de modo a formar anéis de cinco membros, sendo comum, também, a formação de estruturas cíclicas de quatro e seis membros. O mecanismo dessa reação ocorre através do duplo ataque dos grupos hidroxilas à carbonila, levando à formação do acetal cíclico mais estável (carbonos 3' e 5'), com a eliminação de uma molécula de H₂O. O mesmo processo ocorre nas hidroxilas ligadas ao carbono (2' e 4'). No caso da riboflavina, a formação dos dois acetais pode ocorrer entre os pares de hidroxilas 5'-3' e 4'-2' (formando anéis de seis membros, como mostrados no esquema 4.1) e também através dos pares 5'-4' e 3'-2' (formando anéis de cinco membros, menos estáveis por repulsão dos oxigênios). De acordo com os dados de CCD mencionados anteriormente, inferi-se que há a formação de uma mistura de isômeros, no entanto acredita-se que formem preferencialmente acetais cíclicos contendo seis membros.^{93,94} Em busca de mais informações sobre os compostos formados nessa reação, uma alíquota da reação foi analisada por espectrometria de massas com ionização por *electrospray*.

⁹³Pétursson, S. J. *Chem. Edu.* **1997**, 74, 1297.

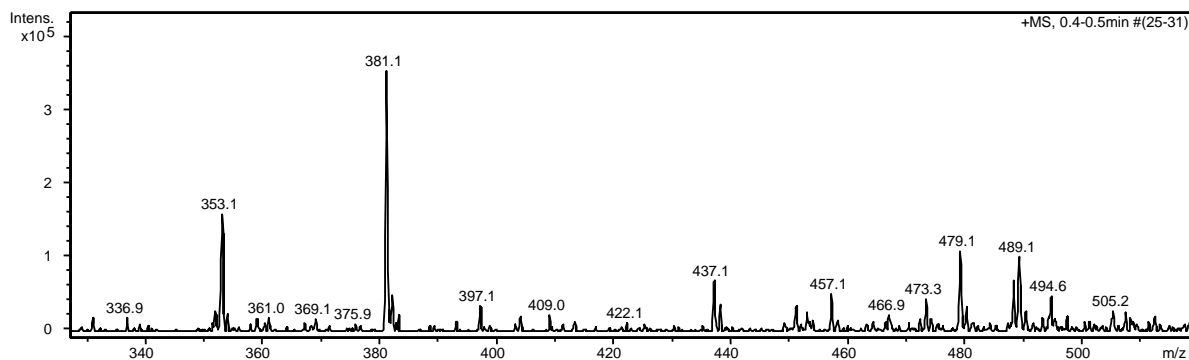


Figura 4.1: Espectro de massas com ionização por *electrospray* (operando no modo positivo) do produto bruto da reação da riboflavina com acetona.

Na figura 4.1 pode-se observar um sinal intenso de riboflavina que não reagiu ($C_{17}H_{20}N_4O_6 + Na - H_2O = 381 \text{ m/z}$). Constatam-se também sinais característicos da formação do produto **RF-Acetal** ($C_{23}H_{28}N_4O_6 + H = 457 \text{ m/z}$; e $C_{23}H_{28}N_4O_6 + Na = 479 \text{ m/z}$), e não se observam sinais de um produto contendo apenas um grupo acetal. A reação foi realizada na temperatura ambiente e a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, bem como em diferentes concentrações de acetona. CCD foi utilizada para acompanhar a formação do produto e, em todos os casos estudados, observavam-se a formação de 3 manchas após aproximadamente uma hora, sempre apresentando grande quantidade de material de partida sem reagir. Tentou-se isolar os produtos e subprodutos por cromatografia em coluna, no entanto apenas traços do produto foram eluídos. Notava-se que a **RF** e a **RF-Acetal** interagem irreversivelmente com a sílica durante a cromatografia. Utilizando a pequena quantidade de produto eluído, analisou-se a amostra por RMN de ^1H em CDCl_3 . Observaram-se sinais (muito pequenos) no espectro característicos do grupo ribitol de um possível derivado da **RF** (em 5,7-4,0 ppm, ver item 4.3) e também sinais intensos de água e acetona. Foi observado, também, que a amostra preparada para RMN formava um precipitado amarelo-laranja após as análises, indicando a regeneração da riboflavina com conseqüente perda de acetona e água. Sendo assim, concluiu-se que esse derivado hidrolisa muito facilmente em meio aquoso e não é compatível com o

objetivo desta tese, que visa aplicar os derivados da riboflavina em meios biológicos. É importante ressaltar que em 2010 uma metodologia sintética para obter um derivado acetal-riboflavina foi descrita por Imada et al.⁹⁴ Nesse artigo, porém, nada foi mencionado sobre a estabilidade do derivado em meio aquoso. Apesar de sua instabilidade frente à água, a **RF-acetal** mostrou-se ser solúvel em solventes orgânicos (como por exemplo, clorofórmio) indicando que a introdução de grupos lipofílicos nas hidroxilas da **RF** são de fato transformações importantes no objetivo desse trabalho. Com essa finalidade estudou-se a síntese da tetra-acetil-riboflavina (**TARF**).

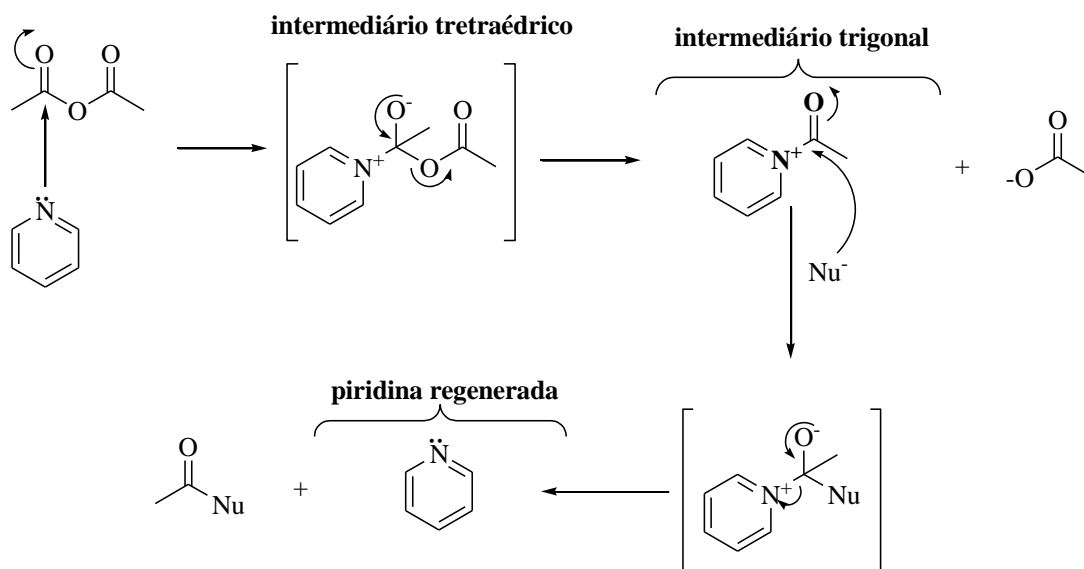
4.1.1.2- Síntese da 2',3',4',5'-tetracetil-riboflavina (**TARF**)

Diferentes protocolos sintéticos estão descritos na literatura para a obtenção da tetra-acetil-riboflavina (**TARF**).⁹⁵ McCormick obteve esse composto com 95% de rendimento isolado, reagindo a **RF** em uma mistura de ácido acético e anidrido acético (1:1) na presença de ácido perclórico em quantidades catalíticas.^{95a} Nesse processo, o oxigênio da carbonila do anidrido acético é eficientemente protonado pelo ácido, aumentando a reatividade (da carbonila) frente ao ataque nucleofílico dos grupos hidroxila da **RF**. Uma rota alternativa de síntese da **TARF** foi desenvolvida por Banekovich *et al.* que reagiu a riboflavina e o anidrido acético na presença do solvente básico piridina em refluxo.^{95d} Nesse caso, além de atuar como base, o solvente participa da reação através de catálise nucleofílica.^{96a}

⁹⁴Imada, Y.; Kitagawa, T.; Ohno, T.; Iida, H.; Naota, T. *Org. Lett.* **2010**, *12*,32.

⁹⁵(a) McCormick, D. B. *J. Heterocycl. Chem.* **1970**, *7*, 447. (b) Ogasawara, F.; Wang, Y.; Bobbett, D. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1637. (c) Edwards, A. M.; Saldaño, A.; Bueno, C.; Silva, E.; Alegría, S. *Bol. Soc. Chil. Quím.*, **2000**, *45*, 423. (d) Kuhn, R.; Wagner-Jauregg, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1933**, *67*, 1577.

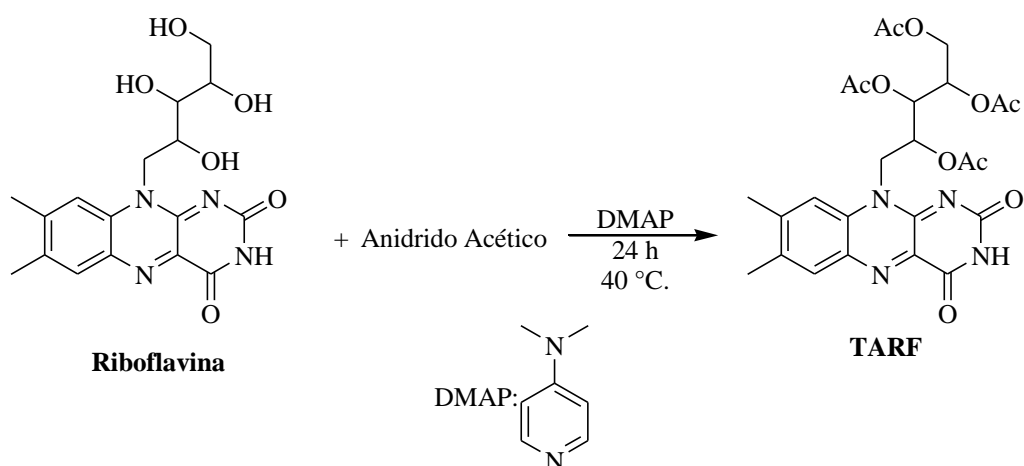
⁹⁶(a) Clayden, J. *et al.* Nucleophilic Substitution at the Carbonyl Group. In: **Organic Chemistry**. 1. ed. New York. Oxford University Press., 2001, p. 282. ISBN 978-0-19-850346-0. (b) Clayden, J. *et al.* Aromatic Heterocycles 1: Structure and Reactions. In: **Organic Chemistry**. 1. ed. New York. Oxford University Press., 2001, p. 1153. ISBN 978-0-19-850346.



Esquema 4.3: Mecanismo da catálise nucleofílica pela piridina entre o anidrido acético e um nucleófilo.

Antes do ataque direto do nucleófilo (Nu⁻), ocorre o ataque da piridina à carbonila, formando um intermediário tetraédrico. Essa espécie formada elimina um grupo acetato formando um intermediário trigonal que, por sua vez, é mais reativo frente a um ataque nucleofílico do que o próprio anidrido acético. A reação entre o nucleófilo e essa espécie formada apresenta uma maior constante de velocidade (em relação à constante cinética entre o nucleófilo e o anidrido acético) levando à formação de um segundo intermediário tetraédrico. O intermediário formado elimina a piridina (que entra no ciclo catalítico outra vez) formando o produto desejado.

Por um mecanismo semelhante, o composto básico 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) também atua como catalisador nucleofílico em reações de substituição à carbonila e se destaca perante aos outros catalisadores devido a sua pronunciada eficiência catalítica (maior que a piridina).^{96b} Metodologias para preparar a **TARF** utilizando DMAP (em quantidades estequiométricas) não foram exploradas. Sendo assim, decidiu-se aplicar o DMAP como catalisador nucleofílico na reação de formação da **TARF** (esquema 4.4).



Esquema 4.4: Síntese da **TARF** utilizando anidrido acético e DMAP.

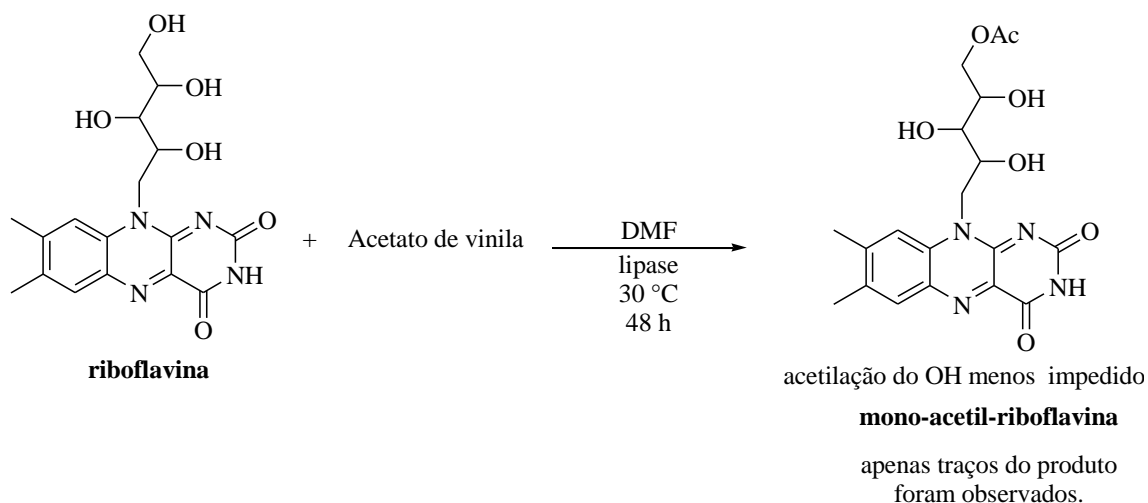
A reação consistiu em utilizar o anidrido acético como agente acilante e o próprio solvente da reação na presença de DMAP. O catalisador nucleofílico foi utilizado em quantidades estequiométricas (4 eq. para 1 eq. de riboflavina) pois para cada hidroxila transformada, produzia-se um próton, que inativa o catalisador por protonação do mesmo. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD) onde se observou a formação do produto de interesse, bem como a geração de traços de subprodutos que podem ser a mono-, di- e/ou tri-acetil riboflavina. O produto foi purificado por coluna cromatográfica levando a obtenção de um sólido laranja. A estrutura química da **TARF** foram confirmadas através da constatação de sinais, no RMN de ^1H , típicos da cadeia ribitol dos derivados da **RF** (entre 5,7-4,0 ppm, ver item 4.3), aliado ao surgimento no espectro (de RMN de ^1H) de 4 singletes com valores de integrais de 3 hidrogênios nas regiões entre 2,21 e 1,68 ppm referente aos grupos metilas (acetil). O espectro de RMN de ^1H mostrou que a substância apresentava elevada pureza. Os dados de EM obtidos, de 545,1881 m/z, estão, também, de acordo com a estrutura química da **TARF** protonada. Com essa metodologia a **TARF** foi obtida com rendimento isolado de 75%.

Diante desse resultado, foi visualizado que essa mesma reação poderia ser realizada entre a riboflavina e um agente acetilante na presença de catalisadores “verdes” como as enzimas lipases.

4.1.1.3 Acetilação da riboflavina mediada por lipase

A fim de contribuir com o arsenal de ferramentas sintéticas para sintetizar derivados flavínicos, estudamos a acetilação quimioenzimática da riboflavina mediada por lipases. Além de sua importância biológica, as lipases são enzimas conhecidas por conter alta atividade e promiscuidade catalítica e são aplicadas extensivamente na derivatização de carboidratos.⁹⁷

Primeiramente, baseado nas condições reacionais geralmente utilizadas na acilação enzimática de carboidratos,⁹⁸ testou-se a metodologia descrita no esquema 4.5.



Esquema 4.5: Acetilação da riboflavina mediada por lipase.

O estudo inicial fez uso do acetato de vinila como acilante, e três tipos de lipases como biocatalisadores: de *Candida antarctica* (CAL-B), de *Pseudomonas cepacia* (PCL) e de pâncreas de porco (PPL). As reações foram monitoradas por CCD; em

⁹⁷Ferla, B. L. *Monatshefte für Chemie*, **2002**, 133, 351.

⁹⁸Rodríguez-Pérez, T.; Lavandera, I. Fernández, S.; Sanghvi, Y. S.; Ferrero, M.; Gotor, V. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2769.

nenhum dos casos, porém, foi observado a formação de um possível produto. Para detectar a existência de um produto de acetilação, analisou-se amostra bruta das reações por espectrometria de massas com ionização por *electrospray*. Essas análises qualitativas sugeriram que a reação, quando catalisada por PCL, levou à formação de um produto monoacetilado ($C_{19}H_{22}N_4O_7 + Na = 441 \text{ m/z}$) (Figura 4.2).

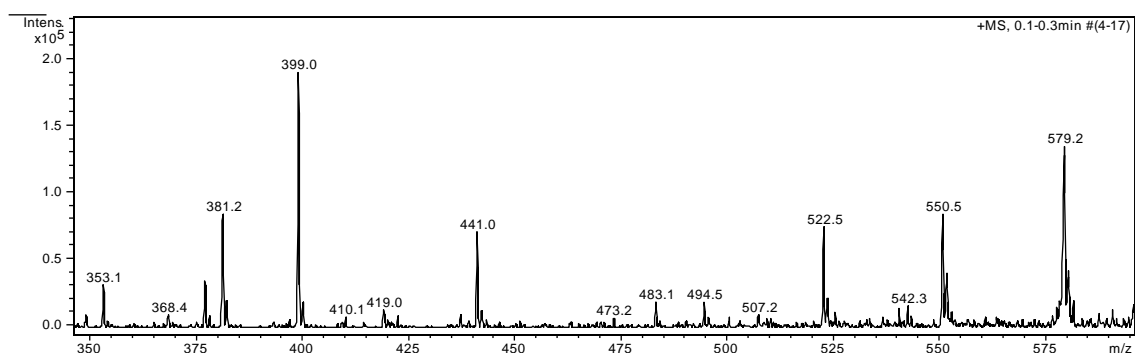


Figura 4.2: Espectro de massas com ionização por *electrospray* (operando no modo positivo) do produto bruto da acetilação enzimática mediada pela PCL.

Quando utilizada a CAL-B e a PPL como biocatalisadores, não foram observados sinais no espectro de massas referentes a produtos de acetilação. Esses resultados preliminares mostram que é possível promover uma acilação enzimática da riboflavina com a lipase PCL. Vários outros parâmetros deveriam ser otimizados (tais como aplicar outras lipases, diferentes temperaturas, acilantes) a fim de desenvolver uma metodologia enzimática com alta eficiência. Na literatura, foi encontrado apenas um exemplo de derivatização da riboflavina por métodos quimioenzimáticos. Nesse trabalho os autores desenvolveram um método de acilação de carboidratos mediada por proteases.⁹⁹ Após aperfeiçoarem o processo para acilar diferentes açúcares, os autores aplicaram a riboflavina como substrato alternativo a fim de mostrar a versatilidade da metodologia desenvolvida. No entanto, nesse único exemplo, os pesquisadores utilizaram butirato de 2'2'2'-tricloroetila como acilante, subtilisina como biocatalisador em DMF. Esse método levou à formação do produto monoacetilado na

⁹⁹ Riva, S.; Chopineau, J.; Kieboom, A. P. G.; Klivanov, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 584.

hidroxila menos impedida (5') com apenas 20% de rendimento após seis dias de reação. Não foram encontrados dados na literatura sobre a utilização de lipases na derivatização da riboflavina.

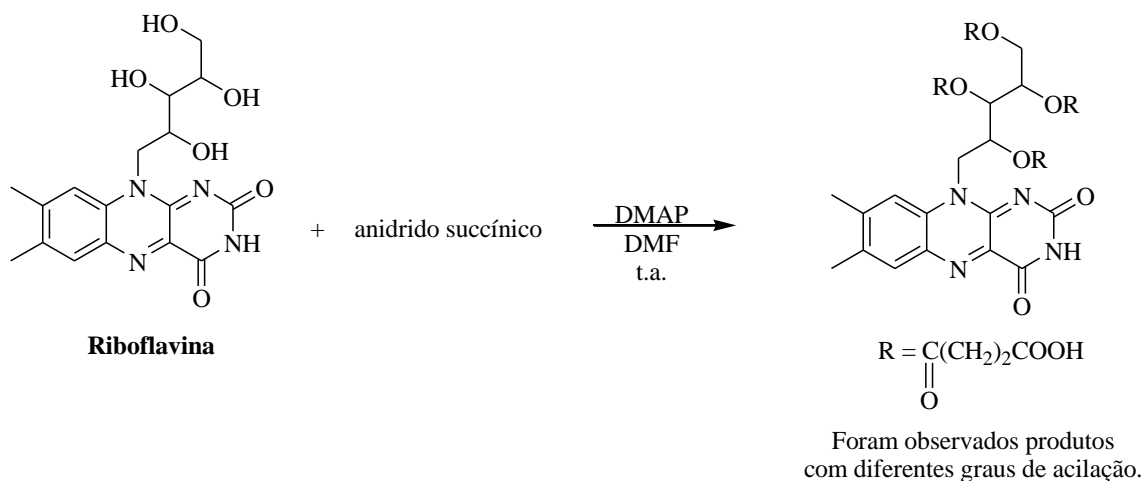
Diante disso, as investigações de rotas biocatalíticas para obtenção de derivados da riboflavina é de grande relevância. Comparado com o único dado de acilação enzimática da **RF** existente na literatura (tempo de reação 144 h), o resultado obtido nessa tese é relevante, pois foi observado o produto mono-acilado em apenas 48 h de reação. Esse resultado foi um dos dados apresentados (na forma de poster) na conferência “11th Tetrahedron Symposium” (2010) em Pequim, sendo esse trabalho contemplado com o prêmio “The Excellent Poster Awards”. No entanto, não investimos mais tempo nessa metodologia enzimática de acetilação e iniciamos o estudo de derivatização da riboflavina com anidrido succínico. No futuro, pretendemos investigar as melhores condições reacionais para acetilar enzimaticamente a **RF**.

4.1.1.4. Funcionalização da riboflavina com anidrido succínico

Com a finalidade de obter um derivado flavínico que apresenta maior solubilidade em água, a derivatização da **RF** com anidrido succínico foi realizada. Essa metodologia de derivatização foi previamente abordada por Furter *et al.*¹⁰⁰, que sintetizaram a di-, tri-, e tetra-acilriboflavina reagindo a vitamina B₂ com anidrido succínico em piridina sob refluxo. Primeiramente testou-se a metodologia comentada acima (proporção **RF**:anidrido succínico, 1:4), mas o produto obtido no nosso caso apresentava aspecto avermelhado e ponto de fusão diferente daquele descrito por Furter *et al.*¹⁰⁰ Além disso, os dados de RMN desse produto estavam inconsistente com o composto de interesse (não foi observado sinais entre 5,7-4,0 ppm). Inferi-se que a alta

¹⁰⁰ Furter, M. F.; Haas, G. J.; Rubin, S. H. *J. Biol.Chem.* **1945**, 160, 293.

temperatura da reação tenha levado à degradação da riboflavina. A fim de pesquisar uma metodologia em condições mais brandas, testou-se o protocolo semelhante ao utilizado para a formação da **TARF** que utiliza o DMAP como catalisador e base (esquema 4.6).



Esquema 4.6: Derivatização da riboflavina com anidrido succínico.

A principal diferença entre a metodologia mostrada no esquema 4.6 e o protocolo de Furter *et al.* é a mudança do catalisador nucleofílico de piridina para DMAP e a utilização de baixa temperatura (de 115 °C para t.a.). O mecanismo esperado para essa reação é semelhante ao mostrado no esquema 4.3. No entanto, devido à utilização do anidrido cíclico (como agente acilante), obtém-se um produto contendo uma porção carboxilato. A formação dos produtos dessa reação foi acompanhada por CCD tendo o material de partida consumido em aproximadamente 3 h. Nessa análise foi observada apenas uma mancha com um fator de retenção menor em relação à **RF**, sugerindo a formação do produto de interesse (mais polar que a **RF**). A análise do produto por espectrometria de massas (figura 4.3) mostrou que o produto tetra-acilado foi formado ($\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{18} + \text{H} = 777 \text{ m/z}$). No entanto, observa-se também a formação dos subprodutos bi-acilado ($\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_{12} + \text{H} = 577 \text{ m/z}$) e tri-acilados ($\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{15} + \text{H} = 677 \text{ m/z}$).

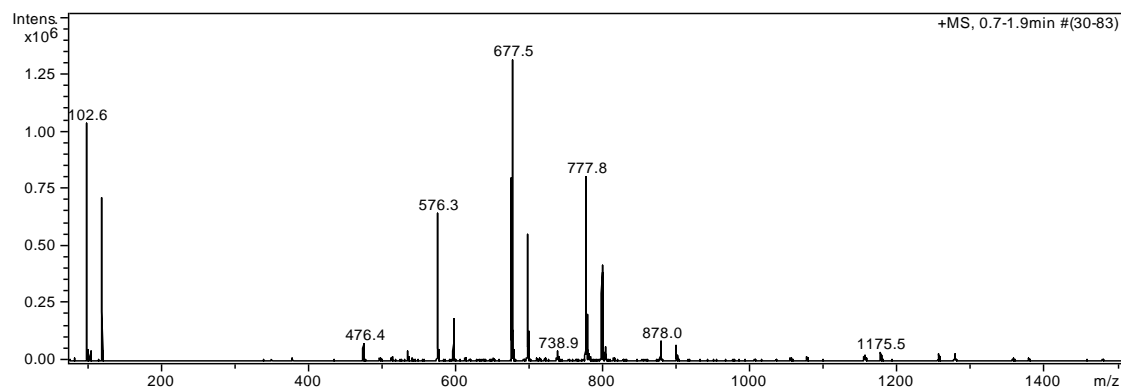


Figura 4.3: Espectro de massas com ionização por *electrospray* (operando no modo positivo) do produto da reação entre a riboflavina e o anidrido succínico na presença de DMAP.

A reação foi testada nas proporções de anidrido succínico e riboflavina de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 e excesso de anidrido. Em todos os casos observamos mistura dos mesmos subprodutos. A metodologia foi testada em temperatura ambiente, 40 e 50 °C e as reações foram acompanhadas por espectrometria de massas com tempos reacionais de até três dias. Para todos os casos a distribuição das misturas de produtos de acilação não variaram significativamente. Os produtos brutos dessas reações foram analisados por RMN de ^1H e, em todos os casos, observaram-se sinais com deslocamentos químicos típicos da riboflavina (os hidrogênios aromáticos e os hidrogênios da cadeia ribitol, ver item 4.3) e também os sinais referentes à nova porção orgânica inserida na molécula (- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ em 2,93-2,70 ppm do succinato). No entanto, os valores das integrais referentes aos hidrogênios da molécula não estavam seguindo a proporção esperada devido à presença de diferentes subprodutos com distintos graus de substituição. É importante ressaltar que, mesmo após sucessivas lavagens dos produtos brutos com solventes orgânicos (CHCl_3 , acetato de etila e metanol gelado) e recristalização em isopropanol, ainda foram observados no espectro de RMN de ^1H sinais característicos do DMAP em 8,00 e 6,88 ppm. Sendo assim, inferi-se que o produto obtido é uma mistura de derivados da riboflavina acilados com anidrido succínico, sendo majoritariamente tri- e tetra- acilado. As funções ácido carboxílico do produto estão na

forma de carboxilato tendo como contraíon o DMAP, como exemplificado na figura 4.4.

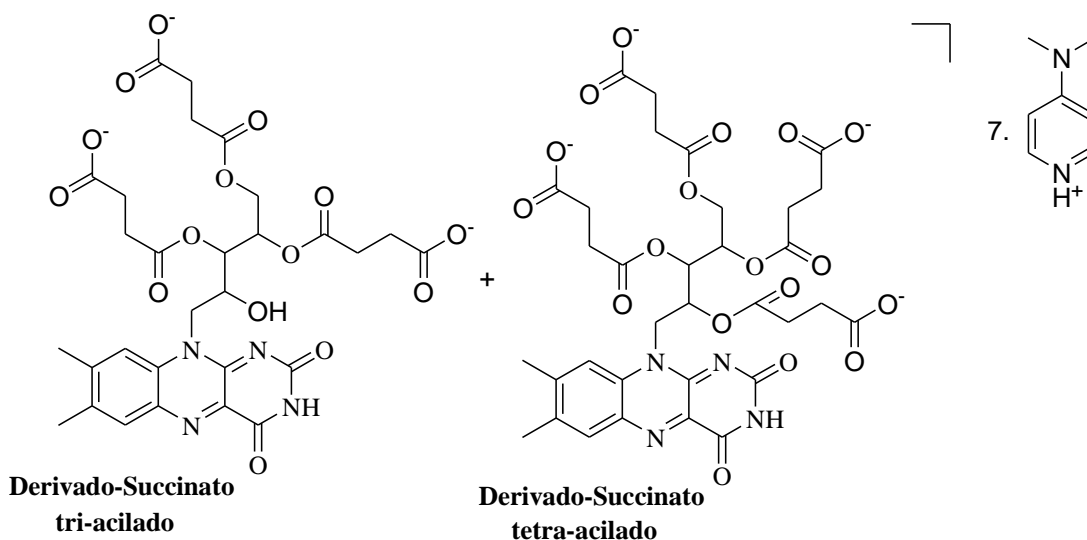


Figura 4.4: Mistura de produtos obtidos na reação entre a riboflavina e o anidrido succínico na presença de DMAP.

De modo a estudar uma metodologia mais eficiente para a formação do produto tetra-acilado, estudou-se a reação nas seguintes condições: anidrido succínico (4 eq.), trietilamina (4 eq.), DMAP em quantidade catalítica, 40 °C por 6 h. Uma vez que a trietilamina ($pK_{aH} = 10,8$) é uma base mais forte que o DMAP ($pK_{aH} = 9,7$), espera-se uma maior reatividade entre os grupos hidroxilas e o anidrido.¹⁰¹ A reação foi analisada por CCD apresentando um perfil cromatográfico semelhante ao das reações anteriores. O produto bruto dessa reação foi analisado por espectrometria de massas (figura 4.5).

¹⁰¹ Clayden, J. *et al.* Aromatic Heterocycles 1: Structure and Reactions. In: **Organic Chemistry**. 1. ed. New York. Oxford University Press., 2001, p. 1165. ISBN 978-0-19-850346-0

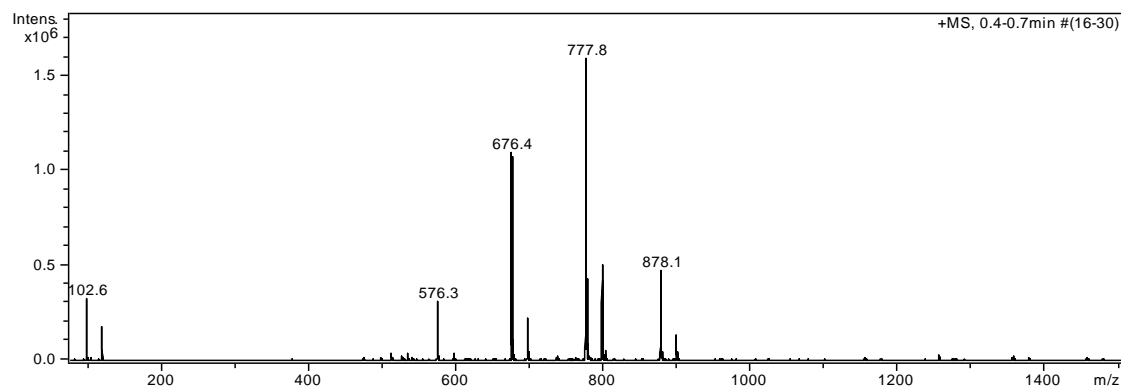


Figura 4.5: Espectro de massas com ionização por *electrospray* (operando no modo positivo) da reação entre a riboflavina e o anidrido succínico na presença de trietilamina.

De acordo com o espectro, nota-se que foram formados os mesmos subprodutos observados na metodologia com DMAP (em quantidade estequiométrica) e também o produto tetra-acilado ($m/z = 777$). Observa-se também a formação do produto penta-acilado ($C_{37}H_{40}N_4O_{21} + H = 878 m/z$). Espectro de massas do tipo MS_2 do sinal em 878 (m/z) produz um fragmento referente ao produto tetra-acilado, sugerindo que o sinal com m/z igual a 878, ao ser fragmentado, elimina uma cadeia derivado do ácido succínico (figura 4.6 a).

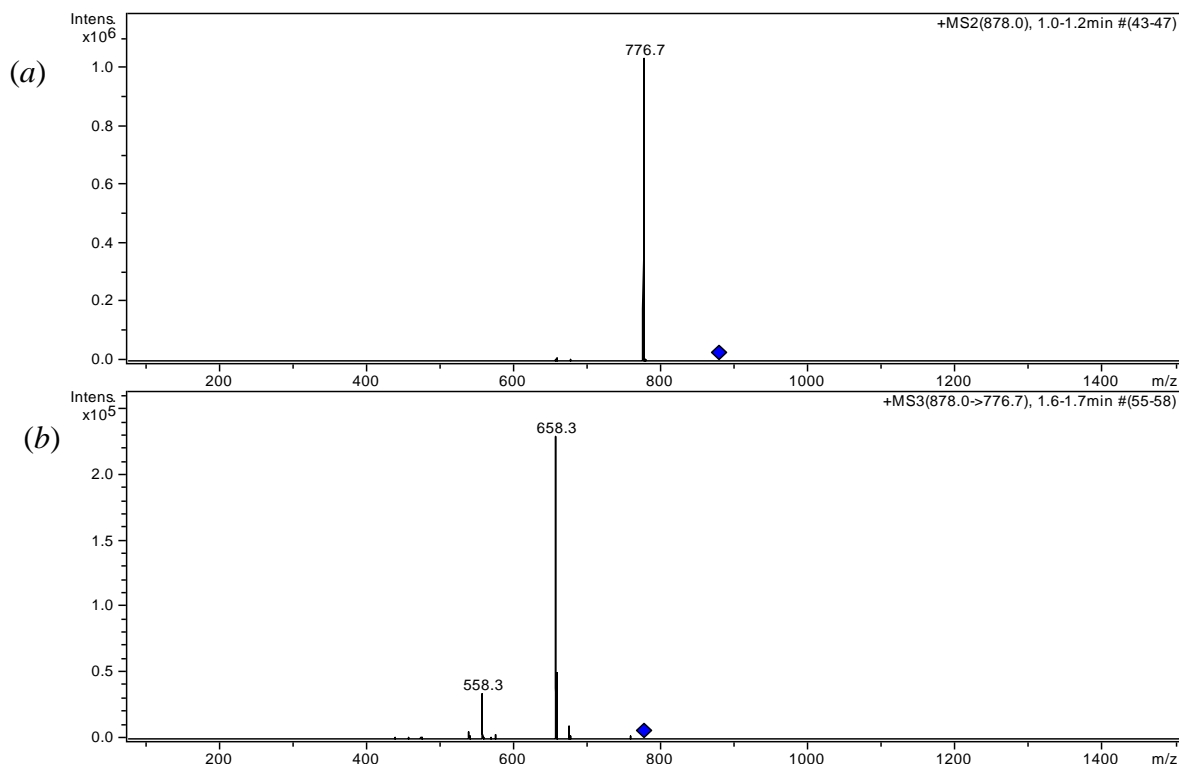
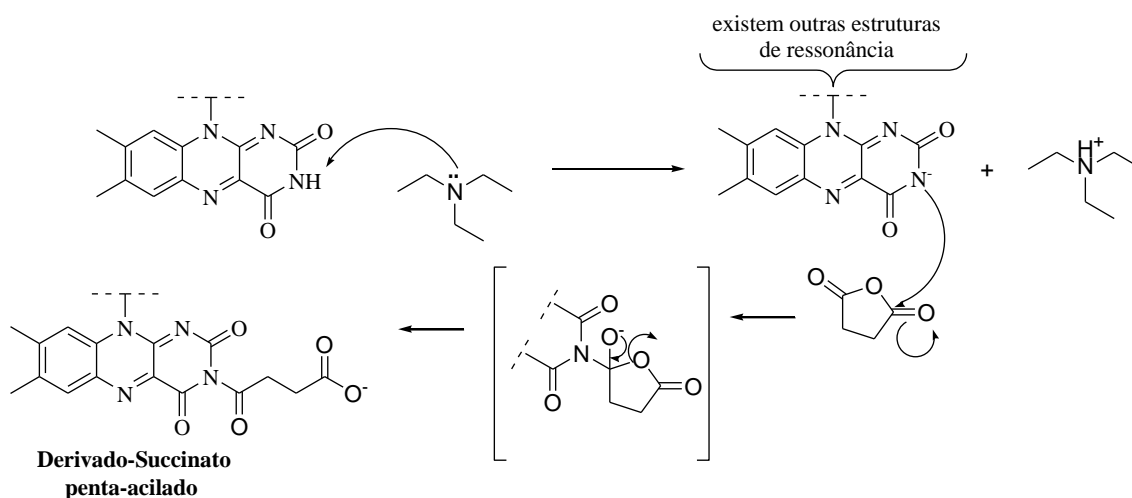


Figura 4.6: (a) espectro de massas tipo MS₂ do sinal 878 m/z observado no produto bruto da reação da riboflavina e anidrido acético na presença de trietilamina; (b) espectro de massas tipo MS₃ do fragmento 777 m/z obtido da primeira fragmentação do sinal 878 m/z de (a).

Na figura 4.6 b, pode-se verificar que a fragmentação do sinal 777 (m/z), ou seja, o MS₃ de 878 (m/z), leva à formação de um intermediário com relação m/z referente ao produto tri-acilado menos uma molécula de água ($C_{29}H_{32}N_4O_{15} - H_2O = 658$ m/z). Esses dados também corroboram com a obtenção de um derivado flavínico contendo diversos grupos succínicos. Infere-se que, nessa última metodologia testada, a base da reação (trietilamina) é forte o suficiente para desprotonar o N-3 do sistema de anéis isoaloxazina levando à ativação desse grupo nucleofílico da riboflavina, promovendo a acilação também nessa porção da molécula (esquema 4.7).



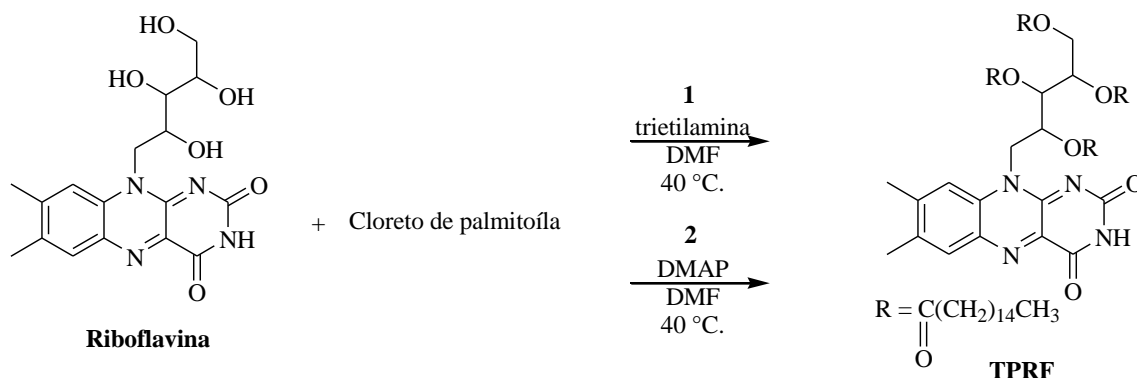
Esquema 4.7: Mecanismo de acilação do *N*-3 da riboflavina na presença de trietilamina.

É importante ressaltar que o mecanismo mostrado no esquema 4.7 ocorre com baixíssima eficiência quando a reação é feita utilizando DMAP como base. Em todos os protocolos sintéticos realizados, não foi possível obter o produto tetra-acilado puro e tampouco métodos de purificação da tetra-acil-riboflavina foram eficientes. Foi estabelecida uma condição ótima para essa reação (ver item 3.2.5) e a mistura de derivados de diferentes graus de acilação (tetra-acil é o produto majoritário) vem sendo utilizada pelo grupo como mimético da **RF** solúvel em meio aquoso. Planeja-se futuramente desenvolver uma metodologia de separação dessas moléculas baseadas em cromatografia de troca iônica.

O conhecimento advindo desse estudo foi de grande importância para estabelecer protocolos que controlem a substituição nas cadeias ribitol ou *N*-3 da **RF**. O uso de DMAP como base (mesmo em excesso) catalisa a introdução de grupos nas hidroxilas da cadeia ribitol, mas não na porção *N*-3. Por outro lado, bases fortes (como por exemplo, trietilamina) provêm a substituição no grupo *N*-3. Esses parâmetros reacionais foram também estudados no caso da acilação da riboflavina com cloreto de palmitoíla.

4.1.1.5- Síntese das 2',3',4',5'-tetrapalmitoil-riboflavina (TPRF)

Com a finalidade de se obter um derivado da **RF** altamente lipofílico, estudou-se a derivatização da riboflavina através da introdução de grupos palmitóilas em sua estrutura química. A introdução de grupos palmitóila é largamente empregada em síntese orgânica de modo a aumentar a lipofilicidade de substâncias.¹⁰² Essa derivatização na molécula da riboflavina já foi estudada por outros grupos de pesquisa e em todos os casos foram descritas reações com baixos rendimentos.^{95b, 95c} Ogasawara *et al.*^{95b} e Edwards *et al.*^{95c} sintetizaram a tetrapalmitoil-riboflavina partindo do ácido palmítico e HClO₄. Esses protocolos utilizam tempos reacionais de até duas semanas e o rendimento máximo obtido foi de apenas 8%. Com a finalidade de obter a **TPRF**, optou-se pela metodologia análoga a desenvolvida por nós na síntese da **TARF** (DMAP como catalisador e base) e, adicionalmente, testou-se outra metodologia de síntese que faz uso da base trietilamina (esquema 4.8).



Esquema 4.8: Derivatização da riboflavina com cloreto de palmitoíla.

As metodologias sintéticas foram realizadas concomitantemente e analisadas primeiramente por CCD, onde foram observados distintos perfis cromatográficos. Ambas as reações apresentavam a formação de um produto majoritário com um fator de retenção cromatográfico maior que a riboflavina. O produto majoritário na reação 1

¹⁰²(a) Foldvari, M.; Attah-Poku,.; Hu, J.; Li, Q.; Hugues, H.; Babiuk, L. A.; Kruger, S. *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 1203. (b) Hashimoto, M.; Takada, K.; Kiso, Y.; Muranishi, S. *Pharmaceutical Res.* **1989**, 6, 171. (c) Rosenblat, G.; Graham, M. F.; Jonas, A.; Tarshis, M.; Schubert, S. Y.; Tabak, M.; Neeman, I. *J. Med. Food* **2001**, 4, 107.

apresentava um fator de retenção maior que o da reação 2, sugerindo uma possível acilação no *N*-3 do sistema de anéis isoaloxazina (ver esquema 4.7), além das 4 acilações das hidroxilas. Para confirmar esse fato, analisou-se o produto bruto da reação 1 por espectrometria de massas.

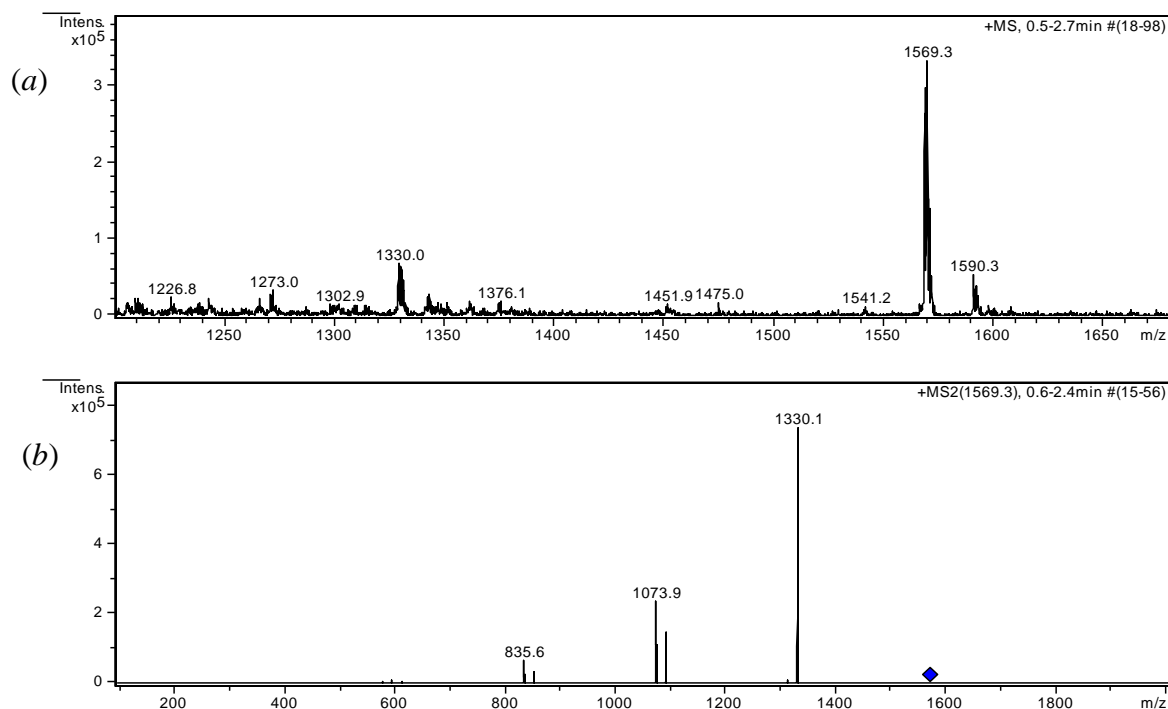


Figura 4.7: (a) Espectro de massas com ionização por *electrospray* (operando no modo positivo) da reação entre a riboflavina e o cloreto de palmitoila na presença de trietilamina; (b) espectro de massas tipo MS₂ do sinal 1569 m/z observado no produto bruto da reação da riboflavina e cloreto de palmitoila na presença de trietilamina.

Na figura 4.7 parte *a*, pode-se observar um sinal intenso em 1569 (m/z) referente ao derivado da riboflavina contendo cinco grupos palmitoil ($C_{97}H_{170}N_4O_{11} + H = 1569$, m/z) e outro em 1330 (m/z), que se refere ao produto **TPRF**, que contém quatro grupos palmitoil ($C_{81}H_{140}N_4O_{10} + H = 1330$, m/z). Uma análise MS₂ do sinal 1569 (m/z) leva à fragmentação do íon com perda de um grupo palmitoil produzindo o íon-**TPRF**. Esse fato sugere que o produto formado na reação 1 é o composto pentapalmitoil-riboflavina.

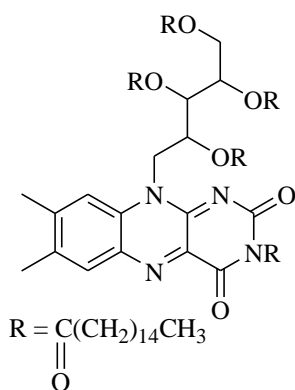


Figura 4.8: Produto majoritário na reação entre a riboflavina e o cloreto de acila na presença de trietilamina.

A análise de RMN de ^1H do produto da reação 1 purificado por coluna cromatográfica mostrou sinais característicos da riboflavina (ver item 4.3) juntamente com sinais referentes a derivados contendo grupo(s) palmitoil (multipletos em 2,38-2,33; 1,66-1,31; 1,30-1,27 e 0,89-0,85 ppm). No entanto, os valores das integrais dos hidrogênios mostraram que havia um excesso de grupos palmitoilas, sugerindo que, mesmo após purificação por coluna, havia impurezas na amostra (provavelmente ácido palmítico). Esse produto penta-acilado é de grande interesse, pois é um derivado altamente lipofílico da riboflavina. No futuro, serão estudadas outras técnicas de purificação do mesmo, principalmente técnicas de recristalização.

A análise por espectrometria de massas do produto bruto da reação 2 mostrou a formação do composto de interesse tetrapalmitoil-riboflavina (sinal intenso em 1330 m/z). Após purificação por coluna, o produto foi analisado por RMN de ^1H e pode-se observar os sinais típicos da riboflavina em 5,7-4,0 ppm (ver item 4.3) juntamente com os sinais dos grupos palmitoil em 1,62-1,47; 1,18; e 0,81 ppm, com as integrais dos hidrogênios indicando a proporção de quatro grupos palmitoil para uma molécula de **RF**. O produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica. Os dados espectrais obtidos para esse composto confirmam a formação da **TPRF**, principalmente pelos sinais típicos da cadeia ribitol em 5,7-4,0 ppm (ver item 4.3) e os sinais das cadeias

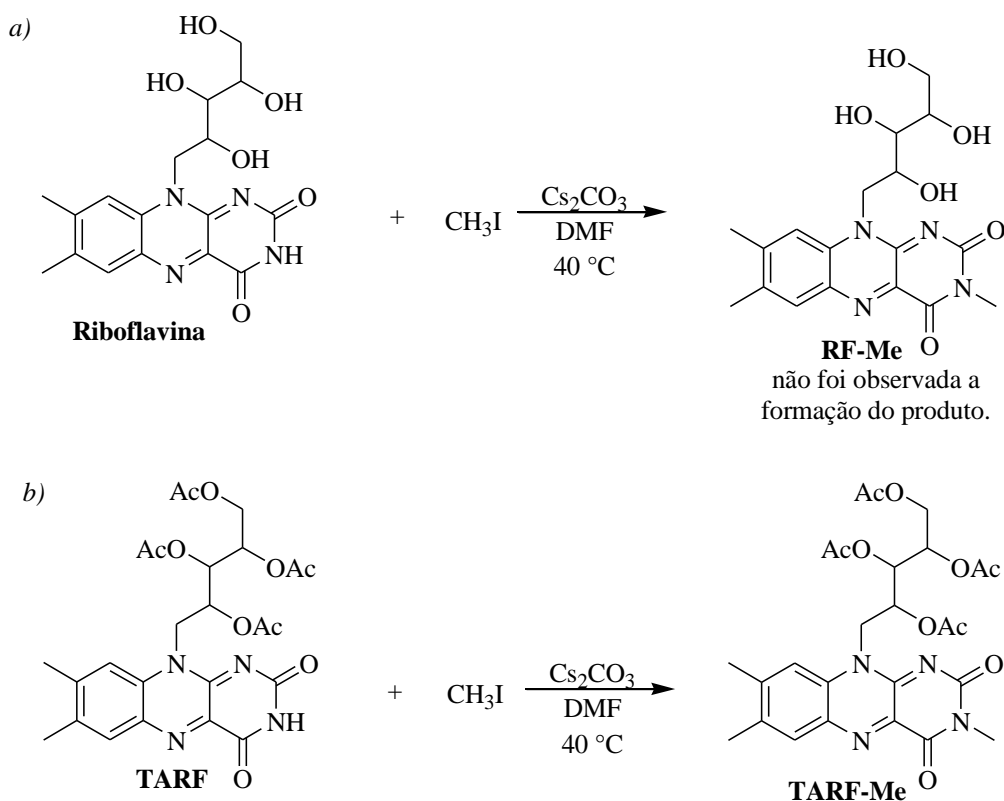
alifáticas entre 1,62-0,81 ppm. Análises de EM de alta resolução mostraram o sinal de 1300,0597 que está de acordo com a estrutura da **TPRF** protonada. Com esse resultado, após otimizar as condições reacionais em relação a diferentes temperaturas, tempos reacionais e solventes (DMF e acetonitrila), obteve-se a **TPRF** com 67% de rendimento. Esse resultado é de grande importância, pois é maior do que o relatado anteriormente na literatura.^{95b,c}

4.1.1.6. – Metilação na posição N-3 do sistema de anéis isoaloxazina

Como comentado na introdução, a funcionalização do N-3 da riboflavina aumenta a lipossolubilidade do derivado além de inibir a sua associação com enzimas e receptores biológicos nas células.¹⁰³ Sendo assim, decidimos derivatizar a **RF** e a **TARF** através da metilação do N-3. Procedimentos de alquilação nesse grupo funcional do sistema de anéis isoaloxazina estão descritos na literatura e fazem uso de haletos de alquila reativos a substituição nucleofílica (ex: iodeto de metila, haleto de benzoíla e haletos α -carbonílicos).^{104,95d} Essas metodologias, quase que exclusivamente, fazem uso de DMF como solvente da reação. No nosso trabalho a metilação do nitrogênio (3) foi realizada de modo semelhante ao descrito por König *et al.* (esquema 4.9).^{104a}

¹⁰³Bradley, L. H.; Swenson, R. P. *Biochem.* **2001**, *40*, 8686.

¹⁰⁴(a) Schmaderer, H.; Hilgers, P.; Lechner, R.; König, B. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 163. (b) Platinga, A.; Witte, A.; Li, M-H.; Harmon, A.; Choi, S. K.; Holl, Am. B.; Orr, B. G.; Baker Jr., J. R.; Sinniah, K. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 363. (c) Iida, H.; Mizoguchi, T.; Oh, S-D.; Yashima, E. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 841.



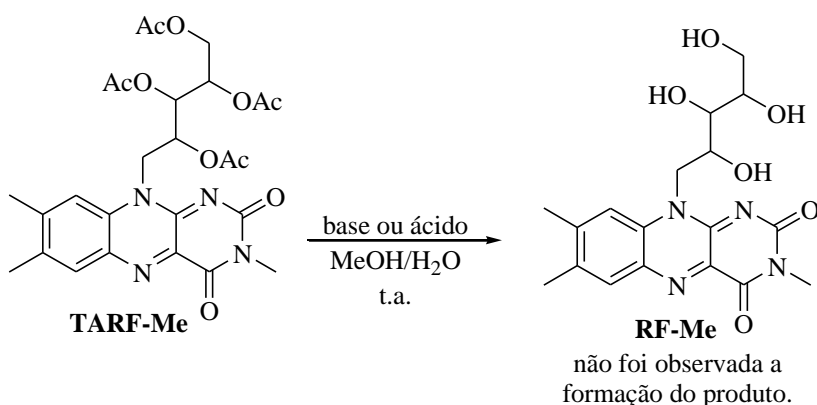
Esquema 4.9: (a) Tentativa de síntese da *N*(3)-metilriboflavina (**RF-Me**); (b) Síntese da *N*(3)-metil-tetraacetil-riboflavina (**TARF-Me**).

Os protocolos utilizados seguem um mecanismo semelhante ao descrito no esquema 4.7. A metilação ocorre através de uma substituição nucleofílica entre o iodeto de metila e o *N*-3 da flavina. A formação dos produtos de interesse foi acompanhada por CCD e, no caso da reação *a*, não se observou a formação de produtos mesmo após 24 h. Por outro lado, após 1 hora da reação *b*, notava-se o surgimento de uma mancha na placa cromatográfica com um fator de retenção maior que o da **TARF**. Inferi-se que a riboflavina não reagiu nessas condições (reação *a*) devido à sua baixa solubilidade em DMF, pois se espera uma reatividade semelhante entre a **RF** e a **TARF**, frente a essa reação.¹⁰⁵ O produto da reação *b* foi purificado por coluna cromatográfica e os dados espectrais comprovaram a formação da **TARF-Me**. A caracterização estrutural desse derivado foi comprovada, por RMN de ¹H, através do desaparecimento do sinal referente ao hidrogênio ligado ao *N*-3 (em 9,12 ppm para a **TARF**) e o aparecimento de

¹⁰⁵Caelen, I.; Kalman, A.; Wahlström, L. *Anal.Chem.* **2004**, 76, 137.

um sinal em 3,50 ppm com integral de 3 hidrogênios referente ao grupo metila inserido na molécula. Os sinais da cadeia ribitol, típicos de derivados da **RF**, constavam também no espectro. O sinal obtido na análise de EM corroboram com a estrutura da **TARF-Me** quelada com Na (581,1861 m/z). O rendimento isolado dessa metodologia foi de 51%.

Na busca de uma rota alternativa para se obter o derivado **RF-Me**, estudou-se a hidrólise da **TARF-Me** em diferentes condições reacionais (esquema 4.10).



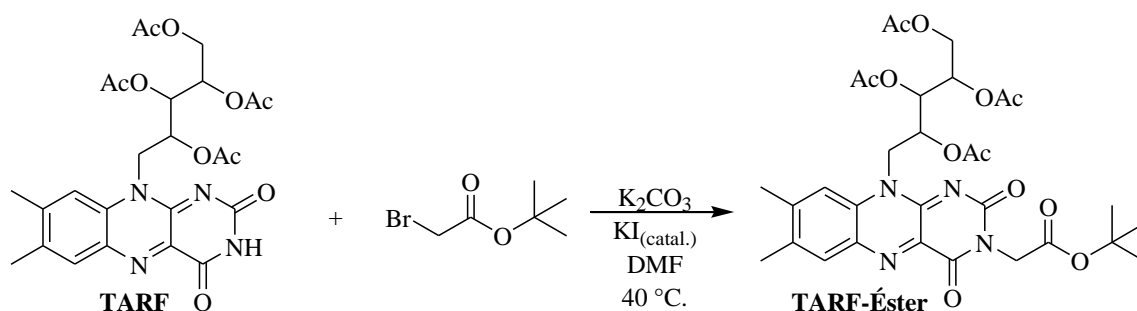
Esquema 4.10: tentativas de hidrólise da **TARF-Me**.

Foram testados diferentes tipos de bases: $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ saturada, $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ saturada, $\text{NaOH}(\text{aq})$ (2 M) e $\text{HCl}(\text{aq})$ (1M). Em nenhum dos casos estudados observou-se a formação da **RF-Me**.

De acordo com o objetivo do trabalho, de sintetizar derivados flavínicos com distintas propriedades físicas, optou-se por iniciar a síntese de outros derivados, como por exemplo, a **TARF-Éster**, ao invés de dedicar mais tempo em reações para obter a **RF-Me**.

4.1.1.7 – Síntese da 2',3',4',5'-tetraacetil-N(3)-tert-butoxicarbonilmetilriboflavina (TARF-Éster)

A síntese do derivado lipofílico **TARF-Éster** foi realizada de acordo com o descrito na literatura.¹⁰⁶

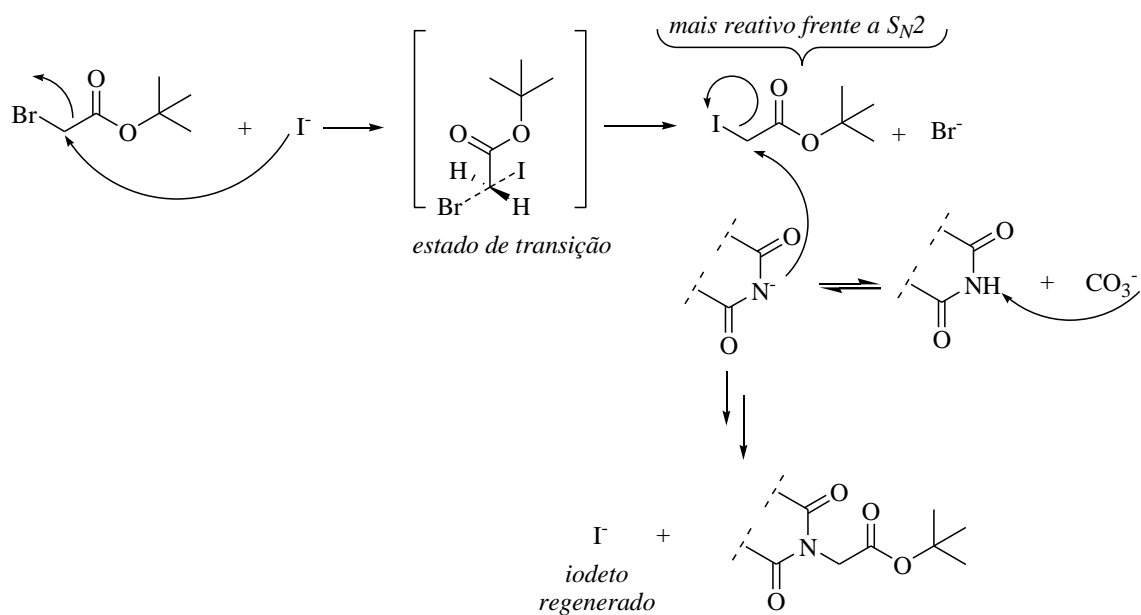


Esquema 4.11: Síntese do derivado 1',3',4',5'-tetraacetil-N(3)-tert-butoxi-carbonil- metilriboflavina (TARF-Éster).

A reação consiste na alquilação do N-3 da **TARF** utilizando o brometo α -carbonílico desejado na presença de iodeto de potássio. O agente alquilante, por ser α -carbonilado, é mais reativo à substituição nucleofílica de segunda ordem que os respectivos análogos (sem o grupo carbonílico). Isso ocorre, pois o grupo carbonílico estabiliza o estado de transição formado durante o mecanismo S_N2, através da sobreposição de seu orbital π^* com o orbital p do carbono que sofre o ataque nucleofílico.¹⁰⁷ O iodeto de potássio é utilizado como catalisador nucleofílico e participa da reação de acordo com o mecanismo descrito no esquema 4.12.

¹⁰⁶Banekovich, C.; Matuszczak, B. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 5053.

¹⁰⁷Clayden, J. *et al.* Nucleophilic Substitution at Saturated Carbon. In: **Organic Chemistry**. 1. ed. New York. Oxford University Press. 2001, p. 424. ISBN 978-0-19-850346-0

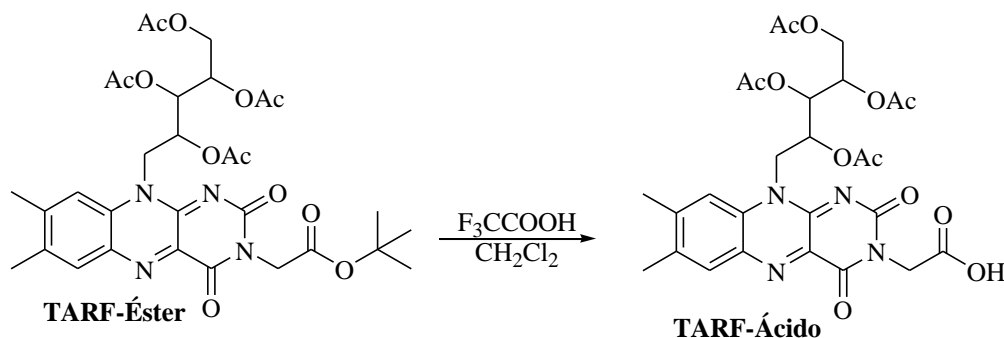


Esquema 4.12: Mecanismo de catálise nucleofílica do iodeto em reação S_N2 .

A reação foi acompanhada por CCD onde se pode observar, após 24 h, a formação de apenas um produto com fator de retenção cromatográfico maior que o da **TARF**. O produto foi purificado eficientemente por coluna cromatográfica. A caracterização estrutural desse derivado foi comprovada, por RMN de ^1H , através do desaparecimento do sinal referente ao hidrogênio ligado ao *N*-3 (em 9,12 ppm para a **TARF**) e o aparecimento de sinais em 4,80 ppm com integral de 2 hidrogênios e em 1,40 (integral 9H) referente ao grupo inserido na molécula ($-\text{CH}_2\text{-Boc}$). Os sinais da cadeia ribitol, típicos de derivados da **RF**, constavam também no espectro. O sinal observado por EM, **TARF-Éster** quelado com Na, em 681,2383 m/z corroboram com o produto de interesse. Seguindo esta metodologia, a **TARF-Éster** foi obtida com 85% de rendimento isolado.

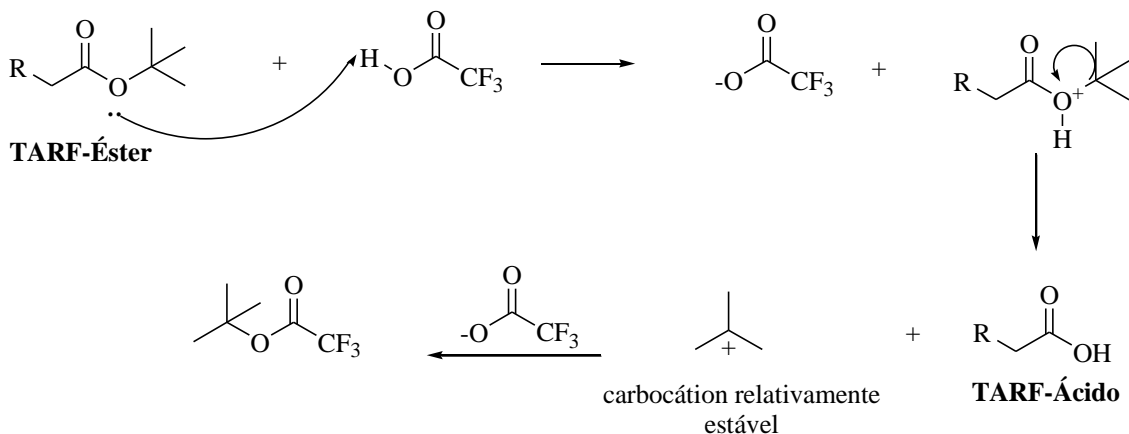
4.1.1.8 – Síntese da 2',3',4',5'-tetraacetil-*N*(3)-carboximetilriboflavina (**TARF-Ácido**)

Para que fosse obtido um composto hidrossolúvel, semelhante ao derivado flavínico contendo grupos succinatos, sintetizou-se o derivado **TARF-Ácido** de acordo com a literatura (esquema 4.13).¹⁰⁶



Esquema 4.13: Síntese do derivado 2',3',4',5'-tetraacetil-*N*(3)-carboximetilriboflavina (**TARF-Ácido**).

A formação do derivado contendo a função ácido carboxílico foi feita através da remoção do grupo *t*-butil utilizando ácido trifluoracético. O mecanismo dessa reação pode ser resumido de acordo com o esquema 4.14.



Esquema 4.14: Mecanismo de transesterificação da **TARF-Éster** na presença de ácido trifluoracético.

O mecanismo apresentado no esquema 4.14 é uma transesterificação. O excesso de ácido trifluoracético desloca o equilíbrio da reação no sentido de formação da **TARF-Ácido**. Uma vez formada, o derivado ácido da riboflavina não é ácido o suficiente para protonar o éster trifluoracético e, portanto, a reação não é reversível. O produto da reação foi acompanhado por CCD e, após 24 h de reação, observou-se

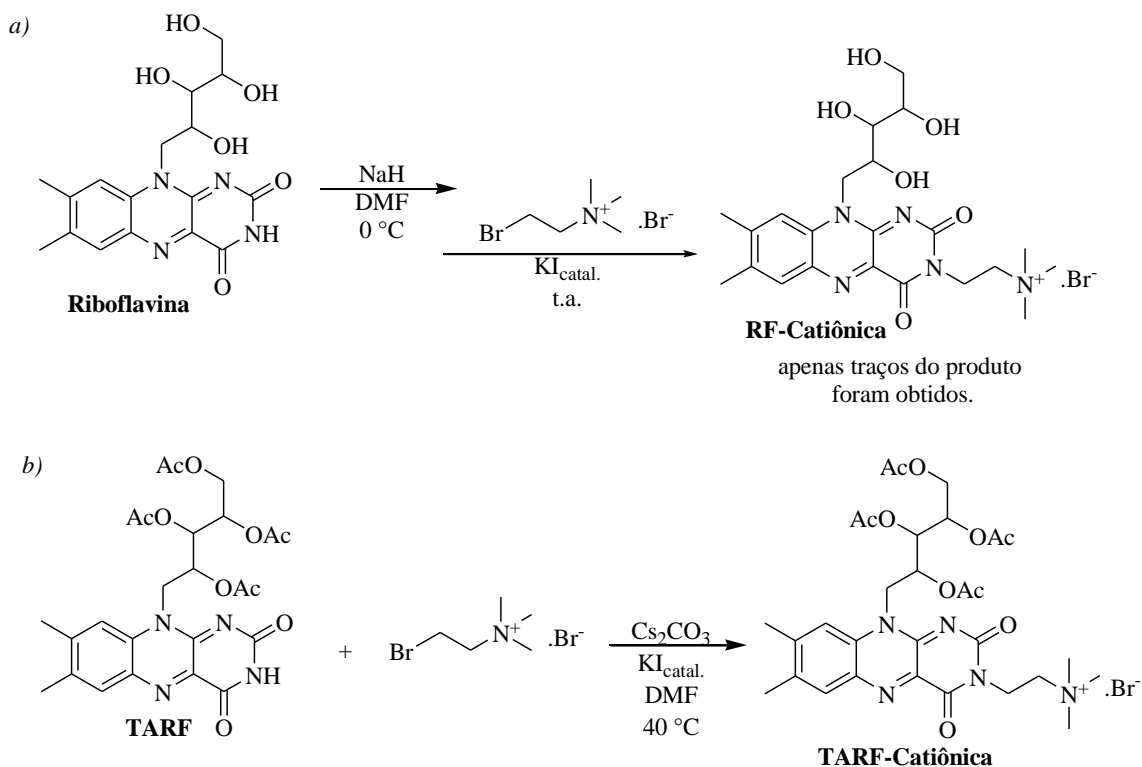
apenas uma mancha na placa cromatográfica com fator de retenção menor que a da **TARF-Éster**, sugerindo a formação do composto de interesse. O produto foi purificado em coluna cromatográfica. A caracterização estrutural desse derivado foi comprovada, por RMN de ^1H , através do desaparecimento do sinal referente aos 3 grupos metilas referente ao grupo Boc (em 1,40 ppm). Além disso, todos os outros sinais, referentes ao derivado **TARF-Éster** constavam no espectro de RMN de ^1H . O sinal observado por EM, **TARF-Ácido** protonada, em 603,1937 m/z corroboram com o produto esperado. O rendimento isolado dessa síntese foi de 50%. Uma vez que todo o material de partida havia sido consumido na reação, atribuímos esse baixo rendimento a perdas por interação irreversível entre esse derivado e a sílica utilizada na cromatografia.

4.1.1.9 – Derivatização na posição N-3 do sistema de anéis isoaloxazina com sais alquil-trimetilamônio

Como comentado na introdução, fotossensibilizadores catiônicos são de grande interesse em PDT, pois esses compostos tendem a se acumular na mitocôndria das células.²⁷ Derivados catiônicos da riboflavina descritos na literatura foram sintetizados através da alquilação do N-5 do sistema de anéis isoaloxazina com a finalidade de serem usados em organocatálise.¹⁰⁸ No entanto esses derivados catiônicos são instáveis em meio aquoso. Para se obter um derivado da riboflavina catiônico e estável em meios biológicos decidiu-se estudar a derivatização da riboflavina inserindo grupos alquilamônio (ex: haleto de bromoalquil-trimetilamônio) no N-3 da riboflavina e **TARF**. Não há precedentes na literatura de funcionalização de flavinas com sais alquil-trimetilamônio. Para se propor rotas sintéticas para essa derivatização, foram consultados artigos relacionados à alquilação do N-3 mencionados no item

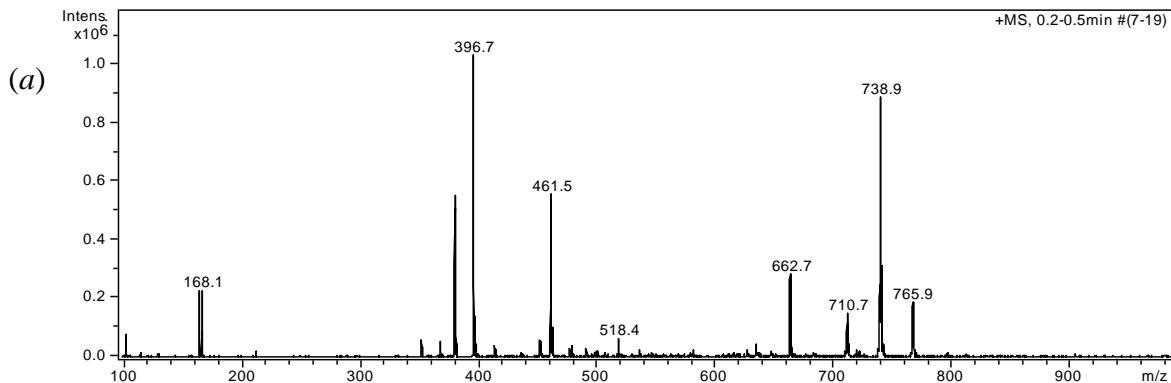
¹⁰⁸ Gelalcha, F. G. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3338.

4.1.1.6.¹⁰⁴ Primeiramente, testou-se essa alquilação utilizando o brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio como material de partida de acordo com o esquema 4.15.



Esquema 4.15: (a) Alquilação da **RF** com brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio; (b) Alquilação da **TARG** com brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio.

Para a reação *a*, optou-se por utilizar hidreto de sódio como base. O produto bruto (reação *a*) foi analisado por CCD e não foram observadas manchas na placa que indicassem a formação de um possível derivado. Foi realizado um espectro de massas do produto bruto (figura 4.9)



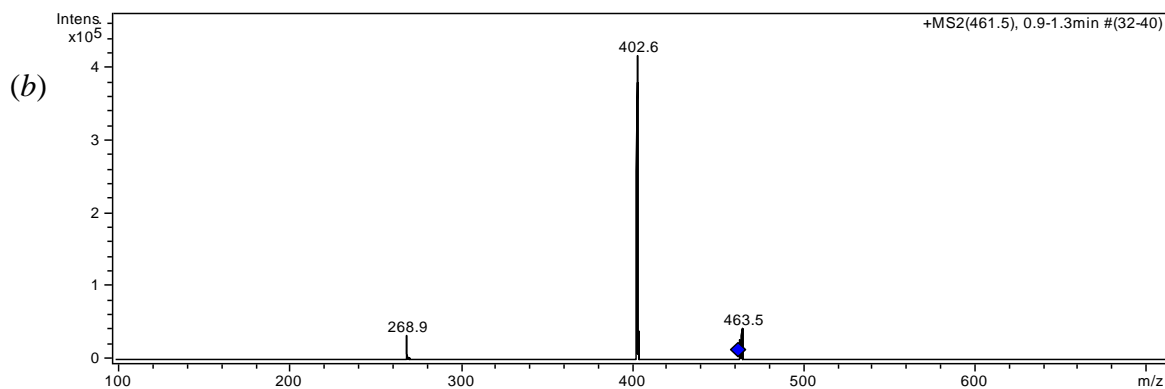


Figura 4.9: (a) Espectro de massas com ionização por *electrospray* (operando no modo positivo) da reação entre a **RF** e o brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio na presença de NaH e KI_(catl.); (b) espectro de massas tipo MS₂ do sinal 462 m/z observado no produto bruto da reação da a **RF** e o brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio na presença de NaH e KI_(catl.).

Analisando o espectro, podemos observar um sinal característico da **RF-Catiônica** ($C_{22}H_{32}N_5O_6 = 462$, m/z). Informações estruturais podem ser obtidas através da análise MS₂ (parte b), pois a fragmentação desse sinal (m/z = 462) leva à formação do íon 403 (m/z) indicando a perda de um grupo trimetilamina ($C_{22}H_{32}N_5O_6 - (CH_3)_3N = 403$, m/z). A fragmentação do íon através da eliminação de uma molécula de trimetilamina é típica de sais de amônio quaternário, sugerindo a formação do produto desejado.¹⁰⁹ Nesse espectro observamos também um sinal intenso da riboflavina que não reagiu em 397 ($C_{17}H_{20}N_4O_6 + K - H_2O = 397$ m/z). No entanto, inferi-se que foi formado apenas traços do produto, pois tentativas de isolar o mesmo por técnicas cromatográficas e de recristalização não obtiveram êxito. Acredita-se que esse baixo rendimento ocorreu devido a baixa solubilidade da **RF** no meio reacional.

No caso da reação *b*, foi observada (por CCD) uma pequena formação de um produto com fator de retenção menor do que a **TARF**. No entanto pode-se constatar que uma grande quantidade de material de partida permanecia sem reagir mesmo após 24 h de reação. É importante ressaltar que após 6 h observou-se a formação de um

¹⁰⁹Evans, C. S.; Startin, J. R.; Goodall, D. M.; Keely, B. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 699.

subproduto com fator de retenção muito menor que a **TARF** de coloração avermelhada. Após particionar o meio reacional com água e clorofórmio, o produto que permanecia na fase aquosa foi analisado por espectrometria de massas.

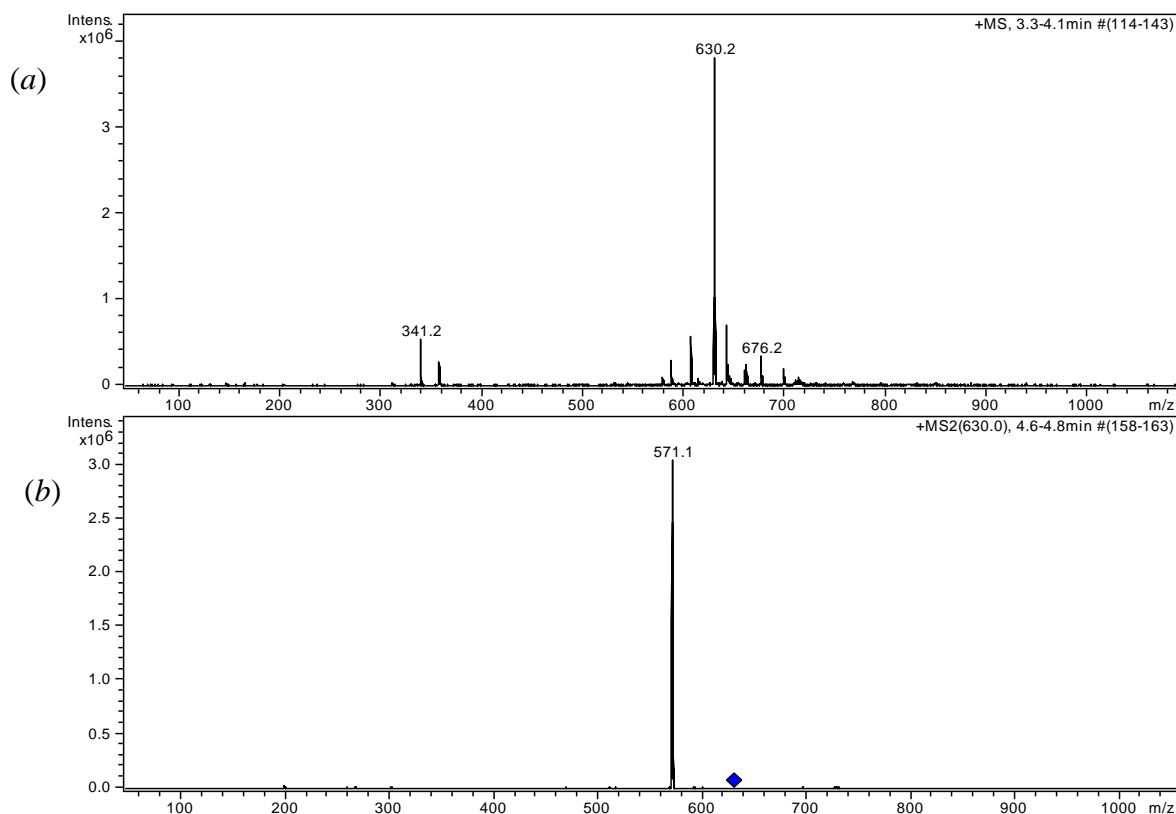


Figura 4.10: (a) Espectro de massas com ionização por *electrospray* (operando no modo positivo) da reação entre a **TARF** e o brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio na presença de Cs_2CO_3 e $\text{KI}_{(\text{catl.})}$; (b) espectro de massas tipo MS_2 do sinal 630 m/z observado no produto bruto da reação da a **TARF** e o brometo de 2-bromoetil-trimetilamônio na presença de Cs_2CO_3 e $\text{KI}_{(\text{catl.})}$.

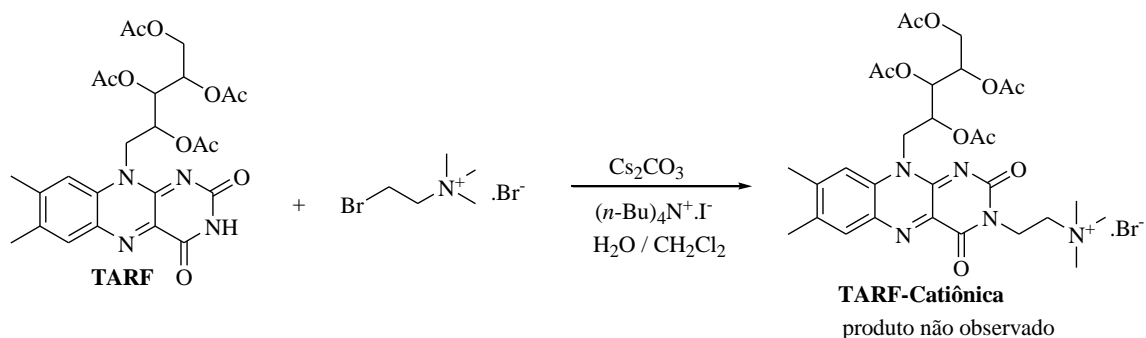
Analisando esse espectro (em *a*) podemos observar um sinal com m/z esperado para o produto **TARF-Catiônica** ($\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_{10} = 630$, m/z). A análise MS_2 (em *b*) mostra que a fragmentação do sinal 630 (m/z) leva à formação do íon 571 (m/z), indicando a perda de um grupo trimetilamina ($\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_{10} - (\text{CH}_3)_3\text{N} = 571$, m/z). Como mencionado anteriormente, a fragmentação do íon através da eliminação de uma molécula de trimetilamina é típica para esses sais de amônio quaternário, sugerindo a formação do produto de interesse.¹⁰⁹ Diferentemente da metodologia *a*, no caso do método *b* o material de partida (**TARF**) mostrou-se ser prontamente solúvel no meio

mas, o brometo de (2-bromoetil)-trimetilamonio (agente alquilante) é insolúvel em DMF. Inferi-se que o baixo rendimento da metodologia *b* ocorreu devido essa baixa solubilidade do agente alquilante. Na reação *b*, foram testados vários solventes orgânicos para solubilizar esse sal de amônio quaternário (clorofórmio, DMSO, acetona, dioxano, acetonitrila, metanol entre outros), mas a substância só apresentou boa solubilidade em água. No entanto a água não é um solvente adequado para essa reação (**TARF** é pouco solúvel em água).

Foram realizadas diversas tentativas para aumentar o rendimento da reação mostrada no esquema 3.15 parte *b* (entre a **TARF** e o alquilante), tais como: uso de grande quantidade de DMF de modo a solubilizar o alquilante e garantir um sistema reacional homogêneo; excesso do agente alquilante em relação à riboflavina em um sistema reacional heterogêneo; uso de *n*-Bu₄N⁺.I⁻ como catalisador nucleofílico em quantidades estequiométricas; uso de LiI como catalisador; uso de trietilamina como base ao invés de Cs₂CO₃ em DMF; e o uso de diclorometano ao invés de DMF na presença de trietilamina como base. Apesar de todos esses esforços, em todos os casos apenas traços do composto desejado foram obtidos. O rendimento calculado através da **TARF** recuperada após a reação era menor que 5% mesmo após 6 h.

Como a **TARF** é bastante solúvel em solventes orgânicos, como, por exemplo, diclorometano, e o alquilante é apenas solúvel em água, conduziu-se uma reação utilizando catálise por transferência de fase. Reações por transferência de fase ocorrem em um meio bifásico (geralmente água/solvente orgânico) na presença de um catalisador (também chamado de catalisador por transferência de fase).¹¹⁰ Sendo assim, realizou-se a reação de acordo com o esquema 4.16.

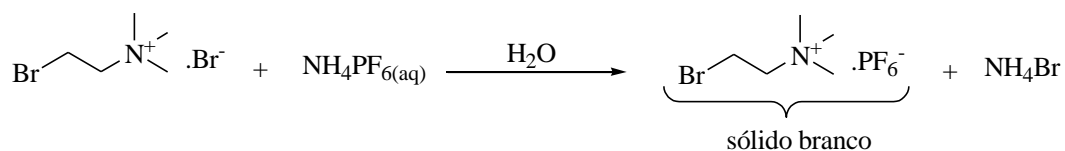
¹¹⁰ (a) Ooi, T.; Maruoka, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4222. (b) Fiamegos, Y. C.; Stalikas, C. D.; Karayannis, M. I. *Pak. J. Anal. Envir. Chem.* **2006**, *7*, 1.



Esquema 4.16: Síntese da **TARF-Catiônica** utilizando catálise por transferência de fase.

Utilizou-se iodeto de *n*-tetrabutilamônio como catalisador por transferência de fase, e os solventes utilizados foram diclorometano e água. A reação foi acompanhada por CCD e MS e, mesmo após 24 h de reação, o produto desejado ($m/z = 630$) não foi observado.

De um modo geral, dentro das metodologias testadas, o baixo rendimento na formação da **TARF-Catônica** foi atribuído principalmente à baixa solubilidade do alquilante nos solventes orgânicos utilizados. Sendo assim, decidiu-se trocar o contraíon do alquilante de brometo por hexafluorofosfato (PF_6) de modo a preparar um alquilante solúvel em solventes orgânicos.



Esquema 4.17: Reação entre o brometo de (2-bromoetil)-trimetilamônio e o hexafluorofosfato de amônio em meio aquoso.

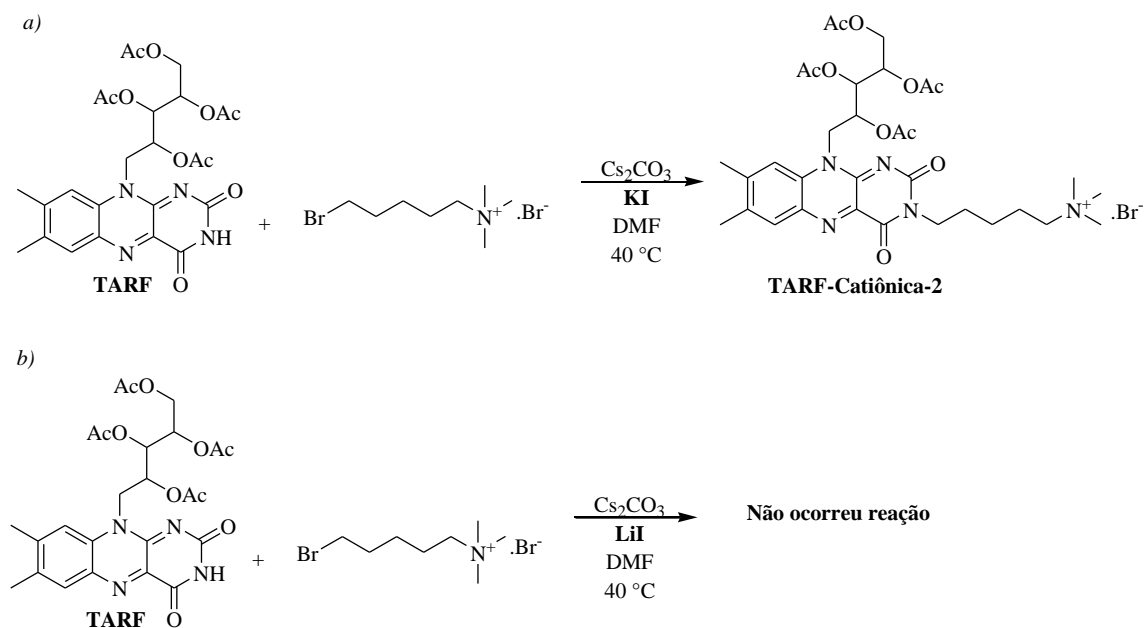
A reação foi realizada misturando em meio aquoso o brometo de alquila com uma solução aquosa saturada de NH_4PF_6 . O alquilante, agora contendo o contraíon PF_6 , mostrou-se prontamente solúvel nos principais solventes orgânicos (DMF, DMSO, clorofórmio, acetona, acetonitrila, diclorometano, entre outros) e insolúvel em água. Com esse alquilante, todas as metodologias discutidas até o momento para a síntese da **TARF-Catiônica** foram refeitas, agora em sistema homogêneo, em

grandes concentrações do alquilante no meio reacional. Mesmo após todos esses esforços, em todos os casos estudados, observaram-se baixos rendimentos (sempre menor que 10%) e o material de partida não foi consumido totalmente mesmo após 24 h de reação. Conclui-se, assim, que a baixa reatividade não é devida à concentração do alquilante na solução da reação, mas pode ser explicada pelo grande impedimento estérico oferecido pelo grupo trimetilamônio ao carbono, que sofre a reação S_N .

A purificação da **TARF-Catiônica** foi feita por coluna de troca iônica Sephadex com eluição através de solução aquosa de NaCl. Dessa forma, o derivado contendo o contra-íon cloreto foi obtido. A caracterização estrutural desse derivado foi realizada, por RMN de 1H , que mostrou o desaparecimento do sinal referente ao hidrogênio ligado ao N-3 (em 9,12 ppm para a **TARF**) e o aparecimento de sinais tripletos em 3,88 ppm e 4,47 ppm, ambos com integrais de 2 hidrogênios, juntamente com o sinal em 3,49 (integral de 9H) (referente ao grupo tetraalquil amônio inserido na molécula). Os sinais da cadeia ribitol, típicos de derivados da **RF**, constavam também no espectro. Os sinais no espectro de RMN de 1H e placas de CCD em diferentes solventes mostravam que a **TARF-Catiônica** apresentava elevada pureza. O sinal obtido na análise de EM corroboram com a estrutura da **TARF-Catiônica** (630,2782 m/z). Após otimizar as condições reacionais em relação a diferentes temperaturas e tempos reacionais, obteve-se a **TARF-Catiônica** com 10% de rendimento isolado.

Uma vez que o alquilante (2-bromoetil)-trimetilamônio é pouco reativo frente as reações de S_N discutidas anteriormente, buscou-se nas diversas fontes comerciais alquilantes com estrutura química semelhante, mas contendo o grupo abandonador (brometo, neste caso) o mais distante possível da porção que oferece o impedimento estérico (grupo trimetilamônio). Foi testado o alquilante brometo de (2-bromopentil)-trimetilamônio, que se mostrou solúvel nos principais solventes orgânicos, não sendo

necessária realizar a troca de contração para esse alquilante (utilizou-se diretamente o brometo). Realizaram-se concomitantemente duas metodologias de alquilação, das quais a primeira foi a mesma utilizada na metodologia otimizada para obter a **TARF-Catiônica** (KI como catalisador nucleofílico); e a segunda, muito semelhante à primeira, diferenciando apenas na utilização do catalisador, iodeto de lítio (LiI).

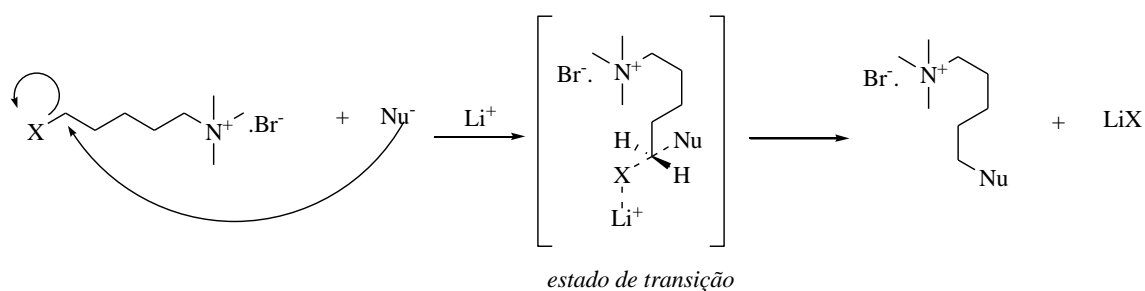


Esquema 4.18: (a) Alquilação da **TARF** com brometo de (2-bromopentil)-trimetilamônio na presença de Cs_2CO_3 e KI em quantidade estequiométrica. (b) Alquilação da **TARF** com brometo de (2-bromopentil)-trimetilamônio na presença de Cs_2CO_3 e LiI em quantidade estequiométrica.

No caso da reação *b*, a ideia de se utilizar o iodeto de lítio está relacionada com a propriedade que esse composto apresenta de promover catálise através de dois mecanismos simultâneos: o de catálise nucleofílica^{96a} (através do iodeto) comentado anteriormente e outro de catálise electrofílica (através do cátion lítio).¹¹¹ Sabe-se que o cátion Li pode catalisar reações de substituição e eliminação como mostramos no esquema 4.18 para a reação de interesse.¹¹²

¹¹¹ Anslyn, E. V. *et al.* Catalysis. In: **Modern Physical Organic Chemistry**. 1. ed. University Science Books, 2005, p. 449. ISBN 1-891389-31-9

¹¹² Yandulov, D. V.; Caulton, K. G. *New J. Chem.* **2002**, 26, 498.



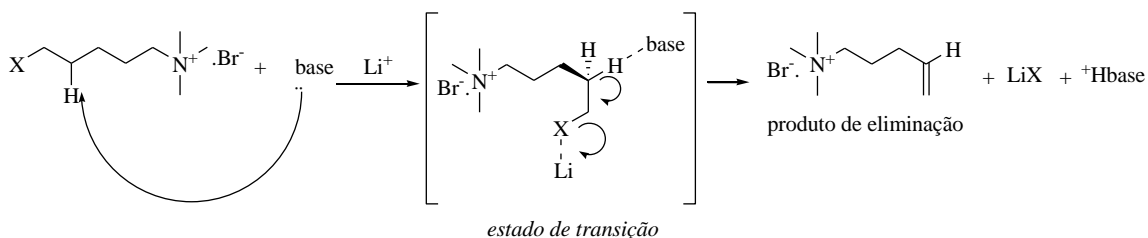
Esquema 4.19: Mecanismo de catálise electrofílica do cátion Li em reações de S_N2 .

Na catálise electrofílica, o electrofílo (no caso Li^+), durante o estado de transição formado, auxilia a saída do grupo abandonador (representado por X).

A metodologia mostrada no esquema 4.18 parte *a* foi acompanhada por CCD onde se pode observar o total consumo do material de partida após 3 h de reação. Como o observado para a **TARF-Catiônica**, notou-se também o produto de interesse (mancha mais intensa) e um subproduto de coloração avermelhada. Inferi-se que o mecanismo desse processo é semelhante ao descrito nos esquemas 4.12 e, como o carbono que sofre a reação de S_N está longe do grupo de alto impedimento estérico (trimetilamônio), a substituição ocorre com mais eficiência do que quando foi utilizado o hexafluorofosfato de (2-bromoetil)-trimetilamônio. A **TARF-Catiônica-2** foi purificada por coluna de troca iônica Sephadex com eluição através de solução aquosa de NaCl. Dessa forma, foi obtido o derivado contendo o contraíon cloreto. A caracterização estrutural desse derivado foi comprovada, por RMN de 1H , através do desaparecimento do sinal referente ao hidrogênio ligado ao *N*-3 (em 9,12 ppm para a **TARF**) e o aparecimento de sinais em 3,91-3,84 ppm e 3,19-3,17 ppm, ambos com integrais de 2 hidrogênios, juntamente com o sinal em 2,96 (integral de 9H) e os sinais metilênicos em 1,73; 1,61 e 1,29 ppm (referente ao grupo tetraalquil amônio inserido na molécula). Os sinais da cadeia ribitol e aromáticos, típicos de derivados da **RF**, constavam também no espectro. O sinal obtido na análise de EM corroboram com a estrutura da **TARF-Catiônica-2** (672,3248 m/z). No entanto, para a **TARF-Catiônica-2**, foi determinado por CCD e

posteriormente por CLAE que o produto apresentava impurezas (apenas 90% de pureza, determinado por CLAE). Esse composto foi purificado por CLAE-preparativa onde se pode obter o derivado catiônico com alta pureza (> 99%) e rendimento isolado (global do processo: síntese e purificação por CLAE) de 68% (ver item 3.2.4).

A reação em *b* foi acompanhada por CCD e não foi observada a formação do produto mesmo após 6 h de reação. Esse fato pode ser explicado, pois o Li^+ deve catalisar preferencialmente a reação de eliminação do agente alquilante como mostrado no esquema 4.20.



Esquema 4.20: Mecanismo de catálise electrofílica do cátion Li em reações de eliminação do tipo E2.

Desse modo, o agente alquilante está sendo consumido nessa reação paralela de eliminação e o produto desejado não é formado.

Foram estudadas diversas rotas sintéticas para a derivatização da riboflavina. Durante o desenvolvimento desses processos foram obtidos sete compostos com alto grau de pureza contendo grupos orgânicos distintos (figura 4.11).

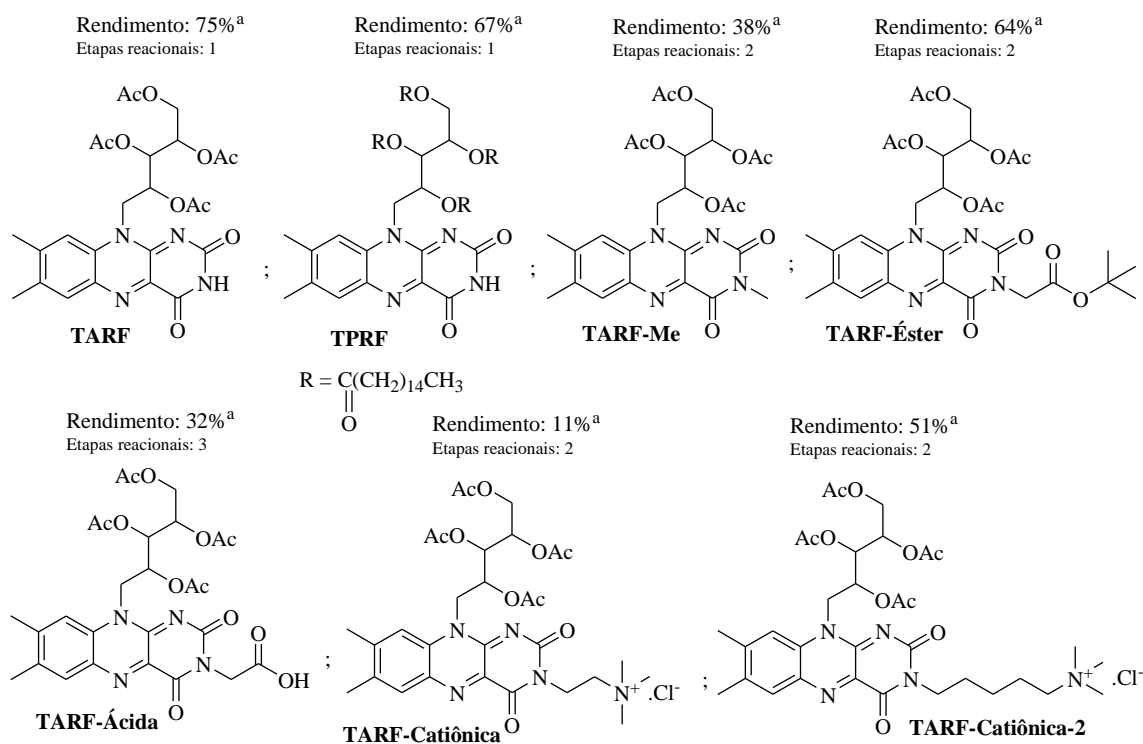


Figura 4.11: Compostos sintetizados e purificados com elevada pureza ($\approx 100\%$).^a rendimento isolado partindo da **RF** como material de partida.

Com esses sete derivados (e a **RF** obtida comercialmente) iniciou-se a próxima etapa do projeto que consistiu na caracterização das propriedades fotoquímicas e fotofísicas.

4.1.2 - Propriedades fotoquímicas e fotofísicas

A próxima etapa do projeto consistiu na caracterização dos parâmetros fotofísicos dos compostos sintetizados. As substâncias utilizadas nessa etapa foram apenas aquelas em que o protocolo sintético foi desenvolvido com êxito resultando em um composto puro. Esses derivados totalizam sete sintéticos e a própria riboflavina, figura 4.11.

4.1.2.1 - Espectros UV-visível e Coeficiente de Extinção Molar (ϵ) dos derivados da riboflavina

Os espectros de absorção foram obtidos em distintos solventes e o ϵ foi determinado através da curva de absorbância versus concentração da flavína. Esses parâmetros, tanto para os derivados sintetizados quanto para a própria riboflavina foram obtidos em diferentes meios uma vez que não há um solvente único capaz de solubilizar todas estas substâncias. A interpretação das bandas obtidas no espectro será discutida primeiramente para a riboflavina em metanol. Posteriormente discutiremos os deslocamentos nos máximos de absorção dos compostos e por último o coeficiente de extinção molar.

O espectro da riboflavina foi realizado em metanol e está mostrado na figura 4.12.

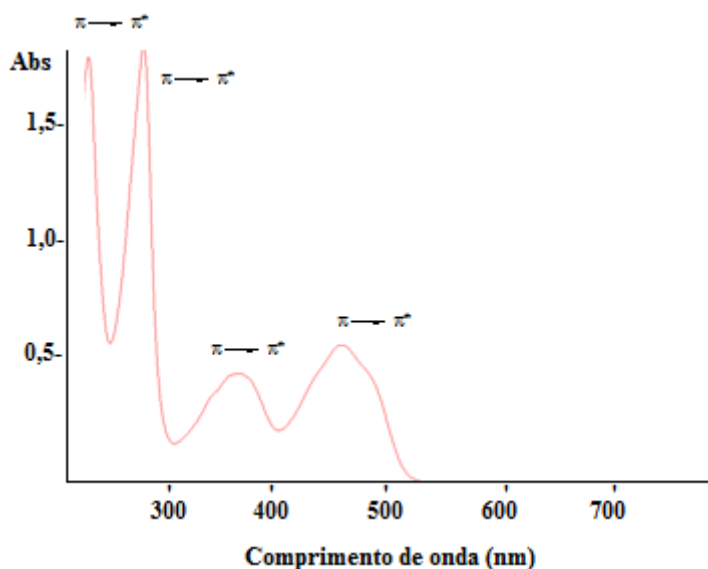


Figura 4.12: Espectro de absorção da riboflavina em metanol na concentração de 5 μ M.

Como comentado na introdução, o espectro da riboflavina apresenta 4 bandas características com máximos de absorção na região do visível (azul) em 442 nm; UVA em 345 nm; e duas na região do UVC em 267 e 217 nm. Devido à elevada magnitude no valor do coeficiente de extinção molar destas 4 bandas ($> 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), se atribui às

mesmas a transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.¹¹³ Os valores nos máximos de absorção da riboflavina em água são 446, 375, 265 e 220 nm.¹¹³ De um modo geral, o espectro da riboflavina não se modifica significativamente quando obtido em solventes de diferentes polaridades.¹¹³ No entanto, como discutido no capítulo introdutório, a absorção e emissão das flavinas são profundamente afetados por variações no pH em meio aquoso¹¹⁴ ou existência de ácidos ou bases em meio orgânico.¹¹⁵ Cálculos teóricos foram realizados por Norrestam *et al.* e predizem, com precisão, que o estado de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ de menor energia para a riboflavina em água está em torno de 450 nm,¹¹⁶ próximo do valor obtido experimentalmente. Por outro lado, os cálculos utilizados para prever a posição da banda no UVA do espectro da riboflavina não são muito acurados.¹¹³ Através de cálculos teóricos foi sugerido que essa banda (no UVA) seria o resultado de sobreposições de transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ (envolvendo os elétrons não ligantes em N-1 da riboflavina) e $\pi \rightarrow \pi^*$.¹¹⁷ Se observa um deslocamento batocrômico no máximo de absorção da riboflavina no UVA com o aumento da polaridade do solvente (de metanol (345 nm) para água (375 nm)). Este deslocamento no espectro corrobora com o fato de que esta transição eletrônica é de natureza $\pi \rightarrow \pi^*$.

O espectro de absorção dos compostos **TARF**, **TPRF**, **TARF-Me**, **TARF-Ácida** e **TARF-Éster** foram obtidos em DMF (exceto para **TPRF** que foi realizado utilizando acetato de etila (AcOEt) como solvente) e estão representados na figura 3.13.

¹¹³Heelis, P. F. *Chem. Soc. Rev.* **1982**, *11*, 15.

¹¹⁴Drössler, P.; Holzer, W.; Penzkofer, A.; Hegemann, P. *Chem. Phys.* **2002**, *282*, 429.

¹¹⁵Yagi, K.; Ohishi, N.; Nishimoto, K.; Choi, J. D.; Song, P-S. *Biochem.* **1980**, *19*, 1553.

¹¹⁶(a) Norrestam, R.; Kierkegaard, P.; Stensland, B.; Torbjörnsson, L. *Chem. Comm.* **1969**, 1250. (b) Grabe, B. *Acta Chem. Scand. Ser. A*, **1972**, *26*, 4084. (c) Grabe, B. *Acta Chem. Scand. Ser. A*, **1974**, *28*, 363.

¹¹⁷Eweg, J. K.; Müller, F.; Van Dam, H.; Terpstra, A.; Oskam, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 51.

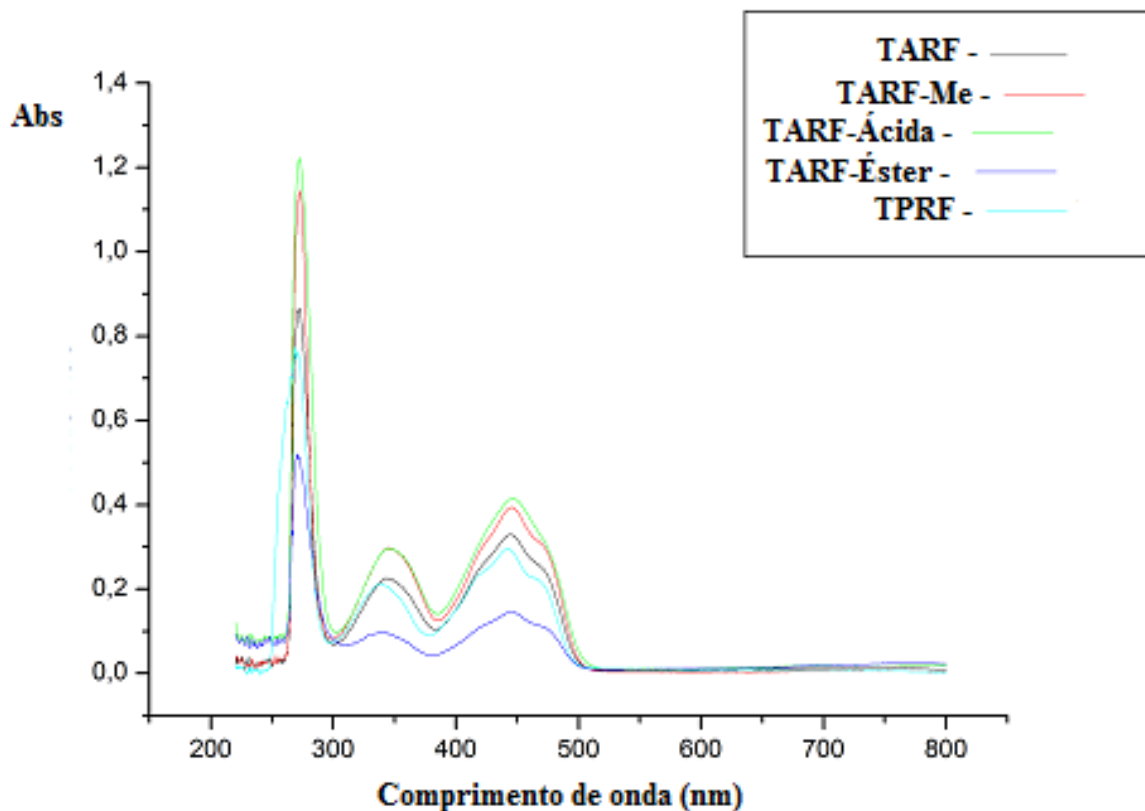
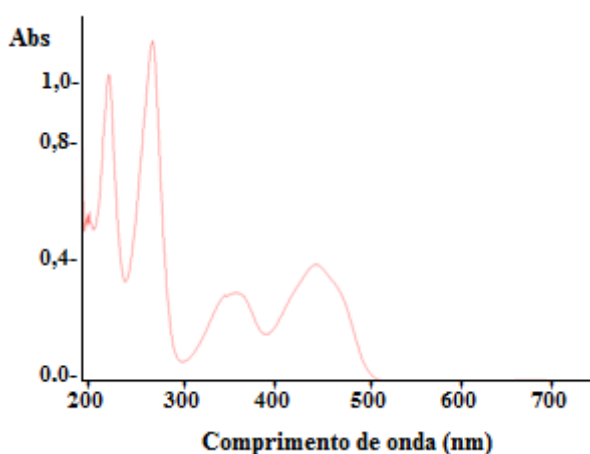


Figura 4.13: Espectros de absorção dos derivados **TARF** (12 μM), **TARF-Me** (10 μM), **TARF-Ácida** (15 μM), **TARF-Éster** (5 μM) em DMF e **TPRF** (5 μM) em acetato de etila.

Analisando a figura 4.13 pode-se inferir que não houve uma mudança significativa nas regiões de máxima absorção dos compostos em relação à **RF**. Os espectros de absorção dos derivados catiônicos tampouco apresentaram variações significativas como mostrado na figura 4.14.

a)



b)

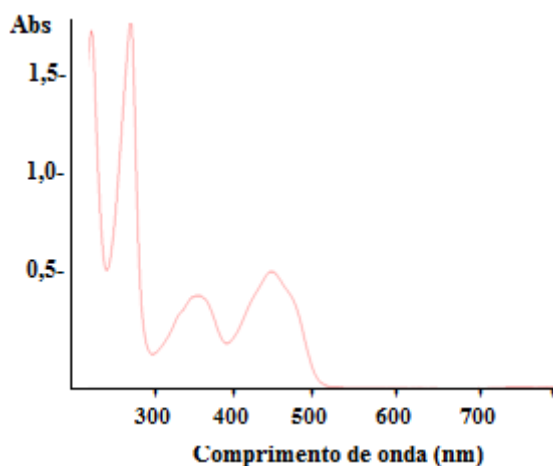


Figura 4.14: Espectro de absorção dos derivados catiônicos da riboflavina: *a)* **TARF-Catiônica**(5 μ M) em metanol; *b)* **TARF-Catiônica-2**(5 μ M) em água.

Na figura 4.14 está ilustrado o espectro da **TARF-Catiônica** em metanol e da **TARF-Catiônica-2** em água. Como esperado, a funcionalização dessa porção da molécula não provocou variações significativas no espectro de absorção desses derivados.

Para cada máximo de absorção foi determinado o coeficiente de extinção molar do composto. Como podemos observar as funcionalizações na estrutura da riboflavina não causaram variações significativas neste parâmetro (tabela 4.1)

Tabela 4.1: Comprimento de onda e ϵ relacionado para os máximos de absorção de cada derivado da riboflavina.

Composto	Solvente	λ_1 (nm); ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_2 (nm); ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_3 (nm); ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
Riboflavina	Metanol	442; 10850	345; 9050	267; 33000
TPRF	AcOEt	443; 10781	338; 7852	269; 26766
TARF	DMF	444; 12101	342; 8182	272; 31668
TARF-Me	DMF	446; 12716	344; 9565	272; 36429
TARF-Éster	DMF	445; 10544	340; 7985	271; 31080
TARF-Ácida	DMF	447; 10297	354; 7388	271; 30069
TARF-Catiônica	Metanol	446; 9485	358; 7231	270; 27400

TARF-Catiônica-2	Água	449; 9866	327; 8242	271; 29617
-------------------------	------	------------------	------------------	-------------------

λ_1 , λ_2 e λ_3 são referentes ao comprimento de onda das três bandas de menor energia no espectro de absorção.

Analisando a tabela 4.1 pode-se inferir que as transformações químicas na molécula da riboflavina, que foram realizadas neste trabalho, não afetaram significativamente os máximos de absorção bem como o ϵ dos derivados sintetizados. Esse resultado é esperado, pois não foram introduzidos heteroátomos ou duplas conjugadas no sistema de anéis isoaloxazina (a introdução de grupos desta natureza no sistema de anéis das flavinas provocam variações energéticas nos orbitais moleculares dos derivados provocando alterações no espectro de absorção dos mesmos).¹¹⁸ Estes resultados são considerados positivos uma vez que as funcionalizações visam afetar minimamente estas propriedades, alterando apenas as características físicas do Fs. Derivados da riboflavina existentes na literatura com variações estruturais semelhantes às realizadas, tampouco sofreram significativas mudanças no espectro de absorção.^{119,120}

.95c

4.1.2.2 - Espectro de fluorescência e rendimento quântico (ϕ_F)

Como mencionado na introdução, as flavinas apresentam um típico espectro de fluorescência de coloração amarelo esverdeado (com comprimento de onda máximo de emissão (λ_F) em 520 nm em meio aquoso).¹¹³ A intensidade e o λ_F das flavinas são

¹¹⁸(a) Siroška, E.; Khmelinskii, I.; Komasa, A.; Koput, J.; Ferreira, L. F. V.; Herance, J. R.; Bourdelande, J. L.; Williams, S. L.; Worrall, D. R.; Insinska-Rak, M.; Sikorski, M. *Chem. Phys.* **2005**, *314*, 239. (b) Insinska-Rak, M.; Siroška, E.; Bourdelande, J. L.; Khmelinskii, I. V.; Prukala, W.; Dobek, K.; Karolczak, J.; Machado, I. F.; Ferreira, L. F. V.; Komasa, A.; Worrall, D. R.; Sikorski M. *J. Mol. Struc.* **2006**, *783*, 184. (c) Massey, V. *Biochem. Soc. Transac.* **2000**, *28*, 283.

¹¹⁹(a) Sikorka, E.; Khmelinskii, I. V.; Prukala, W.; Williams, S. L.; Patel, M.; Worall, D. R.; Bourdelande, J. L.; Koput, J.; Sikorski, M. *J. Phys. Chem A* **2004**, *108*, 1501. (b) Fritz, B. J.; Kasai, S.; Matsui, K. *Photochem. Photobiol.* **1987**, *45*, 113.

¹²⁰Insinska-Rak, M.; Sikorski, E.; Bourdelande, J. L.; Khmelinskii, I. V.; Prukala, W.; Dobek, K.; Karolczak, J.; Machado, I. F.; Ferreira, L. F. V.; Dulewicz, E.; Komasa, A.; Worrall, D. R.; Kubicki, M.; Sikorski, M. *J. Photochem. Photobiol.* **2007**, *186*, 14.

afetadas pela polaridade do solvente.¹²¹ Assim como a absorvância, a emissão também é afetada pelo pH no meio aquoso¹¹⁴ e pela existência de ácidos e bases em meio orgânico.¹¹⁵ O rendimento quântico de fluorescência da **RF** é 0,26 em solução aquosa e este valor não varia com o comprimento de onda de excitação (260-500 nm).¹²² Este fato indica que os derivados flavínicos, ao serem eletronicamente excitados para níveis energéticos maiores que S_1 (ou seja $S_{n>1}$), rapidamente decaem para S_1 sem sofrer perdas por emissão a partir de $S_{n>1}$; ou ISC de $S_{n>1}$ para $T_{n>1}$. Os espectros de emissão foram realizados em meio aquoso com excitação em 440 nm.

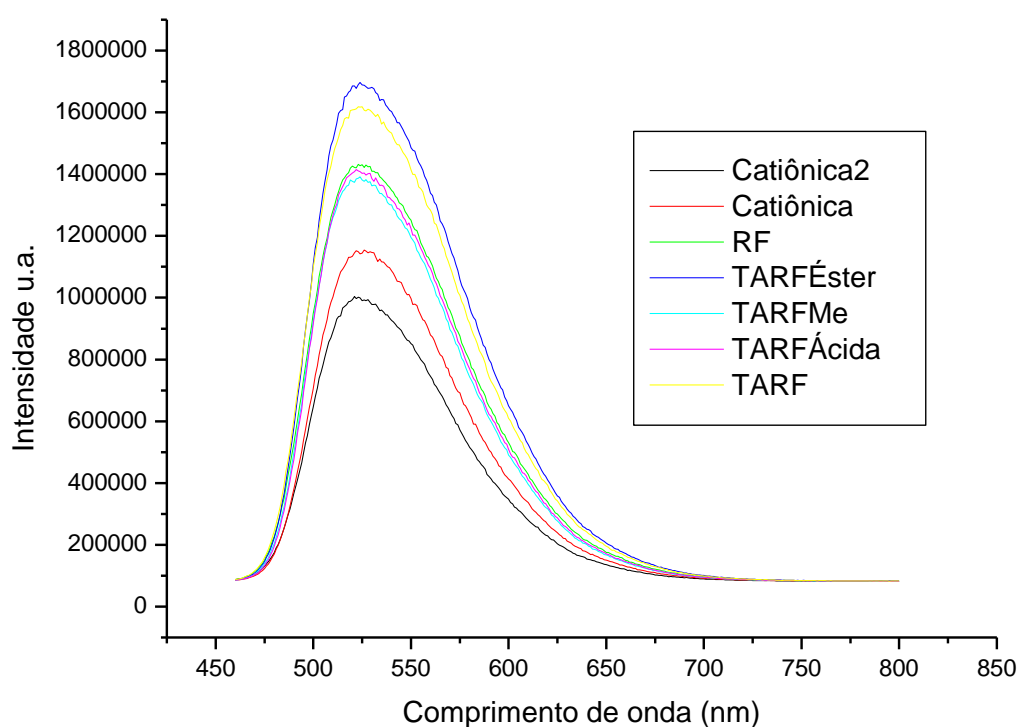


Figura 4.15: Espectro de fluorescência para os derivados da riboflavina obtido por excitação em 445 nm, com fendas de 5 mm em solução aquosa contendo 0,05% (v/v) de DMSO (os valores de absorvância das amostras foi normalizados para 0,01).

¹²¹Silva, E.; Edwards, A. M. Photochemistry of Flavins. In: **Flavins Photochemistry and Photobiology**. 1. ed. United Kingdom. RSC Publishing.2006, p. 17.ISBN 0-85404-331-4.

¹²² Eweg, J. K.; Müller, F.; Visser, A. J. W. G.; Veeger, C.; Bebelaar, D.; Voorst, J. D. W. V.; *Photochem. Photobiol.* **1979**, 30, 463.

Analisando a figura 4.15, observamos a fluorescência típica de flavinas em aproximadamente 525 nm referente à transição $S_1 \rightarrow S_0$. Pode-se inferir através destes resultados que não houve mudanças significativas no comprimento de onda máximo de fluorescência dos derivados em comparação à riboflavina. Esses valores podem ser melhor visualizados na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Máximo de fluorescência dos derivados da riboflavina em meio aquoso (excitação em 445 nm).

Composto	λ_F (nm)
Riboflavina	527
TARF	525
TARF-Me	524
TARF-Éster	524
TARF-Ácida	522
TARF-Catiônica	526
TARF-Catiônica-2	523

Como podemos observar, após a funcionalização da riboflavina, o máximo de emissão no espectro de fluorescência dos compostos não sofreram significativas mudanças. Estes valores estão de acordo com os dados encontrados na literatura para os derivados com estruturas químicas semelhantes.^{95c} Foram efetuados estudos quantitativos de rendimento quântico de fluorescência de alguns dos derivados sintetizados. Estes valores foram obtidos através da comparação direta com a emissão da riboflavina em metanol ($\phi_F = 0,39$),¹²³ na mesma intensidade de absorção, e excitação em 445 nm.

¹²³Drössler, P.; Holzer, W.; Penzkofer, A.; Hegemann, P. *Chem. Phys.* **2003**, 286, 409.

Tabela 4.3: Rendimento quântico de fluorescência de derivados da **RF** em solução metanólica com absorvância de 0,01 (excitação em 445 nm, fendas de 5 mm).

Composto	$\phi_F (\pm 0,05)$
Riboflavina	0,39
TARF	0,46
TARF-Me	0,12
TARF-Catiônica	0,41
TARF-Catiônica-2	0,42

Os valores obtidos para a **TARF-Catiônica** ($\phi_F = 0,41$) e **TARF-Catiônica-2** ($\phi_F = 0,42$) não variaram significativamente quando comparada à **RF**. No caso do derivado **TARF** observou-se um pequeno aumento na eficiência da fluorescência ($\phi_F = 0,46$). O composto **TARF-Me** apresentou um rendimento quântico de fluorescência inferior ao da riboflavina ($\phi_F = 0,12$). Os dados de rendimento quântico de fluorescência reportado por Insinska-Rak *et al.* para a **TARF-Me** em metanol é 0,09.¹²⁰ Os autores deste trabalho atribuem esta baixa eficiência de emissão devido a interações específicas do solvente (metanol) no estado excitado singlete deste derivado. Sabe-se que o ϕ_F da riboflavina é fortemente afetado pela natureza do solvente, principalmente pela polaridade do mesmo. De fato, o rendimento quântico de fluorescência da riboflavina varia de 0,26 em água para 0,47 em acetonirila.¹²⁴

4.1.2.3 - Geração e rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_Δ)

A eficiência na produção de oxigênio singlete (1O_2) foi determinada para todos os derivados sintetizados comparando a intensidade de fosforescência do 1O_2 (gerado por fotossensibilização das flavinas) com um Fs-padrão de ϕ_Δ conhecido. Foi tomada como referência a substância fenalenona devido a sua elevada eficiência na produção de

¹²⁴Visser, A. J. W. G.; Müller, F. *Helv.Chim.Acta* **1979**, 62, 593.

$^1\text{O}_2$ e a pequena variação que esse valor de ϕ_Δ sofre em relação ao solvente utilizado.¹²⁵ Os estudos comparativos foram conduzidos por excitação das amostras (flavinas e fenalenona) nas mesmas condições experimentais (laser, densidade óptica, solvente e abertura de fendas). Realizaram-se os experimentos em metanol para todos os derivados exceto para a **TPRF** cujo transiente foi obtido em clorofórmio. O oxigênio singlete produzido foi detectado através de sua fosforescência (em aproximadamente 1270 nm) resolvida no tempo.

Primeiramente, realizou-se um experimento de fotossensibilização de oxigênio singlete através da fenalenona em metanol (figura 4.16).

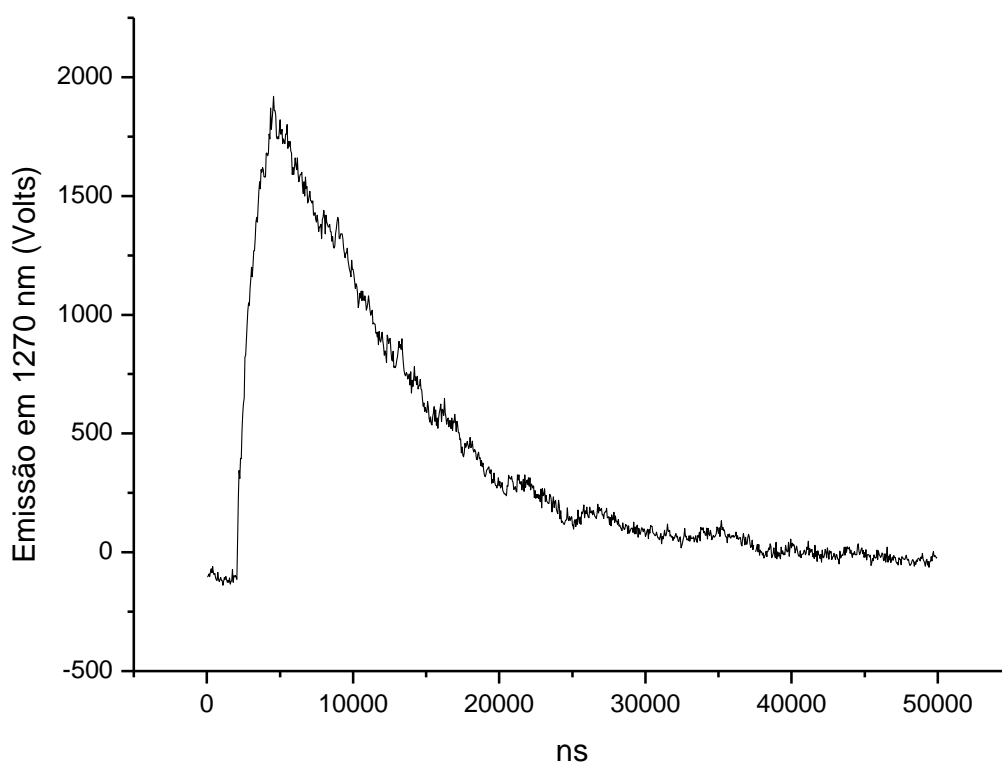


Figura 4.16: Transiente de decaimento da emissão do $^1\text{O}_2$ em 1270 nm fotossensibilizado pela fenalenona em solução metanólica (Abs = 0,01). Obtido por excitação em 355 nm com 2,2 mJ/pulso, 10 pulsos/segundos.

¹²⁵Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C. *J. Photochem. Photobiol. A.* **1994**, 79, 11.

Podemos observar o decaimento típico do oxigênio singlete gerado pela fenalenona. De acordo com o ajuste exponencial da curva apresentada, o tempo de vida de aproximadamente 10000 ns ou 10 μ s foi calculado. Este valor está de acordo com o tempo de vida esperado para o $^1\text{O}_2$ em metanol.¹²⁵ A intensidade de fosforescência da espécie $^1\text{O}_2$ foi atenuada através da diluição da amostra contendo a fenalenona de modo à determinar a concentração ideal para conduzir os experimentos de ϕ_{Δ} . Foi escolhida a concentração referente à absorbância de 0,1 para realizar os estudos comparativos de produção de $^1\text{O}_2$ dos derivados flavínicos e da fenalenona. A título de exemplo, o espectro de emissão do $^1\text{O}_2$ resolvido no tempo fotossensibilizado pela **TARF-Catiônica-2** está apresentado na figura 4.17.

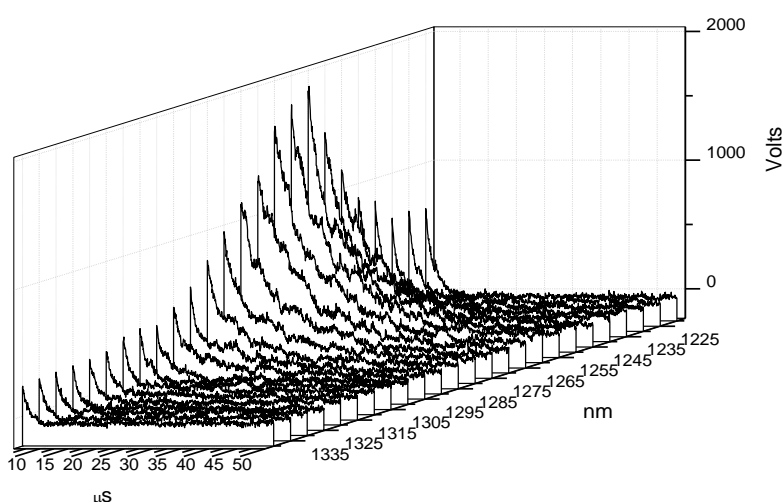


Figura 4.17: Espectro de emissão do $^1\text{O}_2$ a 1270 nm resolvido no tempo, fotossensibilizado pela **TARF-Catiônica-2** em solução metanólica. Obtido por excitação em 355 nm com 2,2 mJ/pulso, 10 pulsos/segundos.

Nota-se que há um aumento de emissão na região em 1270 nm e essa emissão decai com o tempo de vida (10 μ s) esperado para o oxigênio singlete em metanol (figura 4.17). A relação entre as integrais obtidas são diretamente proporcionais à relação entre

os rendimentos quânticos de produção de oxigênio singleto (ϕ_{Δ}), e esses valores estão representados na tabela 4.4.

Tabela 4.4: Rendimento quântico de produção de $^1\text{O}_2$ fotossensibilizado pelos derivados da riboflavina em metanol.

Composto	$\phi_{\Delta} (\pm 0,05)$
Riboflavina	0,50
TARF	0,46
TPRF^a	0,35
TARF-Me	0,58
TARF-Éster	0,52
TARF-Ácida	0,24
TARF-Catiônica	0,53
TARF-Catiônica-2	0,54
Fenalenona^b	0,97

^a experimento realizado em clorofórmio.

^b ϕ_{Δ} da fenalenona obtido da referência 125 e 126. $\phi_{\Delta} = 0,97 \pm 0,05$ em metanol e clorofórmio.

Dentro do erro experimental podemos afirmar que não houve grandes mudanças nos valores de ϕ_{Δ} entre os compostos sintetizados exceto para a **TPRF** e **TARF-Ácida**. No caso da **TPRF**, as análises foram realizadas em clorofórmio. Os decaimentos seguiram o perfil esperado com o tempo de vida de $^1\text{O}_2$ calculado de 200 μs (tempo de vida esperado para este solvente).¹²⁶ Para a **TPRF** foi observado uma diminuição no ϕ_{Δ} . Acredita-se que por ser uma molécula com uma estrutura química muito maior que a da riboflavina, a **TPRF** tem mais canais de desativação dos estados excitados singletes e tripletes por decaimentos não-radioativos ($\Sigma k_{nr} \text{TPRF} > \Sigma k_{nr} \text{RF}$, onde K_{nr} = constante de decaimento não-radioativo). Este efeito parece estar aumentado para a **TARF-Ácida**. Os valores de ϕ_{Δ} obtidos para a **TARF-Me** e para a própria **RF** em

¹²⁶Machado, A. E. H.; Miranda, J. A.; Oliveira-Campos, A. M. F.; Severino, D.; Nicodemc, D. E. *J. Photochem. Photobiol. A.* **2001**, *146*, 75.

metanol estão de acordo com os dados da literatura (0,61¹²⁰ e 0,51^{118a} respectivamente). De um modo geral, as funcionalizações nos grupos hidroxilas da cadeia ribitol da riboflavina e no N-3 do sistema de anéis isoaxazinas não afetaram significativamente as propriedades fotofísicas dos derivados sintetizados.

4.1.3 Avaliação do coeficiente de partição *n*-octanol/água

A afinidade de fotossensibilizadores por células pode ser estimada pelo coeficiente de partição (P), ou seja, pela razão da concentração de um composto em um sistema bifásico *n*-octanol/água.¹²⁷ É conhecido que a partição de um composto em *n*-octanol/água imita o comportamento do mesmo no sistema água/membrana celular. O parâmetro P é muitas vezes representado pela sua função logarítmica ($\log P = \log [FS]_{org}/[FS]_{aq}$) e dependendo da natureza do analito, o valor de P pode variar com o pH do meio. Devido aos grupos protonáveis e desprotonáveis existente nas flavinas, é de se esperar diferentes valores de P para estes compostos em relação ao pH. No entanto, como todos os experimentos em células foram feitos em meios aquoso tamponado este parâmetro foi calculado apenas no pH utilizado nos estudos (pH = 6,7; solução salina de Hanks). Este experimento foi realizado comparando à fluorescência das amostras antes e depois da partição com a fase orgânica, de acordo com a literatura¹²⁸, e o resultado está resumido na tabela 4.5.

¹²⁷Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 525.

¹²⁸Kessel, D. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 447.

Tabela 4.5: Coeficiente de partição (P) *n*-octanol/tampão de Hanks para os derivados da riboflavina.

Composto	P <i>n</i> -octanol /tampão de Hanks (pH = 6,7)	log P
Riboflavina	0,08	- 1,10
TARF	1,28	+ 0,11
TPRF	10,80	+ 1,03
TARF-Me	2,28	+ 0,36
TARF-Éster	3,64	+ 0,56
TARF-Ácida	0,05	- 1,30
TARF-Catiônica	0,01	- 2,00
TARF-Catiônica-2	0,01	-2,00

Avaliando a tabela 4.5 podemos inferir que as funcionalizações na molécula da riboflavina modificaram consideravelmente o valor de P dos derivados e esse resultado segue a mesma tendência dos dados existentes na literatura para os derivados semelhantes.^{95c} As transformações dos grupos alcoóis em ésteres, levaram à formação de compostos mais lipofílicos. Além disso, comparando o valor de P entre a **TARF** e os derivados **TARF-Me** e **TARF-Éster**, observa-se que a alquilação do *N*-3 aumenta também o valor de P. Os dados obtidos para os derivados alquilados **TARF-Catiônica**, **TARF-Catiônica-2**, e **TARF-Ácida** mostram que estes compostos são mais hidrofílicos que a riboflavina.

É importante mencionar que P mede a tendência de um determinado composto migrar da água para um meio que tem propriedade similar à da membrana (*n*-octanol). No entanto, este parâmetro é ineficiente para medir interações específicas entre o Fs e as membranas das células. Estas interações específicas resultam de propriedades do composto tais como anfifilicidade, grupos funcionais e existências de cargas (positivas

ou negativas) no Fs.¹²⁹ Devido a estas interações específicas, é particularmente esperado que os derivados catiônicos apresentem grande afinidade por células mesmo apresentando um baixo valor de P. Isso ocorre, pois membranas biológicas são geralmente carregadas negativamente, de tal forma que a carga positiva destes derivados favorecem as interações eletrostáticas com as membranas.¹³⁰

4.1.4 – Atividade fotodinâmica dos derivados da riboflavina para uso no tratamento de leishmaniose

O estudo comparativo *in vitro* da atividade fotodinâmica dos Fs derivados da riboflavina foi realizado através da morte celular fotoinduzida de promastigotas de *Leishmania major* na presença de luz azul. O dispositivo de irradiação utilizado no estudo de morte celular fotoinduzida das células foi desenvolvido pela “Oficina de Assistência à Pesquisa” da Universidade Complutense de Madri (figura 4.18).

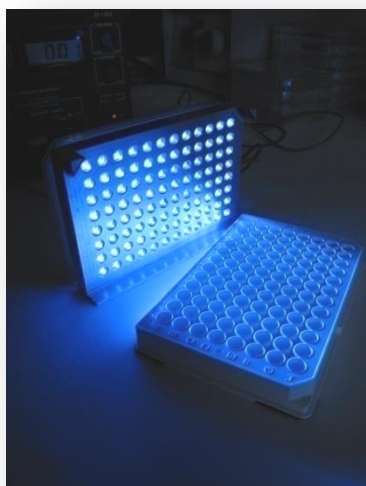


Figura 4.18: Iluminador produzido para irradiar células em placa de cultura de 96 poços. O dispositivo contém 96 LEDs (470 nm) acoplados a uma placa de alumínio.

¹²⁹ Engelmann, F. M.; Mayer, I.; Gabrielli, D. S.; Toma, H. E.; Kowaltowski, A. J.; Araki, K.; Baptista, M. S. J. *Bioenerg. Biomembr.* **2007**, *39*, 175.

¹³⁰ Tossi, A.; Benedetti, F.; Norbedo, S.; Skrbec, D.; Berti, F.; Romeo, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4719.

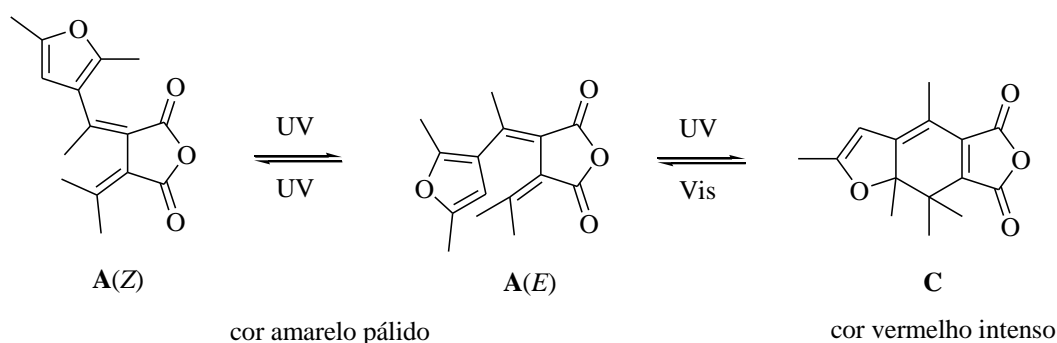
Como podemos ver na figura 4.18 para cada poço há um LED correspondente. A densidade do fluxo fotônico transmitido através dos poços foi calculado por actinometria química.¹³¹

Actinometria refere-se à medida da quantidade de luz que passa por um sistema com uma determinada geometria. Existem basicamente dois tipos de actinometria: uma chamada radiometria, que usa um dispositivo físico para medir a quantidade de luz (como por exemplo, uma fotomultiplicadora ou fotodiodo); e outra chamada actinometria química, que mede a quantidade de luz que atravessa um sistema através de uma reação fotoquímica com rendimento quântico conhecido.¹³¹ Virtualmente todas as reações fotoquímicas com um rendimento quântico conhecido podem ser usadas como actinómetros químicos. No entanto, há certas propriedades químicas necessárias para que um composto seja um bom candidato para esta finalidade. Como por exemplo, podemos mencionar que um bom actinómetro deve apresentar elevada fotoestabilidade; rendimento quântico independente da região de excitação, temperatura e concentração; e os números de moléculas foto-transformadas devem ser analisados por um método rápido e conveniente (como por espectrometria).¹³² Um composto com estas características e muito utilizado em actinometria é o *aberchrome* 540.¹³³ Esta substância reage de forma reversível por fotociclização ($A(E) \rightleftharpoons C$) como mostrado no esquema 4.21.

¹³¹ Kuhn, J.; Braslavsky, E. E.; Schmidt, R. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 2105.

¹³² Montalti, M. *et al.* Chemical Actinometry. In: **Handbook of Photochemistry**. 3 ed. New York. CRC Taylor & Francis. 2006, p. 608. ISBN 2005051416.

¹³³ Uhlmann, E.; Gauglitz, G. *J. Photochem. Photobiol. A.* **1996**, *98*, 45.



Esquema 4.21: Cicliza\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica do *aberchrome 540*.¹³³

Na presen\u00e7a de luz azul ocorre a abertura do anel da subst\u00e2ncia **C**, levando \u00e0 forma\u00e7\u00e3o de **A** e conseq\u00fcentemente h\u00e1 uma diminui\u00e7\u00e3o na intensidade da cor vermelha da amostra em solu\u00e7\u00e3o.

O experimento de actinometria foi realizado utilizando *aberchrome 540* e consistiu em determinar a diminui\u00e7\u00e3o da colora\u00e7\u00e3o da amostra em 490 nm (por espectrometria de absor\u00e7\u00e3o), de acordo com o tempo de ilumina\u00e7\u00e3o. Essa varia\u00e7\u00e3o foi determinada durante os primeiros 15 segundos de irradia\u00e7\u00e3o ($\Delta\text{Abs}_{490} = 0,207$ em 15 s). Atrav\u00e9s dos dados existentes na literatura de rendimento qu\u00e2ntico da rea\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica ($\phi = 0,07$ no comprimento de onda de irradia\u00e7\u00e3o de 470 nm),¹³² e do coeficiente de extin\u00e7\u00e3o molar do composto **C** ($8038 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$),¹³² o fluxo fot\u00f4nico calculado foi de $64,5 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

A atividade fotodin\u00e2mica dos derivados da riboflavina foi testada em parasitas promastigotas de *Leishmana major* usando o LED azul descrito anteriormente (densidade fot\u00f4nica de aproximadamente $65 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) como fonte luminosa. Os derivados foram adicionados ao meio de cultura das promastigotas, incorporados por 30 minutos, irradiados (30 minutos) e incubados no escuro por diferentes per\u00edodos at\u00e9 a determina\u00e7\u00e3o da viabilidade celular pelo m\u00e9todo MTT¹³⁴ ser realizada. O composto **TPRF** n\u00e3o foi utilizado neste estudo, pois esta subst\u00e2ncia precipita mediante adi\u00e7\u00e3o ao meio de cultura. Para utilizar este composto em estudos semelhantes \u00e9 necess\u00e1ria sua

incorporação prévia em vesículas. Utilizando os Fs na concentração de 12 μM e tempo de irradiação de 30 minutos avaliou-se a viabilidade dos parasitas após a irradiação.

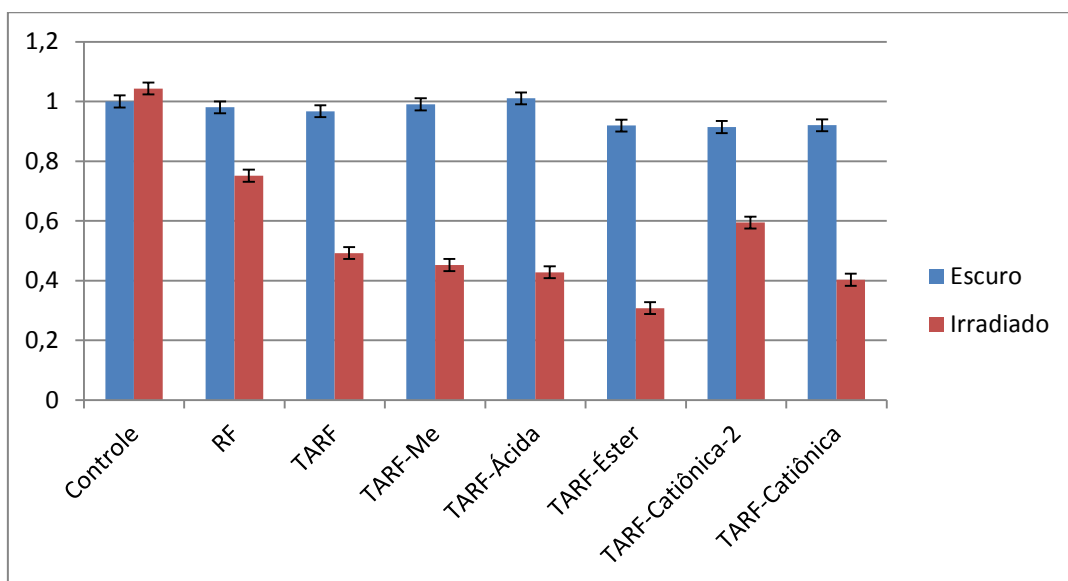


Figura 4.19: Porcentagem da viabilidade celular ($\pm 2\%$) de promastigotas de *Leishmania major* determinado pelo método MTT.¹³⁴ Barras azuis representam a viabilidade celular de promastigotos incubados por 4 h com os Fs no escuro. Barras vermelhas representam a viabilidade celular de promastigotos após 30 minutos de incubação com os Fs, seguido de 30 minutos de iluminação sob luz azul (470 nm ; $65\text{ J m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) e mais 3 h de incubação no escuro. Concentração de Fs de $12\ \mu\text{M}$. Células por poço de $2,4 \cdot 10^6$. Controle indica ausência de Fs. As porcentagens de viabilidade celular mostradas são a média de três ensaios.

Nestas condições, todos os compostos testados apresentaram atividade fotodinâmica sendo que todos os derivados apresentaram melhor atividade do que a riboflavina. Como esperado, por serem derivados de um composto endógeno, a toxicidade no escuro foi baixa para todos os Fs. Após a irradiação, observa-se que os poços contendo a riboflavina estavam transparentes indicando a fotodegradação do Fs. Para todos os derivados estudados as soluções após irradiação continuavam laranjadas indicando qualitativamente que esses compostos são mais fotoestáveis que a **RF**.

¹³⁴ Mosmann, T. J. *Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.

A **TARF-Éster** foi o derivado que apresentou maior atividade fotodinâmica, promovendo a diminuição na viabilidade celular de 70% (método MTT).¹³⁴ Considerando o elevado coeficiente de partição P deste composto, acredita-se que este derivado apresenta maior afinidade (comparado com os outros Fs) pela membrana celular da leishmaniose, conferindo assim uma maior atividade frente à morte celular fotoinduzida. Um estudo mais detalhado de fototoxicidade foi realizado utilizando os Fs nas mesmas condições, no entanto em variadas concentrações. Através da curva dose-resposta, calculado de acordo com a literatura, obteve-se o valor de CE₅₀ (concentração efetiva 50%) de cada substância na presença de luz azul e no escuro.¹³⁵

Tabela 4.6. Toxicidade (CE₅₀) contra promastigotas de *Leishmania major* na presença de luz e no escuro após 3 horas de irradiação (470 nm; 65 J m⁻² s⁻¹).^a

Composto (P)	Fototoxicidade CE ₅₀ (μM)	Toxicidade no escuro CE ₅₀ (μM ± 2)
RF(0,08)	14 ± 1	> 100
TARF(1,28)	3,3 ± 0,7	> 100
TARF-Catiônica(0,01)	7,4 ± 0,5	> 100
TARF-Catiônica-2(0,01)	8,3 ± 1	> 100
TARF-Me(2,28)	4,8 ± 1	> 100
TARF-Éster(3,64)	3,5 ± 0,5	> 100
TARF-Ácida(0,05)	7,3 ± 1	> 100

^a condições experimentais ver item 3.2.18.

Analisando a tabela 4.6 pode-se observar que para todos os compostos estudados a toxicidade no escuro é pequena (> 100 μM) e independe do valor de partição *n*-octanol / água (P). Levando em consideração o erro experimental das análises (± 2μM)

¹³⁵Patneau, D. K.; Mayer, M. L.J. *Neurosci.* **1990**, *10*, 2385.

pode-se inferir que há uma correlação entre o valor de P e a fototoxicidade.

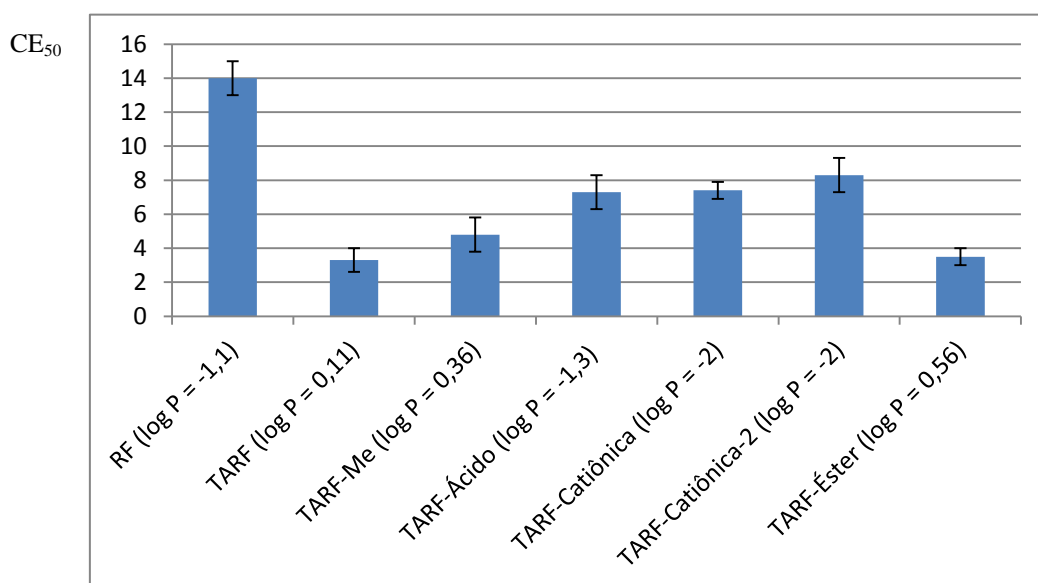


Figura 4.20: Comparação dos valores de CE₅₀(µM) (fototoxicidade contra promastigotas de *Leishmania major*) dos derivados da riboflavina.

Através da figura 4.20, pode-se observar o aumento da fototoxicidade conforme o log P do Fs aumenta, ou seja, a lipofilicidade do derivado aumenta. A partir desse fato pode-se inferir que a afinidade do Fs pela célula apresenta um papel importante na morte celular foto induzida das promastigotas.

A fim de se obter mais informações sobre o processo de morte das promastigotas foi realizado um estudo de inibição da proliferação após o tratamento com os Fs e luz. O experimento é muito semelhante ao anterior, no entanto, as análises de MTT foram realizadas 72 h depois da irradiação com luz. Esse experimento foi realizado para saber se o dano causado por fotossensibilização é irreversível ou se as promastigotas podem se recuperar do dano após a iluminação.

Tabela 4.7: Inibição da proliferação de promastigotas de *Leishmania major* (CE₅₀) na presença de luz e no escuro após 72 horas de irradiação (470 nm; 65 J m⁻² s⁻¹).^a

Composto (P)	Inibição da proliferação iluminado CE₅₀ (μM)	Inibição da proliferação no escuro CE₅₀ (μM ± 2)
RF(0,08)	49 ± 2	> 100
TARF(1,28)	16 ± 2	> 100
TARF-Catiônica(0,01)	12 ± 1	> 100
TARF-Catiônica-2(0,01)	24 ± 2	> 100
TARF-Me(2,28)	14 ± 0,5	> 100
TARF-Éster(3,64)	5,2 ± 0,4	> 100
TARF-Ácida(0,05)	15 ± 1	> 100

^a condições experimentais ver item 3.2.18.

Note na tabela 4.7 que os dados obtidos mostram que os derivados estudados não inibem significativamente a proliferação das promastigotas no escuro. Na presença de luz, o composto com maior valor de P, **TARF-Éster**, foi o que mostrou maior atividade na inibição de proliferação, após irradiação, apresentando um valor muito próximo ao obtido anteriormente no estudo de fototoxicidade (CE₅₀ = 5,2 e 3,5 μM respectivamente), sugerindo que nesse caso o dano causado é irreversível. Nota-se que há uma correlação entre o valor de P e a eficiência na morte celular fotoinduzida como mostrado na figura 4.21.

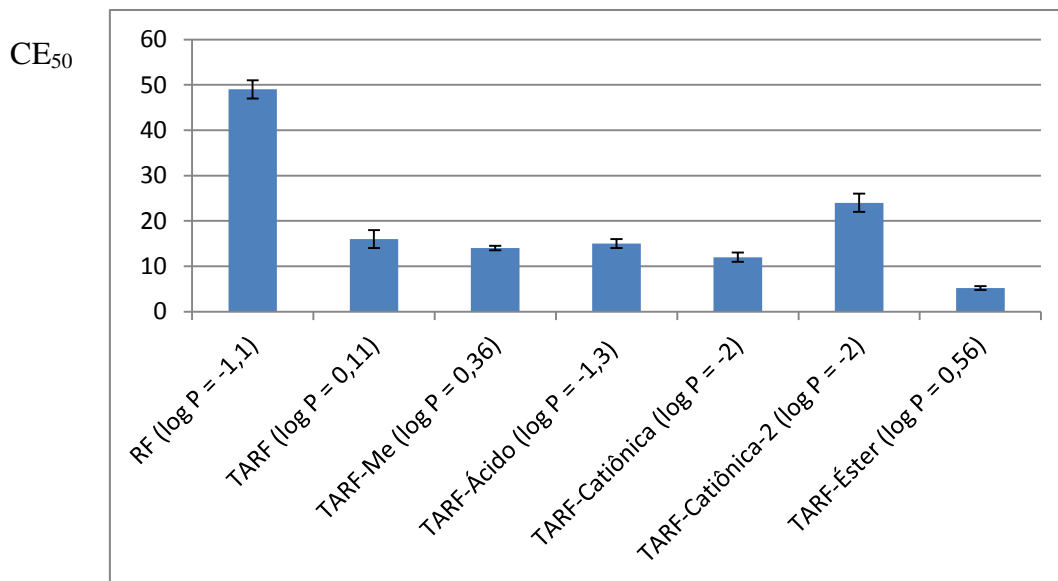


Figura 4.21: Comparação dos valores de CE₅₀ (µM) (inibição da proliferação de promastigotas de *Leishmania major* na presença de luz) dos derivados da riboflavina.

Cabe mencionar também que a **TARF-Catiônica** e a **TARF-Ácida** conferiram elevada atividade fotodinâmica mesmo com o baixo valor de P para estes derivados. Inferi-se que estes compostos apresentam interações secundárias com as células devido aos grupos funcionais existentes na molécula (sal de amônio quaternário e função ácido carboxílico). Em todos os casos, exceto para a **TARF-Éster**, o CE₅₀ da inibição da proliferação foram de duas a três vezes maiores que o CE₅₀ de fototoxicidade. Este fato indica que, de forma geral, as promastigotas tendem a se recuperar dos danos causados. Dados preliminares, não reportados nesta tese, mostraram que estes derivados da riboflavina carregados positivamente não entram eficientemente em células eucarióticas. Nestes casos será necessário utilizar sistemas específicos de entrega intracelular.

Foi mostrado que a aplicação dos derivados da riboflavina como Fs no tratamento de leishmaniose é promissora, principalmente porque estes compostos apresentam baixa toxicidade no escuro. No entanto acredita-se que para melhorar a eficiência na morte celular fotoinduzida desses compostos é preciso aumentar a taxa de

incorporação dos mesmos em células. Uma estratégia que poderia ser utilizada com esta finalidade é a veiculação dos Fs em vesículas sintéticas.

Sabendo que as flavinas estão envolvidas em processos fotodinâmicos tanto por mecanismo tipo I (espécies radicalares)¹³⁶ quanto tipo II ($^1\text{O}_2$)¹³⁶, imagina-se que ambos os mecanismos devem ser responsáveis pelos danos na células das promastigotas. A fim de pesquisar com mais detalhes a natureza deste dano, faz-se necessário estudos mais direcionados sobre o mecanismo de morte celular fotoinduzida, com adição de *scavengers* de ROSs e de oxigênio singlete ao meio de cultura. Estes experimentos serão realizados futuramente.

4.2- SENSORES DE ANTIMÔNIO BASEADOS EM COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) POLIAZAAROMÁTICOS

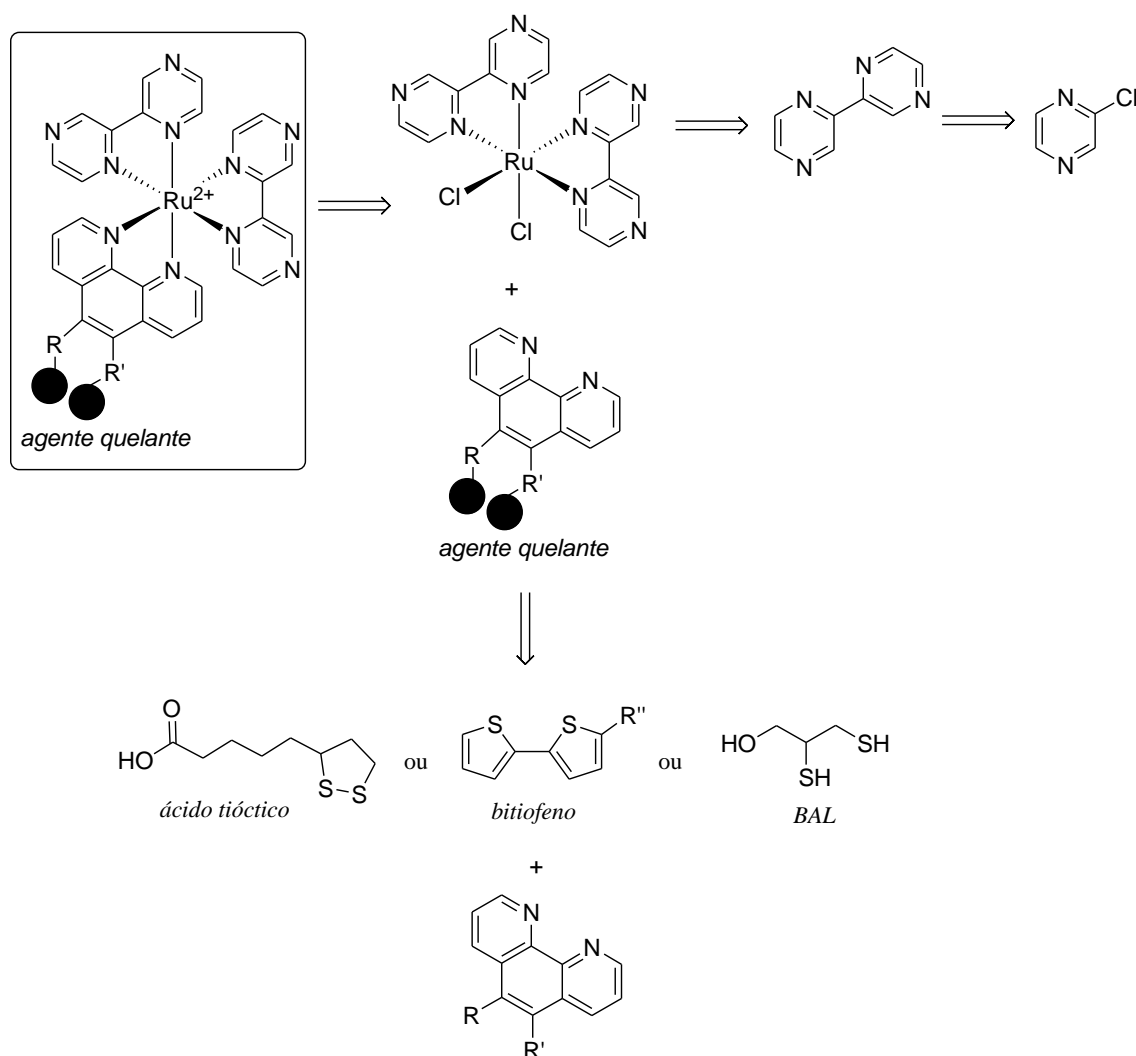
Neste item serão apresentadas as metodologias utilizadas para sintetizar complexos de Ru (II) com a finalidade de serem aplicados como sensores luminescentes. Serão também discutidas as estratégias sintéticas para se obter ligantes capazes de interagir com Sb e os resultados preliminares de luminescência do complexo sintetizado $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})]^{2+}$ na presença de SbCl_3 e tartarato de antimônio e potássio em solvente orgânico e aquoso.

4.2.1- Síntese de ligantes e complexos de Ru (II)

Como discutido na introdução, a estratégia para se obter sensores capazes de detectar antimônio consiste na introdução de um ligante (contendo grupos quelantes) a um complexo heteroléptico de Ru (II). Complexos de Ru (II) contendo ligantes 2,2'-bipirazina (bpz) apresentam elevado potencial redox no estado excitado quando

¹³⁶ Edwards, A. M.; Silva, E.; Jofré, B.; Becker, M. I.; De Ioannes, A. E. *J. Photochem. Photobiol. B.* **1994**, *24*, 179.

comparado aos análogos contendo 2-2'-pipiridina (bip).^{77,137} Esse fato faz com que as propriedades luminescentes dos complexos de Ru (II) contendo ligantes bpz sejam bastante susceptíveis às variações do meio externo. O antimônio é um semimetal tiofílico, ou seja, apresenta afinidade por enxofre.¹¹ Portanto, hipotetizou-se que a unidade receptora desta espécie deveria apresentar grupos químicos derivados do enxofre, como por exemplo, di-tiois vicinais e bitiofenos. Sendo assim, foi proposta a retro-síntese do complexo heteroléptico contendo bpz e derivados da fenantrolina mostrada no esquema 4.22.



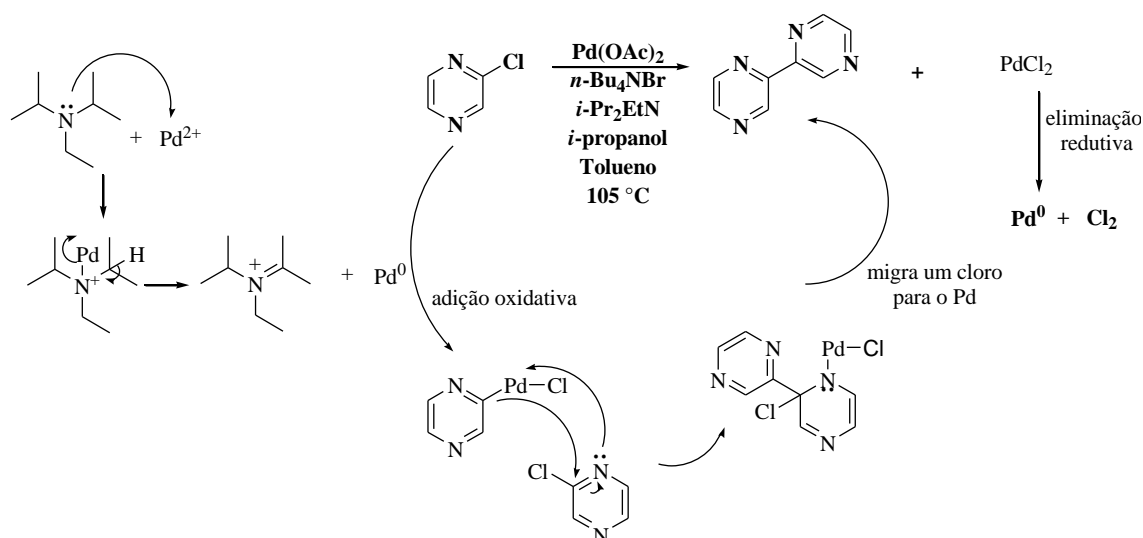
Esquema 4.22: Análise retro-sintética de sensores luminescentes baseados em complexos de Ru (II) poliaaromáticos contendo enxofre que podem servir como agentes receptores de antimônio.

¹³⁷(a) Crutchley, R. J.; Kress, N.; Lever, A. B. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1170. (b) Thanasekaran, P.; Rajagopal, S.; Srinivasan, C. *J. Photochem. Photobiol. A* **1999**, *120*, 181.

A síntese do sensor consiste em duas etapas principais: a obtenção do complexo bis-Ru(bpz)₂Cl₂ e a síntese do ligante que apresenta grupos funcionais receptores de antimônio. Neste item serão apresentados os métodos sintéticos de todos os intermediários envolvidos na preparação do sensor, incluindo as tentativas que não obtiveram êxito.

4.2.1.1 Síntese da 2,2'-bipirazina

O ligante 2,2'-bipirazina (bpz) foi sintetizado de acordo com métodos já descritos na literatura, que utilizam a 2-cloropirazina como material de partida na presença de catalisador de paládio.¹³⁸



Esquema 4.23: Síntese da 2,2'-bipirazina e mecanismo da reação de acoplamento da 2-cloropirazina catalisada por paládio.

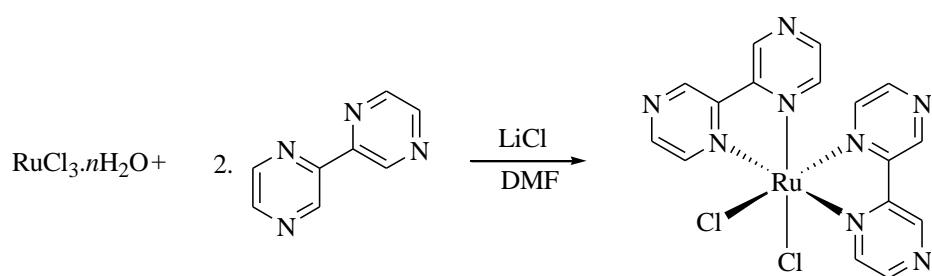
Essa metodologia consiste na formação *in situ* da espécie de paládio catalítica (Pd⁰) através da reação com a amina utilizada (i-Pr₂EtN). Após a formação do Pd⁰ ocorre a adição oxidativa ao cloreto de arila seguido do acoplamento com uma molécula de 2-cloropirazina (possivelmente por um mecanismo concertado). O intermediário diarila formado recupera a aromaticidade através da migração de um cloreto ao paládio,

¹³⁸(a) Bouilly, L.; Darabantu, M.; Turck, A.; Plé, N. *J. Heterocyclic Chem.* **2005**, *42*, 1423. (b) Lafferty, J. J.; Case, F. H. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 1501.

formando PdCl_2 e a 2,2'-bipirazina. O cloreto de paládio formado sofre eliminação redutiva produzindo Cl_2 e a espécie Pd^0 que entra novamente no ciclo catalítico da reação. O produto puro foi obtido através de purificação por coluna cromatográfica. A caracterização estrutural desse composto foi realizada por RMN de ^1H . Os sinais em 9,54 e 8,60 ppm com integrais de 2 e 4 hidrogênios (respectivamente) corroboram com os dados descritos na literatura para esta substância.^{138a} Seguindo esta metodologia o ligante foi obtido com 20% de rendimento isolado.

4.2.1.2 Síntese do complexo *cis*-bis(bipirazina)(cloro) rutênio (II)

A síntese do complexo Ru (II) *cis*-bis(bipirazina) foi realizada adaptando o método descrito na literatura por Crutchley *et al.*¹³⁹



Esquema 4.24: Síntese do complexo Ru (II) *cis*-bis(bipirazina).

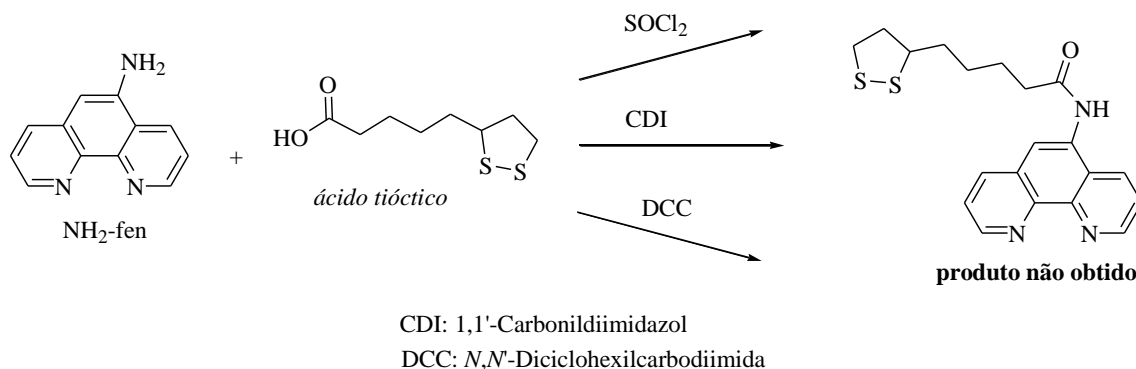
A síntese consiste na adição do ligante e do cloreto de Ru (III) na estequiometria adequada (2:1) em solvente orgânico. O DMF, além de solvente, é utilizado para promover a redução de Ru (III) para Ru (II) e o cloreto de lítio é adicionado para minimizar a possível formação do subproduto tris-complexo $[\text{Ru}(\text{bpz})_3\text{Cl}_2]$. Após a

¹³⁹Crutchley, R. J.; Lever, A. B. P.; Poggi, A. *Inorg.Chem.* **1983**, 22, 2647.

reação, o produto foi purificado por recristalização em DMF e acetona, levando à obtenção de um sólido roxo que foi caracterizado por espectroscopia de absorção.¹⁴⁰ A caracterização foi realizada por espectroscopia no UV-Vis onde pode-se observar as bandas de absorbância típicas desse composto em 510 e 400 nm.¹⁴⁰ O produto foi obtido com rendimento quantitativo.

4.2.1.3 Tentativa de conjugar o ácido tióctico com ligantes derivados do fen e bip

Devido à existência do grupo funcional carboxila (ver esquema 4.25), propôs-se a introdução do ácido tióctico no ligante através da sua reação com a 5-amino-1,10-fenantrolina (NH₂-fen). A reação da NH₂-fen com grupos carboxilas está descrita na literatura e geralmente faz uso de grupos ativadores como DCC, CDI e reagentes como SOCl₂, entre outros.¹⁴¹ De maneira análoga a esses protocolos, foram testadas as metodologias mostradas no esquema 4.25.



Esquema 4.25: Grupos ativadores utilizados na tentativa de conjugar a NH₂-fen com o ácido tióctico.

A reação que fez uso de SOCl₂ foi realizada em DMF onde se observou a degradação do ácido tióctico e a recuperação da NH₂-fen sem sofrer reações. As metodologias que utilizaram CDI e DCC foram testadas em metanol, acetonitrila e

¹⁴⁰Crutchley, R. J.; Lever, A. B. P., *Inorg.Chem.***1982**, *21*, 2276.

¹⁴¹(a) Villien, M.; Deroo, S.; Gicquel, E.; Defrancq, E.; Moucheron, C.; Mesmaeker, A. K-D.; Dumy, P. *Tetrahedron***2007**, *63*, 11299. (b) Batey, H. D.; Whitwood, A. C.; Duhme-Klair, A-K. *Inorg.Chem.***2007**, *46*, 6516. (c) Petrat, F.; Weisheit, D.; Lensen, M.; Groot, H.; Sustmann, R.; Rauen, U. *Biochem. J.***2002**, *362*, 137. Ramiro, P.; Fresnadillo, D. G.; Orellana, G. *Tetrahedron***2005**, *61*, 9478.

DMF a temperatura ambiente, mas em nenhum dos casos foi observado à formação de um possível derivado da NH₂-fen. A baixa reatividade desse composto nas reações que fizeram uso de CDI e DCC pode ser explicada pela existência de um segundo grupo nucleofílico na molécula. Dessa forma, o grupo da molécula que ataca a carbonila do composto tióctico ativado com CDI ou DCC é o nitrogênio piridíneo. Esse ataque levaria à formação de um intermediário que é, provavelmente, instável e logo hidrolisado, regenerando os materiais de partida.

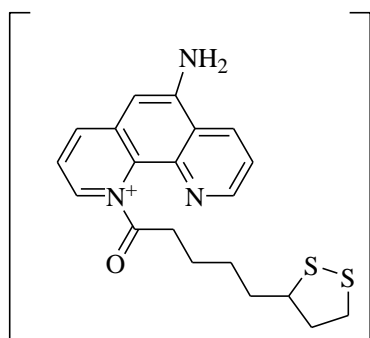
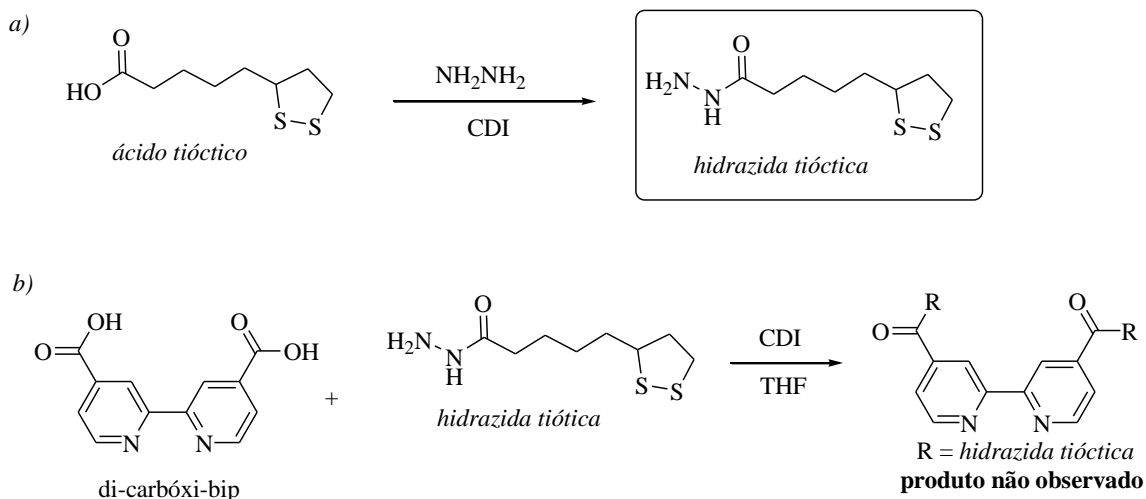


Figura 4.22: Possível intermediário formado na reação entre a NH₂-fen e o ácido tióctico.

Esse possível intermediário, porém, não foi detectado por CCD. Devido a esse caráter nucleofílico dos nitrogênios do anel piridina da NH₂-fen, buscou-se uma nova metodologia sintética que faz uso do derivado tióctico contendo um grupo hidrazida. Nesse caso, o grupo nucleofílico está localizado no derivado tióctico. A síntese desse novo derivado tióctico, bem como, a tentativa de conjugá-lo com o ligante di-carbóxi-bip estão mostradas no esquema 4.26.



Esquema 4.26: a) Síntese do composto hidrazida tióctica; b) tentativa de conjugar a hidrazida tióctica com o ligante di-carbóxi-bip.

A síntese da hidrazida foi adaptada da metodologia utilizada por Koufaki *et al.*¹⁴² Os autores desse trabalho sintetizaram a hidrazida através da transformação do ácido tióctico em cloreto ácido, seguido da reação com hidrazina hidratada. No nosso caso, para sintetizar esse derivado, utilizamos o ácido tióctico na presença do ativador CDI, seguido da adição do nucleófilo hidrazina em THF (ver item 3.3.21). A purificação desse composto foi eficientemente realizada por coluna cromatográfica. A caracterização dessa substância foi realizada por RMN de ¹H onde se pode observar os sinais entre 3,50 e 1,33 ppm referente a cadeia alifática do derivado tióctico, de acordo com o descrito na literatura.¹⁴² O derivado hidrazida tióctica foi obtido com 67% de rendimento isolado.

Com essa hidrazida, tentou-se sintetizar o ligante mostrados na figura 4.26 b. As sínteses foram acompanhadas por CCD e não foi observada a formação de um possível produto, mesmo após 24 h de reação.

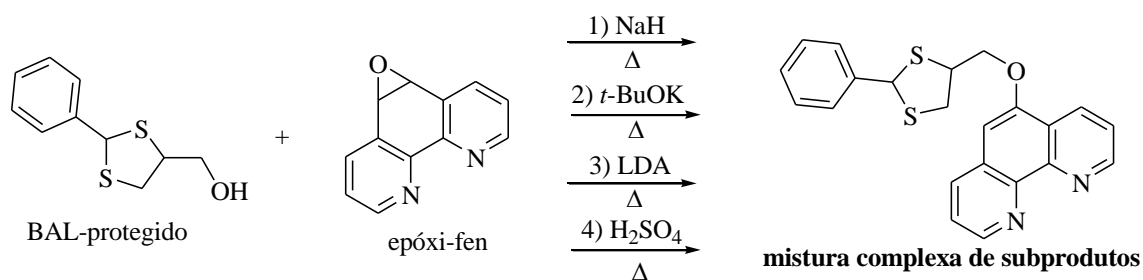
¹⁴²Koufaki, M.; Kiziridi, C.; Alexi, X.; Alexis, M. N. *Bioorg.Med. Chem.* **2009**, *17*, 6432.

Ao longo do tempo reacional, foi observada a formação de um precipitado que atribuímos ser produto de polimerização do derivado tióctico. Derivados tiócticos são conhecidos por sua instabilidade térmica e fotoquímica por polimerização.¹⁴³

A baixa reatividade da 5-amino-fenantrolina e a instabilidade do ácido tióctico foram os motivos que culminaram no insucesso da metodologia de conjugar os dois compostos. Com a finalidade de se obter derivados contendo grupos capazes de quelar com Sb testou-se a síntese de ligantes contendo grupos di-tiol vicinal.

4.2.1.4 Tentativa de introduzir grupos di-tiol-vicinal em ligantes derivados da fenantrolina

Foram estudadas metodologias para introduzir a molécula BAL (do inglês, *british anti lewisite*, (RS)-2,3-dimercapto-propanol), que apresenta um grupo di-tiol vicinal, no ligante 5,6-epoxi-5,6-dihidro-[1,10]-fenantrolina (epóxi-fen). Reações de abertura do grupo epóxido desse ligante com diferentes nucleófilos são conhecidas na literatura.¹⁴⁴ Baseados nesses artigos, foram propostas as metodologias de abertura do epóxido com o BAL-protegido mostradas no esquema 4.27.



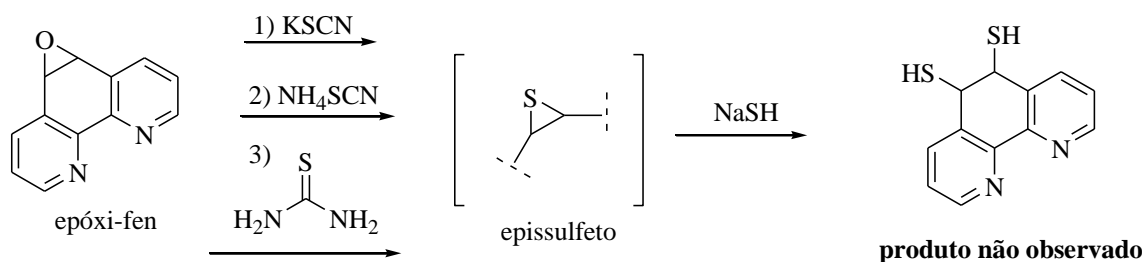
Esquema 4.27: Tentativas de conjugar o composto BAL-protegido com a epóxi-fen.

¹⁴³ (a) Wagner, A. F.; Walton, E.; Boxer, G. E.; Pruss, M. P.; Holly, F. W.; Folkers, K. *J. Am. Chem. Soc.***1956**, 78, 5079. (b) Kofuji, K.; Nakamura, M.; Isobe, T.; Murata, Y.; Kawashima, S. *Food Chem.***2008**, 109, 167.

¹⁴⁴(a) Shen, Y.; Sullivan, P. *Inorg. Chem.***1995**, 34, 6235. (b) Sanfilippo, C.; Nicolosi, G. *Tetrahedron: Asymm.***2008**, 19, 2171. (c) Sanfilippo, C.; Nicolosi, G. *Tetrahedron: Asymm.***2007**, 18, 1828. (d) Schoffers, E.; Kohler, L. *Tetrahedron: Asymm.***2009**, 20, 1879.

As tentativas de sínteses mostradas no esquema 4.27 foram acompanhadas por CCD por um período de até 24 h. A reação 4, em meio ácido, não mostrou a formação de produtos. As reações realizadas na presença de base (1, 2 e 3), quando analisadas por CCD após 3 h, mostravam a formação de sete manchas. Esse resultado mostrou que essas metodologias são pouco atrativas, pois possivelmente apresentaria baixo rendimento. Dessa forma, foi proposta uma rota alternativa para se obter um ligante contendo uma função orgânica di-tiol-vicinal.

Diversos grupos nucleofílicos de enxofre são descritos na literatura para sintetizar epissulfetos a partir de epóxidos.¹⁴⁵ É conhecido, também, que a abertura do anel epissulfeto com NaSH leva à formação de di-tiol vicinal.¹⁴⁶ Dessa forma, estudou-se as metodologias mostradas no esquema 4.28 para sintetizar um ligante contendo um grupo di-tiol-vicinal.



Esquema 4.28: Tentativa de síntese de um ligante contendo a função orgânica di-tiol vicinal.

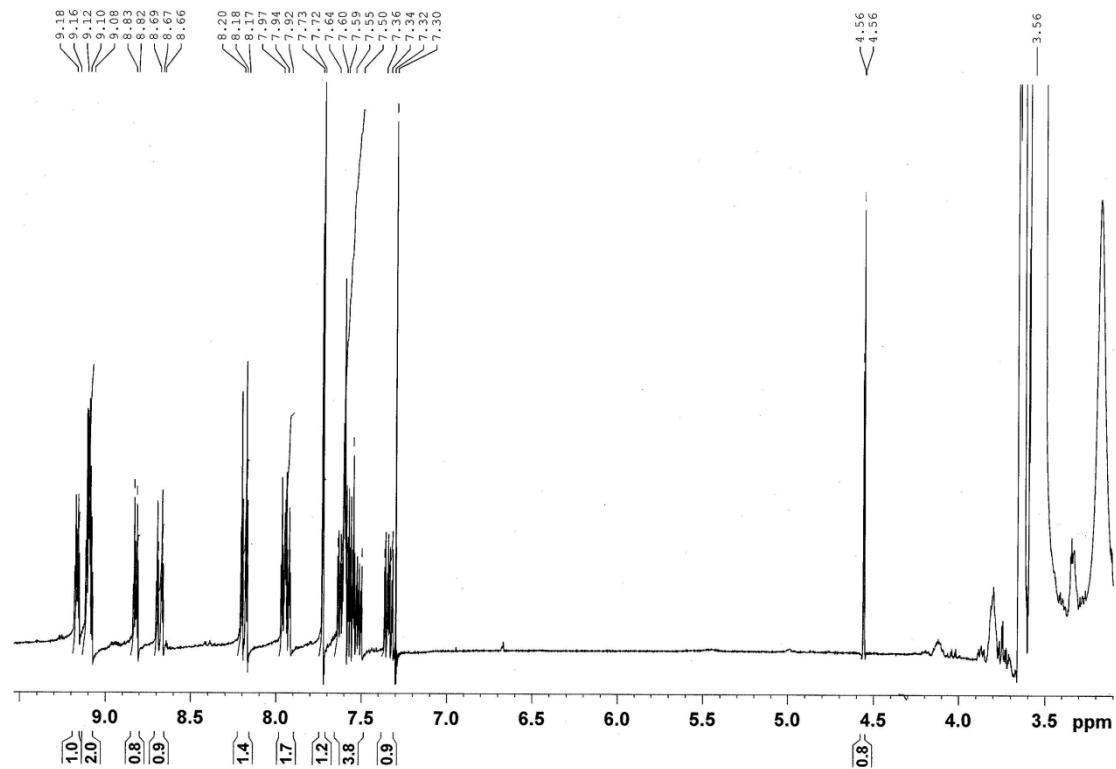
As reações foram acompanhadas por CCD e os solventes testados foram acetonitrila, PEG-400 (polietileno glicol 400) e DMF, em t.a. e 120 °C. As análises cromatográficas da reação antes da adição do segundo nucleófilo (NaSH) mostraram que, após 1 h, ocorria a formação de quatro manchas com um fator de retenção menor do que o material de partida epóxi-fen. Ainda antes da adição do segundo nucleófilo,

¹⁴⁵(a) Das, B.; Reddy, V. S.; Krishnaiah, M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 8473. (b) Confalone, P. N.; Pizzolato, G. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5520. (c) Jin, Y.; Ghaffari, M. A.; Schwartz, M. A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 7319.

¹⁴⁶ Carlsen, P. H. J.; Rist, O.; Maldal, T.; Vikane, O.; Gilje, E. *Acta Chem. Scand.* **1996**, 50, 158.

uma alíquota do produto bruto da reação utilizando KSCN em PEG-400 a 120 °C foi submetida à análise de RMN de ^1H .

a)



b)

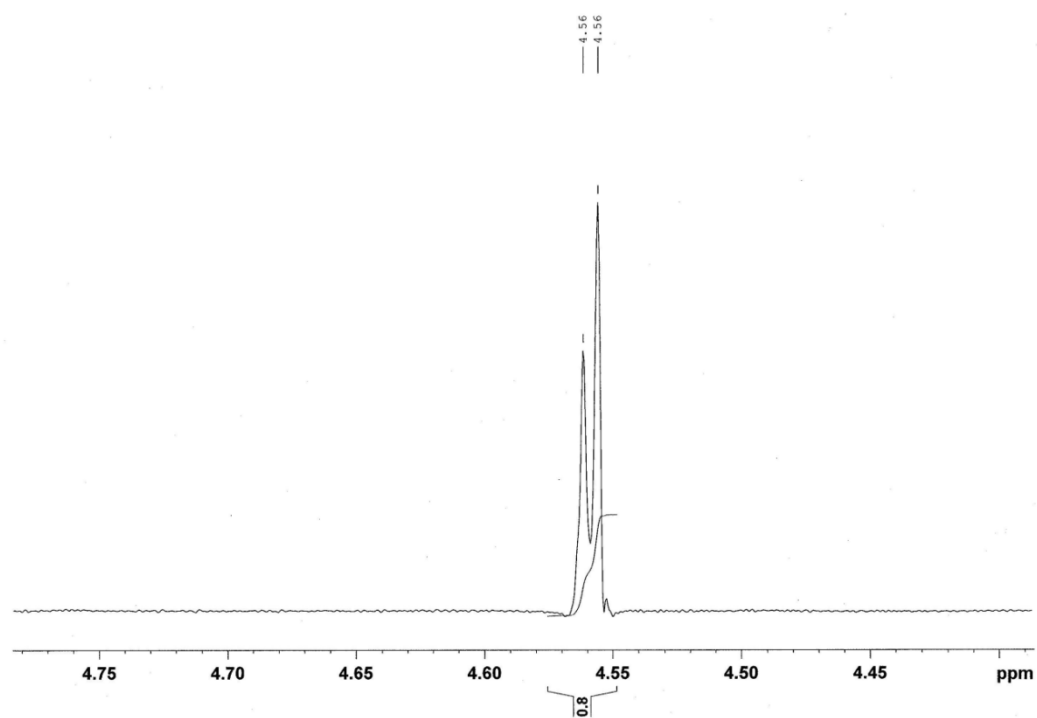


Figura 4.23: Análise de RMN (em CDCl_3 ; 300 MHz) da alíquota da reação entre a epóxi fen e KSCN em PEG-400 a 120 °C. a) região entre 3 e 10 ppm; b) região entre 4,75 e 4,4 ppm.

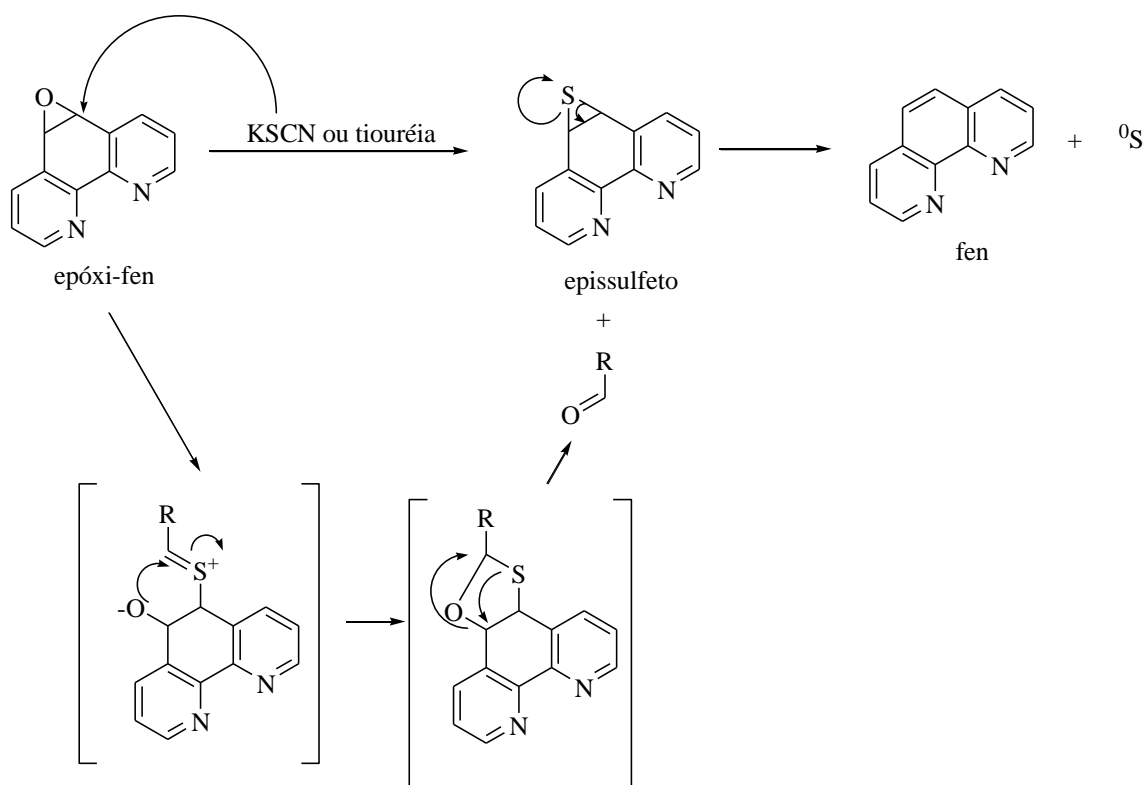
Os dados de RMN de ^1H do produto bruto (Figura 4.23) mostram dois sinais próximos de 4,5 ppm, que podem ser atribuídos ao material de partida (epóxido) e do possível epissulfeto formado. Os sinais na região aromática mostram-se duplicados sugerindo essa possível mistura de compostos. No entanto, mesmo tendo sido detectado por RMN, tentativas de isolar o epissulfeto por coluna cromatográfica não obtiveram êxito. Após coluna, o principal produto eluído foi caracterizado como sendo a fenantrolina. Dessa forma, inferi-se que o produto de interesse (epissulfeto) degrada facilmente.

A adição *in situ* do segundo nucleófilo (NaSH) ao meio reacional levou a uma formação complexa de subprodutos que, após tentativa de purificação por coluna, também levou à obtenção da fenantrolina. Foram testados o uso do ácido de Lewis LiBF_4 ¹⁴⁷ (como ativador) na síntese do epissulfeto através da reação da epóxi-fen com os nucleófilos de enxofre (^-SCN e tiouréia) utilizados anteriormente, mas os mesmos perfis reacionais foram obtidos.

Zoller *et al.* provaram através de cálculos computacionais que os compostos areno-epissulfetos são termodinamicamente menos estáveis que os análogos areno-epóxidos devido à eliminação, respectivamente, de enxofre e oxigênio elementar.¹⁴⁸ Nas reações mostradas no esquema 4.28, após 6 h de reação notava-se a formação de um precipitado amarelo que sugere-se ser a formação de enxofre elementar (^0S). Para a reação mostrada no esquema 4.28 está proposto um mecanismo que envolve a formação do epissulfeto, seguido de um rearranjo intramolecular que leva à expulsão de enxofre e formação da fenantrolina.

¹⁴⁷Kazemi, F.; Kiasat, A. R.; Ebrahimi, S. *Syn. Comm.* **2003**, 33, 595.

¹⁴⁸Zoller, U.; Shakkour, E.; Pastersky, I. *Tetrahedron* **1998**, 54, 14283.



Esquema 4.29: Mecanismo geral da reação entre a epóxi-fen e KSCN ou tiouréia.

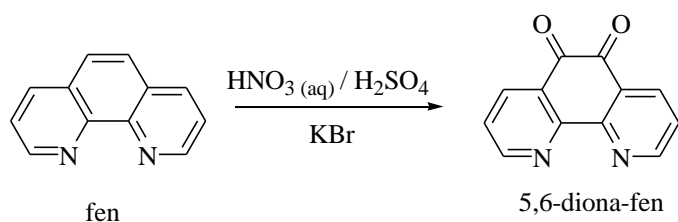
Esse resultado é complementar ao observado por Zoller *et al.*¹⁴⁸, indicando que a maior instabilidade dos epissulfetos quando comparado com os análogos epóxidos também se aplicam aos derivados da fenantrolina. Seguindo o objetivo do projeto, de obter um ligante contendo um grupo receptor de antimônio, iniciou-se a síntese de um derivado da fenantrolina contendo um grupo bitiofeno.

4.2.1.5 Síntese do ligante bitiofeno-imidazo-fenantrolina

Para sintetizar o ligante contendo o grupo bitiofeno, foi escolhida a metodologia descrita por Batista *et al.*¹⁴⁹, que faz uso da 5,6-diona-fenantrolina (5,6-diona-fen) como material de partida. A diona em questão foi sintetizada a partir da fenantrolina de acordo com métodos descritos na literatura.¹⁵⁰

¹⁴⁹Batista, R. M. F.; Costa, S. P. G.; Belsley, M.; Lodeiro, C.; Raposo, M. M. M. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9230.

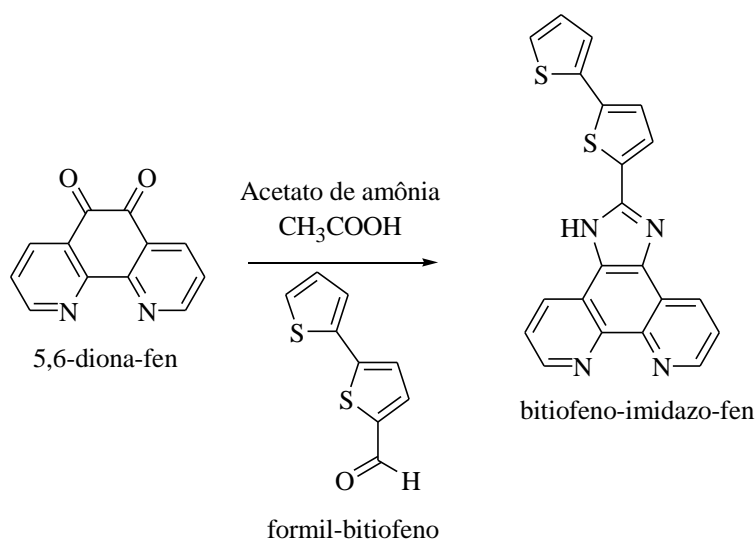
¹⁵⁰Yamada, M.; Tanaka, Y.; Yoshimoto, Y.; Kuroda, S.; Shimao, I. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *65*, 1006.



Esquema 4.30: Síntese da 5,6-diona-fen a partir da fenantrolina.

De acordo com Paw *et al.*, a fenantrolina é oxidada através do Br_2 , que foi formado *in situ* pela reação entre o H_2SO_4 , HNO_3 e KBr .¹⁵¹ O produto puro foi obtido por recristalização em etanol. A diona foi caracterizada por RMN de ^1H , onde se pode observar os 6 hidrogênios aromáticos em 8,98 (2H); 8,39 (2H) e 7,67 (2H) ppm.¹⁵¹ Utilizando essa metodologia, a diona foi obtida com um rendimento isolado de 39%.

Misturou-se a diona com amônia e formil-bitiofeno para se obter o ligante bitiofeno-imidazo-fenantrolina de acordo com o esquema 4.31.

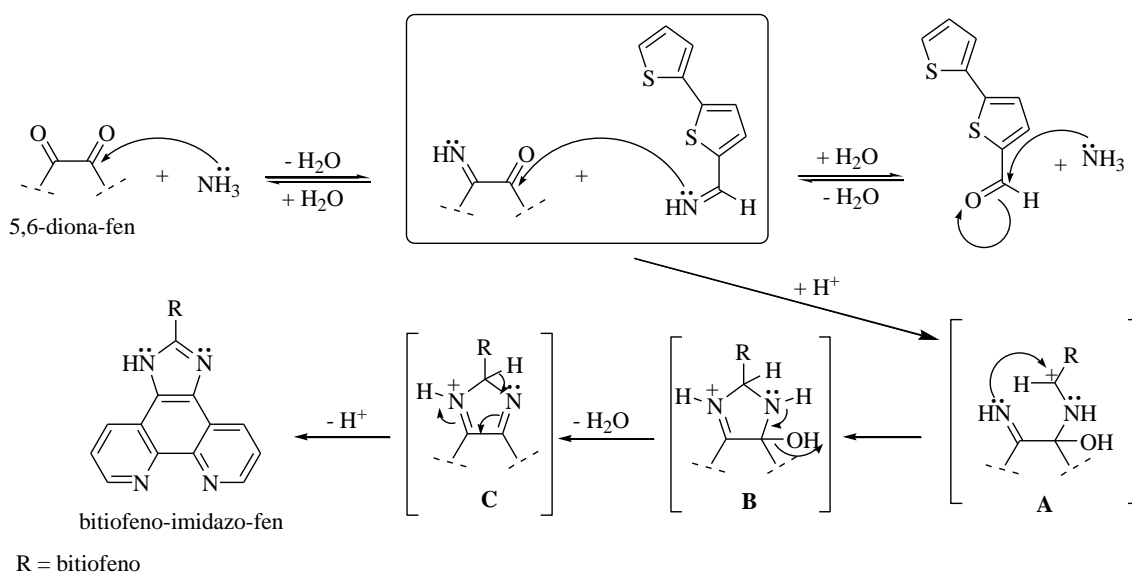


Esquema 4.31: Síntese do ligante bitiofeno-imidazo-fenantrolina a partir da 5,6-diona-fen.

O mecanismo dessa reação inicia com um ataque nucleofílico da molécula de amônia (proveniente do equilíbrio $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}^+$) na carbonila do material de partida (diona). Após esse processo ocorre a perda de uma molécula de água, levando à formação de uma imina. Um processo semelhante ocorre ao formil-bitiofeno, levando a formação de outra imina (imina-bitiofeno). Através de um ataque nucleofílico da

¹⁵¹Paw, W.; Eisenberg, R. *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 2287.

imina-bitiofeno à cetona que não sofreu reação ocorre à união das duas moléculas formando o intermediário **A** (esquema 4.32).



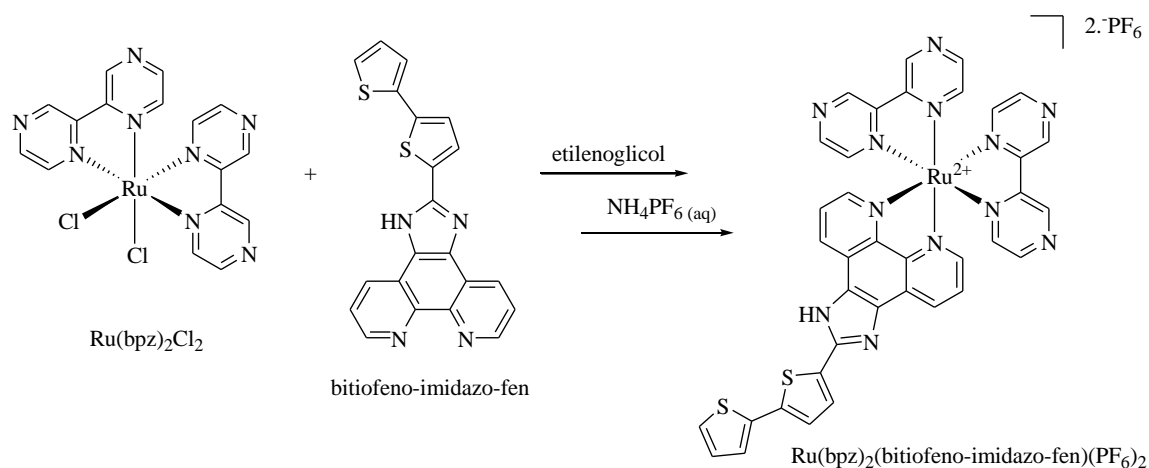
Esquema 4.32: Mecanismo da síntese do ligante bitiofeno-imidazo-fenantrolina.

Após a formação de **A**, ocorre um ataque nucleofílico de uma imina ao carbono deficiente de elétrons (vizinho ao grupo bitiofeno), formando o intermediário cíclico **B**. Esse composto cíclico, após eliminação de uma molécula de H_2O , forma o intermediário **C**. Através desse intermediário (**C**), ocorre a formação do anel aromático imidazol por eliminação de um próton e rearranjo das duplas ligações. Esse ligante foi purificação por recristalização em metanol. A caracterização desse composto foi realizada por RMN de ^1H onde se pode observar o hidrogênio em 13,92 ppm (sinal alargado, ^1H) referente ao ^1H do anel imidazol formado. Os outros hidrogênios aromáticos encontrados no espectro (entre 9,09-7,16 ppm; integrais totalizando 11 hidrogênios) apresentaram deslocamento químicos semelhantes ao reportado por Batista *et al.*¹⁴⁹ Seguindo essa metodologia, o produto foi obtido com 45% de rendimento isolado.

Com esse ligante, sintetizou-se um complexo heteroléptico de Ru (II) utilizando o complexo bis-Ru(bpz)₂Cl₂ como material de partida.

4.2.1.6 Síntese do complexo heteroléptico de Ru (II) empregando os ligantes bpz e bitiofeno-imidazo-fen

O complexo heteroléptico [Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)] foi preparado de maneira análoga ao descrito por Pedras *et al.*¹⁵² A síntese do complexo heteroléptico foi realizada partindo da Ru(bpz)₂Cl₂ de acordo com o esquema 4.33.



Esquema 4.33: Síntese do complexo heteroléptico [Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)].

A reação consiste na adição dos nitrogênios do ligante ao átomo de Ru através da remoção de dois cloretos. A formação do produto foi acompanhada por CCD e espectroscopia de UV-Vis.

¹⁵²Pedras, B.; Batista, R. M. F.; Tormo, L.; Costa, S. P. G.; Raposo, M. M. M.; Orellana, G.; Capelo, J. L.; Lodeiro, C. *Inorg. Chim. Acta* **2012**, 381, 95.

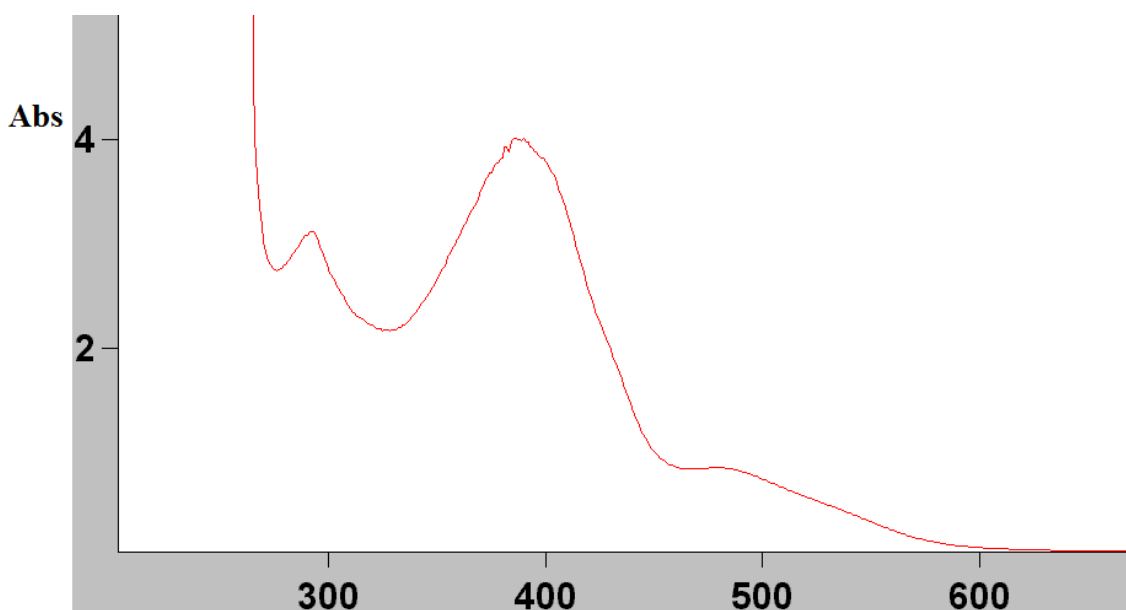


Figura 4.24: Espectro de absorção UV-vis da alíquota da reação de síntese do complexo heteroléptico $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})]$ após 6 h (solvente DMF).

Analisando a figura 4.24, pode-se observar um sinal referente à transição MLCT de complexos de Ru (II), indicando a formação do produto. O complexo heteroléptico foi isolado do meio reacional através da sua precipitação com a adição de solução aquosa saturada de NH_4PF_6 , levando à obtenção de um produto com coloração laranja-amarelado. O complexo foi caracterizado por RMN de ^1H onde observamos os sinais esperados na presença de impurezas. Dessa forma, o produto foi purificado por CLAE-preparativa (ver item 3.2.4). Durante esse processo de purificação ocorreu a troca de contra-íons de PF_6^- para CF_3COO^- . O produto foi caracterizado por RMN de ^1H e EM com ionização por MALDI. Foram encontrados no espectro de RMN de ^1H os sinais referentes aos ligantes bpz (9,91; 9,10 e 8,96 ppm) e do ligante bitiofeno-imidazo-fen (8,43; 8,19; 7,85; 7,66; 7,37; 7,31 e 7,03 ppm). As integrais dos sinais obtidos no espectro de RMN apresentaram pequenas variações em relação ao esperado devido à formação de agregados. Os dados de EM de alta resolução mostraram os sinais esperado para o complexo de interesse em 1028,974 m/z (referente ao íon $[\text{M} + 2(\text{CF}_3\text{COO}) + 1\text{H}]^+$) e o sinal em 869,929 m/z (referente ao íon $[\text{M} + 2(\text{CF}_3\text{COO}) - 1\text{bpz}]^+$). Os dois

sinais observados por EM apresentaram a distribuição isotópica típica do rutênio, comprovando que estes íons contêm um átomo de Ru em suas estruturas. Após purificação por CLAE, o complexo de Ru (II) de interesse foi obtido com elevada pureza (> 99%) e rendimento isolado de 9%.

Foram estudadas diversas rotas para derivatizar ligantes derivados da fenantrolina com grupos contendo enxofre. A única rota obtida com êxito foi a derivatização da fenantrolina com grupo bitiofeno e a partir desse ligante foi sintetizado o complexo heteroléptico $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})]$. A próxima etapa do trabalho foi aplicar esse complexo em estudos de luminescência na presença de sais de antimônio.

4.2.2 – Estudos de luminescência do complexo $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})].(\text{CF}_3\text{COO})_2$ na presença de sais de antimônio

Neste item serão apresentados os resultados preliminares da aplicação do complexo heteroléptico $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})].(\text{CF}_3\text{COO})_2$ como sensor de antimônio. De modo a conhecer os dados espectrais do complexo, o espectro de absorção do mesmo foi determinado em acetonitrila.

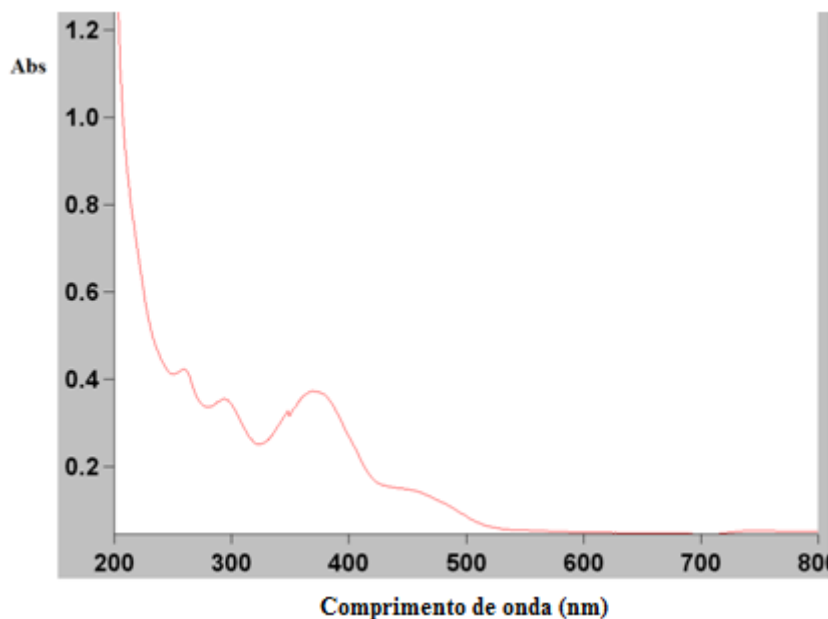


Figura 4.25: Espectro de absorção UV-vis do complexo heteroléptico [Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)] (solvente acetonitrila; concentração 1 μM; temperatura ambiente).

Na figura 4.25, pode-se observar uma banda com máximo de absorção na região do visível (455 nm) referente à transição típica de complexos de Ru polipiridina $d \rightarrow \pi^*$ (transferência de carga metal-ligante, MLCT) e uma outra banda intensa com máximo em 380 nm que pode ser atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante que contém o grupo bitiofeno (LC). Foi escolhida a região de excitação no visível, referente à transição MLCT, para conduzir os estudos de luminescência desse composto na presença de sais de antimônio. O espectro de emissão do complexo de Ru puro, com excitação em 440 nm, está mostrado na figura 4.26.

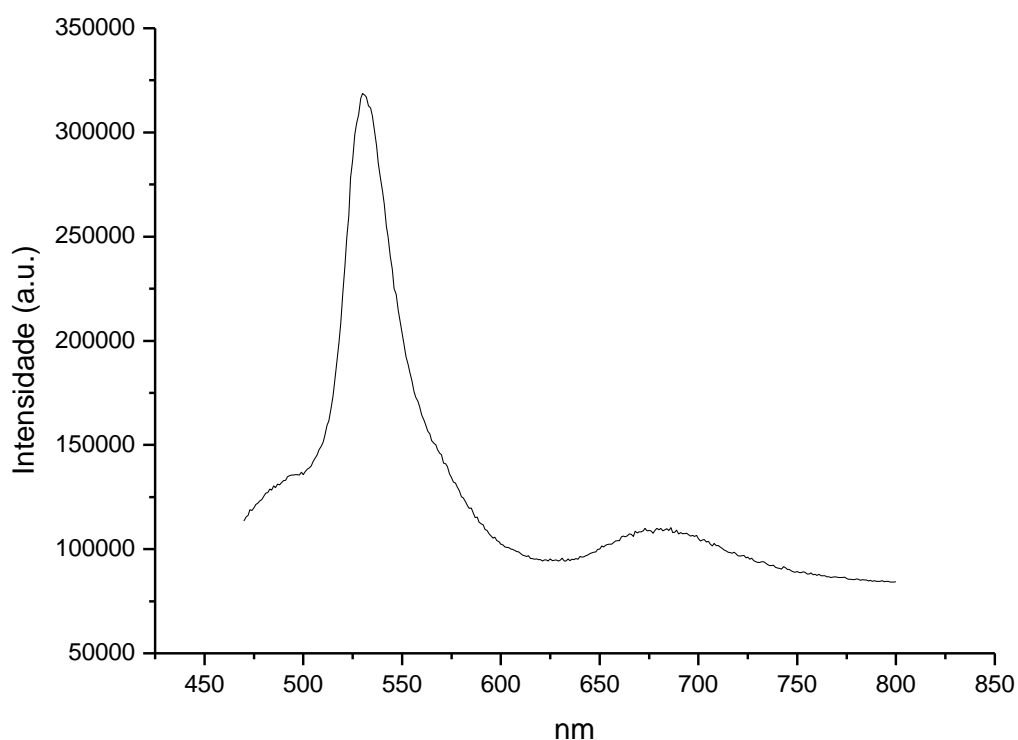


Figura 4.26: Espectro de luminescência do complexo $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})]^{2+}$ na concentração de $5 \mu\text{M}$, obtido por excitação em 440 nm em $\text{CHCl}_3/\text{acetonitrila}$ (17:3) a temperatura ambiente.

Analisando esse espectro pode se observar que o complexo apresenta dois máximos de emissão. A primeira banda, mais intensa (emissão máxima em 530 nm), corresponde à desativação radioativa da espécie eletronicamente excitada do ligante bitiofeno-imidazo-fen que é fluorescente. A segunda emissão é significativamente menos intensa, com máximo em 683 nm , referente à fosforescência a partir do estado excitado $^3\text{MLCT}$ do complexo. Conhecendo-se os parâmetros de absorção e emissão do complexo de Ru (II) foi feito um estudo da resposta da intensidade e do tempo de vida de luminescência do complexo na presença de diferentes concentrações de SbCl_3 em solvente orgânico (figura 4.27).

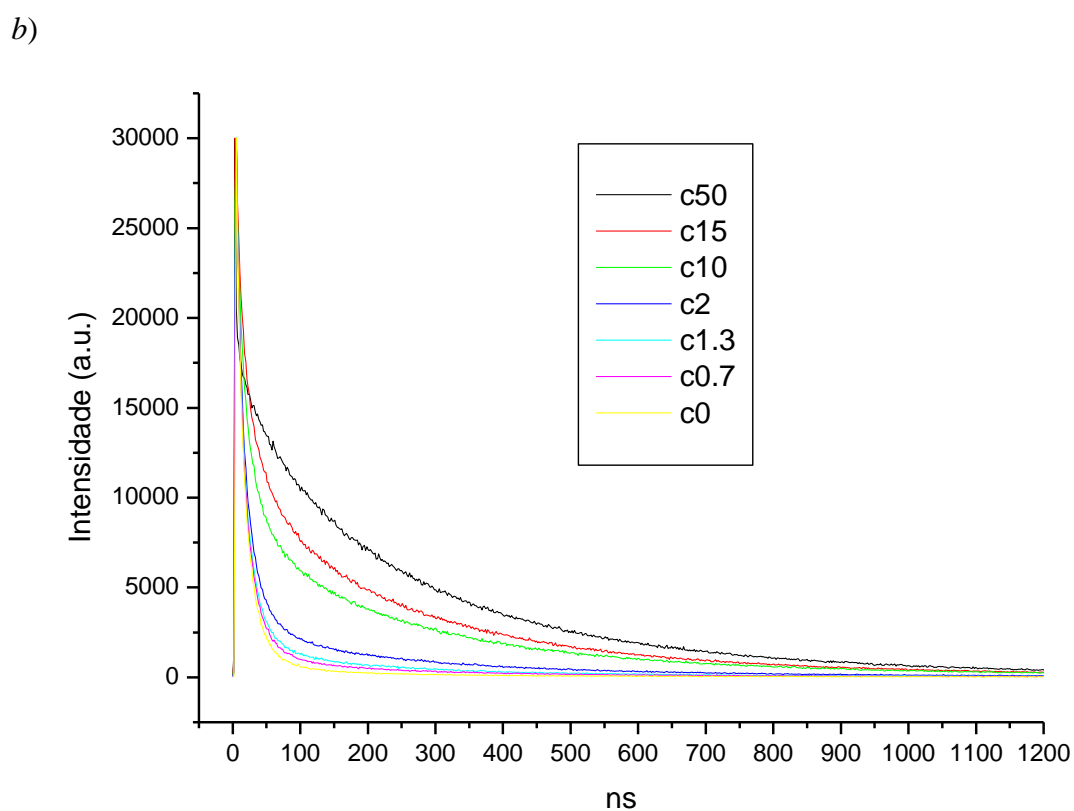
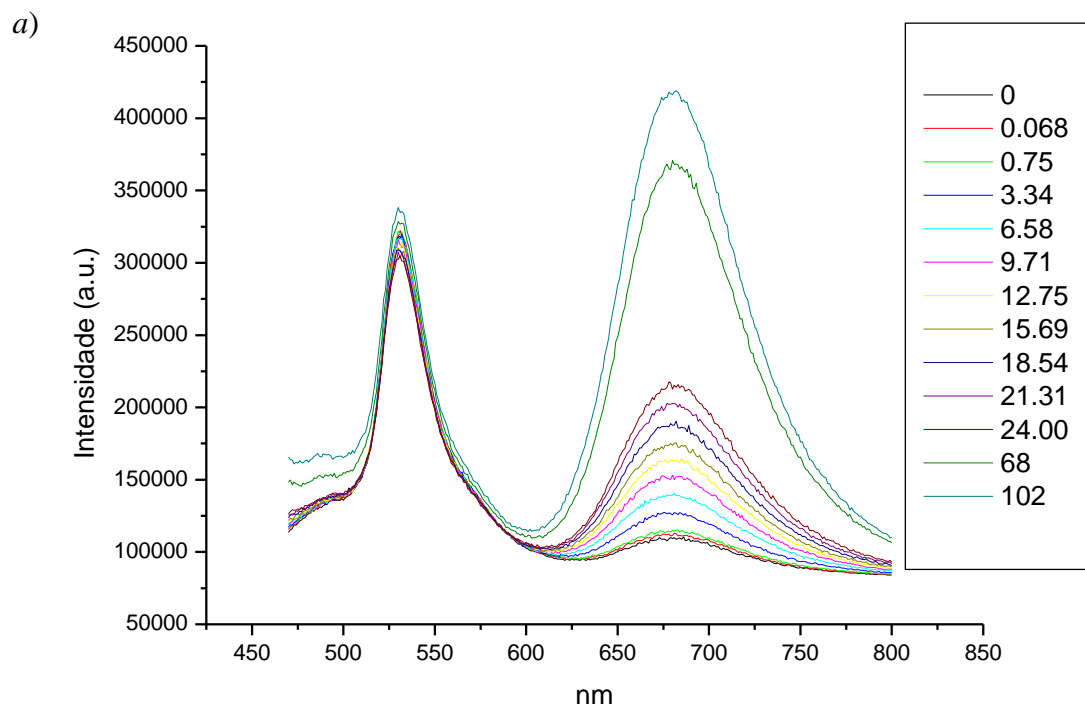


Figura 4.27: Espectro de luminescência do complexo $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})]^{2+}$ na concentração de $5 \mu\text{M}$, obtido em $\text{CHCl}_3/\text{acetonitrila}$ (17:3) na presença de diferentes concentrações de

SbCl₃ (em μM); t.a..a) intensidade de emissão *versus* comprimento de onda; excitação em 440 nm; b) tempo de vida (τ) determinado por SPT; excitação em 463 nm, emissão 690 nm.

Analisando a figura 4.27 a pode-se concluir que a intensidade de emissão na região de 683 nm é significativamente aumentada com o aumento da concentração de antimônio na solução. Nota-se também um aumento na emissão em 530 nm. No entanto, o aumento da emissão em 530 nm é menos expressivo do que o aumento em 683 nm. Pode-se mencionar que quando o complexo de Ru é excitado (em 440 nm) na presença de 102 μM de SbCl₃, a intensidade de emissão com máximo em 530 nm aumenta apenas 12% quando comparada com o complexo na ausência de Sb. Por outro lado, nas mesmas condições, a intensidade da emissão em 683 nm aumenta 145% na presença de 102 μM de antimônio. Como proposto anteriormente, inferimos que há uma interação entre o antimônio e o complexo de rutênio através do grupo bi-tiofeno. Devido à falta de tempo hábil, não foram realizados estudos para determinar a estequiometria desse processo (através do gráfico de *Job*) e conseqüentemente não foi determinada a constante de associação (K_a) dessa possível interação metal-tiofeno-complexo. No entanto, para provar que o grupo bitiofeno é capaz de interagir com antimônio, estudamos a luminescência do composto formil-bitiofeno na presença de distintas quantidades de SbCl₃.

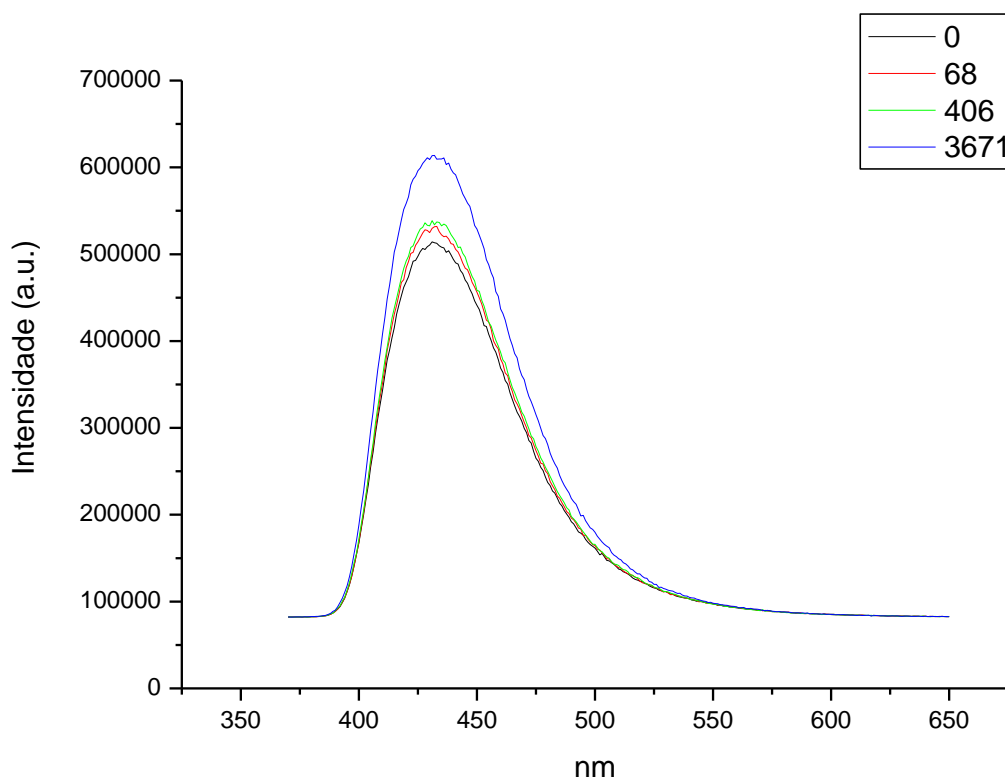
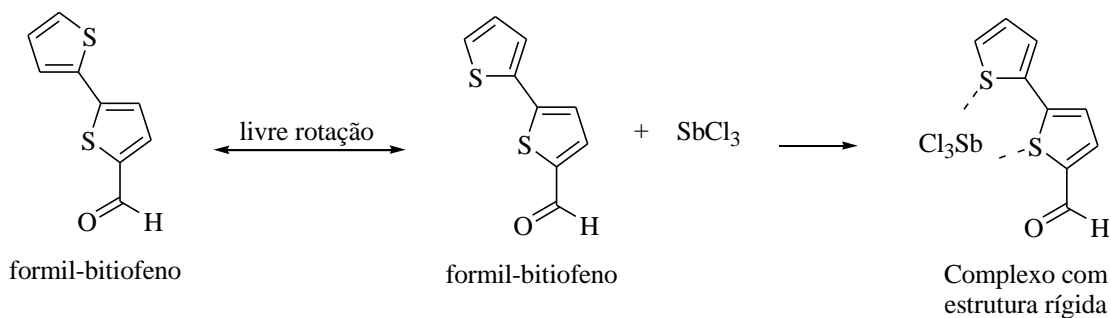


Figura 4.28: Espectro de luminescência do formil-bitiofeno na concentração de 5 μM , obtido em CHCl_3 /acetonitrila (17:3) na presença de diferentes concentrações de SbCl_3 (em μM) e t.a.. Excitação em 330 nm.

Através da figura 4.28 nota-se um aumento na emissão do formil-bitiofeno, indicando que há uma interação entre esse composto e o semimetal. É conhecido que certos fluoróforos têm sua luminescência aumentada devido à formação de quelatos com metais, pois essa interação deixa mais rígida a estrutura química da substância fotoativa.⁷¹



Esquema 4.34: Complexação do bitiofeno com antimônio.

A formação do complexo com Sb aumenta a rigidez da molécula e por conseguinte diminui a flexibilidade (livre rotação) dos anéis tiofenos. Dessa forma, há um aumento na luminescência do composto devido à diminuição na desativação não-radioativa dos estados eletronicamente excitados do bitiofeno.

Um estudo realizado paralelamente a esse refere à luminescência do complexo [Ru(bpz)₂(fen)] na presença de SbCl₃. Por apresentar propriedades redox e fotoquímicas semelhantes,¹⁵³ o [Ru(bpz)₂(fen)] é um análogo ao complexo [Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)], mas sem o grupo bi-tiofeno. Neste estudo foi observado supressão da luminescência do complexo [Ru(bpz)₂(fen)] na presença de grandes concentrações de SbCl₃. A supressão, neste caso, pode ser explicada pela presença de íons cloreto. Esse íon (Cl⁻) é capaz de promover supressão redutiva de complexos de Ru que contêm ligantes bpz.¹⁵⁴ Esses resultados corroboram com a explicação que o aumento da fluorescência ocorre pela complexação do antimônio com o bitiofeno.

Como mostrado na figura 4.27 *b*, foi avaliado a influência do SbCl₃ no tempo de vida (τ) de emissão (em 690 nm) do complexo [Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)] utilizando a técnica de *single photon timing* (SPT).¹⁵⁵ Essa análise permite determinar se a influência de um analito na luminescência de um fluoróforo é estática ou dinâmica. Através das curvas de decaimento da emissão pelo tempo podemos inferir que a presença do antimônio está aumentando o tempo de vida da emissão do complexo de Ru. O ajuste exponencial da curva de luminescência pelo tempo (ver figura 4.27 *b*) indicou um decaimento tri-exponencial em todos os casos, como mostrado na tabela 4.8.

¹⁵³Lecomte, J. P.; Mesmaeker, A. K-D.; Feeney, M. M.; Kely, J. M. *Inorg.Chem.* **1995**, *34*, 6481.

¹⁵⁴Nishida, S. Y.; Kimura, M. *Bull.Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 1840.

¹⁵⁵Lakowicz, J. R. Time-Domain Lifetime Measurements. In: **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3 ed. Baltimore.Springer. 2006. p. 103. ISBN 0-387-31278-1.

Tabela 4.8: tempo de vida da emissão do complexo $\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})^{2+}$ em $\text{CHCl}_3/\text{acetonitrila}$ (17:3) na presença de diferentes concentrações de SbCl_3 .^a

Concentração de SbCl_3 (μM)	τ_1 ns (α em %) ^b	τ_2 ns (α em %) ^b	τ_3 ns (α em %) ^b	$\tau_{\text{médio}}$ ns ^c
0	268 (22)	40 (30)	12 (47)	213
0,68	326 (44)	65 (22)	14 (35)	293
1,36	336 (46)	79 (23)	17 (32)	300
2	351 (60)	115 (22)	18 (18)	321
10	359 (68)	140 (25)	19 (7)	330
14	362 (65)	162 (29)	27 (6)	327
47	386 (63)	186 (34)	41 (2)	344

^aTempo de vida (τ) determinado por SPT; excitação em 463 nm, emissão 690 nm.

^b α corresponde à contribuição relativa de cada componente calculada através da equação: $\alpha = A_i\tau_i / (A_i\tau_i + A_j\tau_j)$.

^c τ médio calculado através da equação: $\sum\alpha_i(\tau_i)^2 / \sum\alpha_i\tau_i$

Analisando o tempo de vida de luminescência (em 690 nm) do complexo de Ru em solução orgânica na ausência de SbCl_3 , pode-se observar a existência de três componentes que influenciam a desativação do complexo de Ru eletronicamente excitado. O decaimento mais rápido ($\tau = 12$ ns) é típico de compostos que contêm grupos tiofenos em solventes orgânicos (valores entre 14-10 ns em acetonitrila e diclorometano).¹⁵⁶ Observa-se a diminuição na porcentagem da contribuição desse componente (α de τ_3) com o aumento da concentração de Sb. Baseado nesses dados, τ_3 é atribuído como sendo a cauda de emissão do ligante bitiofeno-imidazo-fen em 690 nm (referente ao $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão em 530 nm). As outras duas componentes do decaimento da luminescência com tempos de vida de 268 (τ_1) e 40 (τ_2) ns são atribuídas à transição eletrônica ³MLCT do complexo. Essas componentes podem ser explicadas pela existência do grupo bitiofeno que promove auto supressão na emissão do complexo. De

¹⁵⁶ Aydogan, B.; Yagci, Y.; Toppare, L.; Jockusch, S.; Turro, N. J. *Macromolecules* **2012**, *45*, 7829.

acordo com Majewski *et al.*, grupos oligotiofenos são capazes de promover supressão redutiva da espécie Ru (III) formada durante o estado excitado (MLCT).¹⁵⁷

De um modo geral, foi observado que os tempos de vida são maiores com o aumento da concentração de SbCl_3 . Por exemplo: o tempo de vida médio da luminescência do complexo aumenta de 213 ns na ausência de Sb para 344 ns na presença de $47 \mu\text{M}$ de Sb. Esse aumento do $\tau_{\text{médio}}$, gradativo com o aumento da concentração de antimônio, indica que ocorrem interações através do estado eletronicamente excitado do complexo de Ru (II). Baseados nesses resultados e em dados da literatura para complexos semelhantes,¹⁵⁷ propomos que há, no estado excitado, transferência eletrônica entre ligantes (ILCT) do grupo tiofeno para o rutênio.

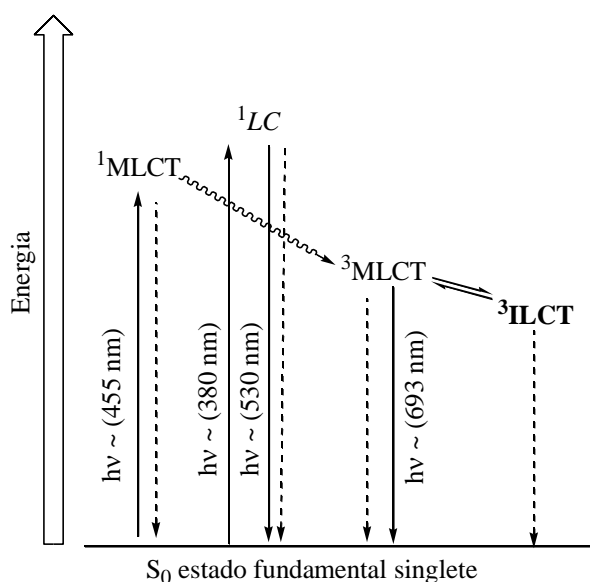
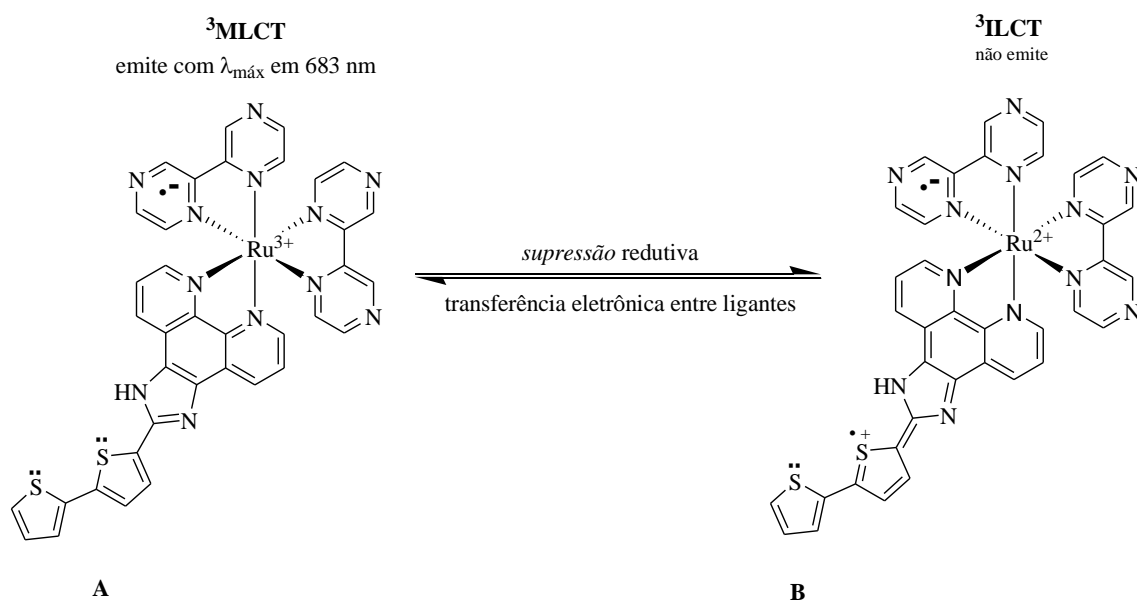


Figura 4.29: Diagrama de Jablonski proposto para o complexo $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})]^{2+}$.

Após absorver luz, o complexo de Ru decai para o estado fundamental de modo radioativo de duas maneiras. A primeira, através do estado excitado singlete do ligante que contém o grupo bitiofeno (1LC); e a segunda a partir do estado tripleto 3MLCT . A emissão com máximo em 683 nm mostra-se pouco intensa devido à alta eficiência na

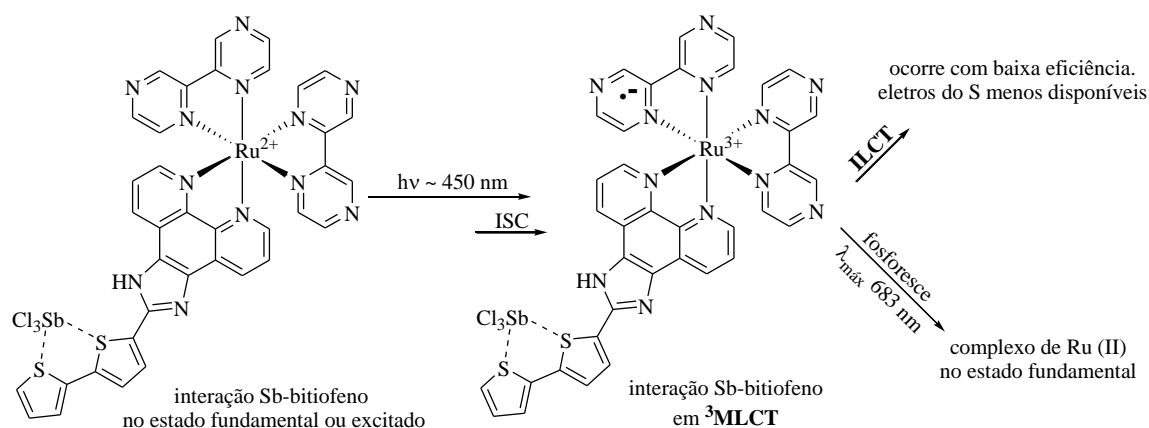
¹⁵⁷Majewski, M. B.; Tacconi, N. R.; MacDonnell, F. M.; Wolf, M. O. *Inorg.Chem.* **2011**, 50, 9939.

população do orbital $^3\text{ILCT}$ através da transferência de elétron do bitiofeno para o rutênio, despopulando o estado emissor $^3\text{MLCT}$.



Esquema 4.35: Resumo das estruturas de ressonância envolvidas no processo de supressão redutiva.

No esquema 4.35 encontram as principais estruturas de ressonância que envolve o equilíbrio entre $^3\text{MLCT}$ e $^3\text{ILCT}$. Na transição eletrônica $^3\text{MLCT}$ ocorre transferência de um elétron do Ru para o ligante bpz, formando a espécie eletronicamente excitada com o rutênio oxidado (Ru^{3+}) **A**. Essa espécie pode decair radioativamente ou sofrer supressão redutiva através da doação de um elétron do grupo tiofeno formando a espécie reduzida (tiofeno-radical- Ru^{2+}) **B**, que não emite fótons. Devido à baixa luminescência do complexo pode-se afirmar que essa supressão redutiva é bastante eficiente. Por outro lado, a supressão redutiva é menos eficiente na presença de antimônio. Isso ocorre porque há a formação do quelato antimônio bitiofeno como mostrado no esquema 4.36.



Esquema 4.36: Processos envolvidos no estado excitado $^3\text{MLCT}$ na presença de antimônio.

O complexo de Ru (II) (quelado com Sb no estado fundamental) absorve luz e, após sofrer cruzamento entre sistemas (ISC), forma $^3\text{MLCT}$. Ao contrário do observado na ausência de Sb, a espécie triplete formada decai preferencialmente para o estado fundamental através da emissão de luz e não há (significativamente) transferência de carga entre ligantes (ILCT). Esse fato pode ser melhor entendido pelo fato de que a formação do quelato entre Sb e o grupo bitiofeno desfavorece a transferência eletrônica, pois os elétrons do enxofre estão interagindo com o antimônio e, portanto, pouco disponíveis. Dessa forma, o tempo de vida do complexo de Ru (II) na presença de antimônio aumenta, pois há menos probabilidade de popular o estado $^3\text{ILCT}$. Logo, esse complexo de Ru (II) é mais luminescente na presença de SbCl_3 .

Um ensaio qualitativo para determinar a influência do tartarato duplo de antimônio e potássio na luminescência do complexo $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazolo-fen})].(\text{CF}_3\text{COO})_2$ foi realizado em meio aquoso (50% de DMSO).

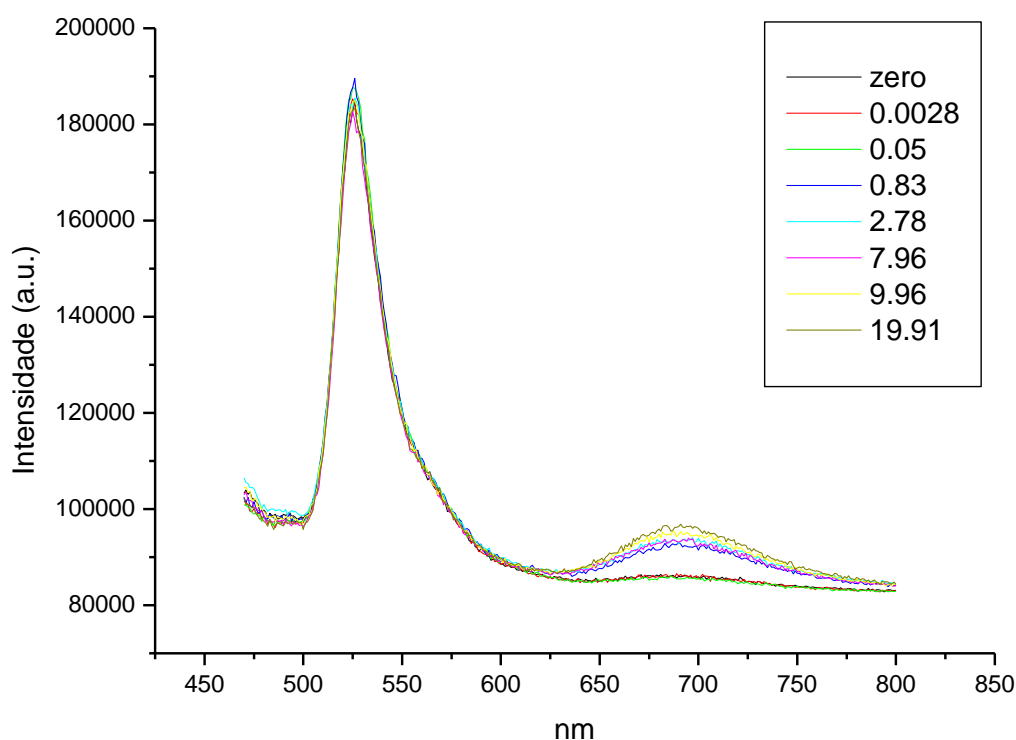


Figura 4.30: Espectro de luminescência do complexo $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})].(\text{CF}_3\text{COO})_2$ na concentração de $5 \mu\text{M}$, obtido em água/DMSO (1:1) na presença de diferentes concentrações (em μM) de tartarato duplo de antimônio e potássio.

De acordo com os espectros de luminescência, pode-se observar que, na ausência de tartarato de antimônio, o composto na solução $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (50%) emite na região de 680 nm com menos eficiência do que em meio orgânico. Acredita-se que isso ocorra porque solventes próticos estabilizam melhor os intermediários que contém múltiplas cargas (**B**, esquema 4.35). Como observado para o SbCl_3 , a presença do ânion tartarato de antimônio aumenta a intensidade de luminescência do complexo de Ru (II). No entanto, o aumento da intensidade de emissão na presença do tartarato de antimônio e potássio é menor que o observado para SbCl_3 . Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato da constante de formação (K_f) do quelato Sb-bitiofeno, a partir do tartarato de antimônio, ser energeticamente menos favorável (em relação ao SbCl_3), pois é necessário romper a interação Sb-tartarato já existente. Mesmo com um baixo valor de

K_f , há a formação do quelato Sb-bitiofeno que interfere na luminescência do complexo. Acreditamos que o mecanismo envolvido nesse processo é o apresentado nos esquemas 4.35 e 4.36.

Esses dados mostram que o complexo heteroléptico [Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)].(CF₃COO)₂ apresenta potencial uso como sensor luminescente do tipo “*turn-on*” na detecção de antimônio tanto em solvente orgânico quanto em meio aquoso. Sensores do tipo “*turn-on*” apresentam um aumento do sinal na presença da amostra e são escassos, pois a maioria dos sensores apresenta supressão da luminescência na presença do analito.¹⁵⁸ No futuro, será determinada a interferência de outros cátions na luminescência do complexo e o pH ótimo para se conduzir análises em meio aquoso.

4.3 – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA TARF-Catiônica-2

Todos os compostos sintetizados tiveram as estruturas químicas confirmadas por técnicas espectroscópicas e espectrométricas. A título de exemplo, serão discutidos os dados espectrais obtidos para elucidar a estrutura química do composto **TARF-Catiônica-2**. Esse composto foi escolhido, pois é inédito na literatura. Além disso, a interpretação dos dados espectroscópicos para a **TARF-Catiônica-2** é, também, aplicada para todos os derivados da riboflavina.

O espectro de RMN de ¹H da riboflavina e seus derivados são caracterizados principalmente pelos deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos e os hidrogênios alifáticos da cadeia ribitil. Os hidrogênios da cadeia ribitil aparecem no RMN de ¹H entre 4,0 ppm e 5,7 ppm e apresentam desdobramentos característicos que permitem a elucidação estrutural inequívoca dessas substâncias. Nessa região (5,7-4,0

¹⁵⁸ Li, M.; Lu, H-Y.; Liu, R-L.; Chen, J-D.; Chen, C-F. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 3670.

ppm) são observados 6 sinais: 1 duplete; 2 multipletos, 1 singlete alargado; e 2 duplos-dupletes.

Analisando o espectro de RMN de ^1H da **TARF-Catiônica-2** podem-se observar os sinais típicos aromáticos e da cadeia ribitol de derivados da riboflavina (figura 4.31).

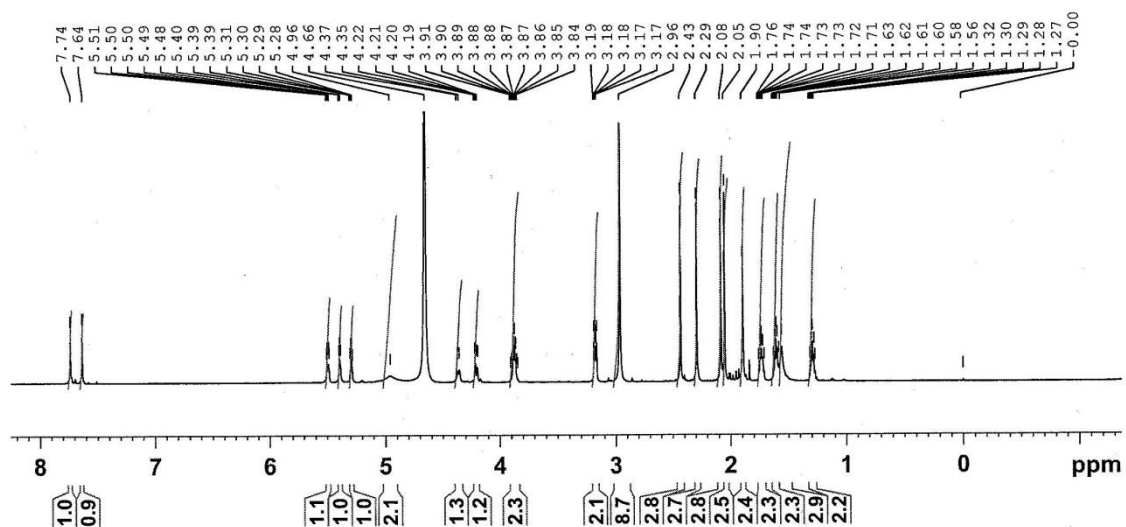
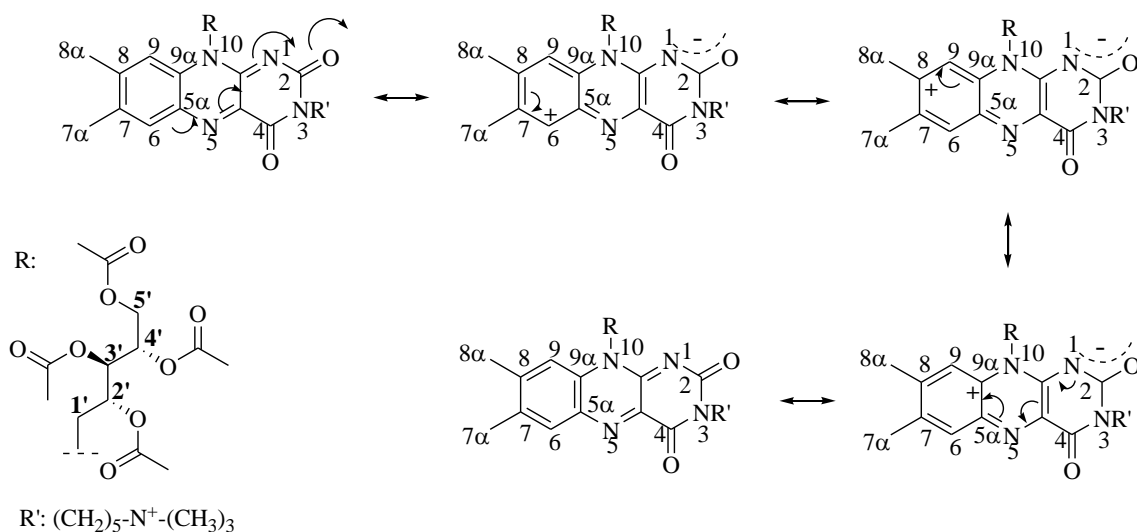


Figura 4.31: Espectro de RMN de ^1H (700 MHz) da **TARF-Catiônica-2** em D_2O .

Na região entre 7-8 ppm do espectro (ver regiões expandidas no anexo), pode-se observar os sinais aromáticos em 7,74 e 7,68 ppm. Os sinais referente à cadeia ribitol aparecem entre 5,50-4,19 ppm. Observam-se também, com integral no valor de 9 prótons, os sinais referentes ao grupo trimetilamônio (em 2,96 ppm). Os grupos metilênicos de R' (ver esquema 4,37) vizinhos ao nitrogênio aparecem em 3,88 e 3,18 ppm. Os sinais dos grupos metil ligados à carbonila (em R , ver esquema 4,37) aparecem com deslocamentos próximos aos outros sinais metilênicos da cadeia em R' entre 2,43-1,29 ppm.

Para atribuir os deslocamentos químicos dos hidrogênios no espectro de RMN dos derivados da riboflavina, é necessário considerar a forma em que o anel isoaloxazina se encontra. No caso da **TARF-Catiônica-2**, esse composto flavínico apresenta o sistema de anéis isoaloxazinas na forma oxidada. A estrutura química dessa substância, assim como de todos os derivados da riboflavina na forma oxidada, existe na

forma de equilíbrio de várias estruturas de ressonância como mostrado no esquema 4.37.



Esquema 4.37: Estruturas de ressonância existentes para a estrutura da **TARF-Catiônica-2**.

Essas estruturas de ressonância influenciam nos sinais espectroscópicos observados para essa classe de compostos, tornando possível atribuir os deslocamentos químicos de alguns ^1H e ^{13}C de forma inequívoca. Por exemplo, pode-se mencionar que a existência de cargas positivas nos carbonos C6, C8 e C9 α promove um deslocamento para campos mais altos (mais à esquerda do espectro) dos hidrogênios e carbonos próximos a esses átomos. Os sinais aromáticos podem ser diferenciados de acordo com as estruturas de ressonância mostradas no esquema 4.37, pois o ^1H ligado a C6 está mais desprotegido e aparece mais à esquerda no espectro em relação ao ^1H ligado a C9.

Os desdobramentos observados para alguns dos hidrogênios da cadeia ribitol podem ser atribuídos de forma inequívoca. Um exemplo disso, são os hidrogênios metilênicos em C5' que podem ser identificados através de seus desdobramentos típicos no espectro, referente a um sistema de spins ABX em 4,36 e 4,20 ppm (ver figura 4.32).^{95c}

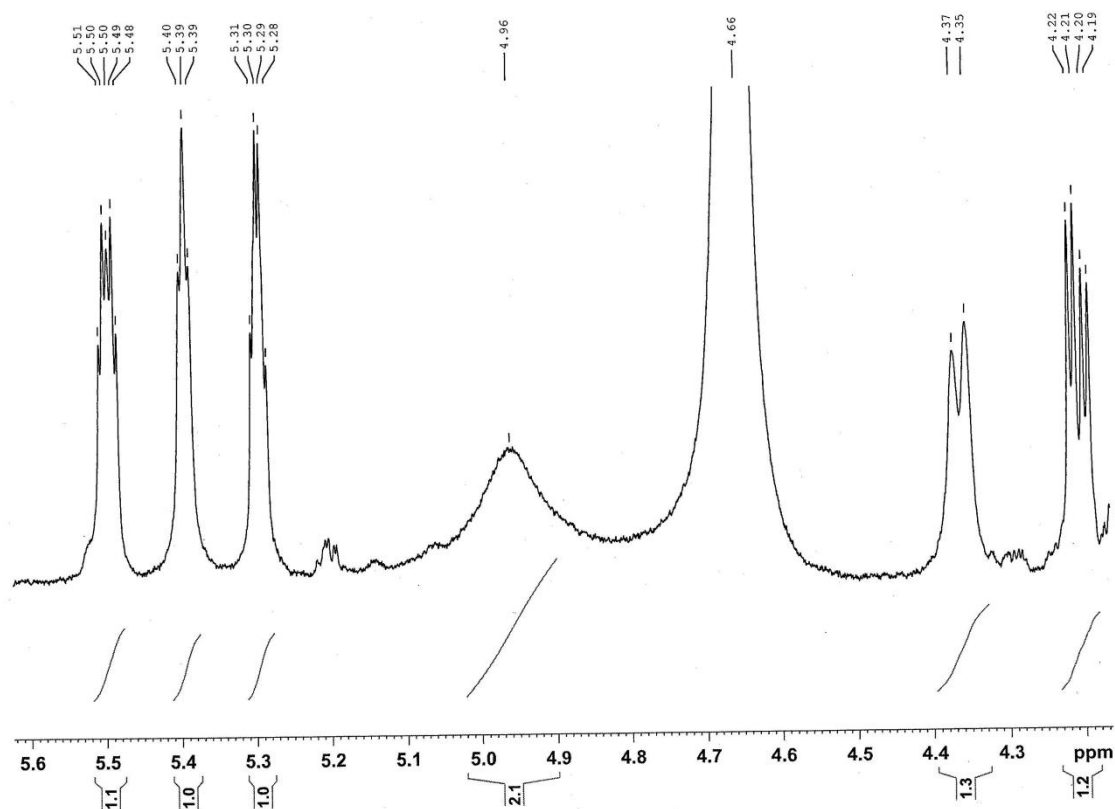


Figura 4.32: Espectro de RMN de ^1H (700 MHz) da **TARF-Catiônica-2** em D_2O (deslocamentos entre 5,6 e 4,1 ppm).

A existência de centros quirais na cadeia ribitol faz com que os hidrogênios (CH_2) ligados a $\text{C5}'$ apresentem desdobramentos do tipo ABX por serem diastereotópicos.

Em relação ao sinal dos hidrogênios metilênicos ligados a $\text{C1}'$, observa-se um alargamento do pico em 4,96 ppm.^{95c} Isso pode ser explicado devido ao tempo de relaxação desses spins que sofre aumento devido ao acoplamento quadrupolar com o nitrogênio $N-10$, levando ao alargamento do sinal.

Para interpretar os outros deslocamentos químicos dos hidrogênios da cadeia ribitol, baseamo-nos no trabalho de Edwards *et al.*^{95c} Os autores desse trabalho realizaram estudos de ressonância magnética nuclear com a **TARF** e outros ésteres da riboflavina de modo a estabelecer os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C desses compostos. Esses pesquisadores observaram variações mínimas nos deslocamentos

químicos e desdobramentos dos sinais de ^1H da cadeia ribitol entre os derivados ésteres estudados. As variações dos espectros de RMN, observadas nesse trabalho, entre a **TARF-Catiônica-2** e a **TARF** também foram mínimas. Edward *et al.* realizaram o experimento de RMN de desacoplamento homonuclear seletivo, irradiando o sinal referente aos prótons metilênicos ligados a C1' e esse fato levou a um estreitamento do sinal (no nosso caso, equivalente ao sinal em 5,50 ppm). Sendo assim, atribuímos o sinal em 5,50 ppm para os ^1H ligados ao C2'. O próton ligado a C3' pode ser diferenciado de C4' por apresentar maior complexidade de acoplamentos, sendo C3' o sinal em 5,39 e C4' em 5,30 ppm.

Os sinais metilênicos referente à cadeia R' podem ser diferenciados, pois o grupo trimetilamônio, por ser positivo, deslocará o grupo vizinho para regiões em campos mais baixos. Os grupos metilas ligados ao anel aromático aparecem mais à esquerda do espectro em relação aos grupos metilas ligados às funções ésteres. Os grupos metilas ligados ao anel aromáticos podem ser diferenciados de acordo com as estruturas de ressonância mostradas no esquema 4.37. Os grupos metilênicos de R' podem ser diferenciados de acordo com as constantes de acoplamento obtidas (ver item 3.3.11). Sendo assim, estabeleceram-se os deslocamentos químicos de ^1H da **TARF-Catiônica-2** mostrados na figura 4.33.

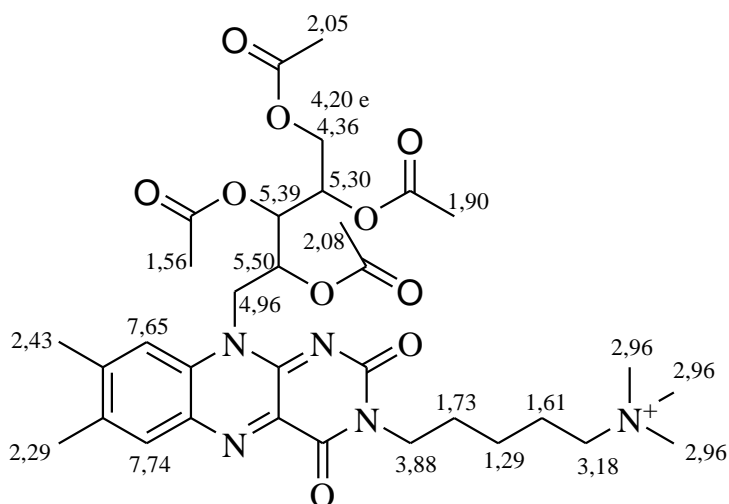


Figura 4.33: Deslocamentos químicos (em ppm) dos ^1H da **TARF-Catiônica-2** obtidos por RMN em D_2O (700 MHz).

Os deslocamentos químicos dos grupos metilas da função éster foram estabelecidos de acordo com a referência 95c. Foram realizados espectros de RMN de ^{13}C e o espectro bi-dimensional HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) para a **TARF-Catiônica-2**, ver anexos. A técnica de HMQC correlaciona os prótons com os ^{13}C , diretamente ligados. Baseados nos espectros de HMQC ficaram estabelecidos os deslocamentos químicos dos ^{13}C do derivado, como mostrados na figura 4.34.

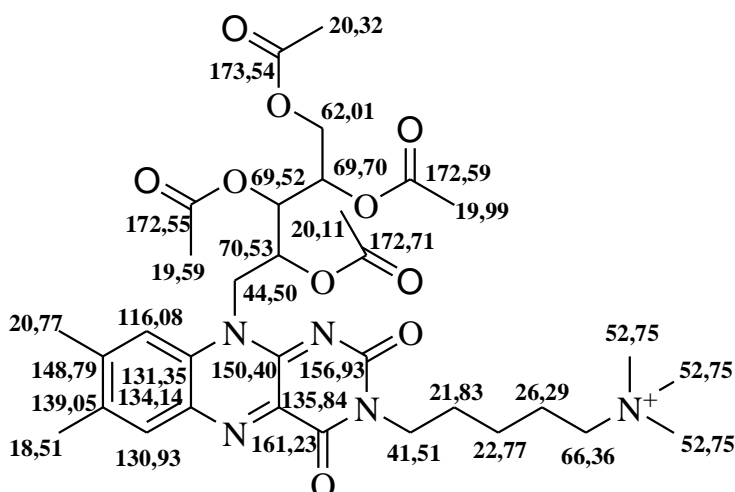


Figura 4.34: Deslocamentos químicos (em ppm) dos ^{13}C da **TARF-Catiônica-2** obtidos por RMN em D_2O (700 MHz).

Os carbonos carbonílicos e quaternários em geral foram atribuídos segundo os dados reportados por Edwards *et al.* e de acordo com as estruturas de ressonância mostradas no esquema 4.37.

A **TARF-Catiônica-2** foi submetida à espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray*.

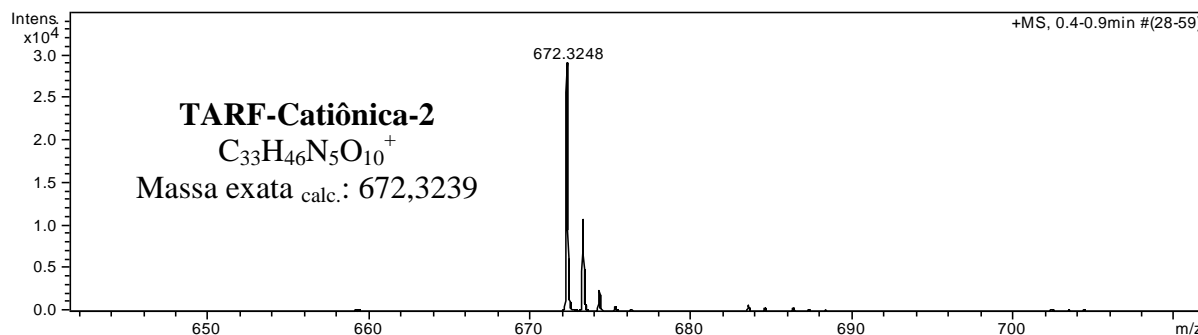


Figura 4.35: Espectro de massas com ionização por *electrospray* (operando no modo positivo) da **TARF-Catiônica-2**.

No espectro de massas pode-se observar o sinal do cátion com relação massa-carga de 672,3248. Esse valor está de acordo com o calculado para a estrutura da **TARF-Catiônica-2** de 672,3239 m/z. Através das técnicas de elucidação estrutural apresentadas nesse item, confirmou-se que o produto obtido apresenta a estrutura química proposta para a **TARF-Catiônica-2**. Os derivados da riboflavina obtidos nesse trabalho tiveram as respectivas estruturas químicas confirmadas de maneira análoga aos dados discutidos para a **TARF-Catiônica-2**.

5- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este item está dividido em duas partes: a primeira é relacionada com a síntese de fotossensibilizadores derivados da riboflavina para tratar leishmanioses por PDT e a segunda refere-se à obtenção de sensores de antimônio baseados em complexos de Ru (II) poliazaaromáticos.

A riboflavina mostrou ser um versátil reagente de partida para a síntese de derivados flavínicos. Através de transformações nas hidroxilas e no *N*-3 do sistema de anéis isoaloxazina, oito compostos com distintas características físicas e físico-químicas foram preparados a partir desse fotossensibilizador natural. Há compostos catiônicos, aniônicos, hidro e lipossolúveis. Além de aumentarmos os rendimentos de rotas sintéticas de derivados já conhecidos na literatura, foram obtidas duas substâncias inéditas. Uma com rendimento baixo (10% para a **TARF-Catiônica-1**) e outra com rendimento excelente (75% para a **TARF-Catiônica-2**). É importante mencionar que diferente dos derivados catiônicos encontrados na literatura, os compostos preparados nessa tese são estáveis em meio aquoso.

Observamos que a reatividade dos grupos alcoóis da cadeia ribitol para a formação de ésteres pode ser aumentada através do catalisador ou da base utilizada. Foi mostrado que a dimetilaminopiridina (DMAP) em quantidades estequiométricas confere melhores rendimentos na esterificação das hidroxilas. A alquilação do *N*-3 do sistema de anéis isoloxazina mostrou-se eficiente apenas quando alquilantes reativos são utilizados (haleto de alquila pouco impedidos e haleto de alquila ativados frente a S_N2). As transformações estudadas na cadeia ribitol e no nitrogênio *N*-3 da molécula não afetaram de forma significativa as propriedades fotofísicas do derivado. Todos os compostos estudados mantiveram a propriedade fotossensibilizadora de oxigênio

singlete com rendimentos quânticos próximos ao do fotossensibilizador natural ($\phi_{\Delta} \approx 0,50$). Em análises qualitativas, todos os derivados obtidos apresentaram maior estabilidade fotoquímica do que a riboflavina. Além disso, as propriedades físicas, tais como, solubilidade e coeficiente de partição (*n*-octanol/água) foram bastante modificadas. Os ensaios preliminares de terapia fotodinâmica contra promastigotas de *Leishmania major* mostraram que todos os compostos apresentam atividade fotodinâmica contra o protozoário. Todos os derivados foram mais eficientes do que a riboflavina sendo que o mais eficaz apresentou CE_{50} de 5 μ M na inibição da proliferação do protozoário após irradiação. Como esperado, os compostos estudados apresentaram baixa toxicidade no escuro ($CE_{50} > 100$ para todos os compostos). Foi observada uma notável relação entre lipofilicidade do fotossensibilizador e eficiência na morte celular fotoinduzida, sendo o composto com maior log P o mais eficaz. Acreditamos que os fotossensibilizadores estão causando danos nas células tanto pelo mecanismo I quanto II, mas outros estudos devem ser realizados para avaliar a real influência de cada mecanismo.

Foi mostrado que derivados da riboflavina são promissores no tratamento da leishmaniose cutânea através de terapia fotodinâmica principalmente devido à baixa toxicidade no escuro (manuscrito em fase final de preparação, ver *Curriculum Vitae*). No entanto, de modo a aumentar a eficiência na morte celular fotoinduzida desses derivados, faz-se necessária a otimização da internalização desses compostos em células. Acreditamos que as aplicações desses derivados, principalmente os catiônicos, podem ser ampliadas para diversas finalidades como, por exemplo, desinfecção de bolsas de sangue, purificação de resíduos aquosos e tratamento de outras enfermidades cutâneas.

Dos protocolos de síntese de ligantes contendo grupos capazes de interagir com antimônio, apenas o método que fez uso do bitiofeno foi realizado com êxito. As tentativas consistiram em unir quimicamente derivados do ácido tióctico, di-tiol vicinais e bitiofeno em ligantes polipiridinas. Acredita-se que a elevada instabilidade dos materiais de partida, ácido tióctico e BAL, e dos produtos contendo a função di-tiol vicinal foram os responsáveis pelo insucesso das metodologias.

O novo complexo de Ru (II) obtido, $[\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazofen})].(\text{CF}_3\text{COO})_2$, é inédito na literatura e foi sintetizado utilizando o ligante contendo o grupo bi-tiofeno e o $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{Cl}_2$ como reagentes de partida. Através dos estudos de luminescência desse complexo na presença e ausência de antimônio, observou-se que o complexo pode ser usado como sensor de antimônio do tipo “*turn-on*” em meio orgânico e meio aquoso. Foi constatado que grupo bitiofeno funciona como grupo quelante do semimetal e também promove autosupressão da emissão a partir de $^3\text{MLCT}$ do complexo de Ru por transferência eletrônica entre ligantes (ILCT). Na presença do analito, o bitiofeno forma um complexo com o antimônio e os elétrons do enxofre estão menos disponíveis (o grupo bitiofeno torna-se menos redutor) para promover a autosupressão do complexo de Ru. Dessa forma, mais moléculas desativam o estado excitado $^3\text{MLCT}$ por emissão de fótons com máximo em 683 nm e, conseqüentemente, ocorre um aumento na intensidade de luminescência na presença desse semimetal. Pode-se afirmar que, após o conhecimento das melhores condições e limitações experimentais, esse complexo poderá ser utilizado para detectar a concentração de antimônio presente em células de leishmaniose previamente tratadas com fármacos à base de antimônio. Como o sensor desenvolvido apresenta aumento no tempo de vida na presença do analito, acredita-se que possam ser obtidas imagens dos protozoários tratados com antimônio através da técnica FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging*

Microscopy). Esta técnica poderá ser usada como diagnóstico de protozoários resistentes ao tratamento com antimônio. Além disso, com o conhecimento advindo desses experimentos, esperam-se obter maiores informações sobre o mecanismo de ação e cito-localização dos fármacos à base de antimônio.

CURRICULUMVITAE

Curriculum Vitae de **Alexandre Vieira Silva**

1-Dados Pessoais

Nome Alexandre Vieira Silva

Nome em SILVA, A.V.

Citações

Bibliográficas

Sexo Masculino

Filiação Odonias Silva e Regina Célia Vieira

Nascimento 16/07/1983-Rio claro/SP-Brasil

Endereço Rua Flávio de Matos, n° 2383, vila Morumbi.

Residencial Campo Grande -MS

79051-510, Brasil

Telefone:(067) 3027-3427 ou (067) 9205-5746

E-mail: alelike@hotmail.com ou a_vieira@iq.usp.br

Endereço Universidade de São Paulo, Instituto de Química.

Profissional Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Bloco 12, sala 1262.

Butantã – 05508-900 – São Paulo, SP – Brasil.

Telefone: (11) 3091-8951

Celular: (67) 9205-5746

e-mail: alelike@hotmail.com ou a_vieira@iq.usp.br

2- Formação

2006-2008

Mestrado em Química Orgânica (Conceito CAPES 7) .

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Síntese de organo-selênio aminas e sua resolução cinética via reação de acetilação mediada por lipases, Ano de Obtenção: 2008.

Orientador: Leandro Helgueira de Andrade.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Palavras-chave: selênio-aminas; Biocatálise.

Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química/Subárea: Química Orgânica.

2002-2005

Graduação em Bacharelado Em Química Tecnológica.

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, UFMS, Brasil.

Bolsista do(a): Programa de ensino tutorial (PET).

3- Idiomas

- **Inglês:** Compreende bem, fala bem, lê bem e escreve bem.

- **Alemão:** Compreende pouco, fala pouco, lê pouco e escreve pouco.

- **Espanhol:** Compreende bem, fala bem, lê bem e escreve bem.

4- Atividades Didáticas

4.1 Monitor do curso de **Enzimas - Catalisadores Naturais em Síntese Orgânica** na *XII Disciplina Intersemestral Grupo Químicas Integradas G6* no Instituto de Química da USP (2008).

4.2 Monitorias em disciplinas realizadas no Instituto de Química da USP

Disciplinas: QFL0137- Química Geral

QFL0605 – Química Geral Experimental

QFL0314 – Química Orgânica Experimental II

4.3 Prática de Ensino em Química e Bioquímica (QBQ5825-3/1)

4.4 Ministrante do curso de **Biodiesel** e de **Catálise e Biocatálise** na *I Escola de Verão em Química Verde* do Instituto de Química da USP (2007).

5 – Prêmios e Títulos

2010 – The Excellent Poster Award, *The Eleventh Tetrahedron Symposium* (2010), Beijing –China.

6- Publicações

6.1- Artigos completos publicados em periódicos

1. Silva, A. V.; López-Sánchez, A.; Rivas, L.; Baptista, M.; Orellana, G. **Riboflavin Derivatives for Enhanced Photodynamic Activity against Leishmania**. *Organic Letters*, a ser submetido, **2013**.
2. Silva, Alexandre V.; Andrade, Leandro H.; Milani, P.; Koszelewski, D. ; Kroutil, W. **Transaminases as efficient biocatalysts to obtain novel chiral selenium-amine ligands for Pd-catalysis**.*Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 08, p. 2043-2051, **2010**
3. Silva, A. V.; Andrade, L. H.; Pedrozo, E. C. **First dynamic kinetic resolution of selenium-containing chiral amines catalyzed by palladium (Pd/BaSO₄) and Candida antartica lipase (CAL-B)**.*Tetrahedron Letters*, v. 50, p. 4331-4334, **2009**.
4. Silva, A.V.; Andrade, L. H. **First chemoenzymatic synthesis of organoselenium amines and amides**.*Tetrahedron: Asymmetry*, v. 19, p. 1175-1181, **2008**.

6.2 Apresentação Oral de Trabalhos

1. Silva, Alexandre V.; Baptista, M. S.; Rivas, L.; Orellana, G. *Novel Riboflavin derivatives for Photodynamic Therapy*. In: *XI Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología*, **2012**. (Apresentação de Trabalho/Conferência) Idioma: Inglês.

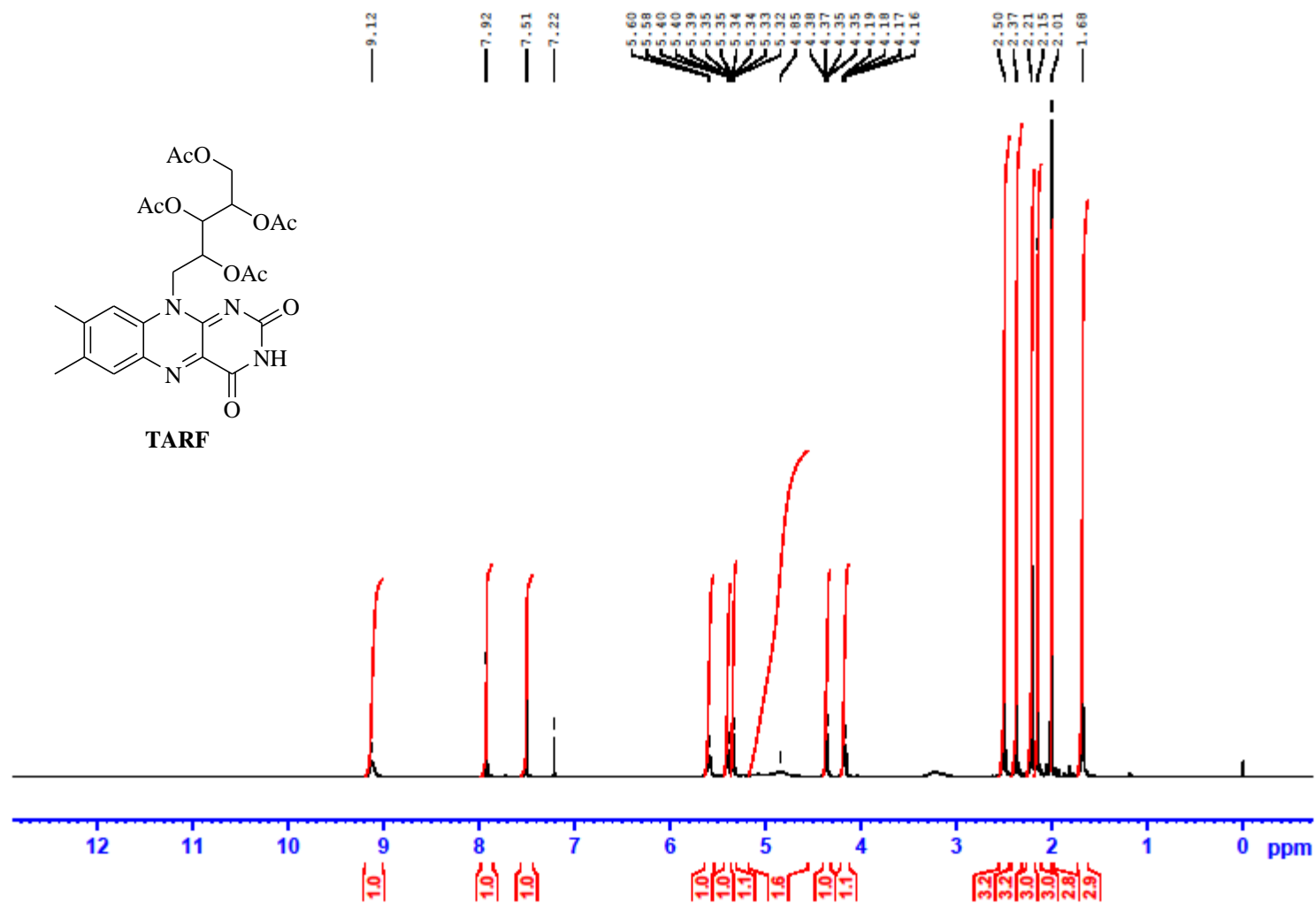
6.3 Trabalhos publicados em anais de eventos internacionais

1. Cunha, N. A.; Silva, Alexandre V.; Baptista, M. S. **Synthesis and use of riboflavin derivatives to study its photocycle in the presence of others vitamins.** In: *XI Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología*, **2012**, Córdoba (Argentina).
2. Silva, Alexandre V.; Baptista, M. S. ; Chiarelli-Neto, O. **Synthesis and Studies of Riboflavin Derivatives on Cell Photodamage.** In: *17th Intl Symposium on Flavins and Flavoproteins*, **2011**, Berkeley.
3. Silva, Alexandre V.; Uchoa, Adjaci F.; Baptista, M. S. **Synthetic Approaches to Obtain Riboflavin Derivatives.** In: *Eleventh Tetrahedron Symposium*, **2010**, Beijing (China).
5. Silva, Alexandre V., Koszelewski, D., Kroutil, W., Andrade, L. H. **Application of w-transaminases for the synthesis of chiral selenium-containing amines.** In: *9th International Symposium on Biocatalysis*, **2009**, Bern (Suíça).
6. Silva, Alexandre V., Milani, P., Koszelewski, D., Kroutil, W., Andrade, L. H. **Chemoenzymatic synthesis of selenium-containing chiral, amines, amides and imines** In: *13th Brazillian Meeting on Organic Synthesis*, **2009**, águas de São Pedro (Brasil).
7. Silva, Alexandre V., Pedrozo, Eliane C., Andrade, L. H. **Dynamic Kinetic Resolution of Organoselenium Amines** In: *Tenth Tetrahedron Symposium*, **2009**, Paris (França).
8. Silva, Alexandre V., Andrade, L. H. **An easy access to organoselenium amines** In: *Tenth International Conference on the Chemistry of Selenium and tellurium*, **2007**, Lodz (Polônia).
9. Silva, Alexandre V., Pedrozo, Eliane C., Andrade, L. H. **Synthesis and kinetic resolution mediated by lipases of organoselenium amines** In: *12th Brazillian Meeting on Organic Synthesis*, **2007**, Itapema (Brasil).

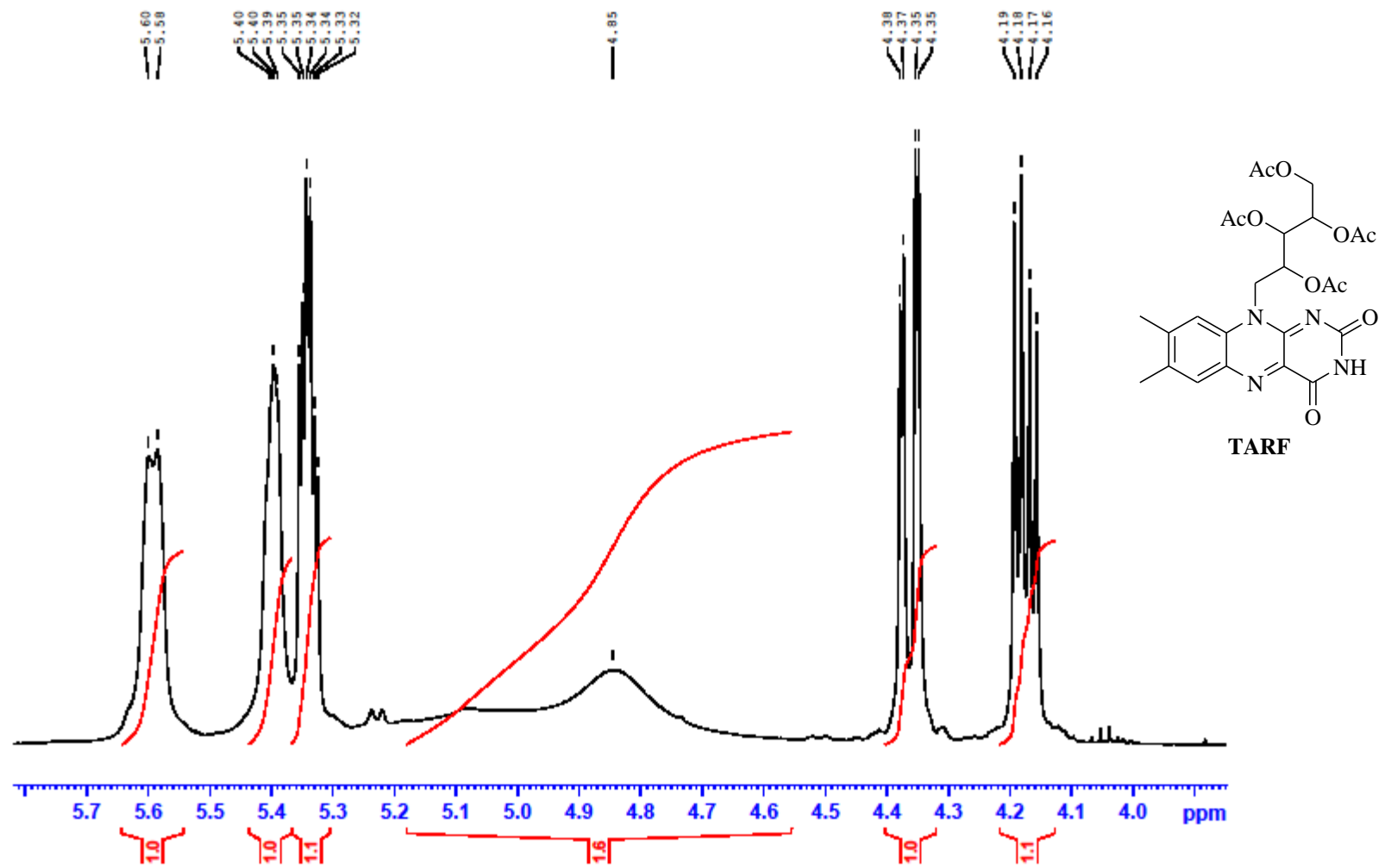
6.4 Trabalhos publicados em anais de eventos nacionais

1. Silva, Alexandre V., Andrade, L. H. **Síntese Assimétrica de Organo-seleno aminas** In: *30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, **2007**, Águas de Lindóia.

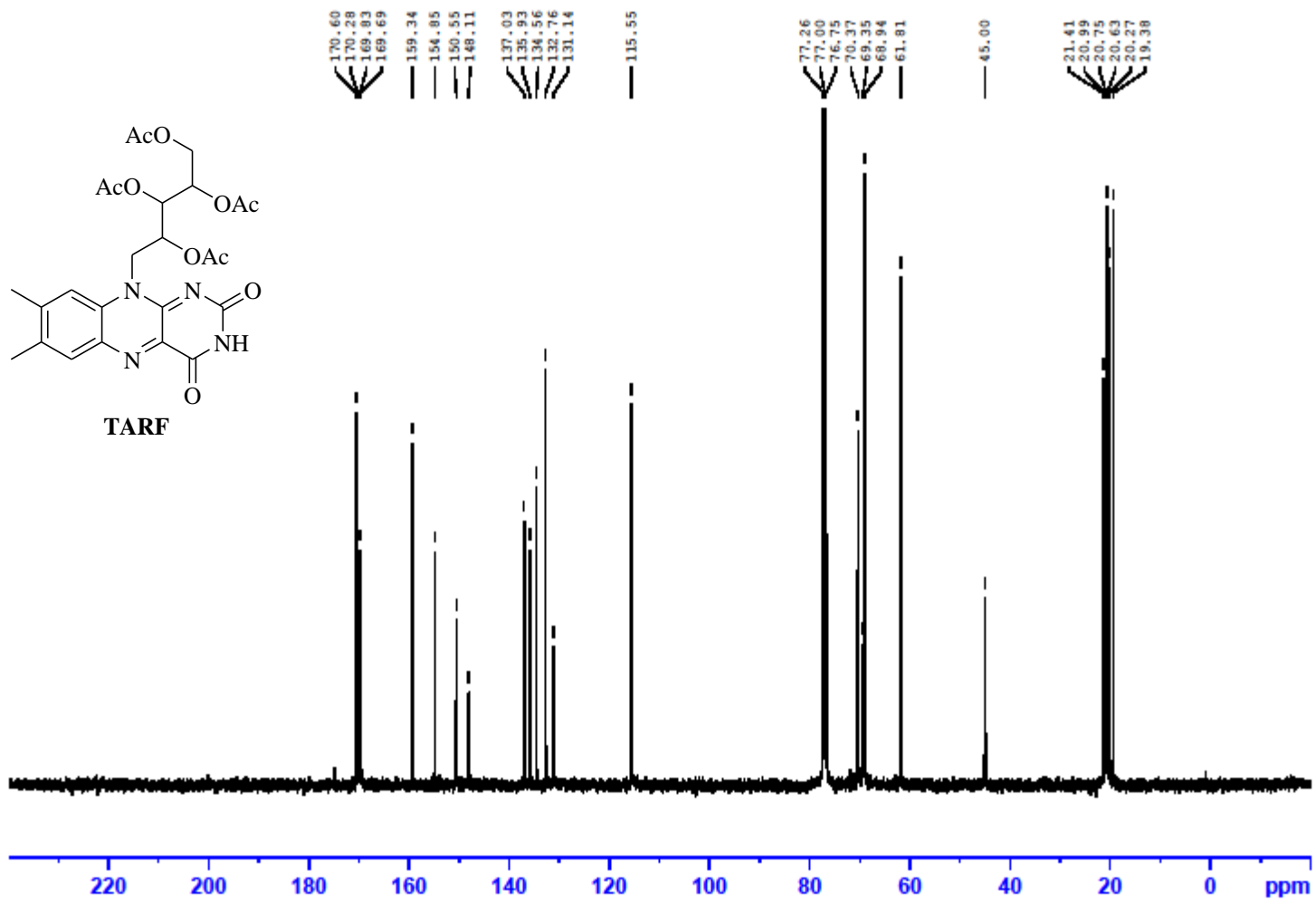
ANEXOS



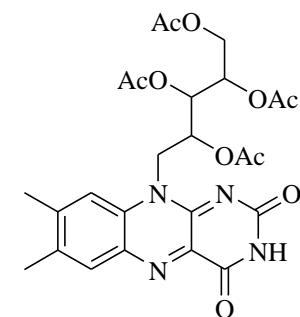
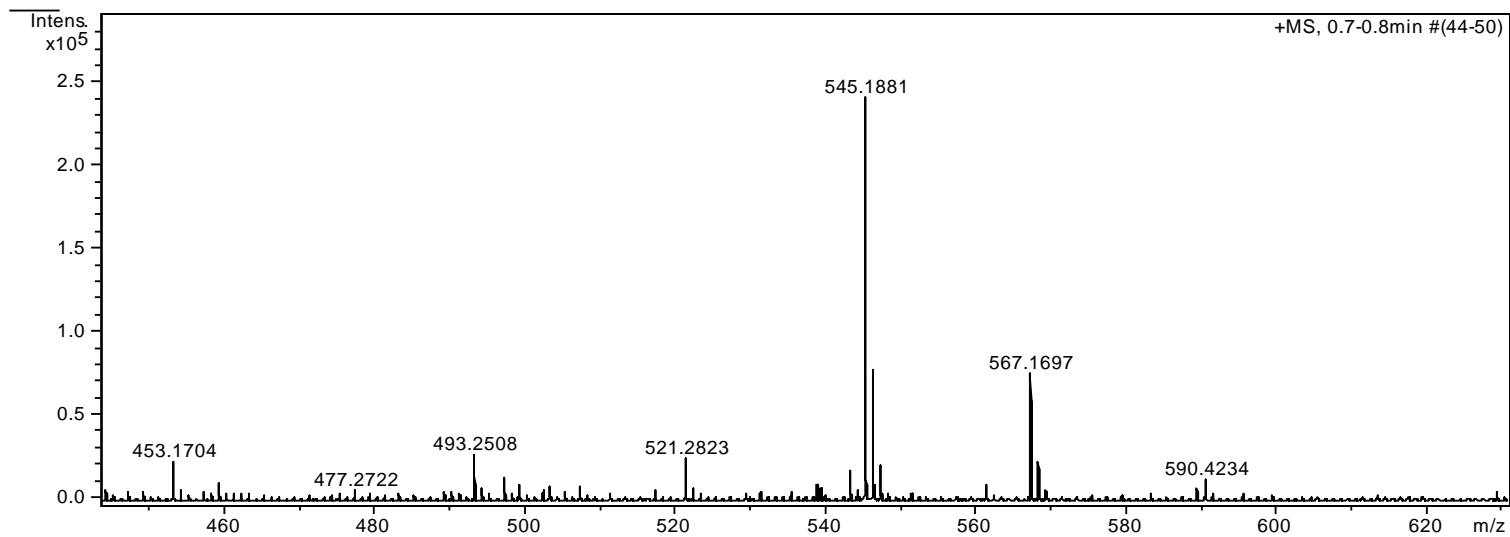
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da **TARF**



Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da **TARE**

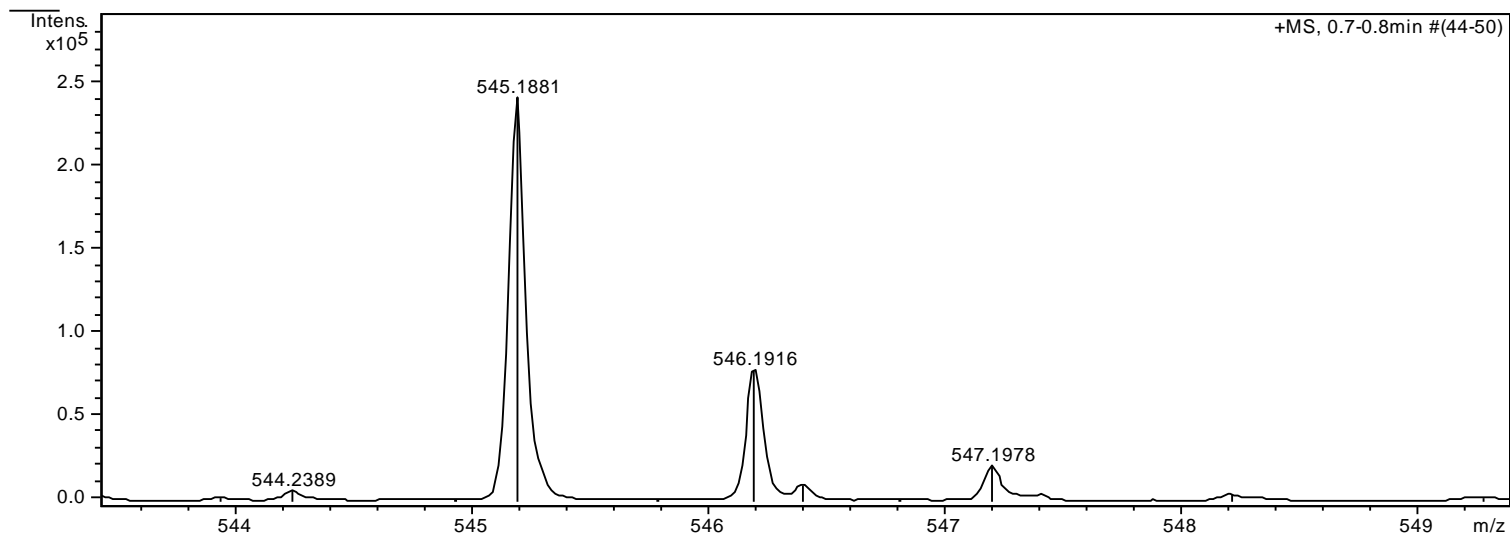


Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da **TARF**

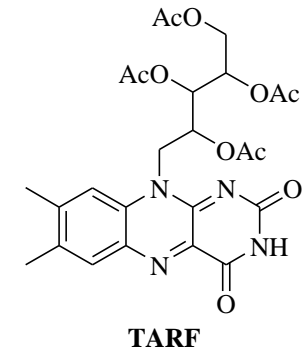
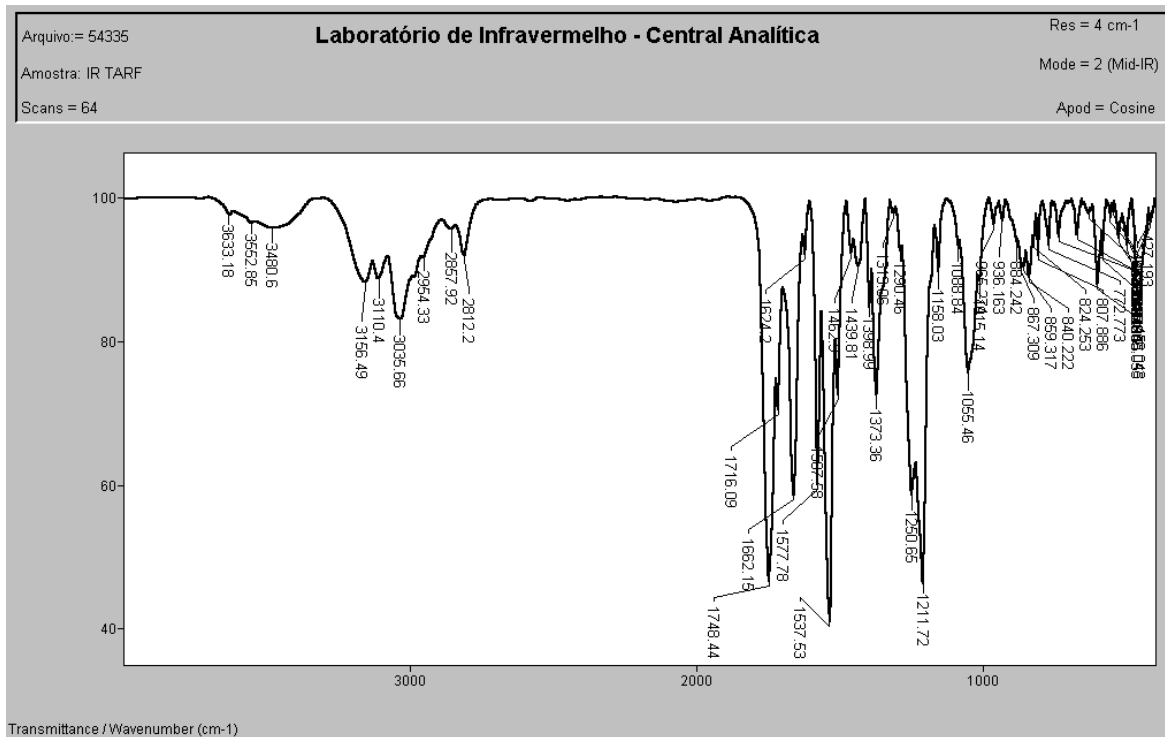


$C_{25}H_{28}N_4O_{10}$
Exact Mass: 544,1805

TARF

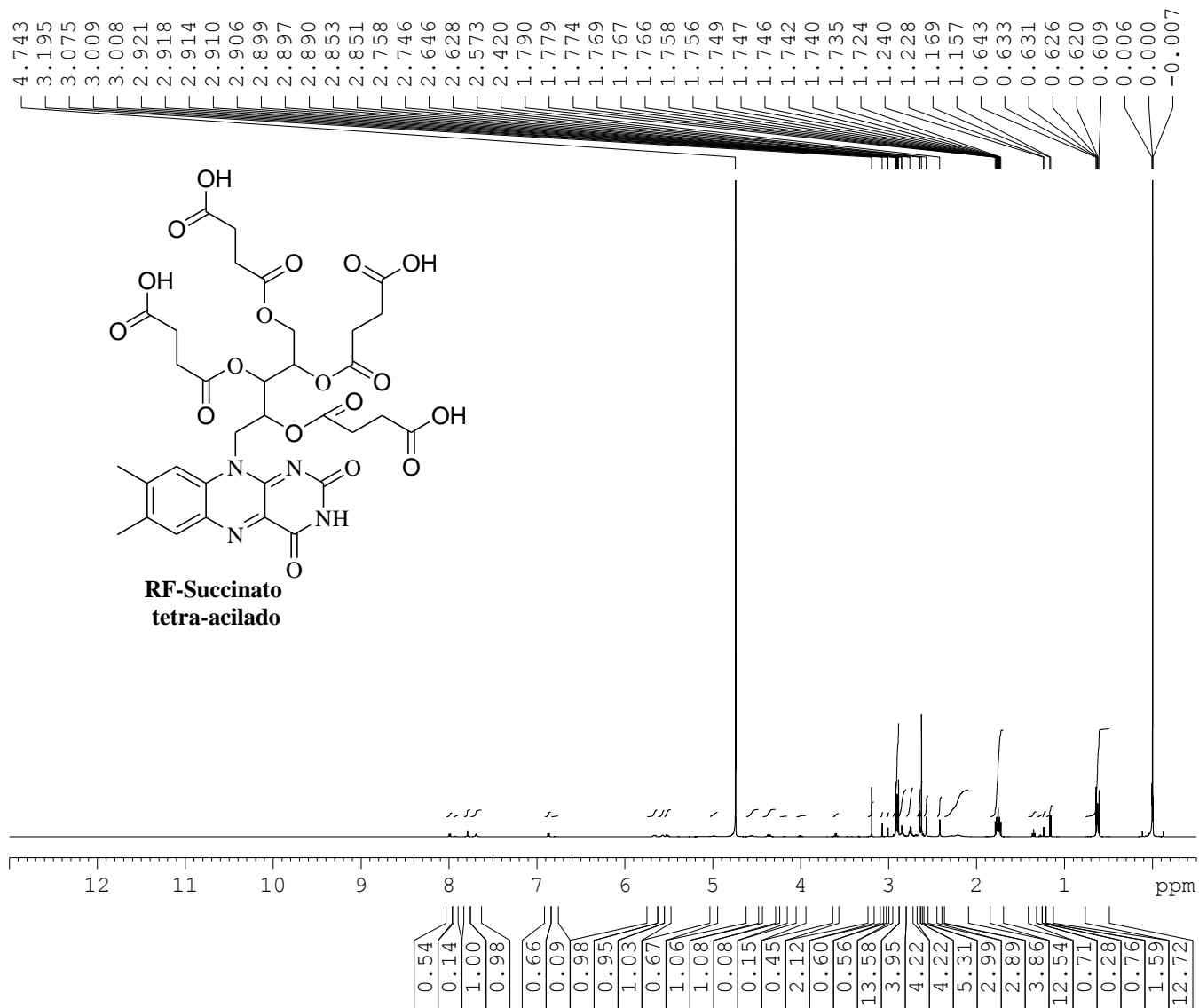


Espectro de massas de alta resolução da **TARF**



Espectro de infravermelho da TARF

Alexandre RF_acida_09_11 T=300K DRX500 18/Nov/2010 51141



Current Data Parameters
 NAME 51141_Alexandre
 EXPNO 1
 PROCNO 1

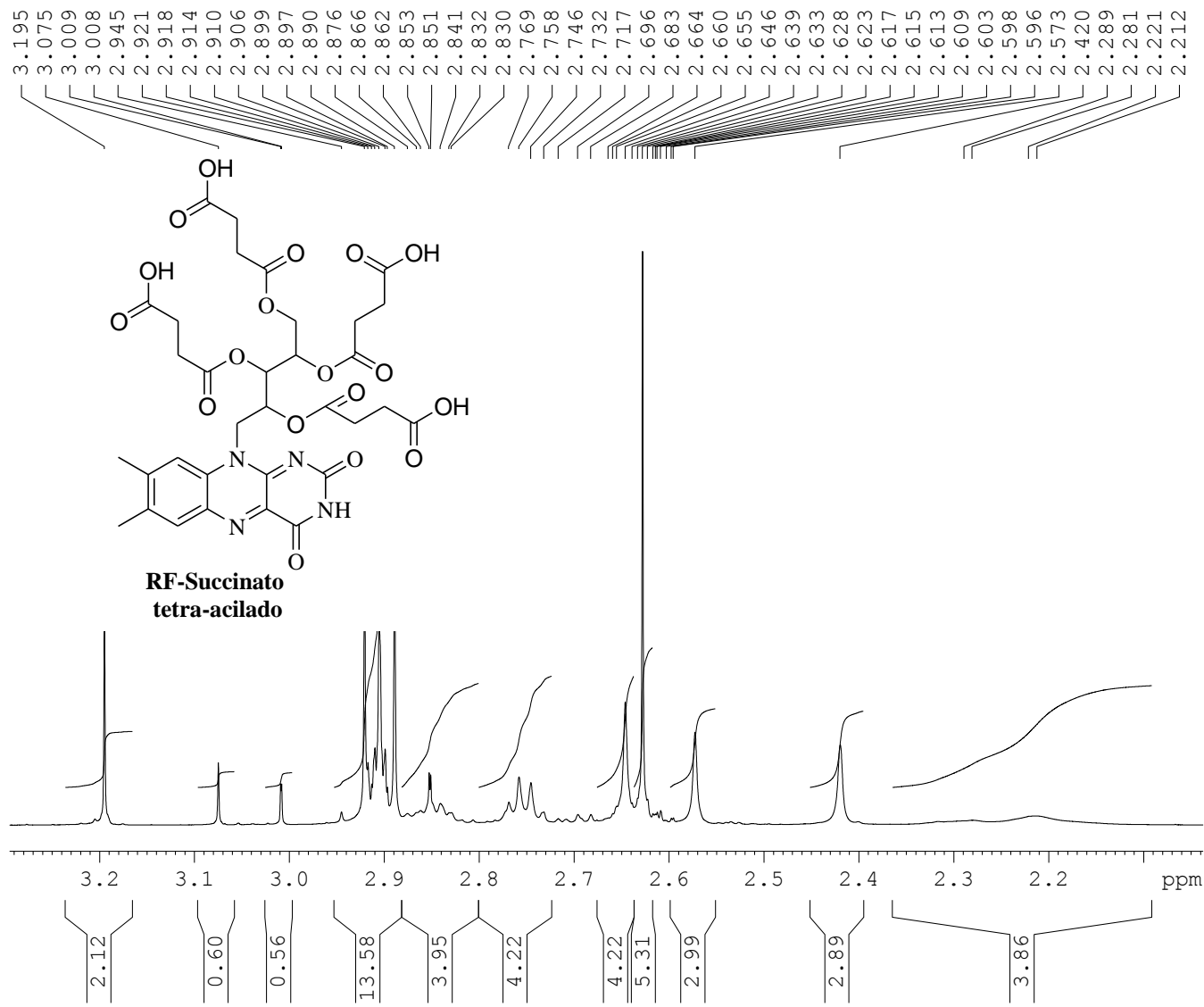
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20101118
 Time 10.46
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT D2O
 NS 128
 DS 4
 SWH 7225.434 Hz
 FIDRES 0.110251 Hz
 AQ 4.5351410 sec
 RG 181
 DW 69.200 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.2 K
 D1 5.00000000 sec
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 10.90 usec
 PL1 -5.00 dB
 SFO1 500.1326932 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 131072
 SF 500.1299808 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.10 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, D₂O) do RF-Succinato

Alexandre RF_acida_09_11 T=300K DRX500 18/Nov/2010 51141



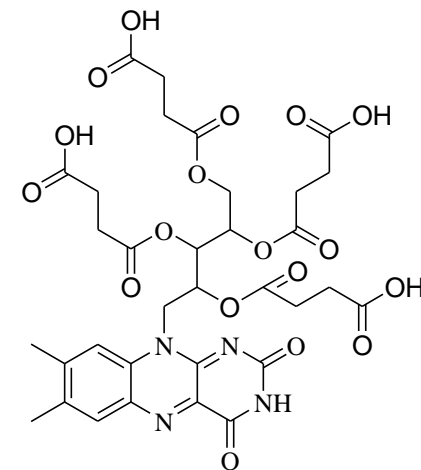
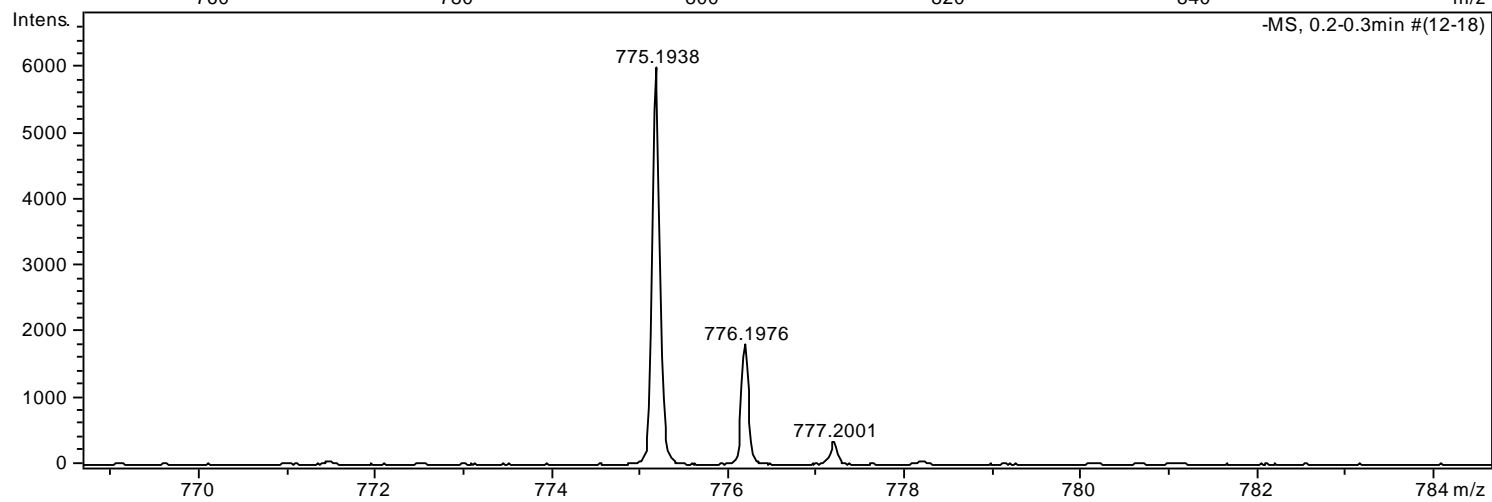
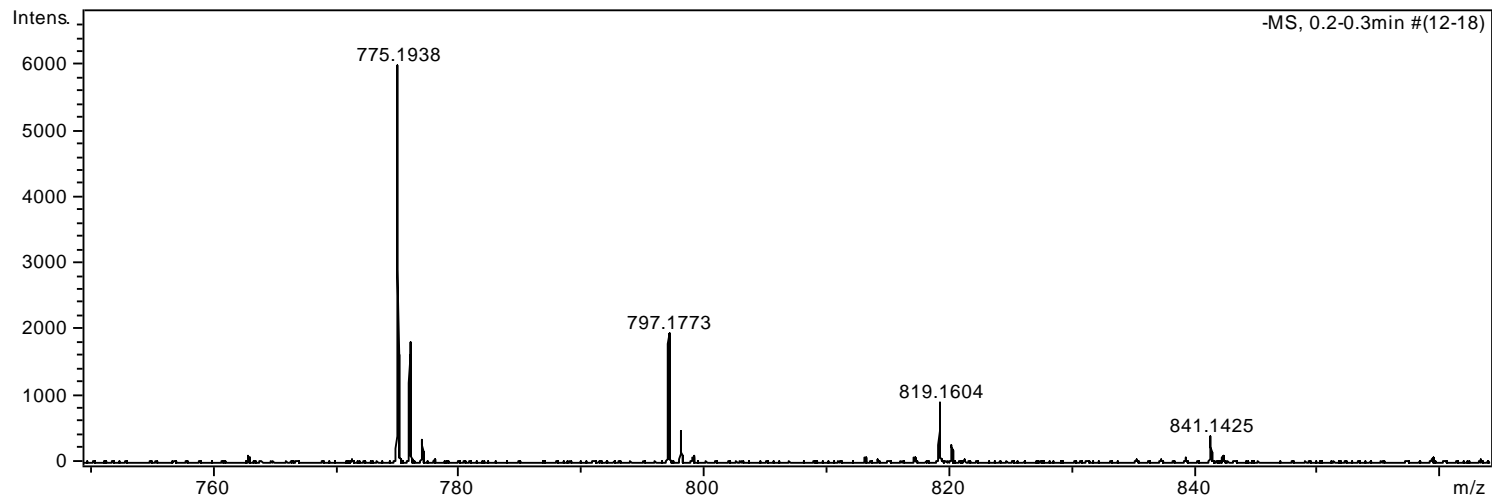
Current Data Parameters
NAME 51141_Alexandre
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20101118
Time 10.46
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 128
DS 4
SWH 7225.434 Hz
FIDRES 0.110251 Hz
AQ 4.5351410 sec
RG 181
DW 69.200 usec
DE 10.00 usec
TE 300.2 K
D1 5.00000000 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 10.90 usec
PL1 -5.00 dB
SFO1 500.1328932 MHz

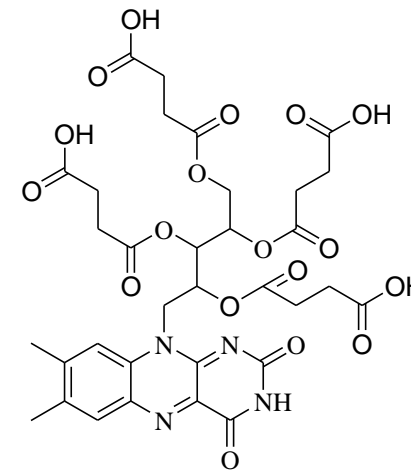
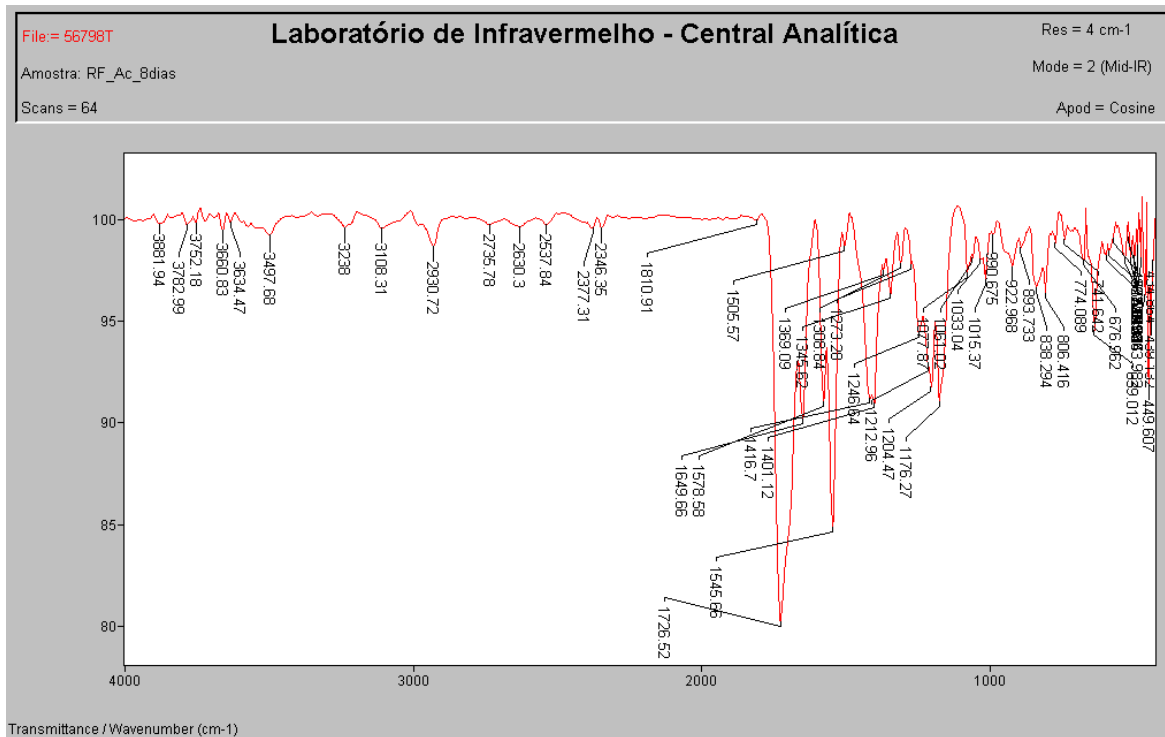
F2 - Processing parameters
SI 131072
SF 500.1299808 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, D₂O) do derivado da RF-Succinato



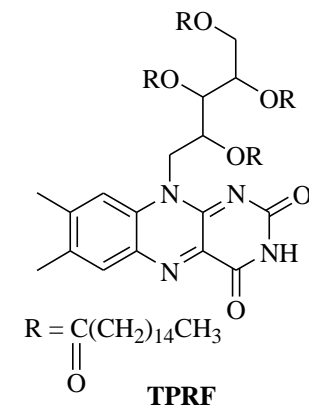
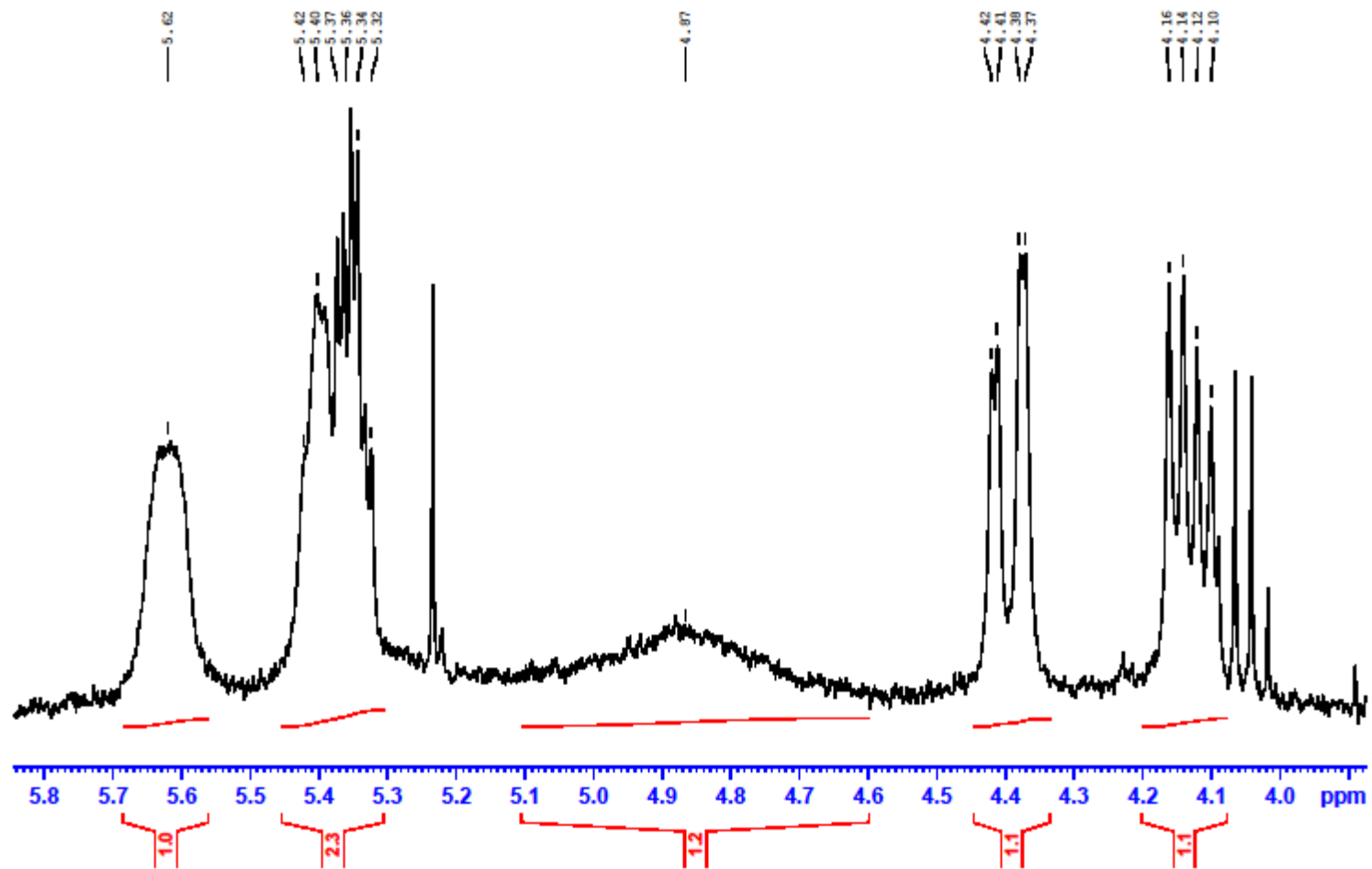
$C_{33}H_{36}N_4O_{18}$
Exact Mass: 776,2025

**RF-Succinato
tetra-acilado**

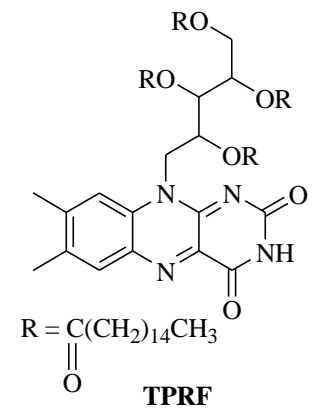
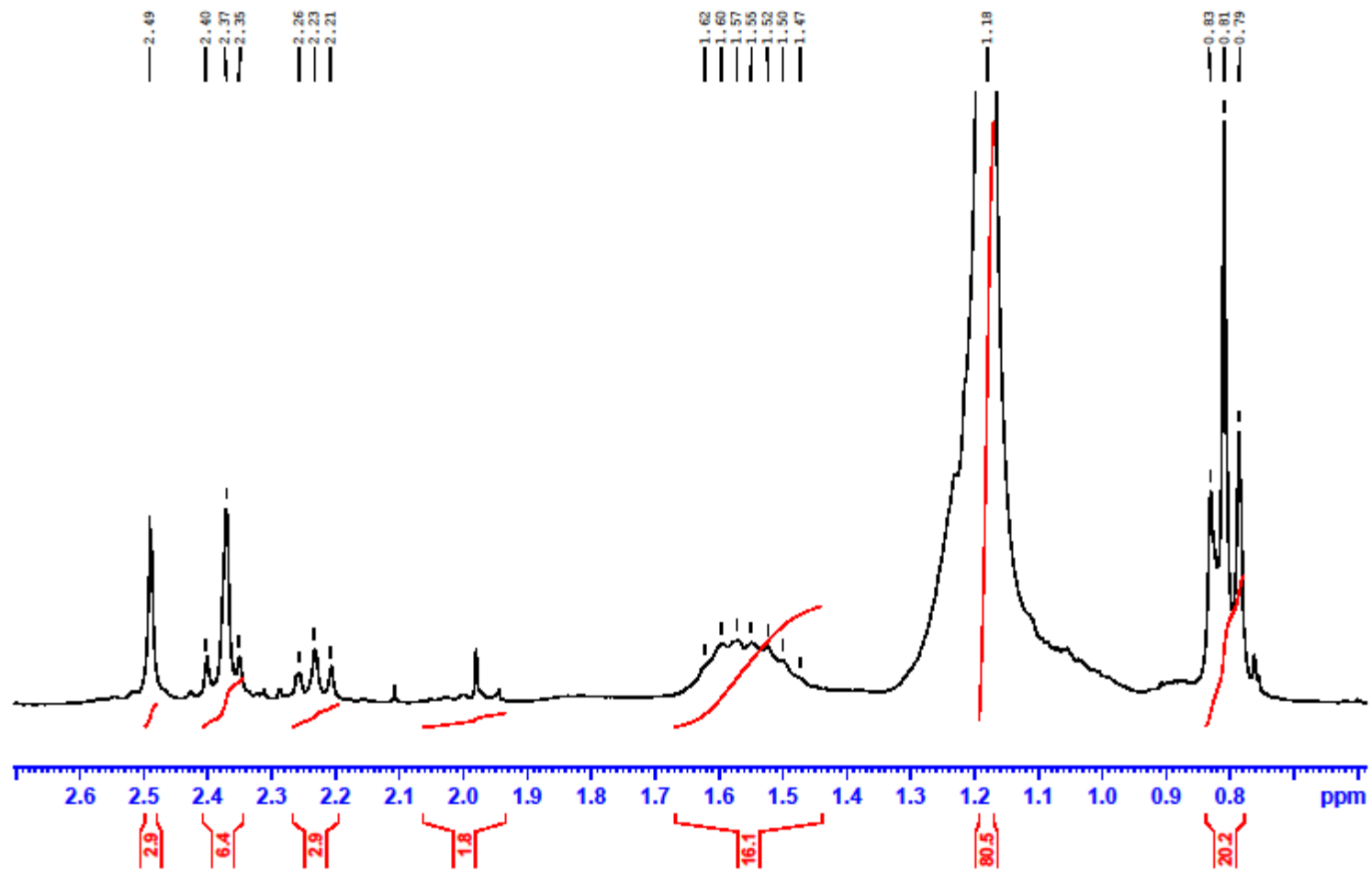


**RF-Succinato
tetra-acilado**

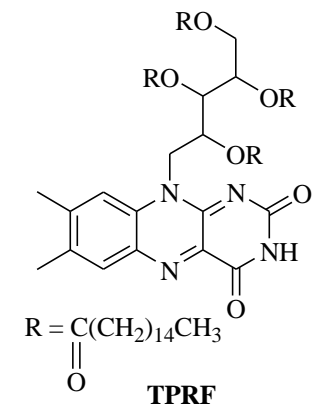
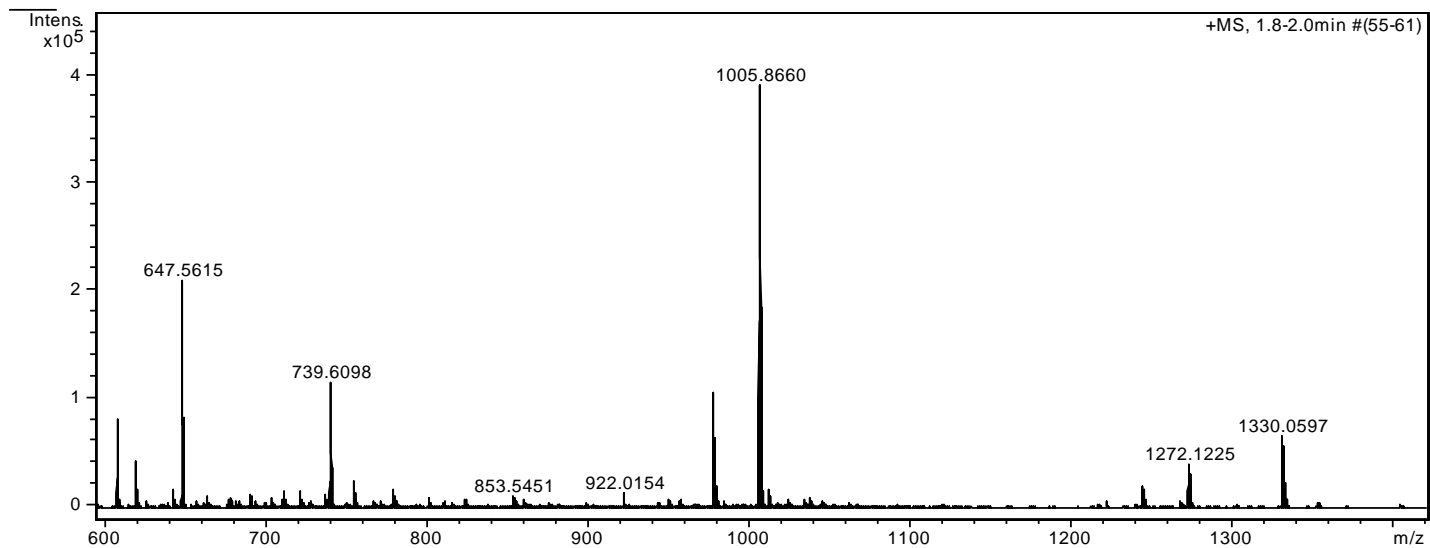
Espectro de infravermelho do derivado da **RF-Succinato**



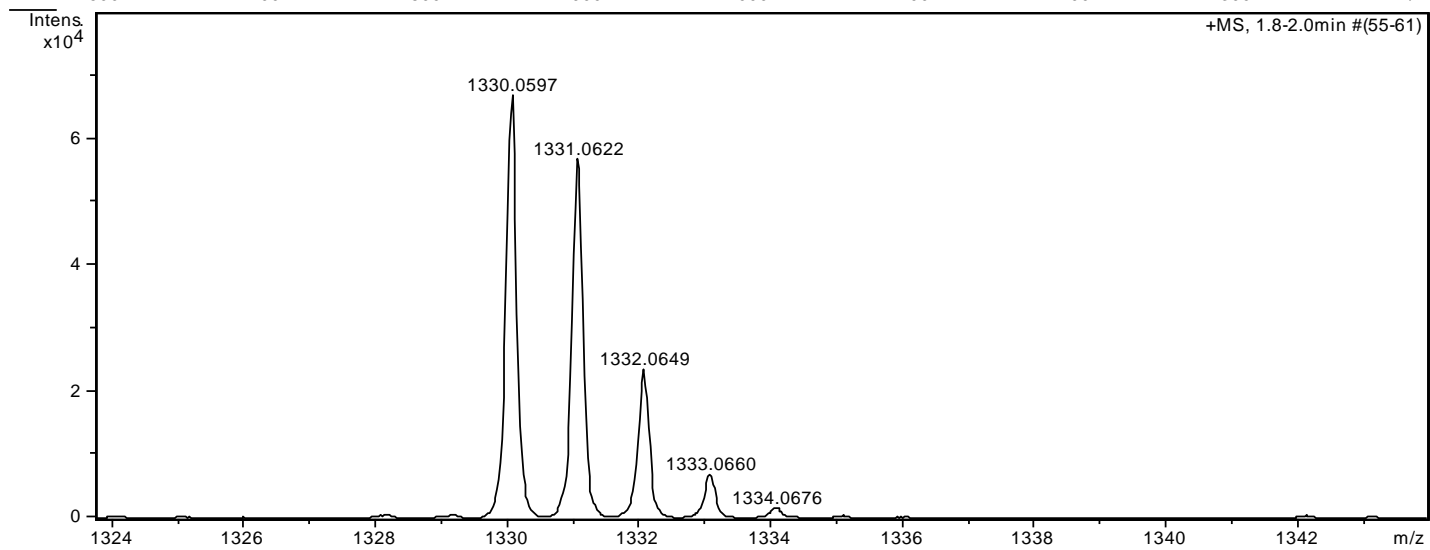
Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) da **TPRF**



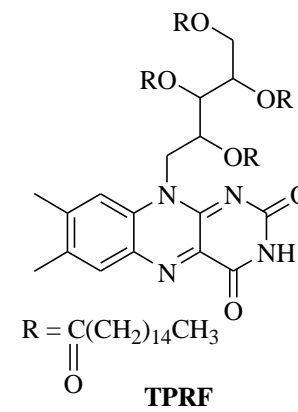
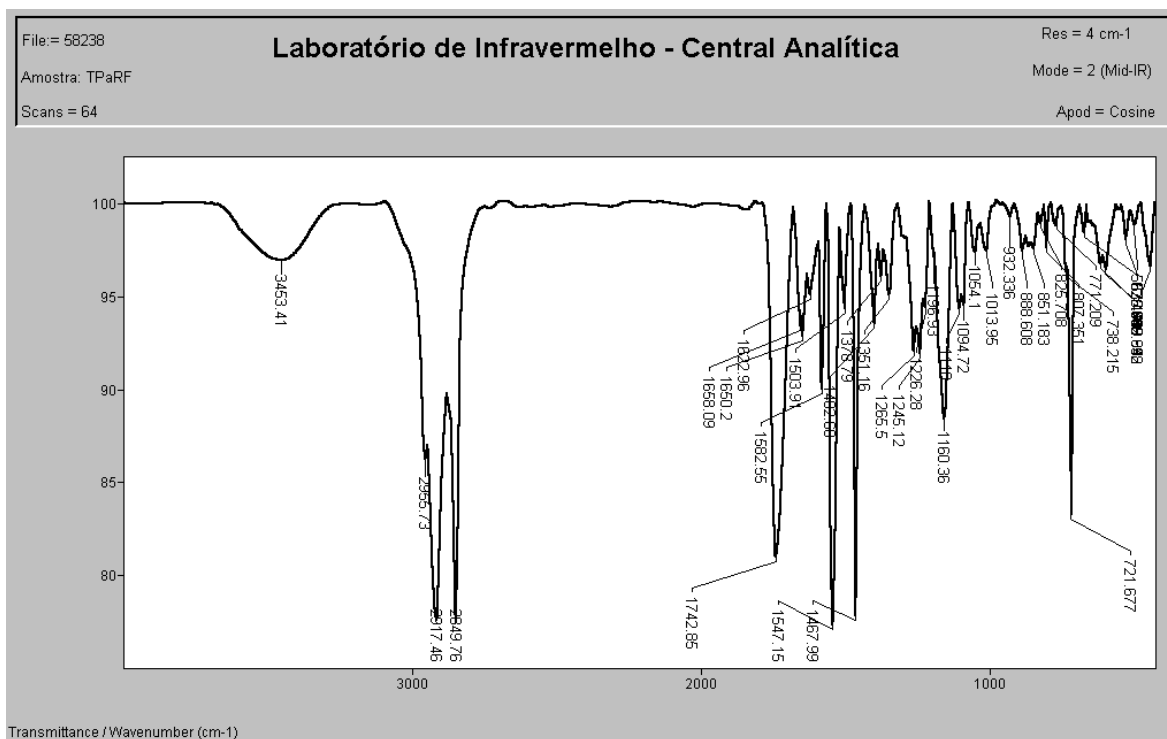
Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) da **TPRF**



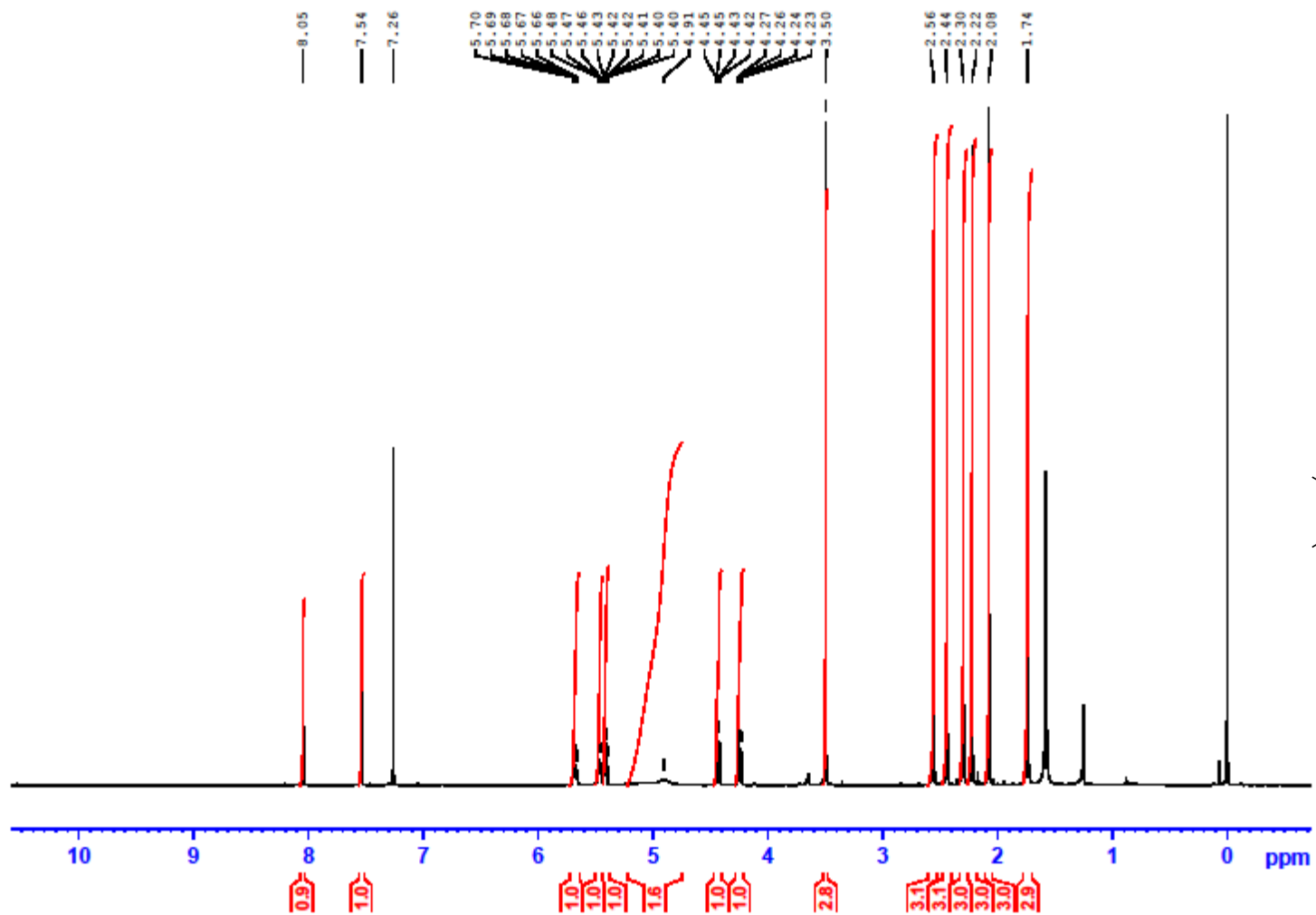
$\text{C}_{81}\text{H}_{140}\text{N}_4\text{O}_{10}$
 Exact Mass: 1329,0569



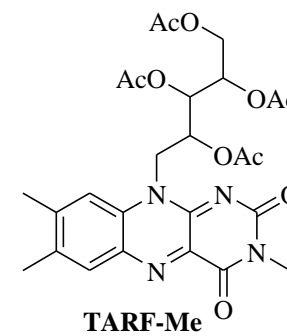
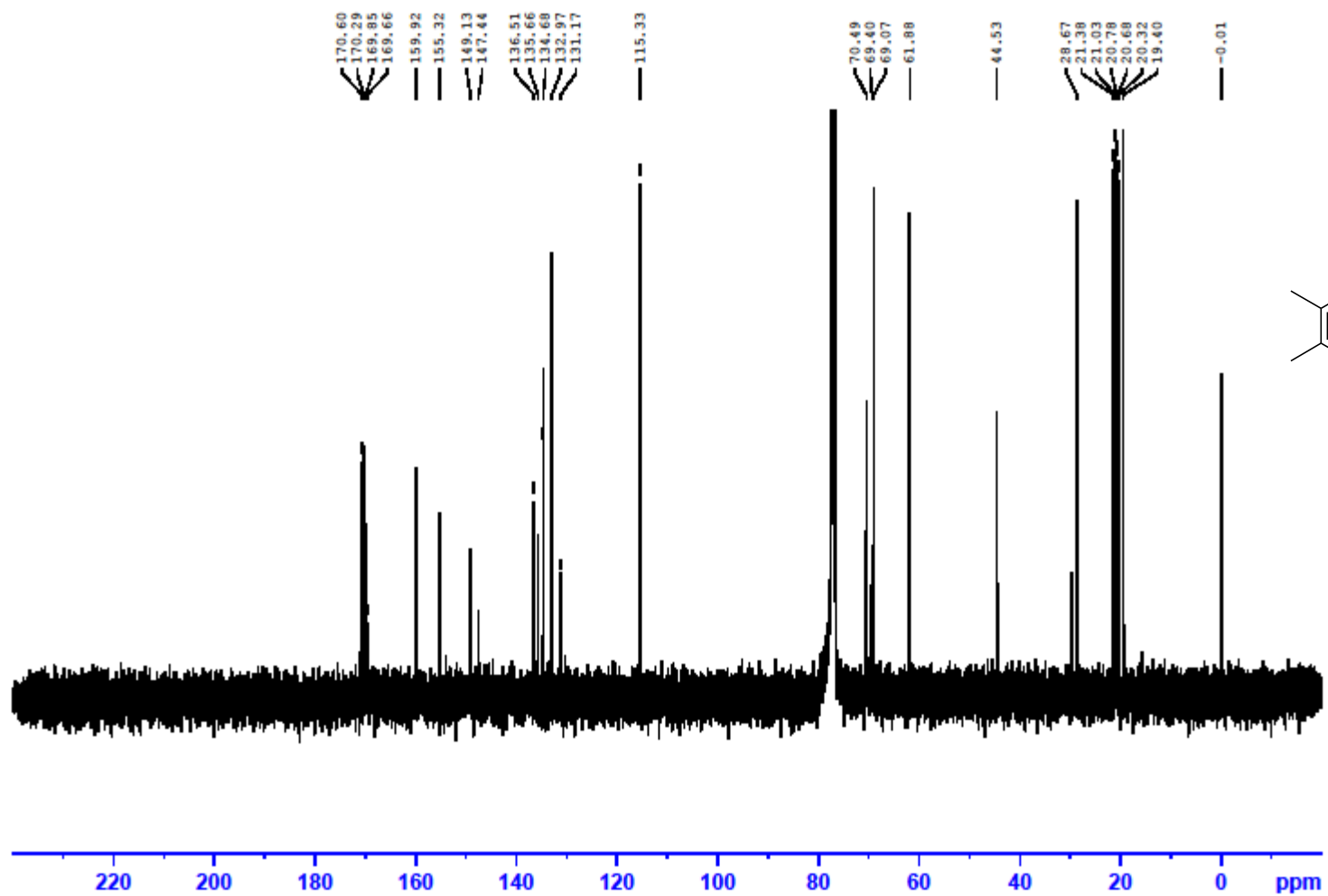
Espectro de massas de alta resolução da **TPRF**



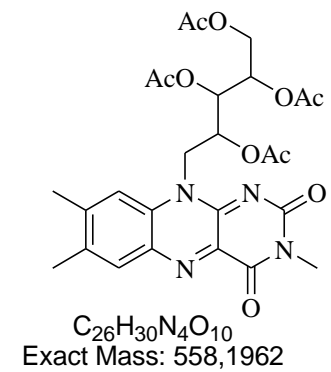
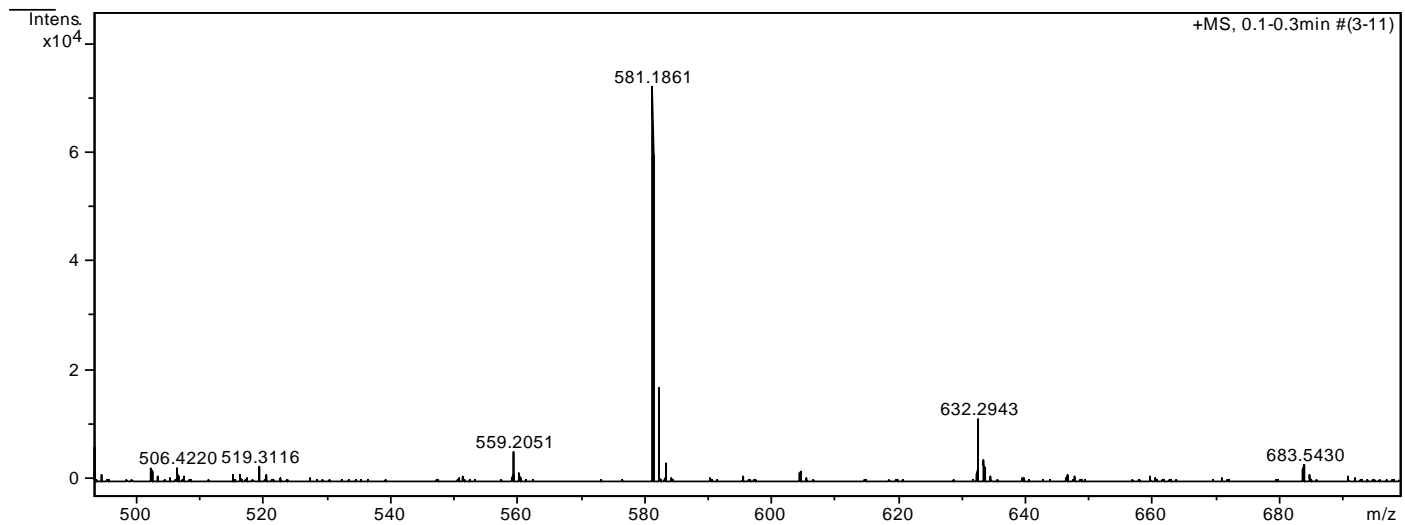
Espectro de infravermelho da **TPRF**



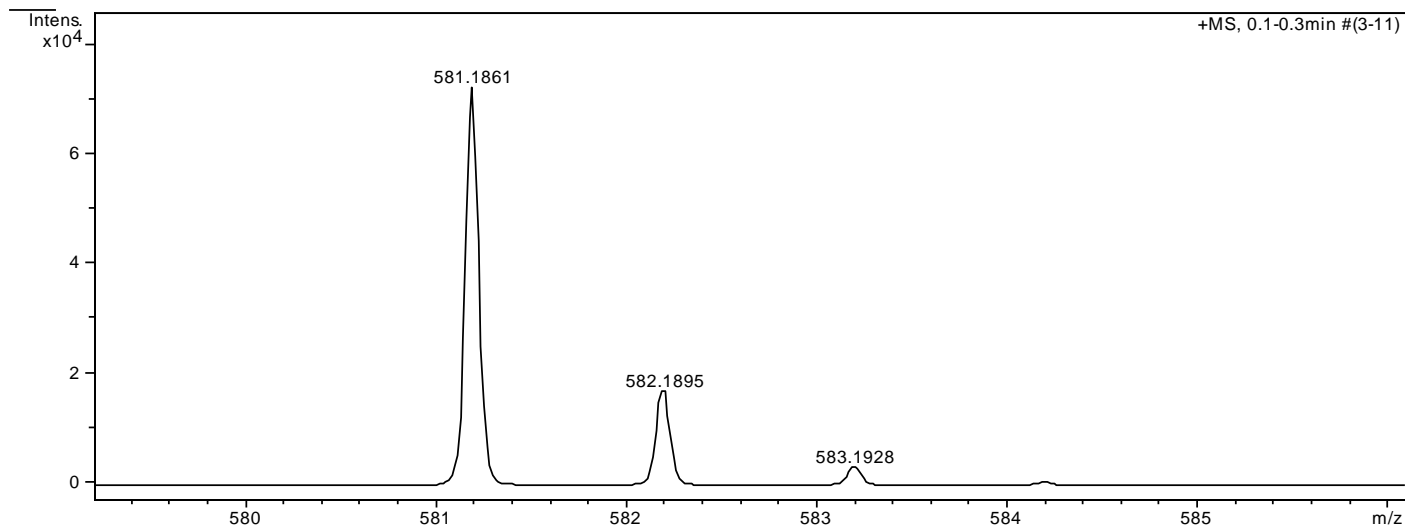
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da **TARF-Me**



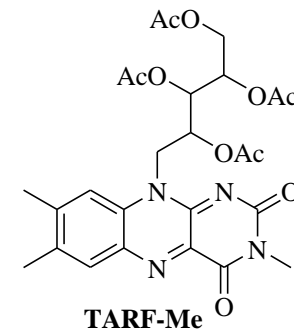
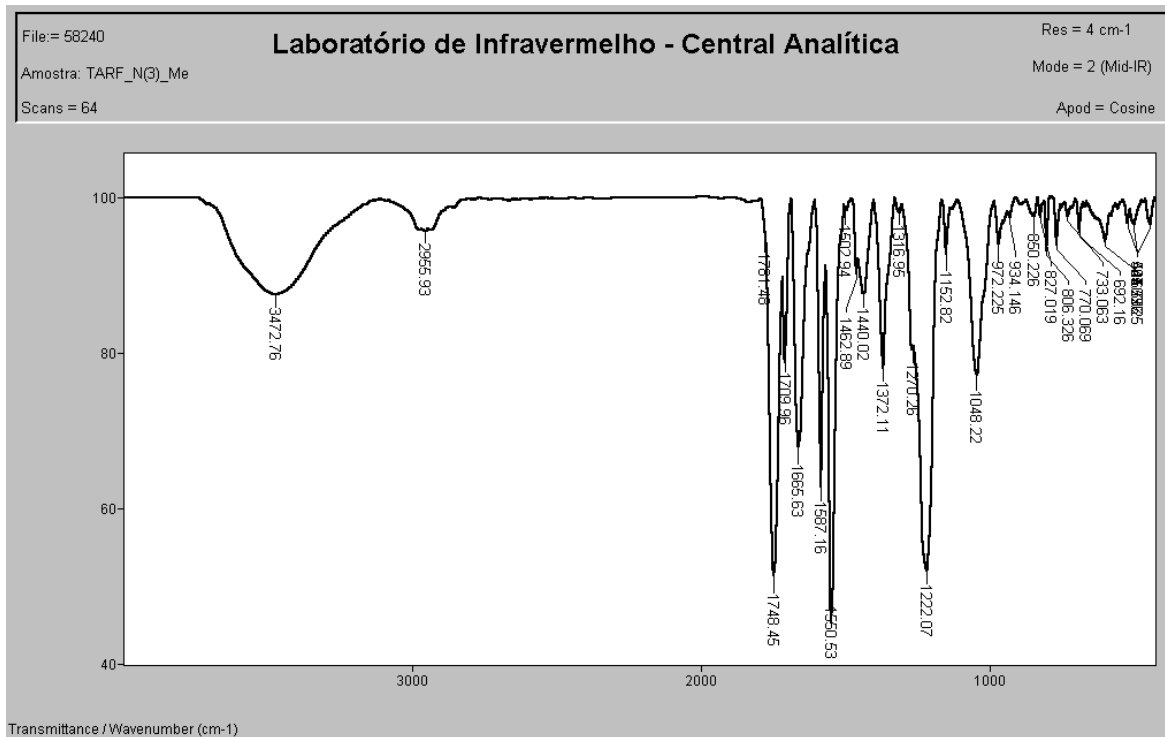
Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da **TARF-Me**



TARF-Me

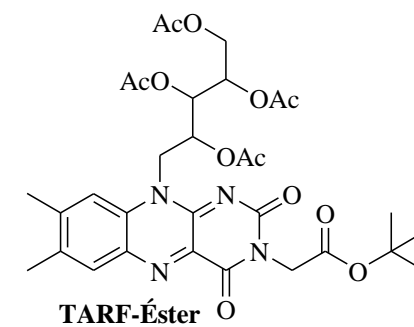
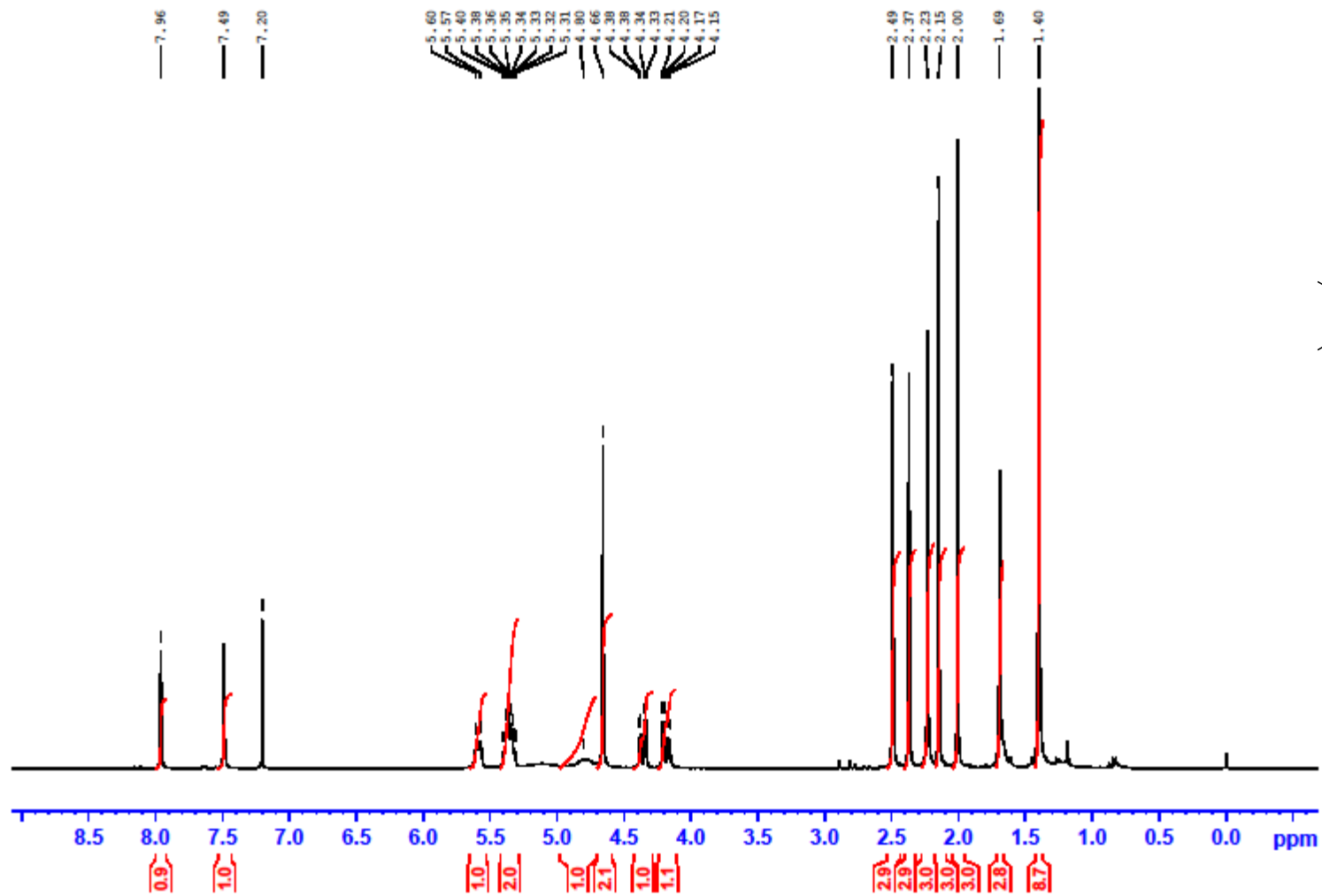


Espectro de massas de alta resolução da **TARF-Me**



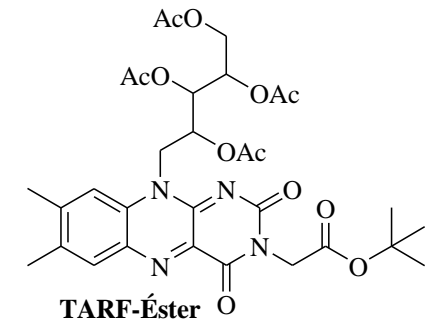
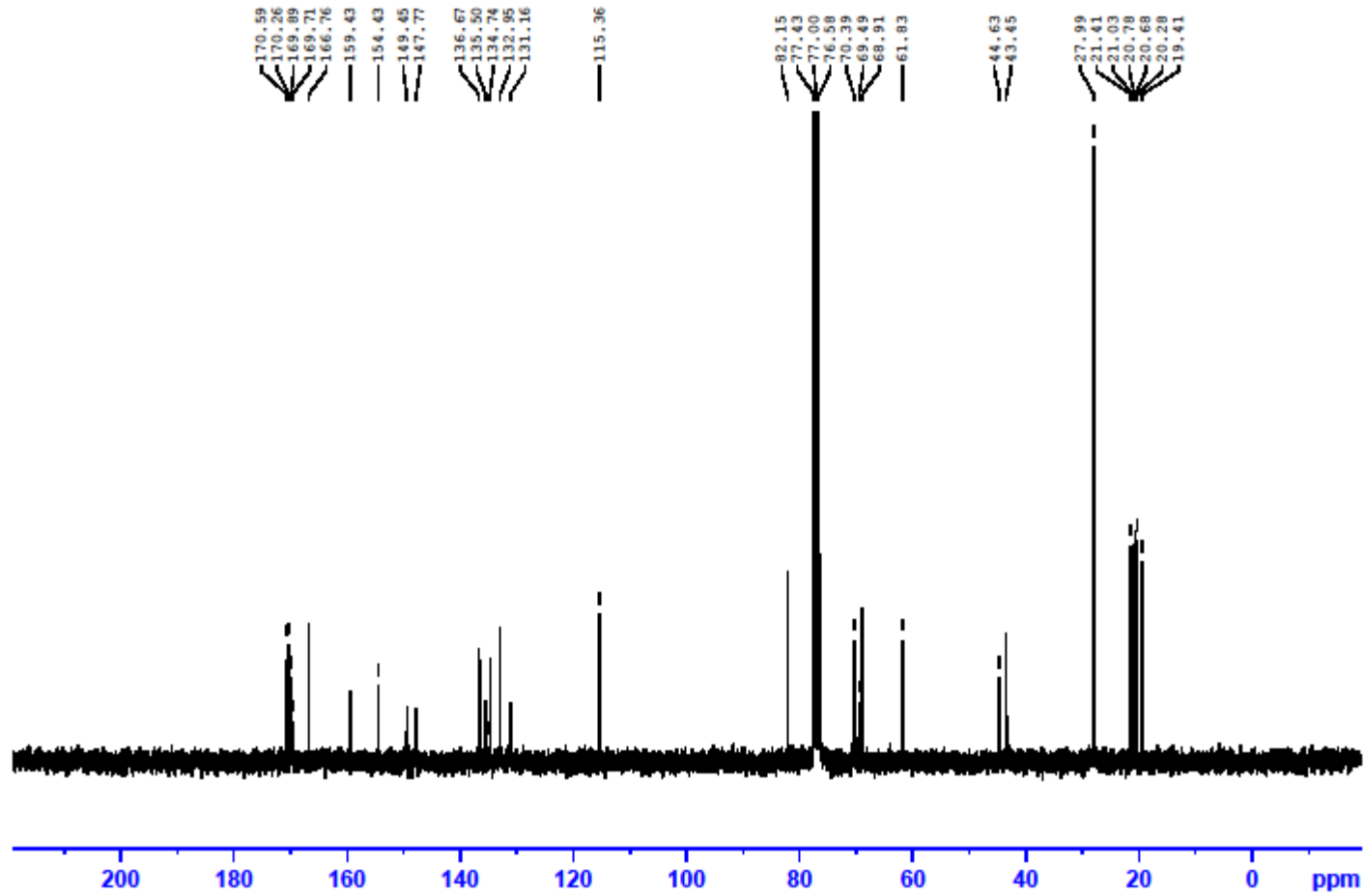
Espectro de infravermelho da **TARF-Me**

Q16VSESTER189

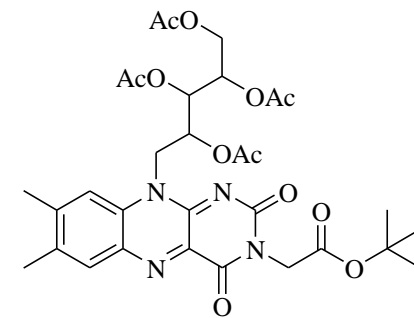
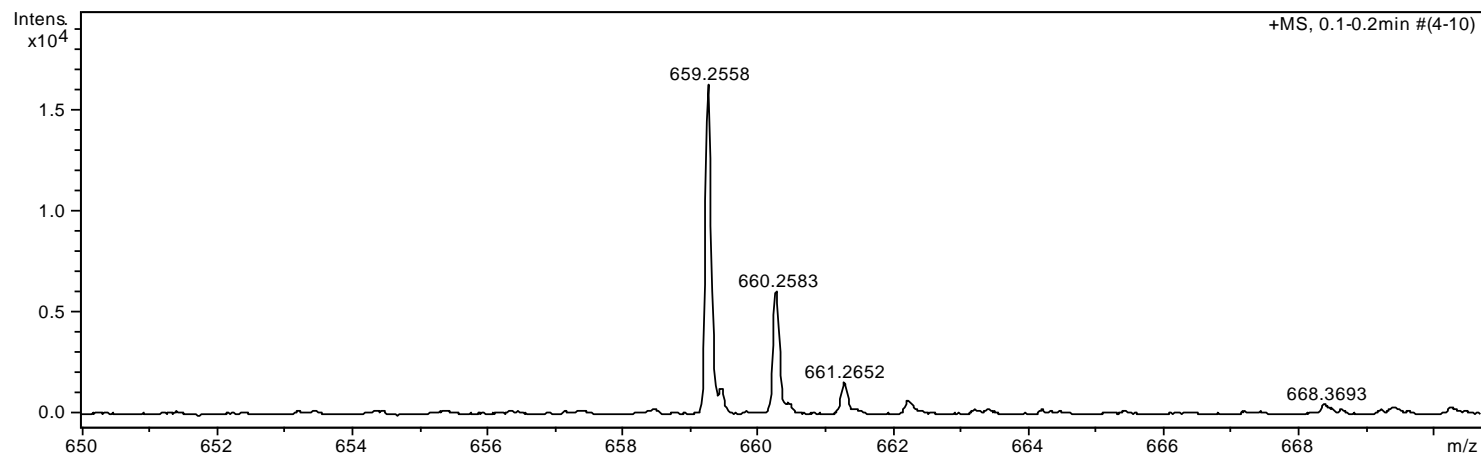
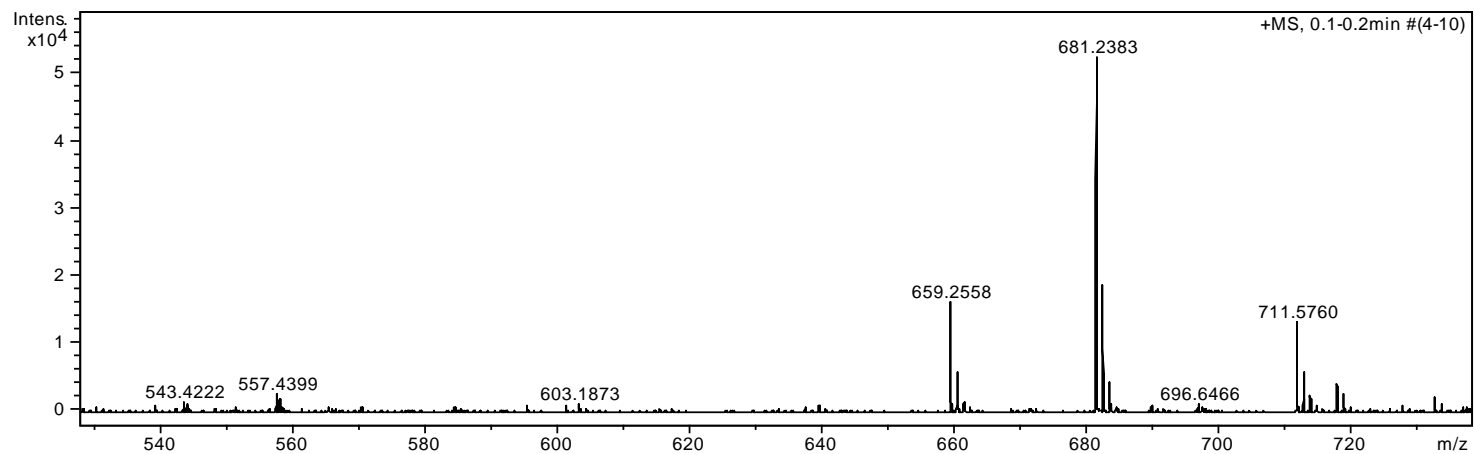


Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da **TARE-Éster**

Q16VSESTER189



Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da **TARG-Éster**



$C_{31}H_{38}N_4O_{12}$
Exact Mass: 658,2486

TARF-Éster

Espectro de massas de alta resolução da **TARF-Éster**

File # 1 : 71571T

Mode = 2 (Mid-IR)

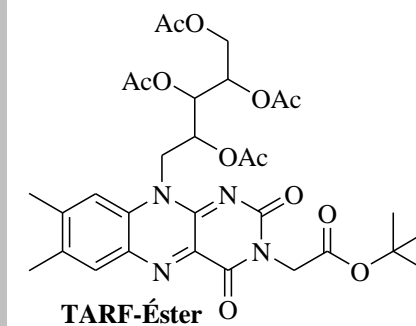
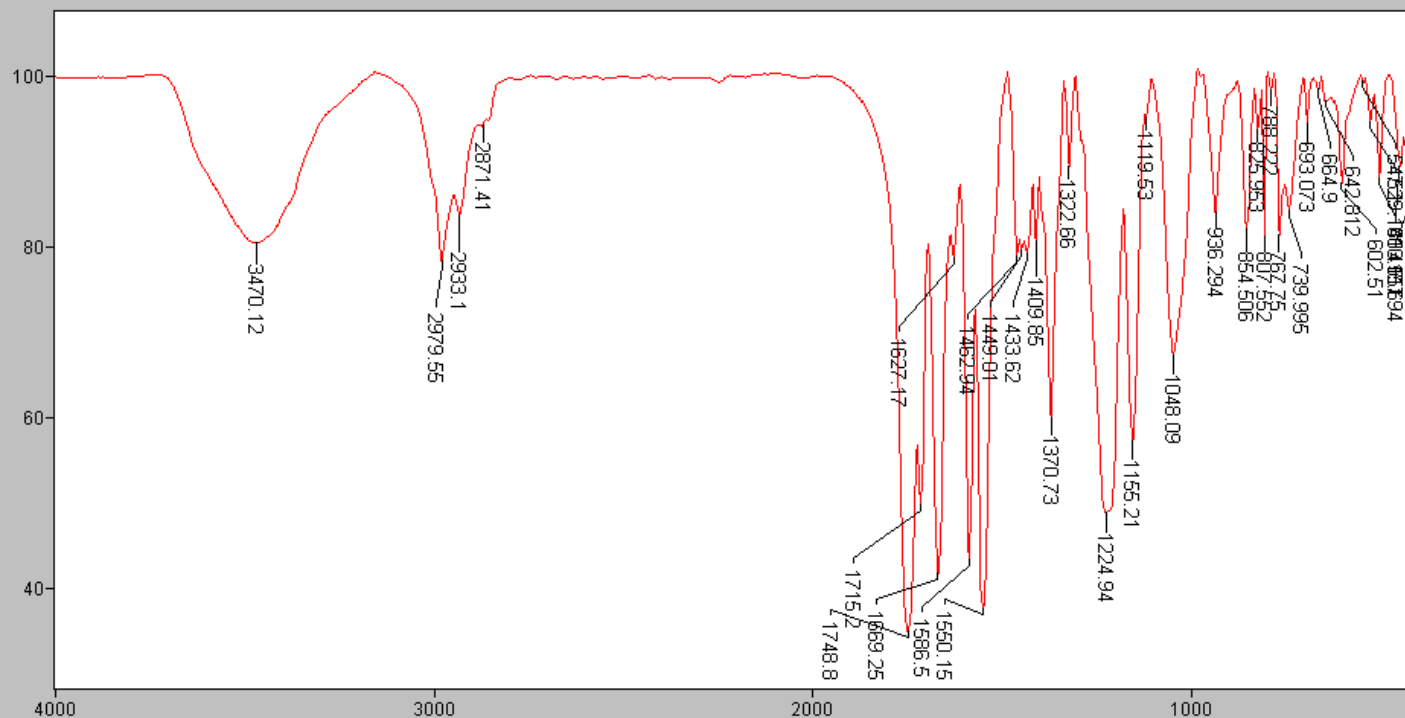
04/04/13 09:45

Sample Description: TARF Ester

Scans = 64

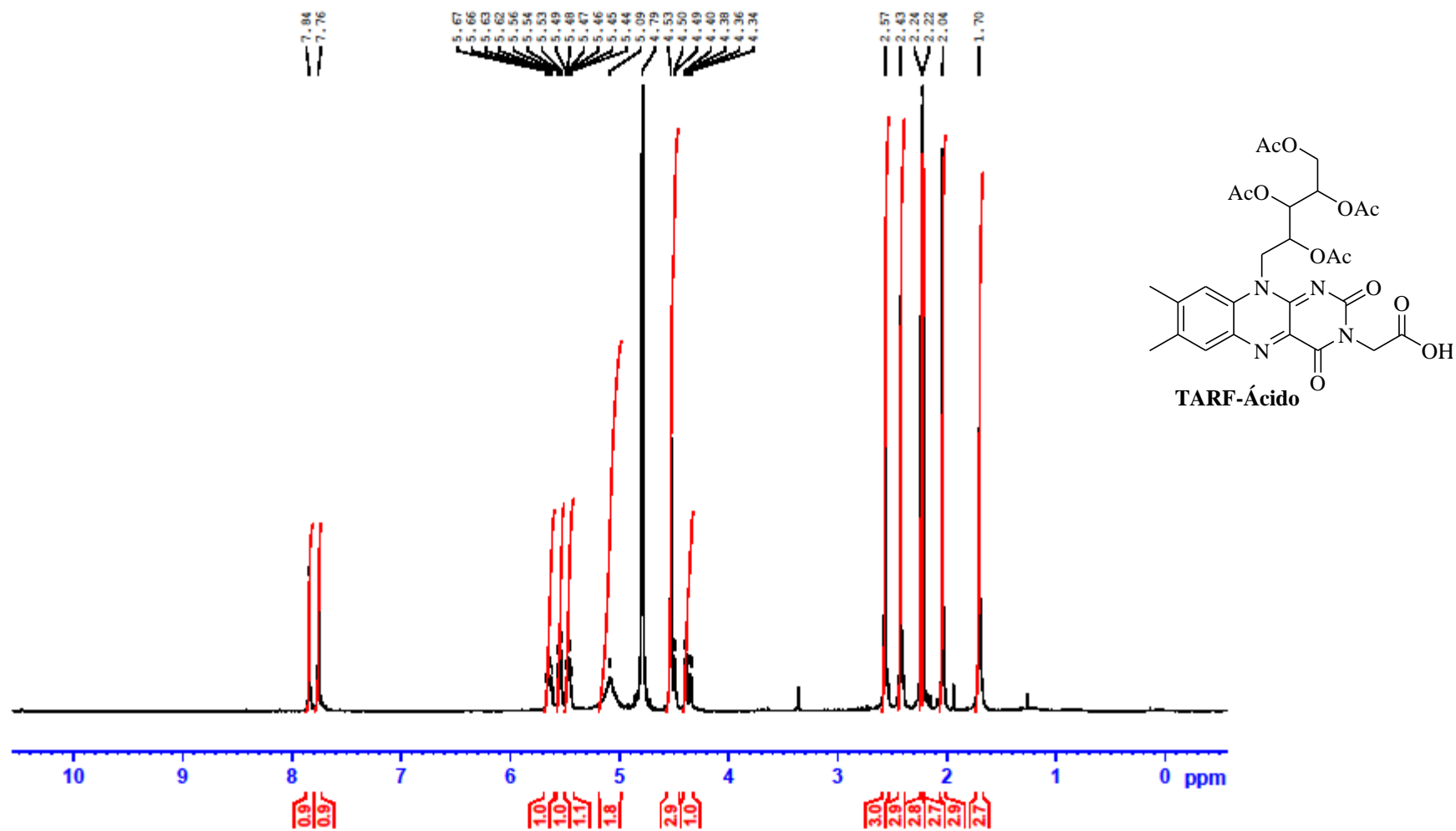
Res = 4 cm-1 20 scans/min

Apod = Cosine



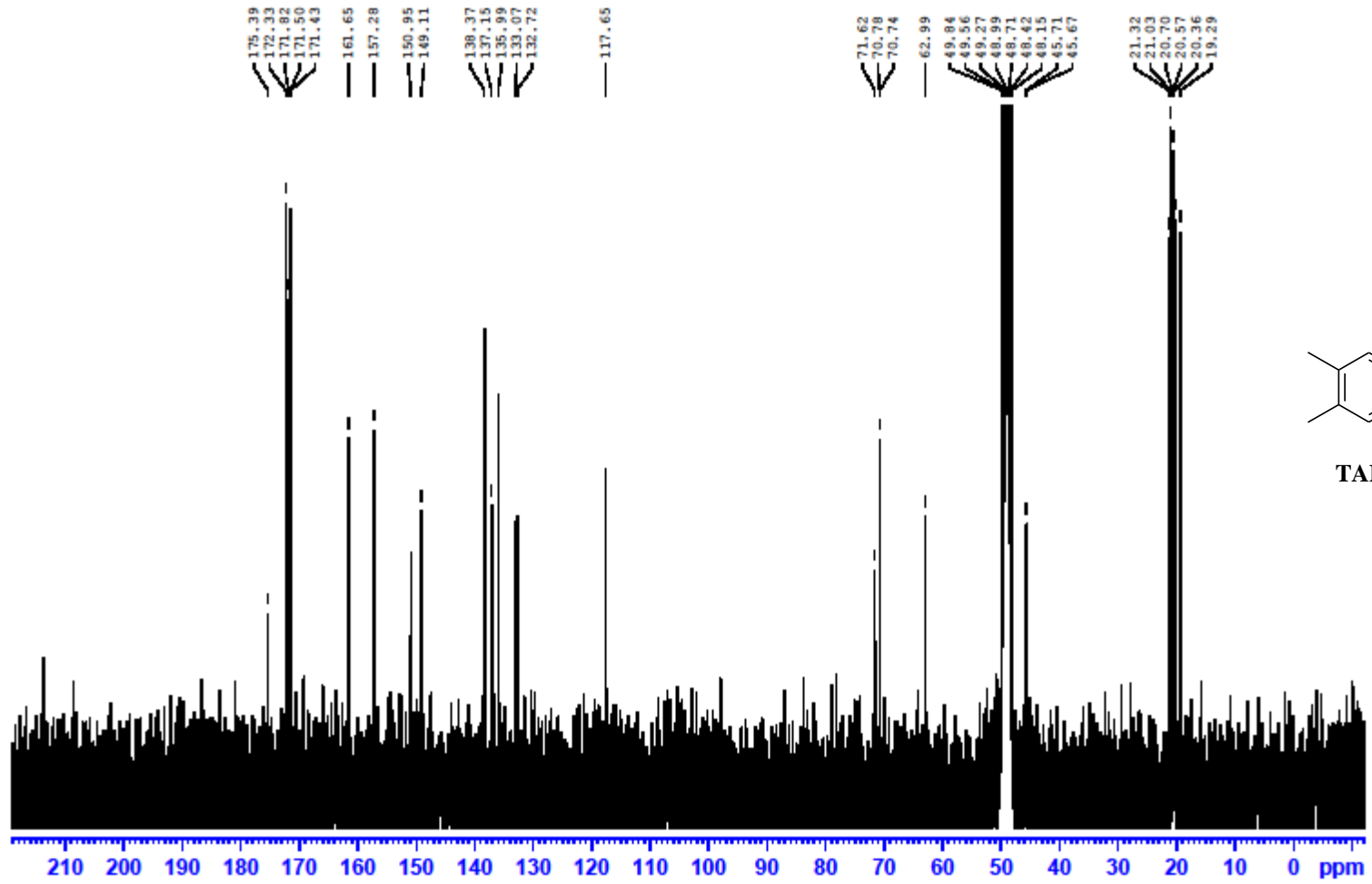
Espectro de infravermelho da TARF-Éster

Q16VSACID1809

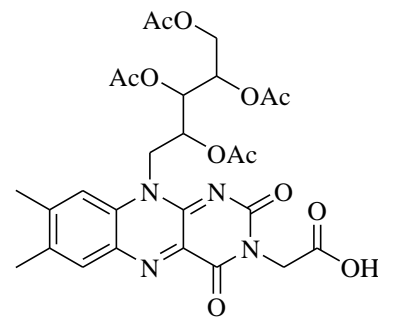
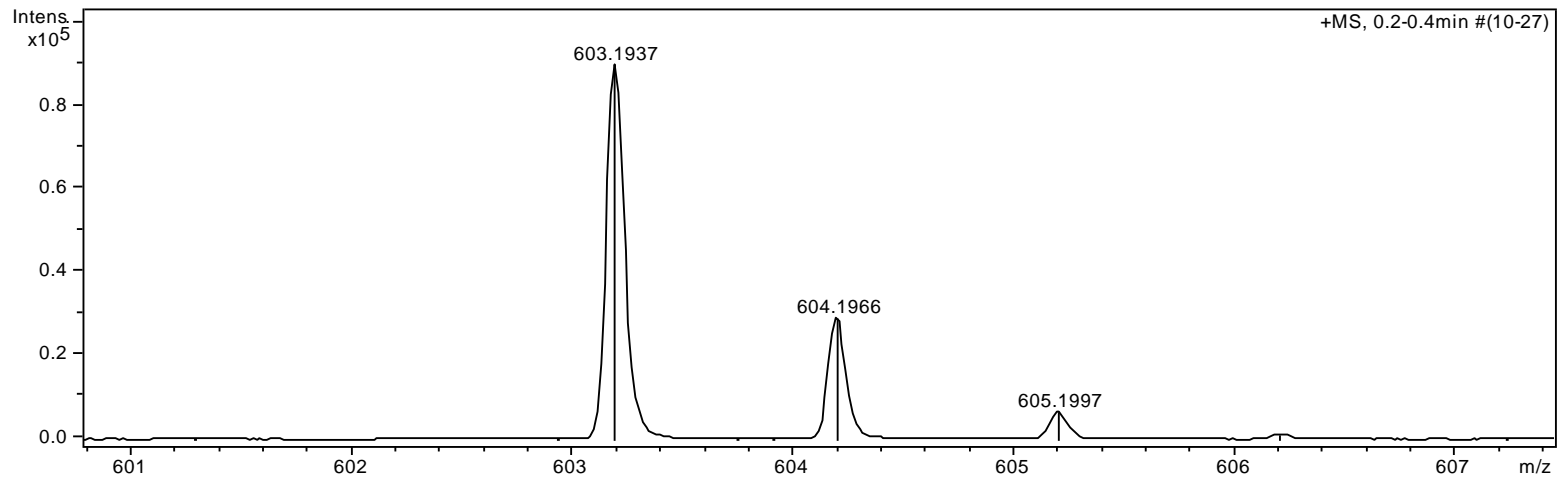
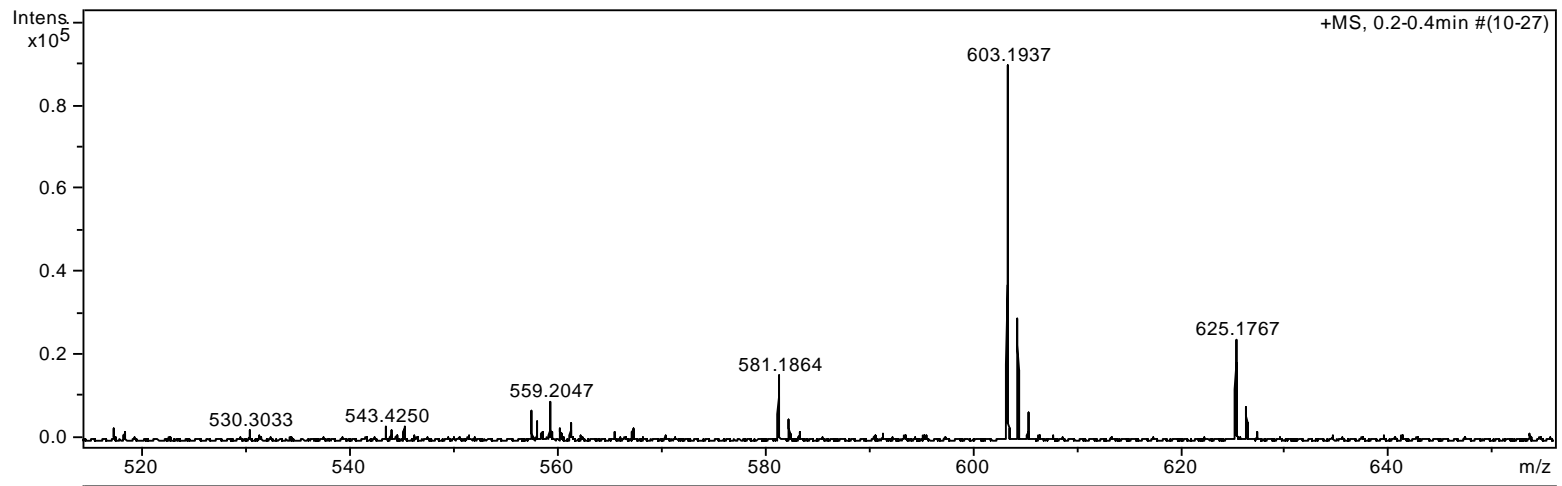


Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, D₂O) da TARF-Ácido

Q16VSTAAG1810

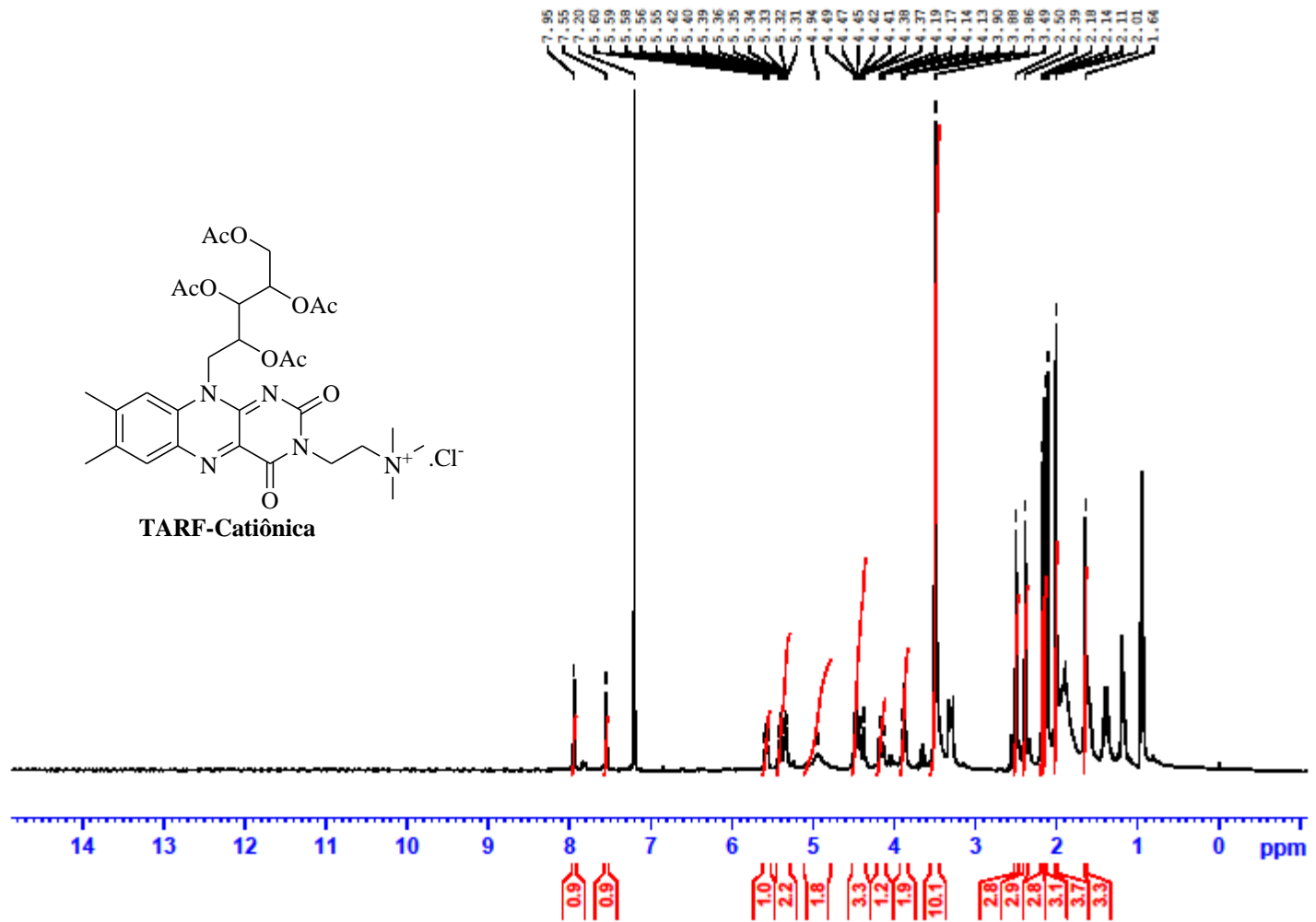


Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) da TARF-Ácido

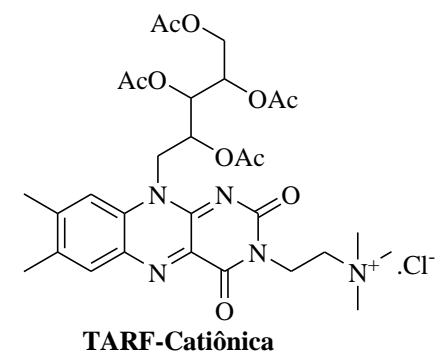
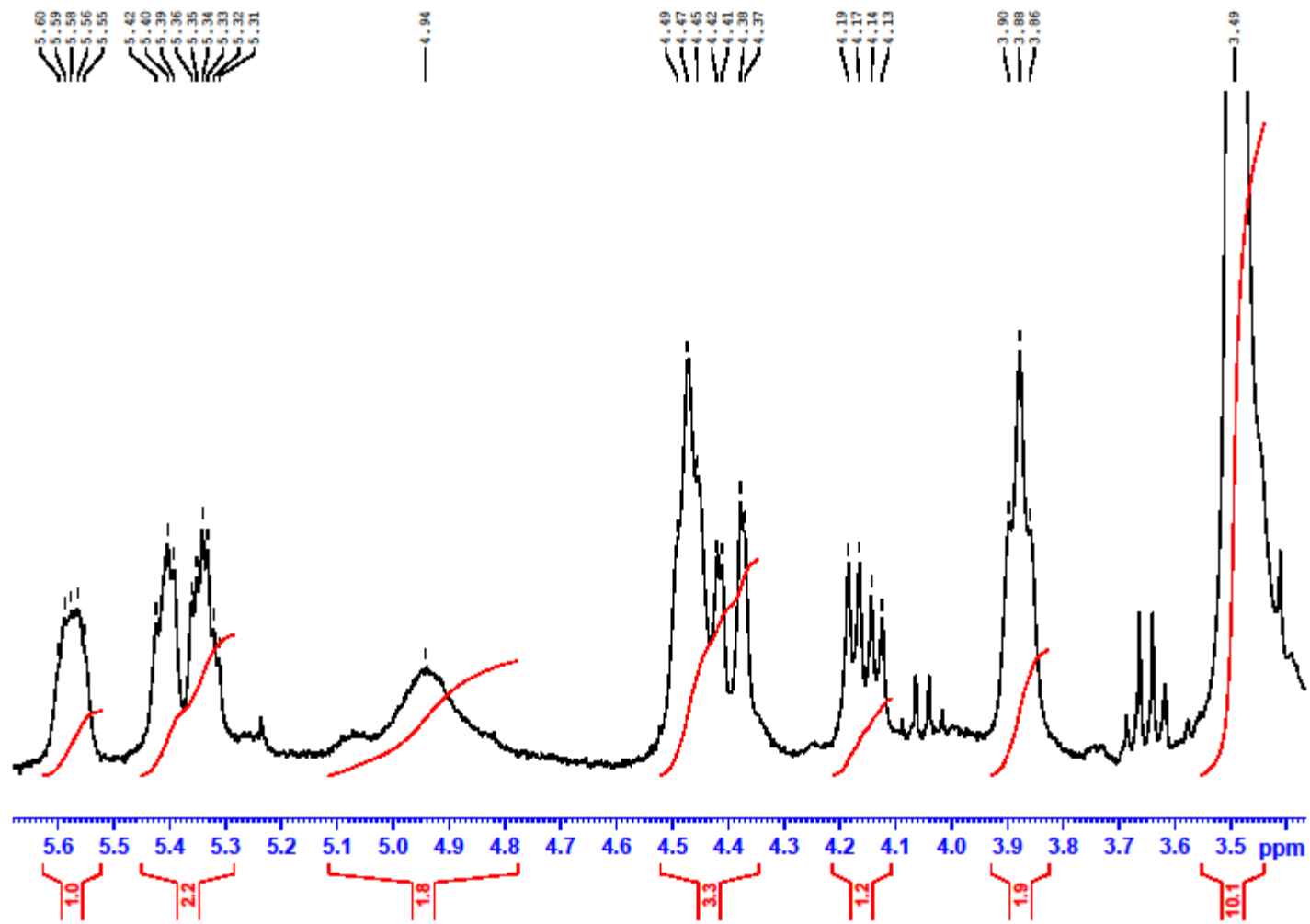


$C_{27}H_{30}N_4O_{12}$
 Exact Mass: 602,1860
TARF-Ácido

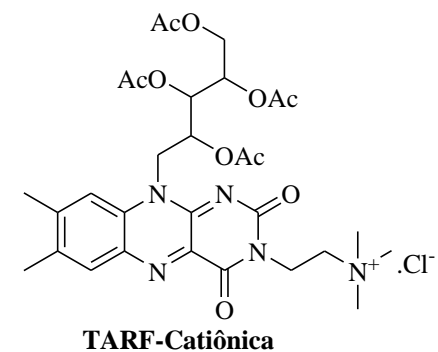
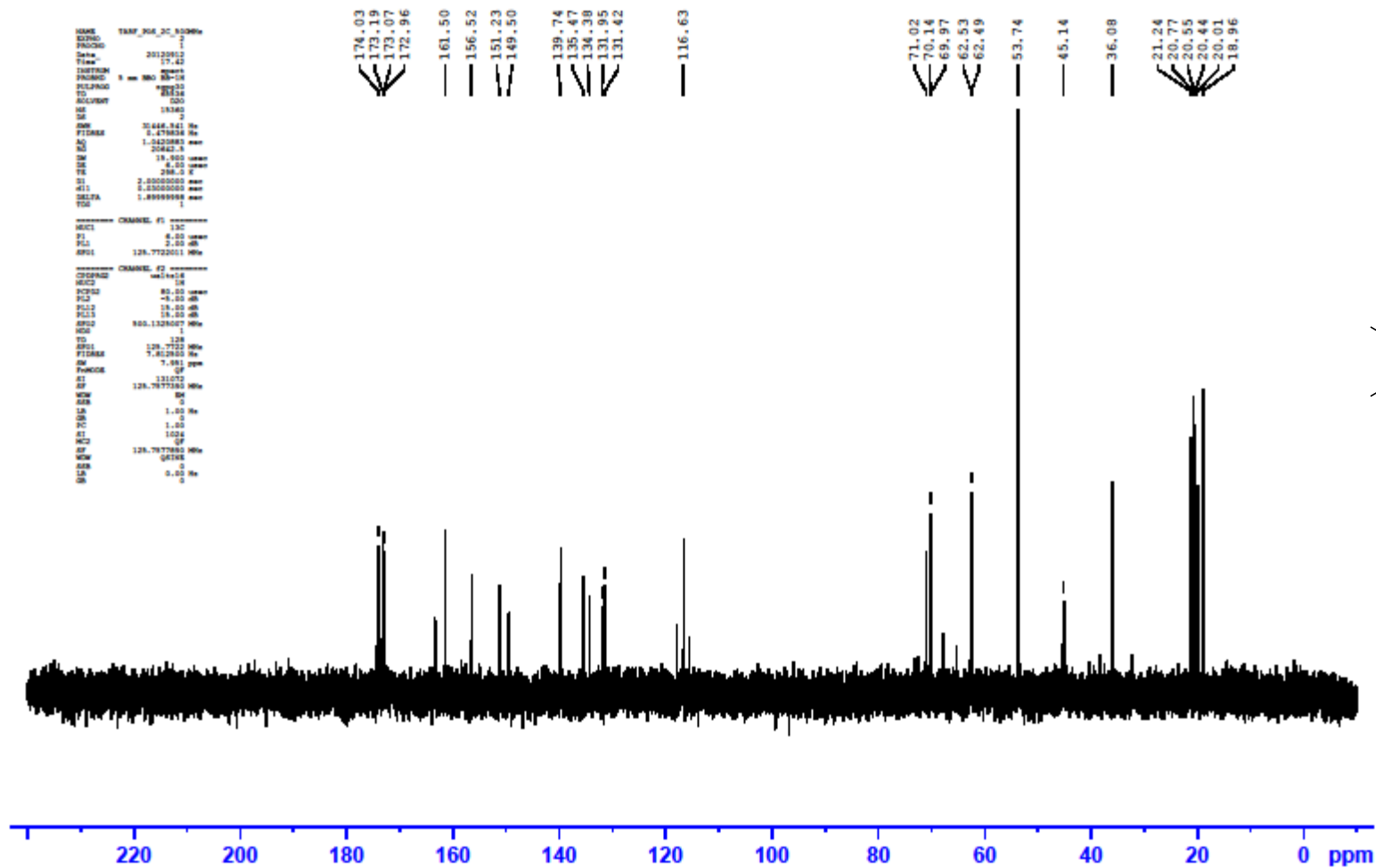
Espectro de massas de alta resolução da **TARF-Ácido**



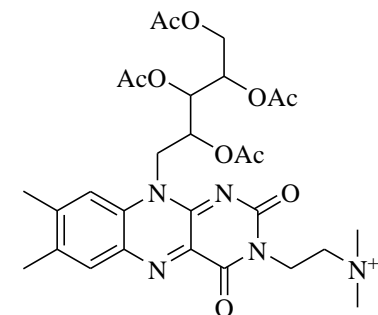
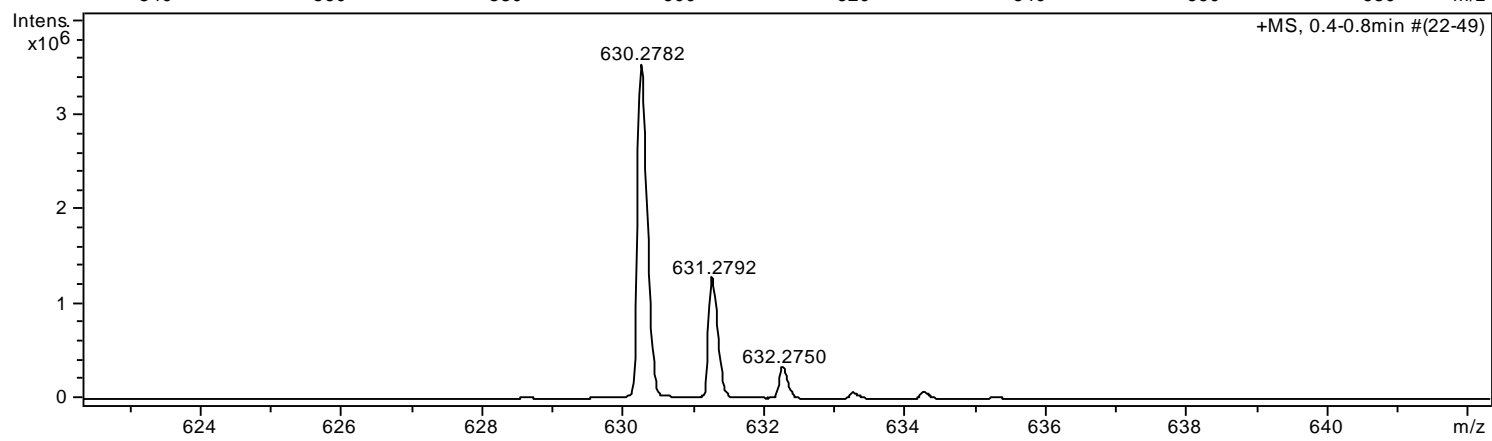
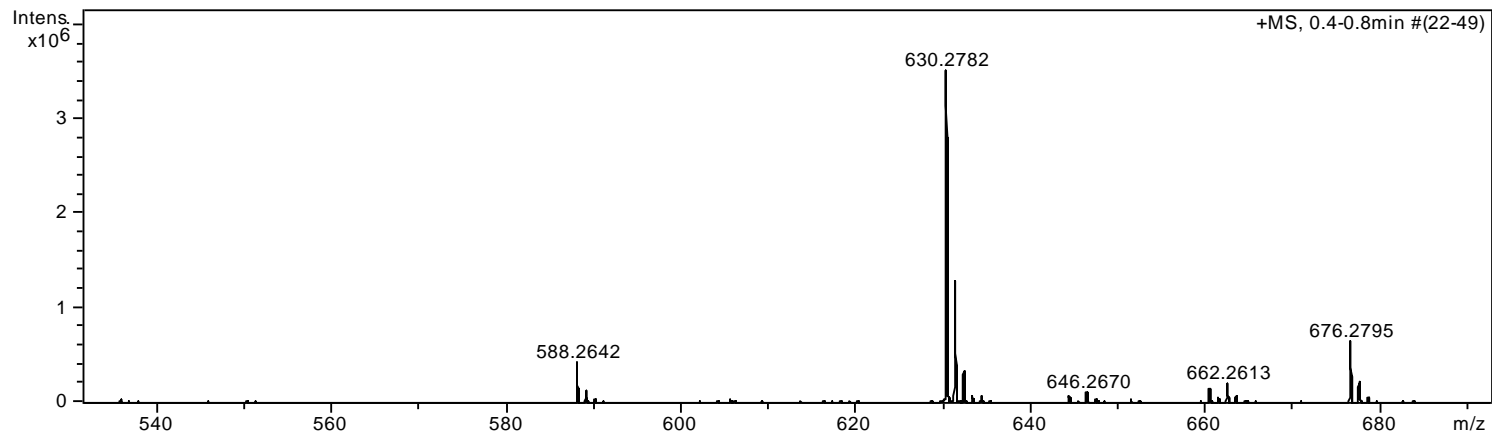
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da TARF-Catiônica



Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da **TARF-Catiônica**



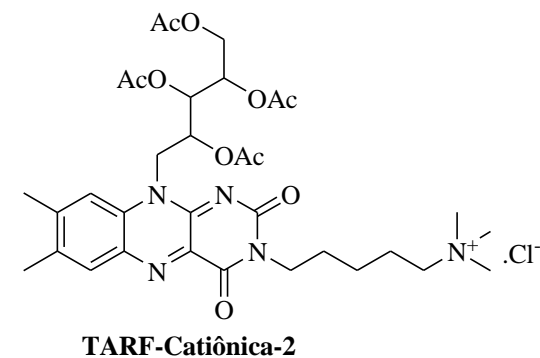
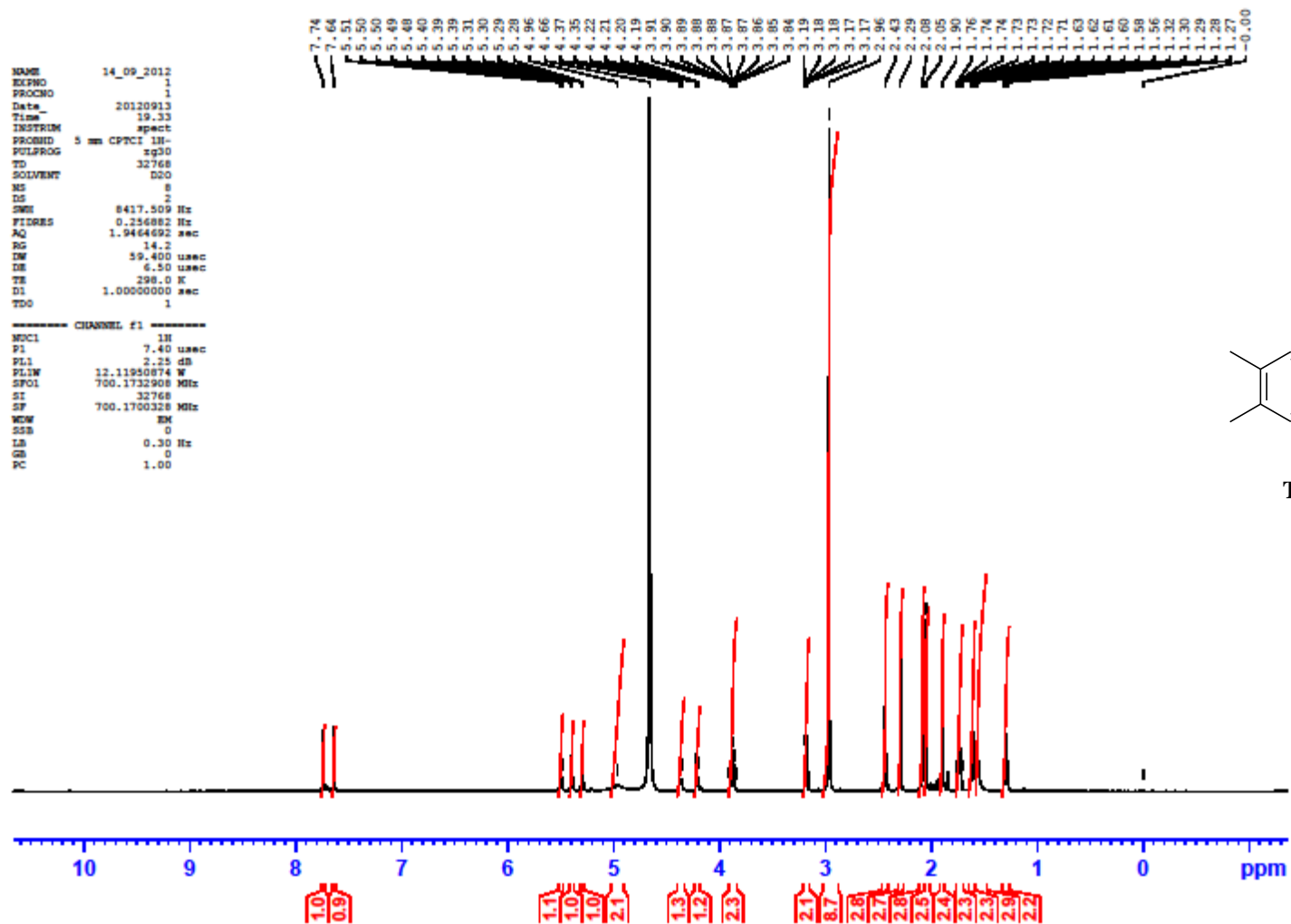
Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, D_2O) da **TARF-Catiônica**



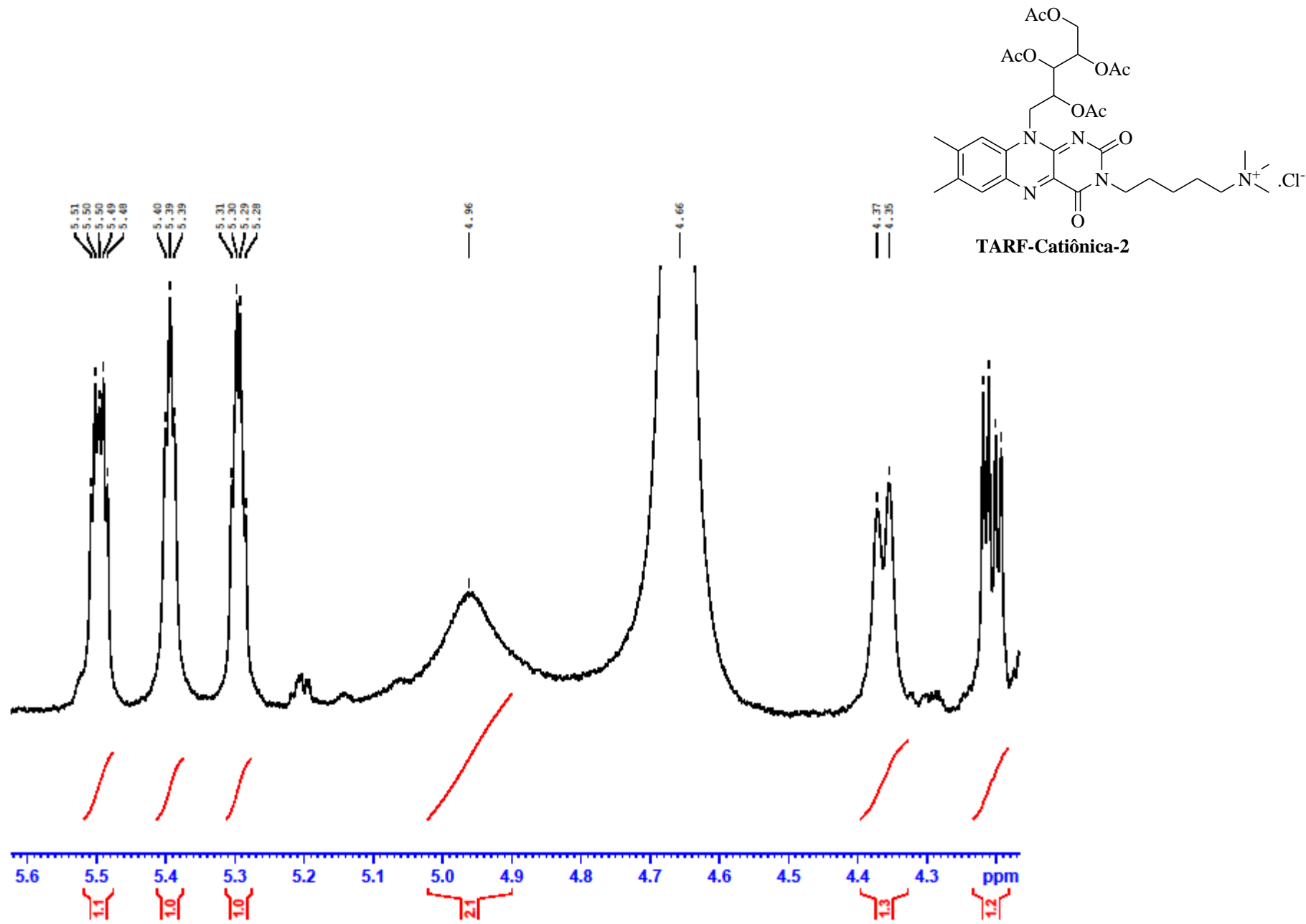
$C_{30}H_{40}N_5O_{10}^+$
Exact Mass: 630,2770

TARF-Catiônica

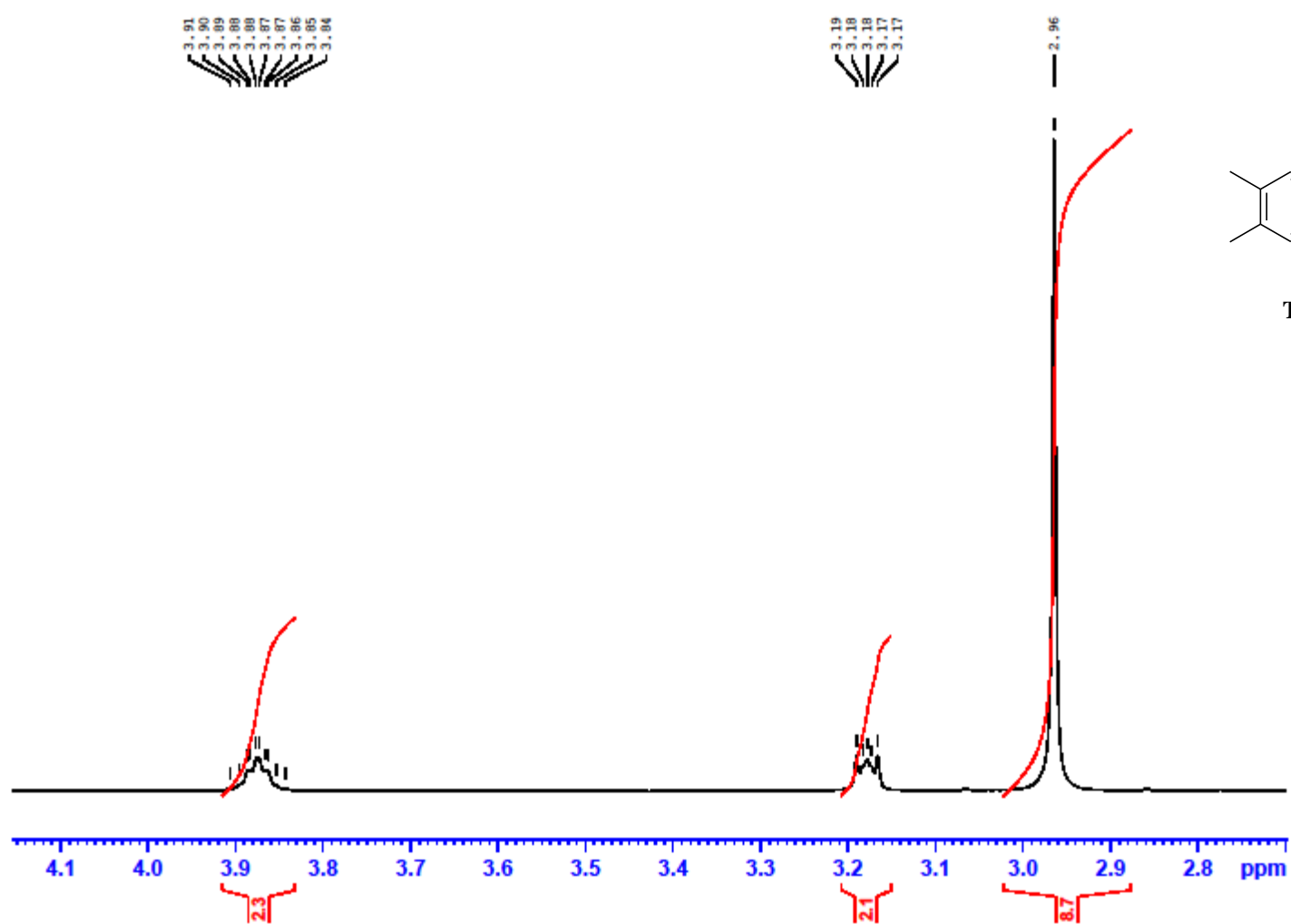
Espectro de massas de alta resolução da **TARF-Catiônica**



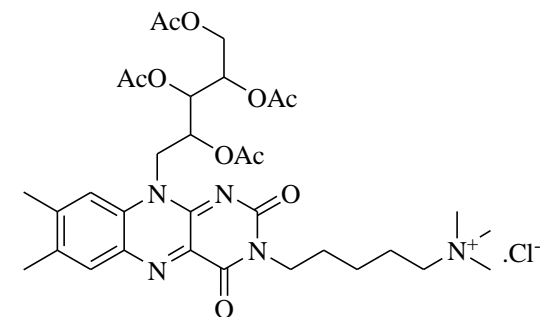
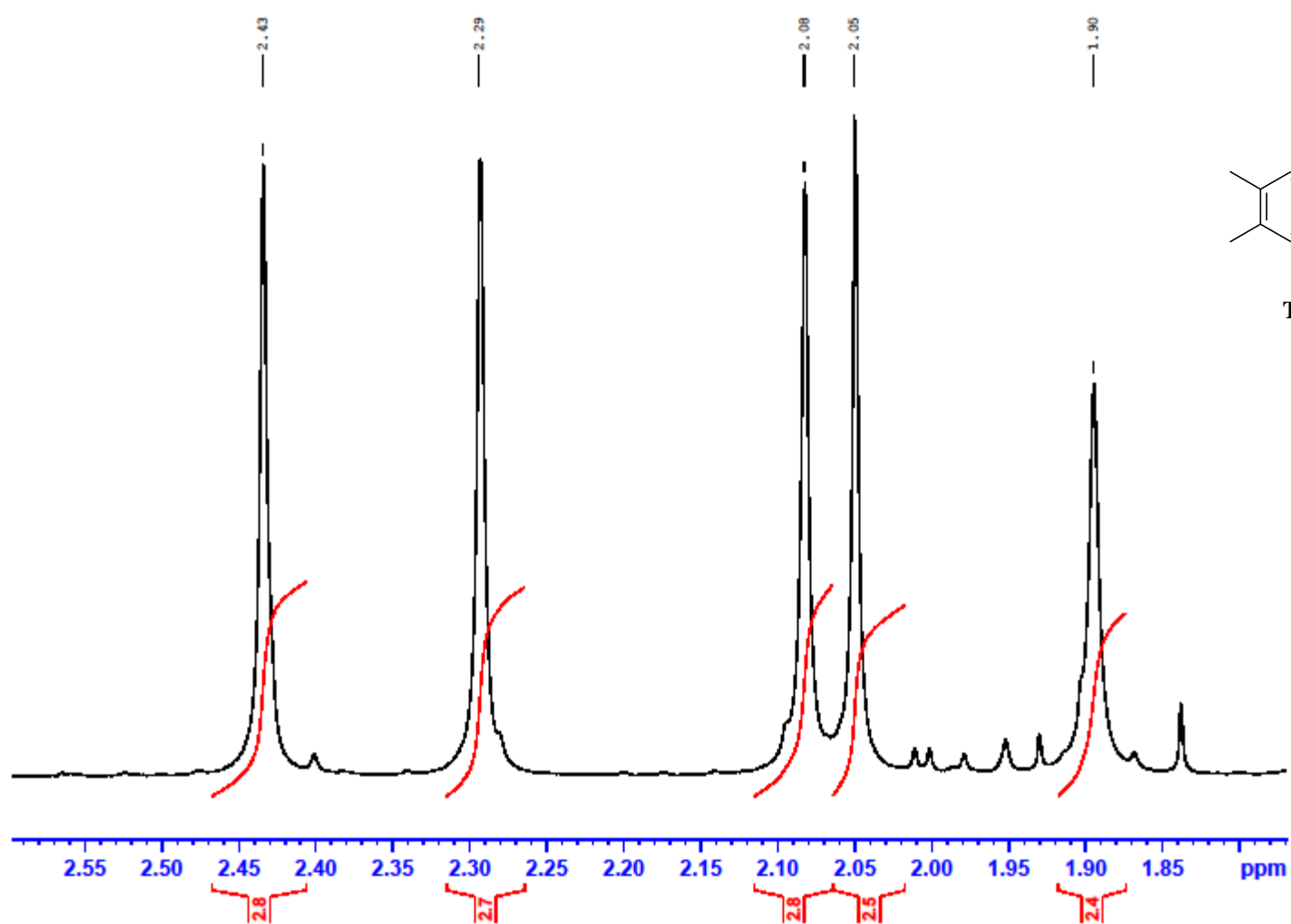
Espectro de RMN de ^1H (700 MHz, D_2O) da **TARE-Catiônica-2**



Espectro de RMN de ¹H (700 MHz, D₂O) da **TARF-Catiônica-2**

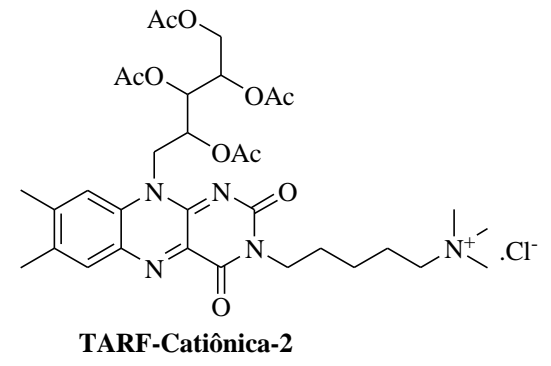
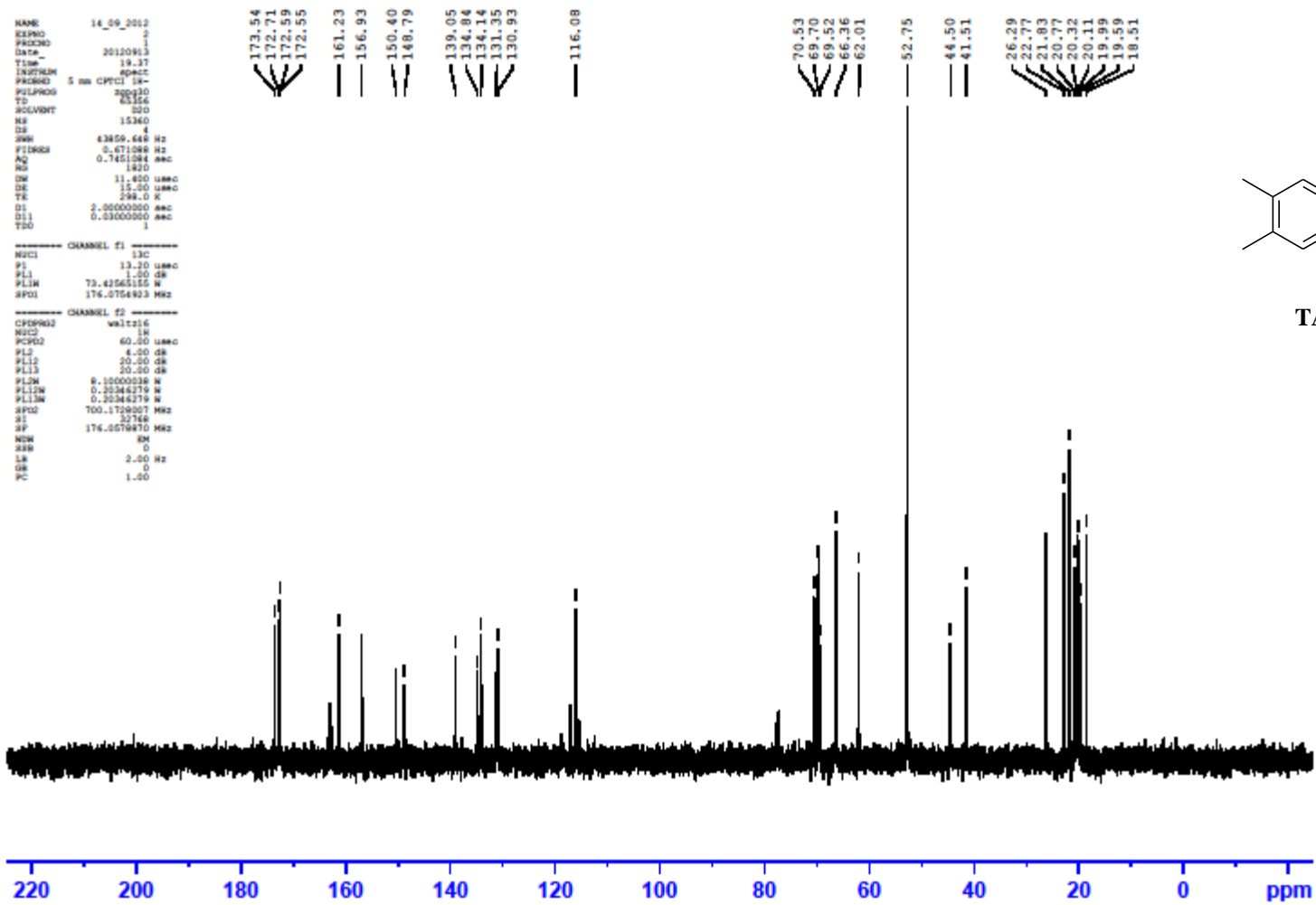


Espectro de RMN de ^1H (700 MHz, D_2O) da TARF-Catiônica-2

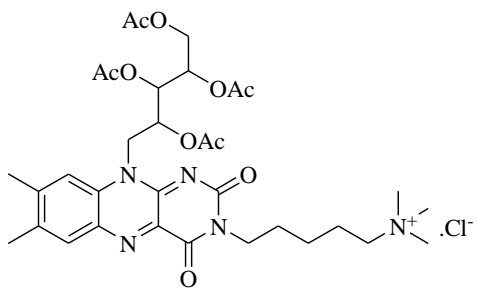


TARF-Catiônica-2

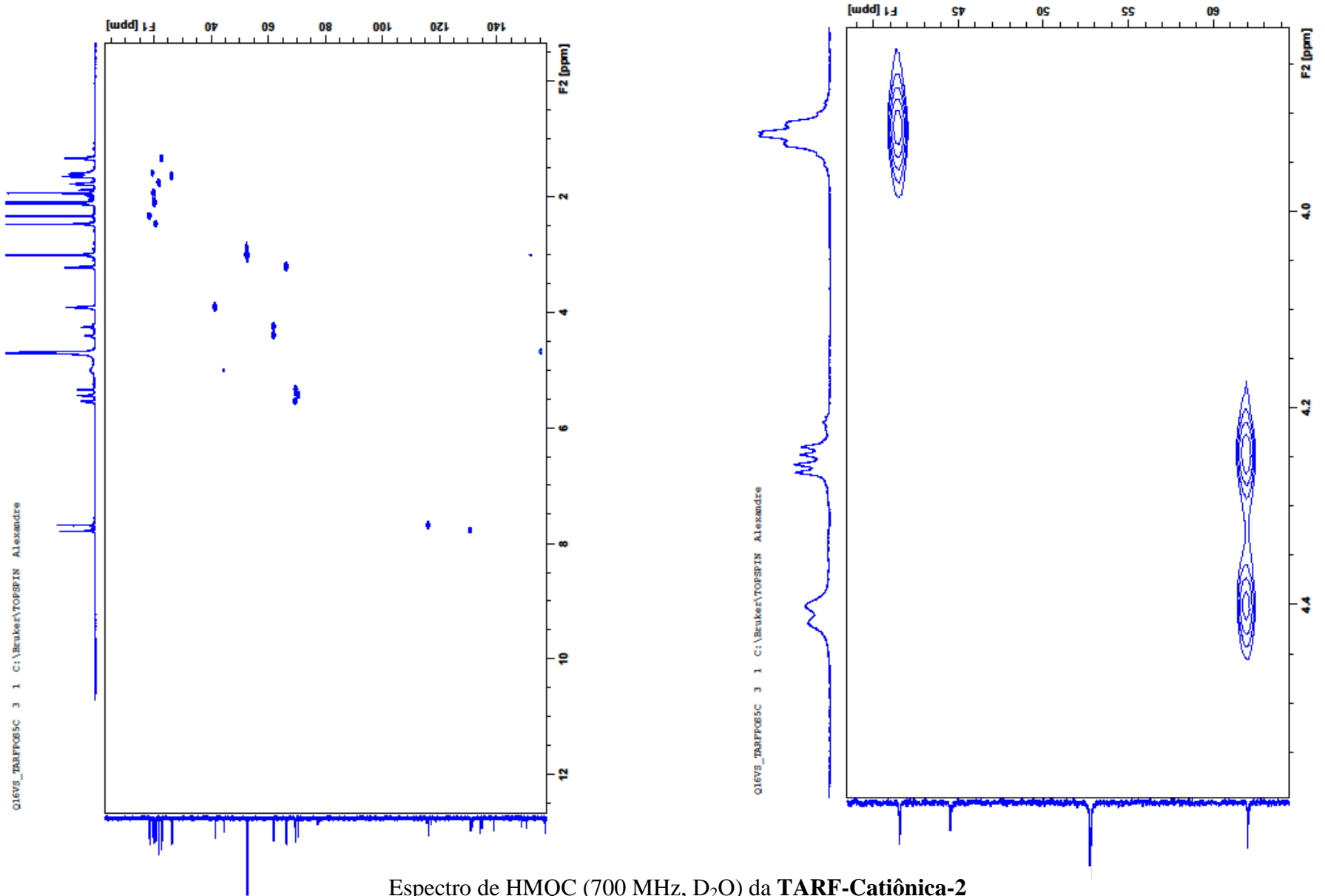
Espectro de RMN de ^1H (700 MHz, D_2O) da **TARF-Catiônica-2**



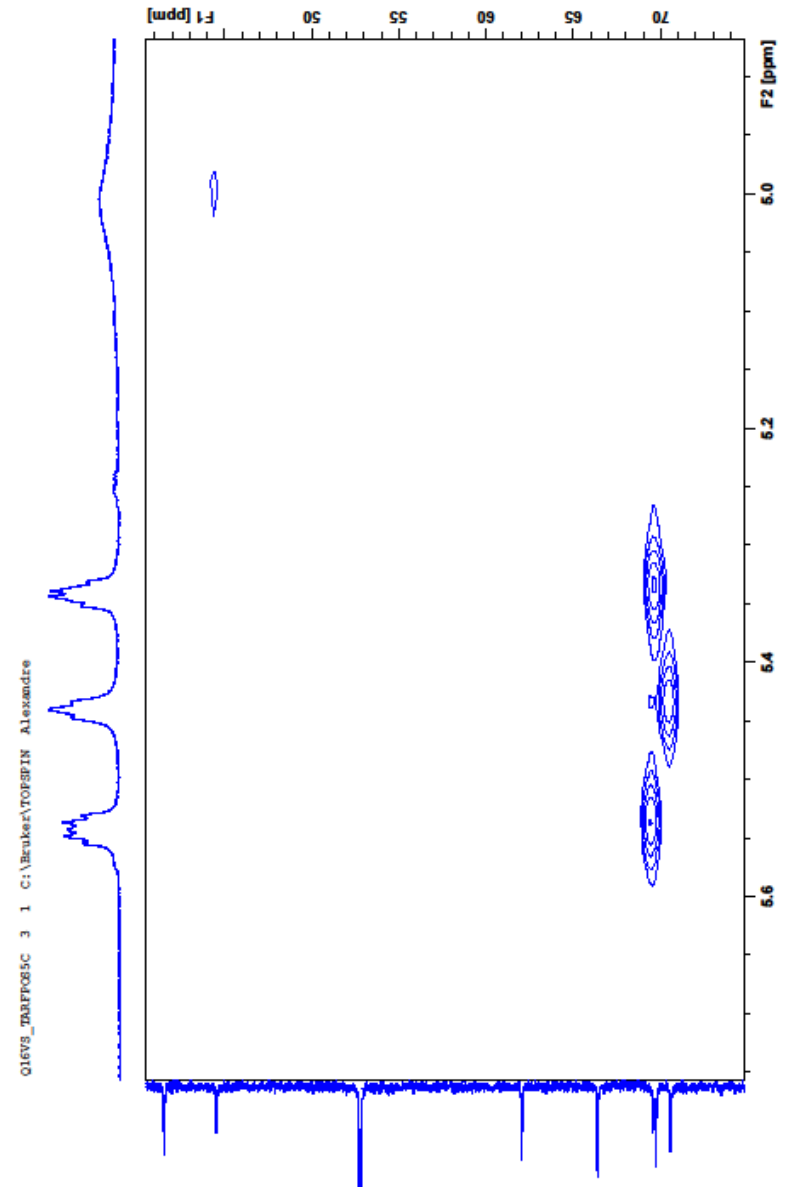
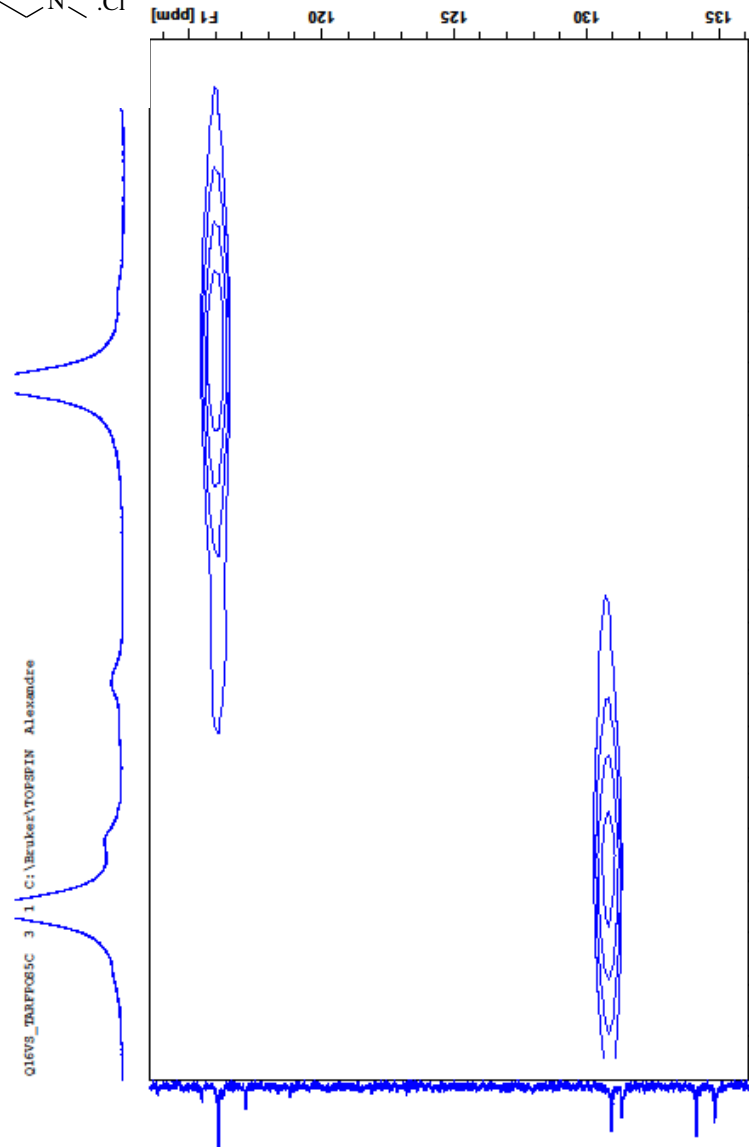
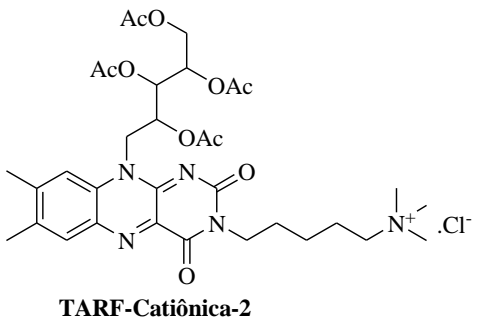
Espectro de RMN de ¹³C (175 MHz, D₂O) da **TARE-Catiônica-2**



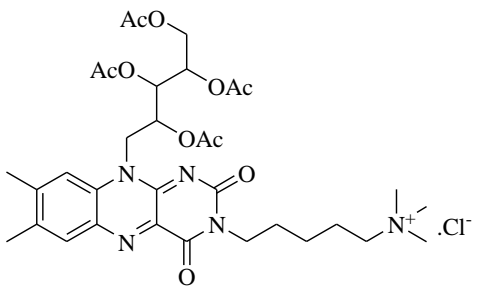
TARE-Catiônica-2



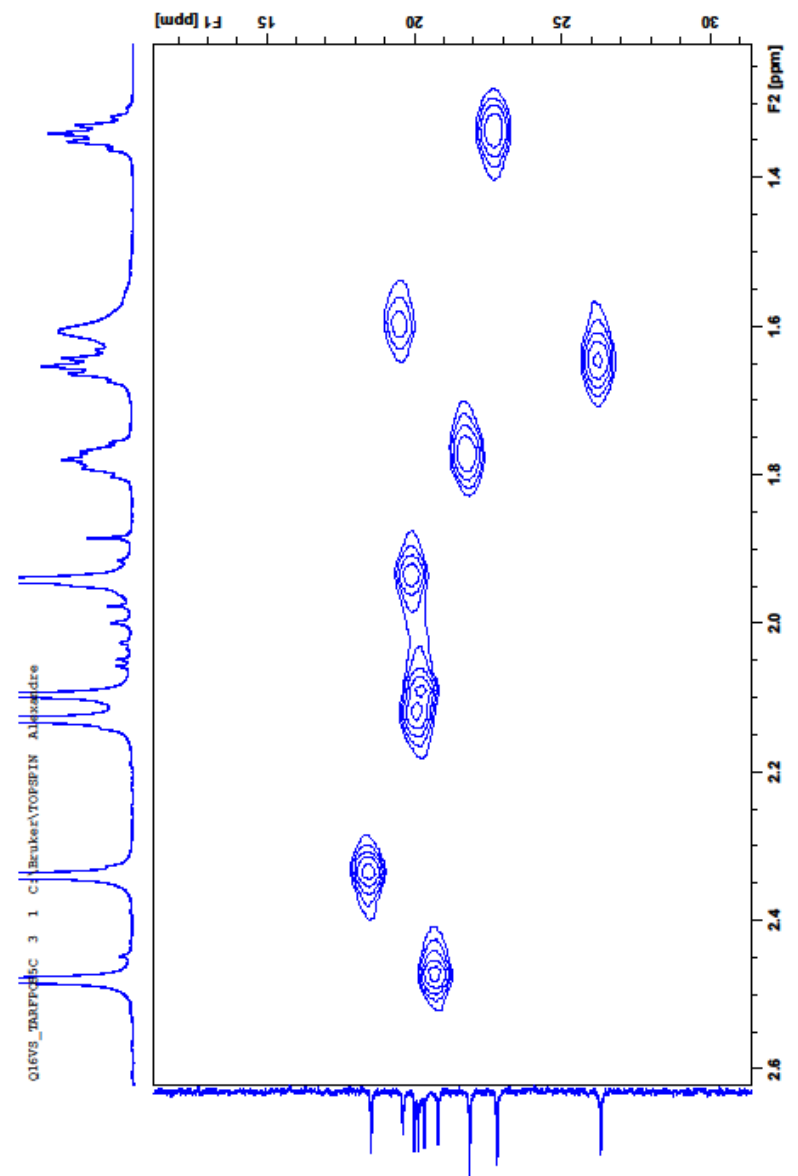
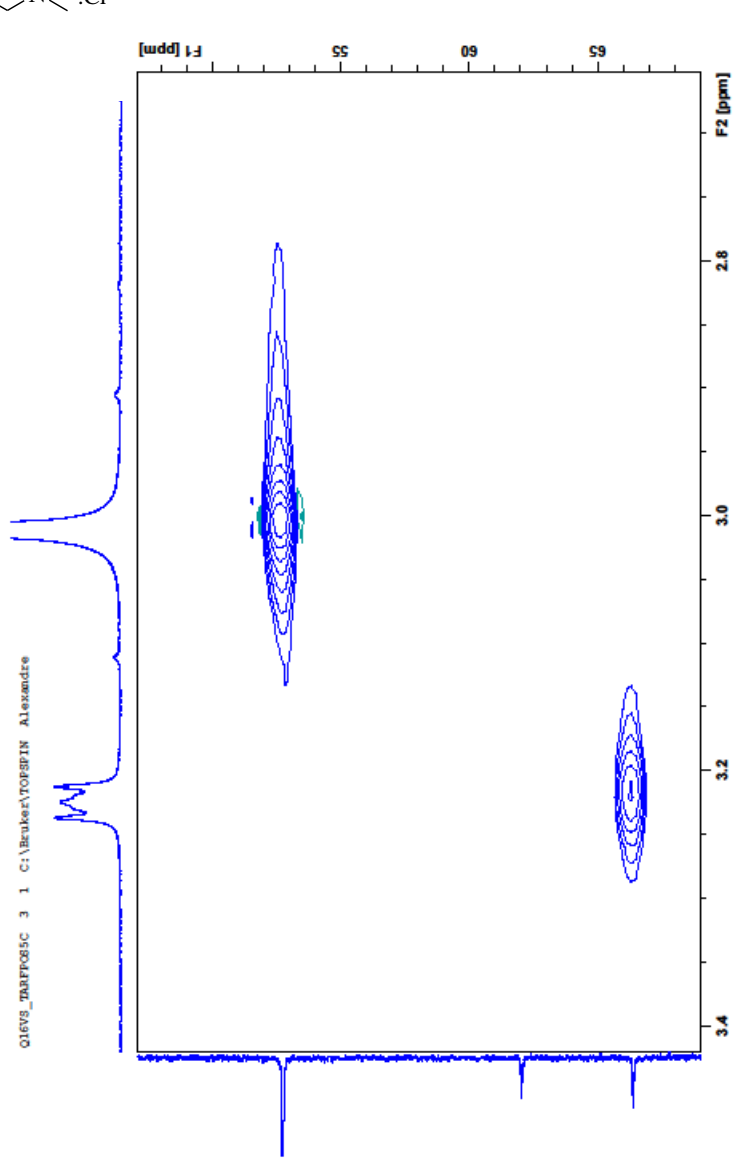
Espectro de HMQC (700 MHz, D₂O) da TARE-Catiônica-2



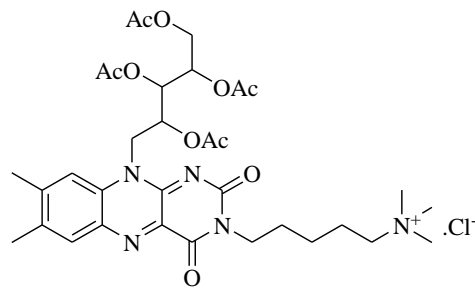
Espectro de HMQC (700 MHz, D₂O) da **TARF-Catiônica-2**



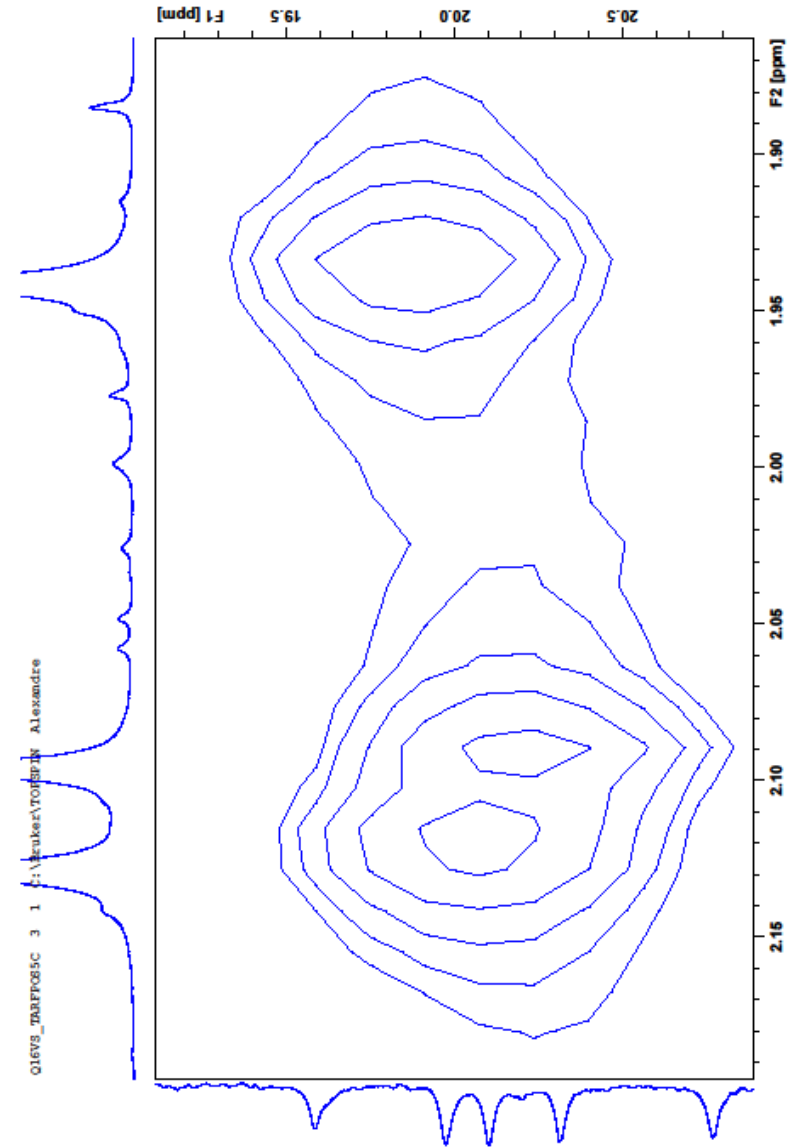
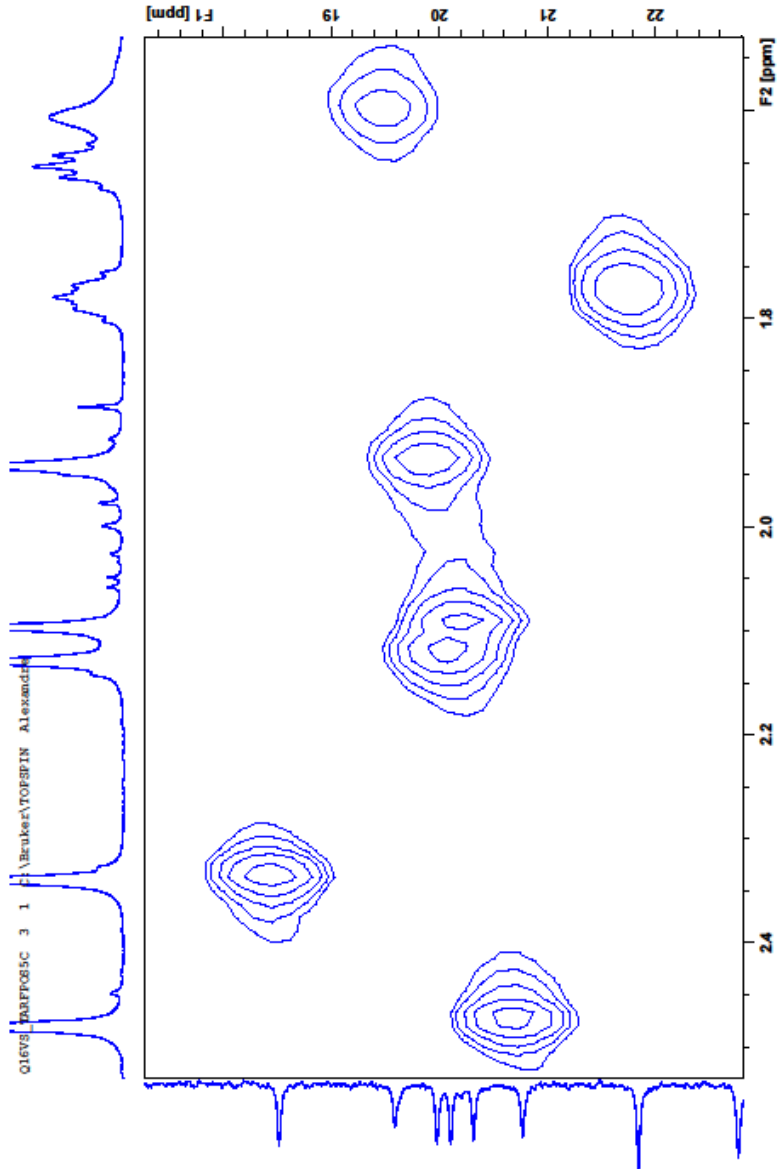
TARG-Catiônica-2



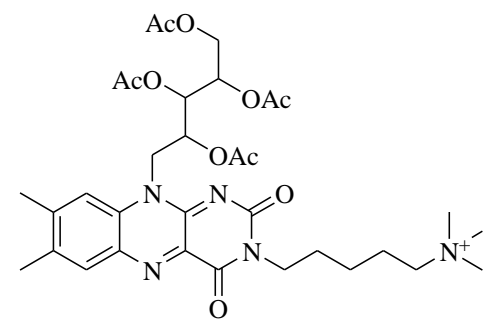
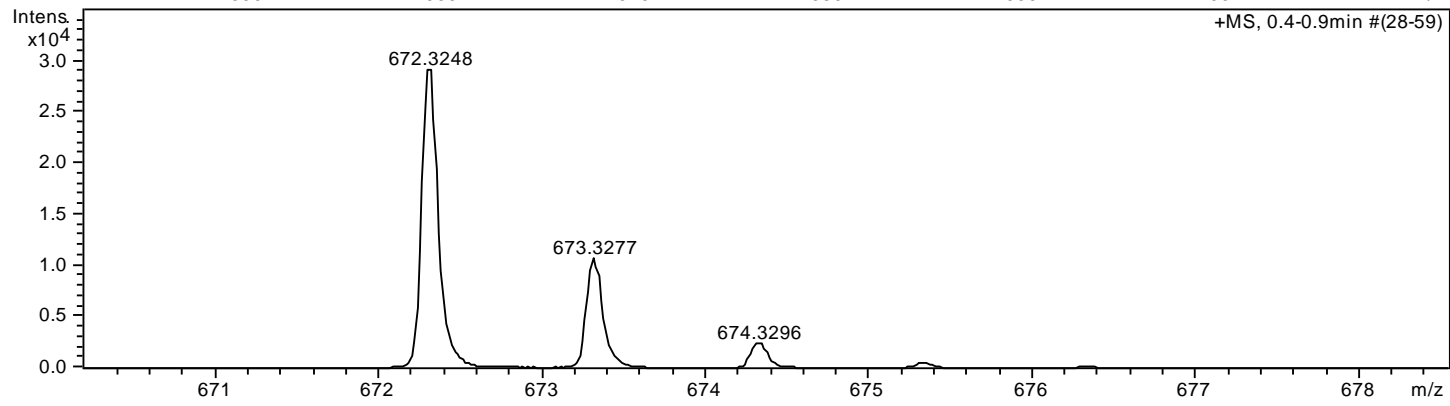
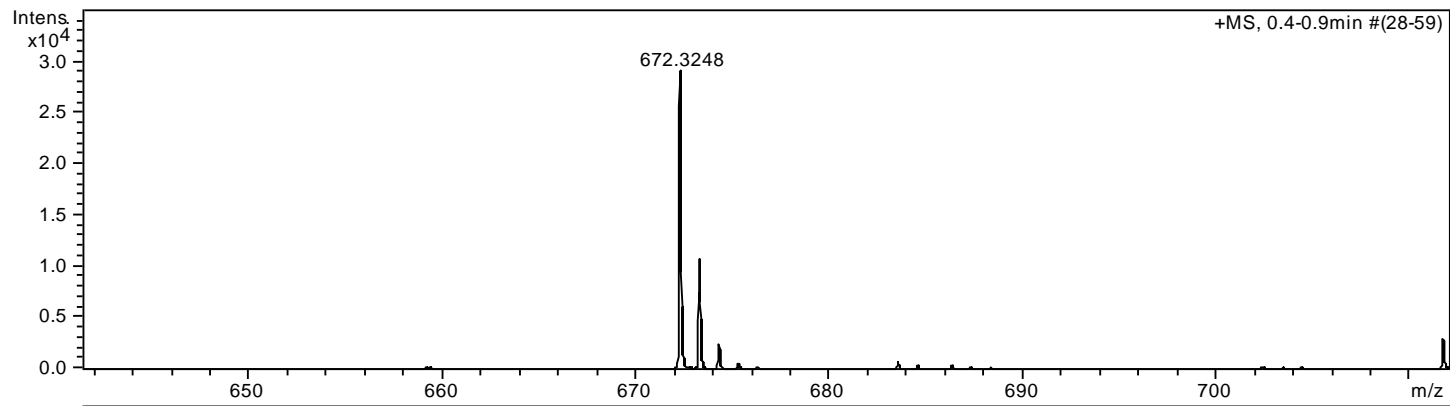
Espectro de HMQC (700 MHz, D₂O) da TARG-Catiônica-2



TARF-Catiônica-2



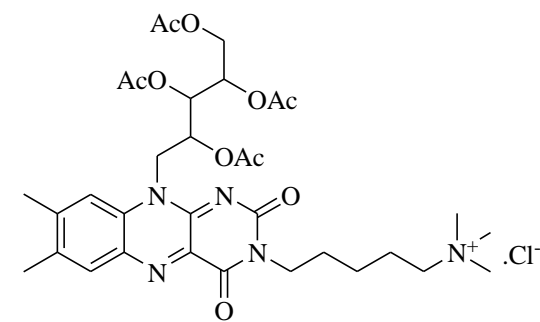
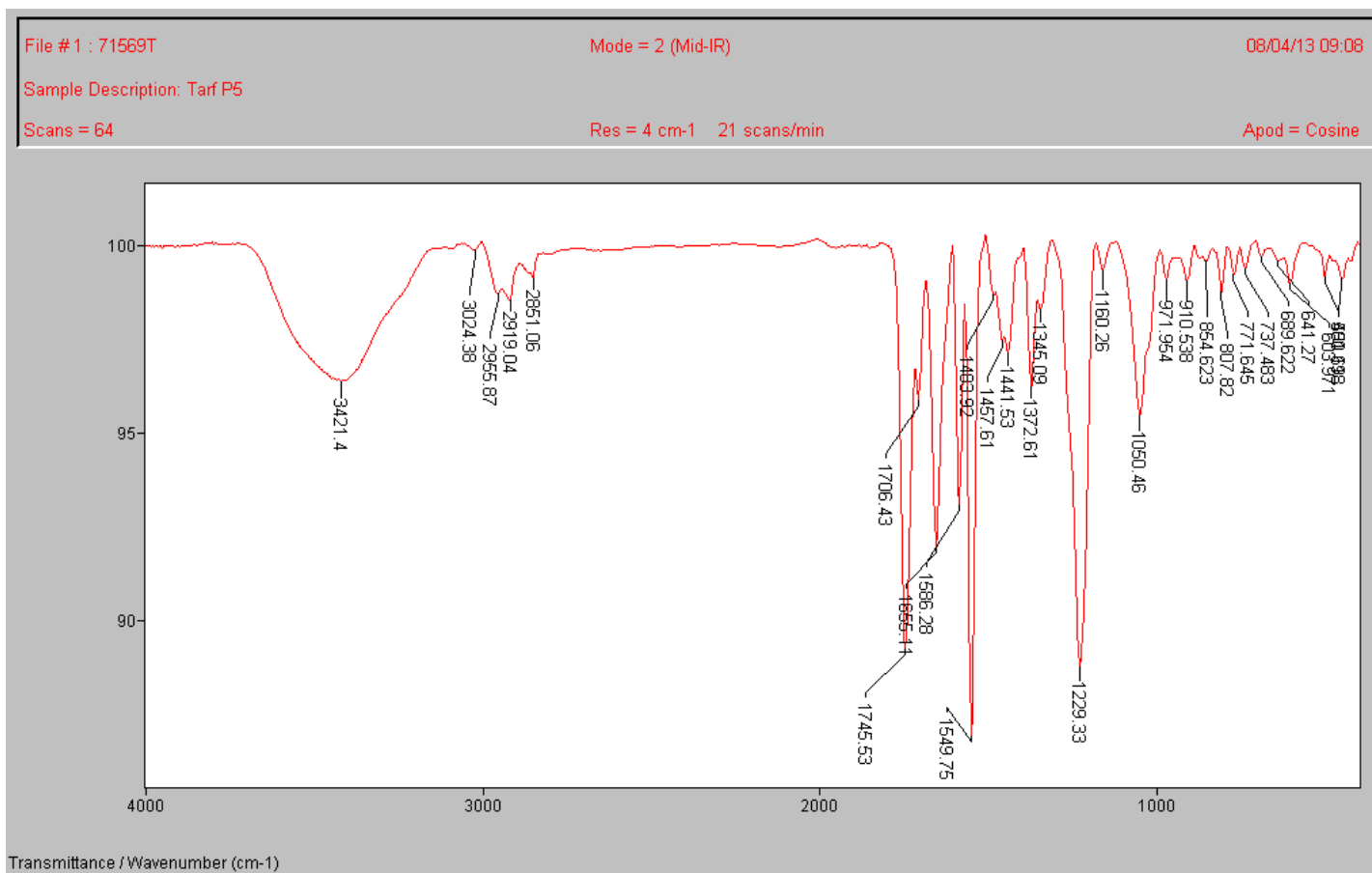
Espectro de HMQC (700 MHz, D_2O) da **TARF-Catiônica-2**



$C_{33}H_{46}N_5O_{10}^+$
 Exact Mass: 672,3239

TARF-Catiônica-2

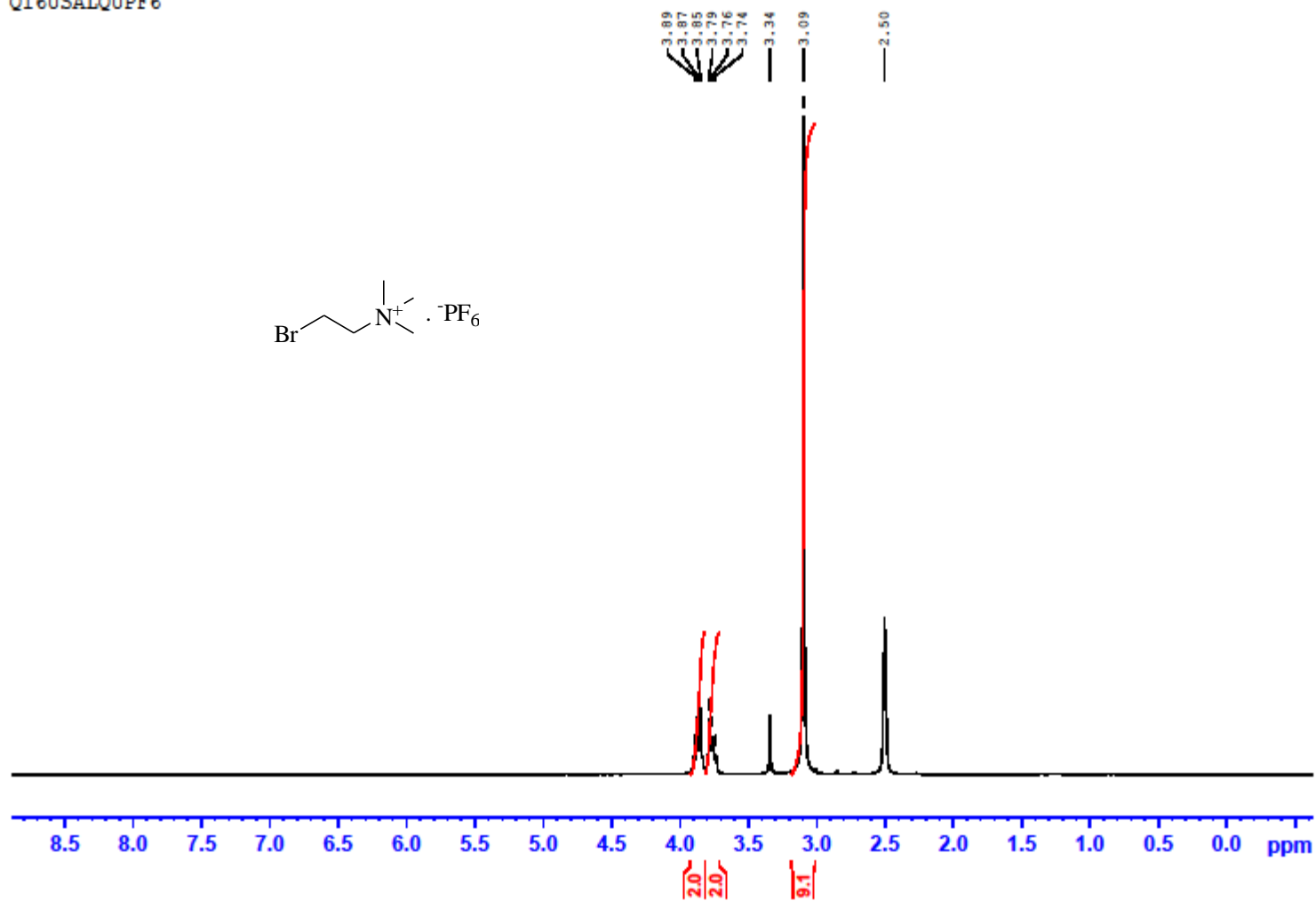
Espectro de massas de alta resolução da **TARF-Catiônica-2**



TARF-Catiônica-2

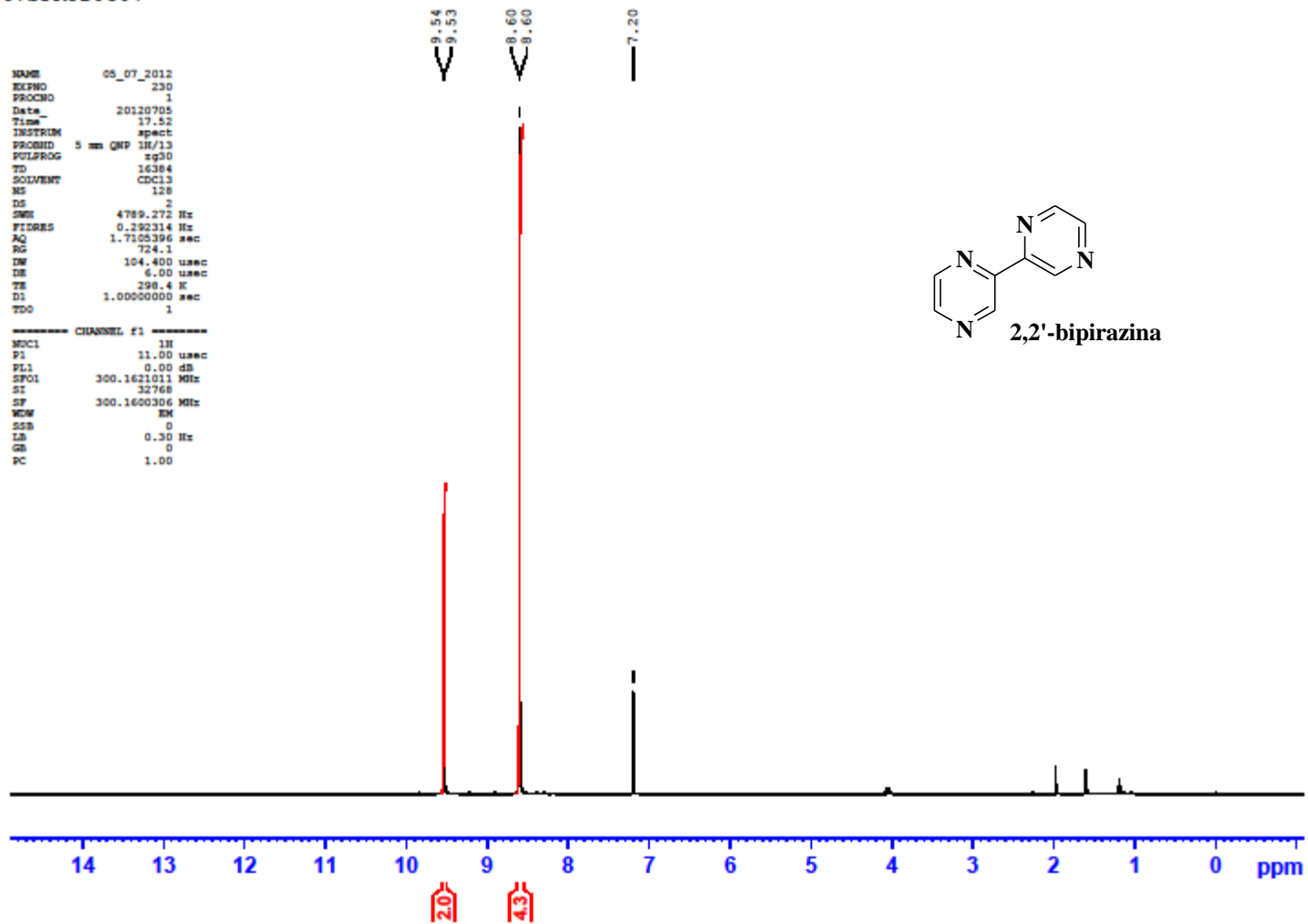
Espectro de infravermelho da **TARF-Catiônica-2**

Q16USALQUPF6

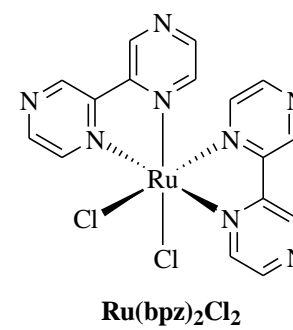
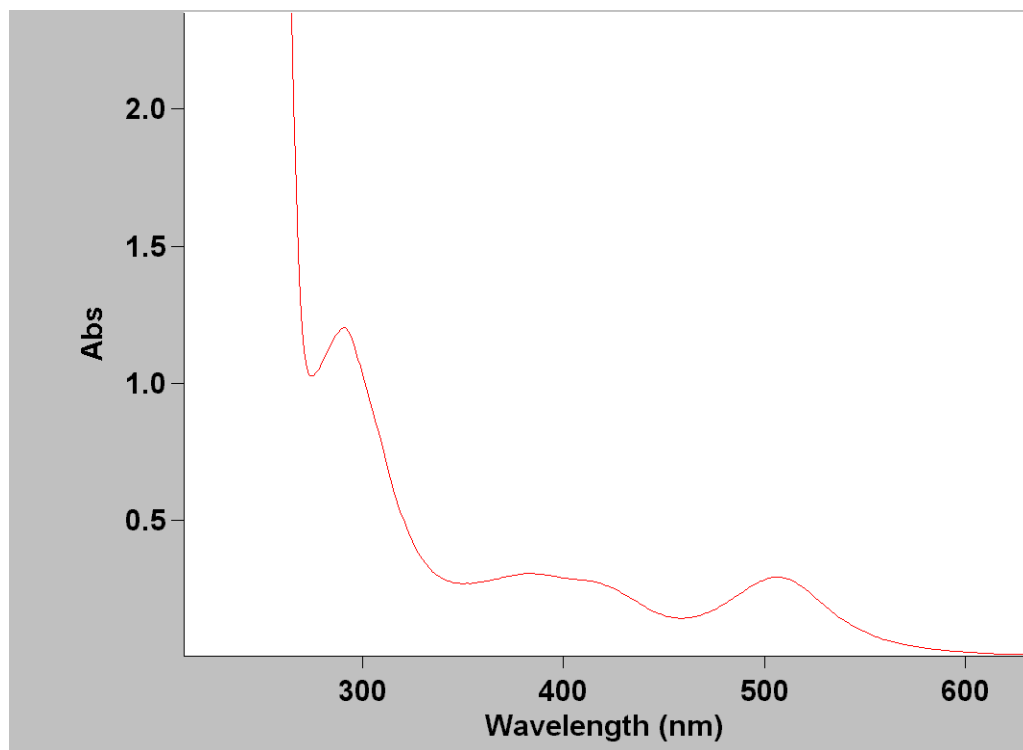


Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO) da hexaflúorfosfato de (2-bromoetil)-trimetil-amônio

Q16VSPROD0507

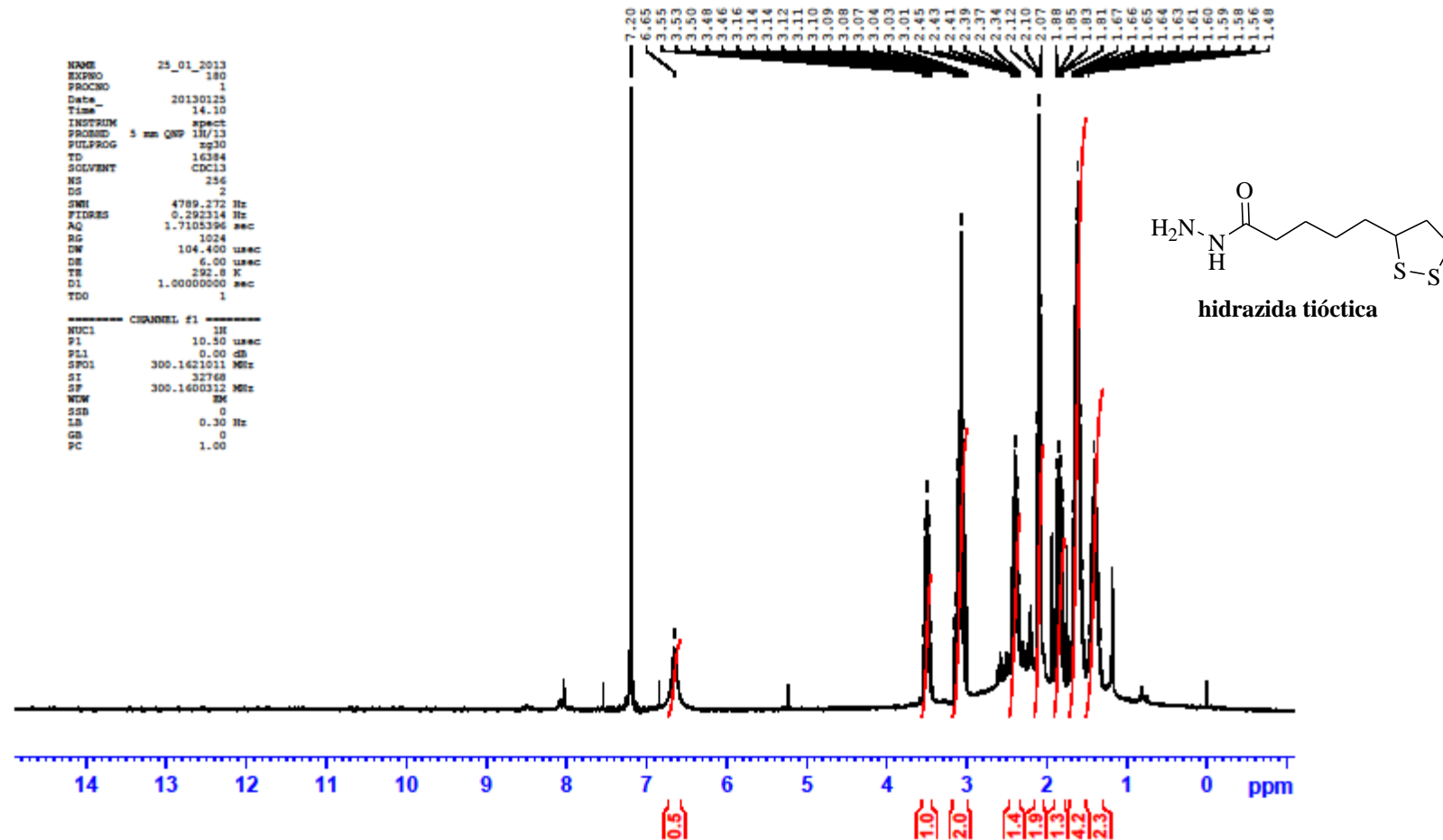


Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 2,2'-bipirazina



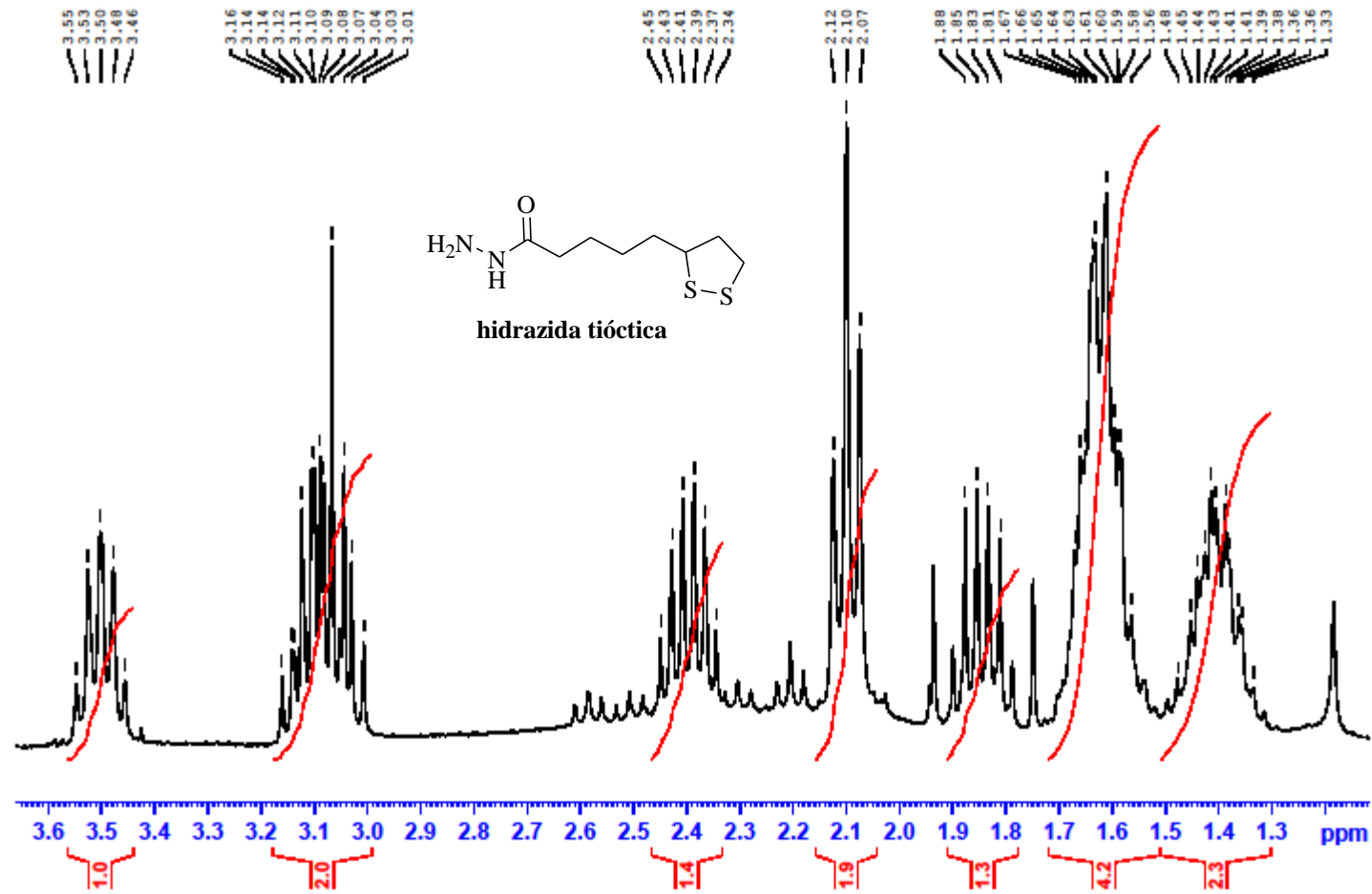
Espectro de absorção UV-Vis da **Ru(bpz)₂Cl₂**

A16VS250113



Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da hidrazida tióctica

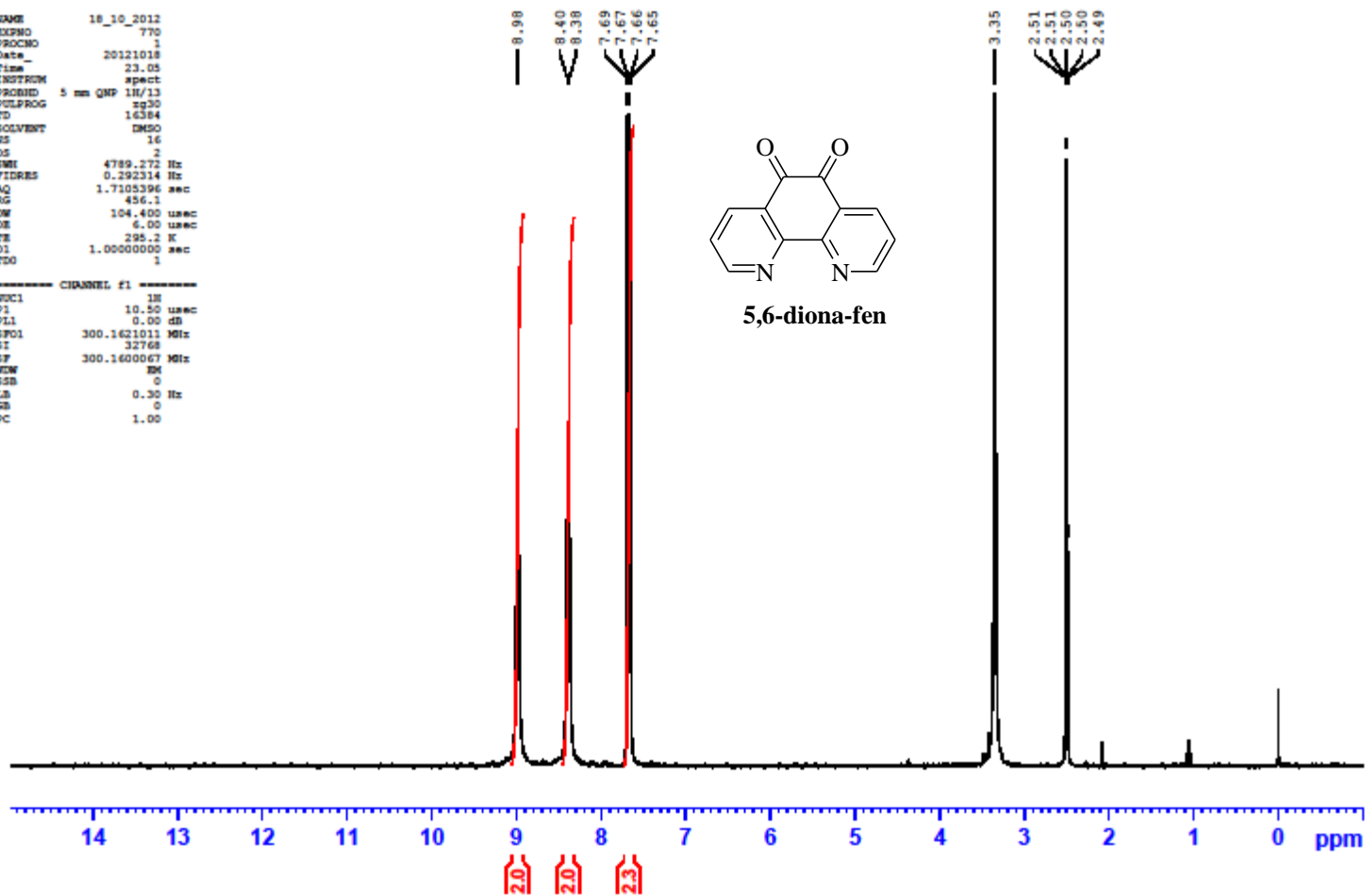
A16VS250113



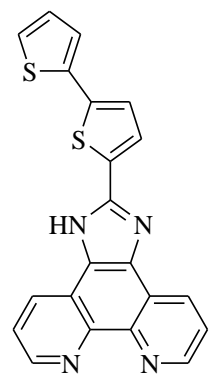
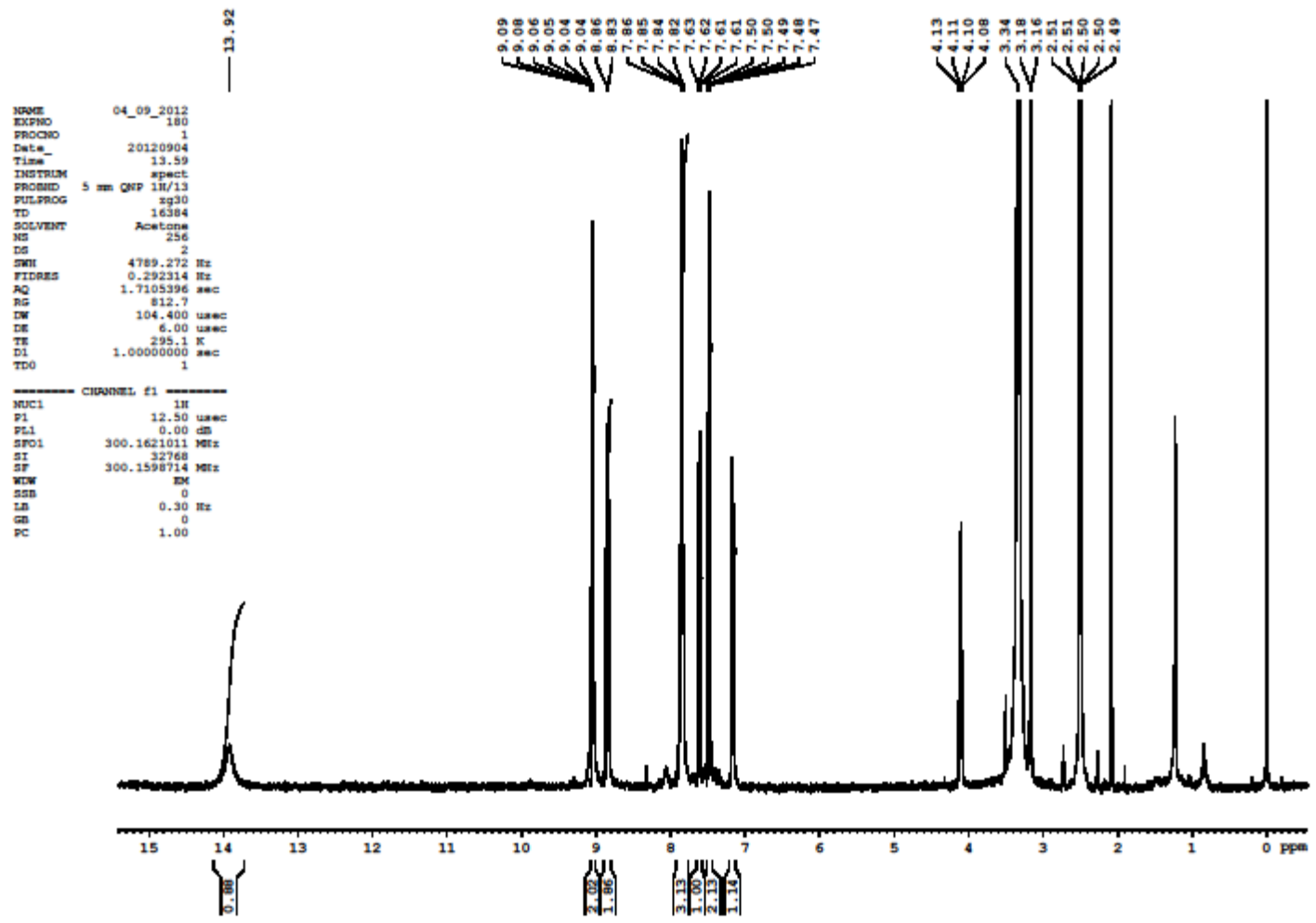
Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) da **hidrazida tióctica**

Q16VS-DION1810

```
NAME      18_10_2012
EXPNO     770
PROCNO    1
DATA_     20121018
Time      23.05
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   zg30
TD        14384
SOLVENT   DMSO
NS         16
DS         2
SWH        4789.272 Hz
FIDRES    0.292314 Hz
AQ         1.7105396 sec
RG         456.1
DW         104.400 usec
DE         6.00 usec
TE         295.2 K
D1         1.00000000 sec
TDO        1
----- CHANNEL f1 -----
NUC1       1H
P1         10.50 usec
PL1        0.00 dB
SFO1       300.1421011 MHz
SI         32768
SF         300.1400067 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00
```

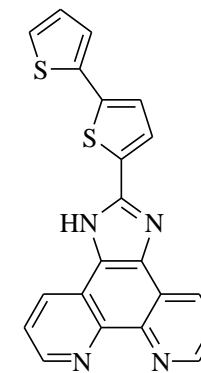
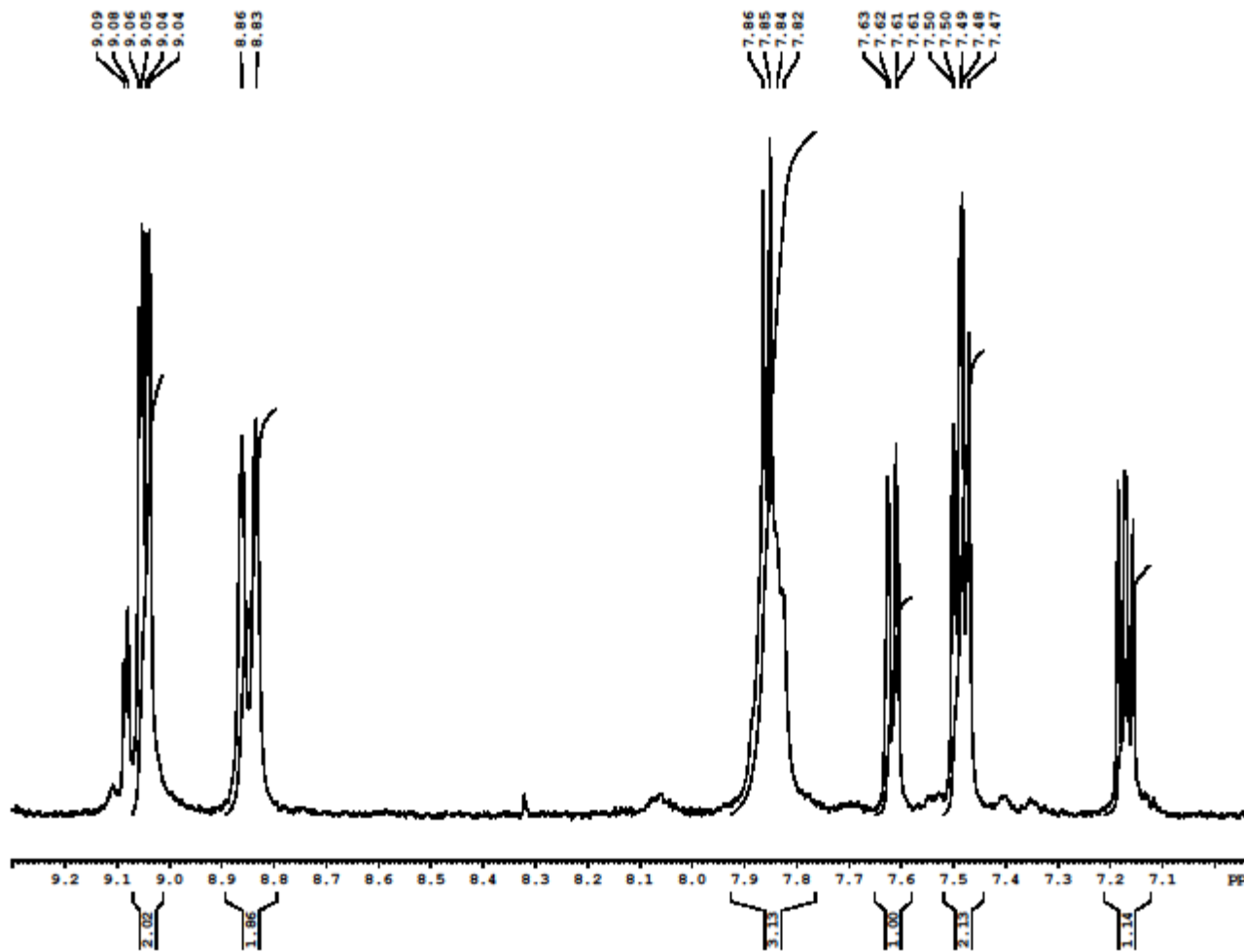


Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO) da 5,6-diona-fenantrolina



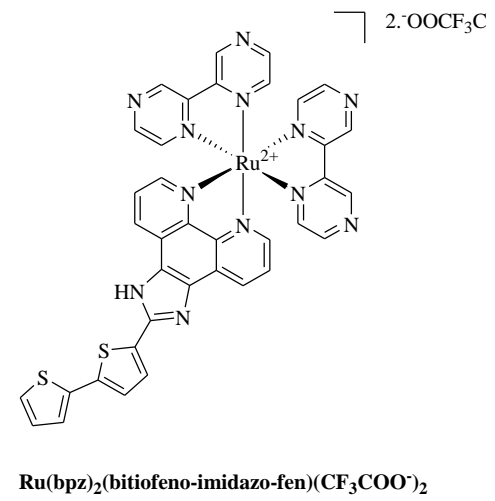
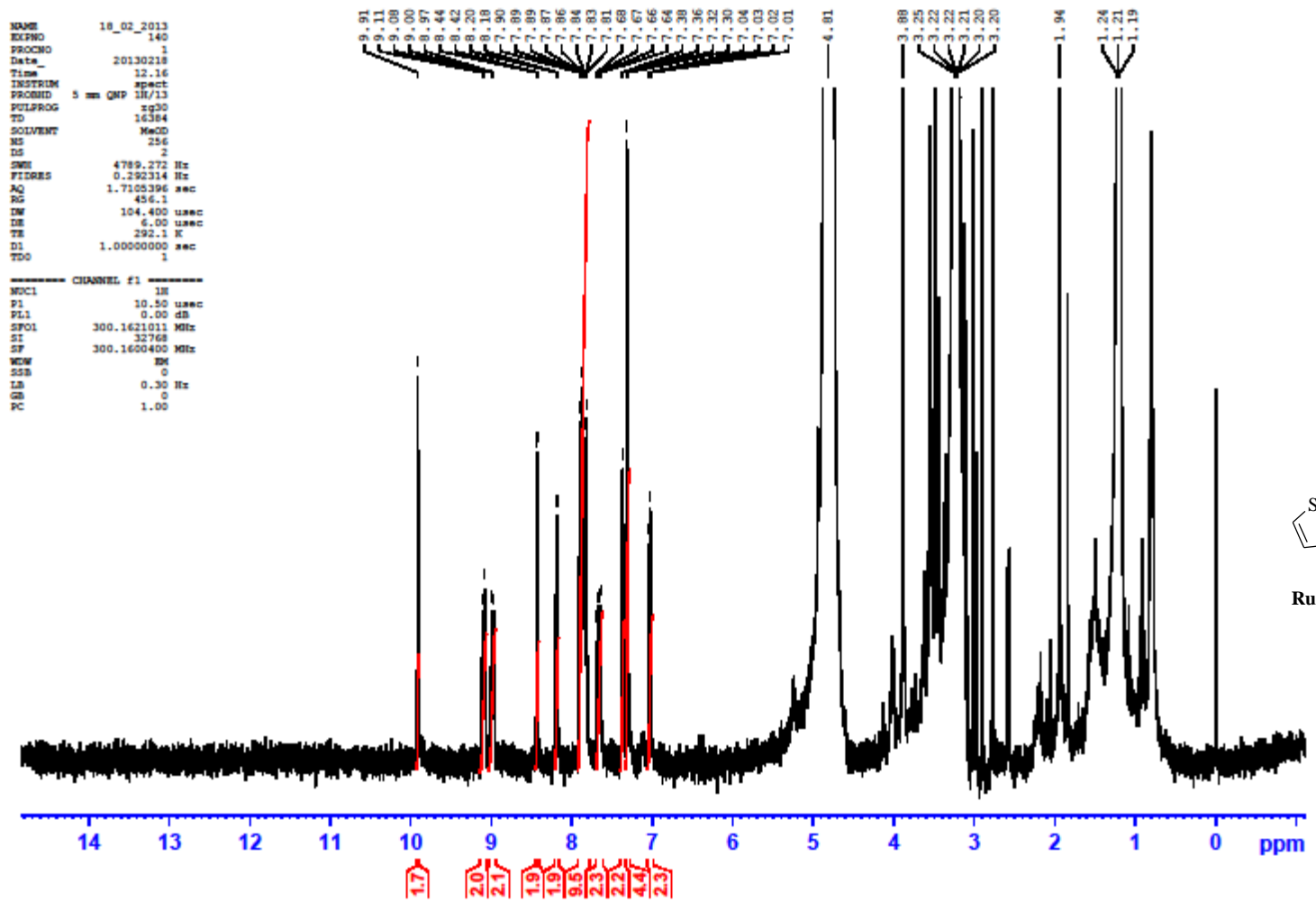
bitiofeno-imidazo-fen

Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO) da bitiofeno-imidazo-fenantrolina

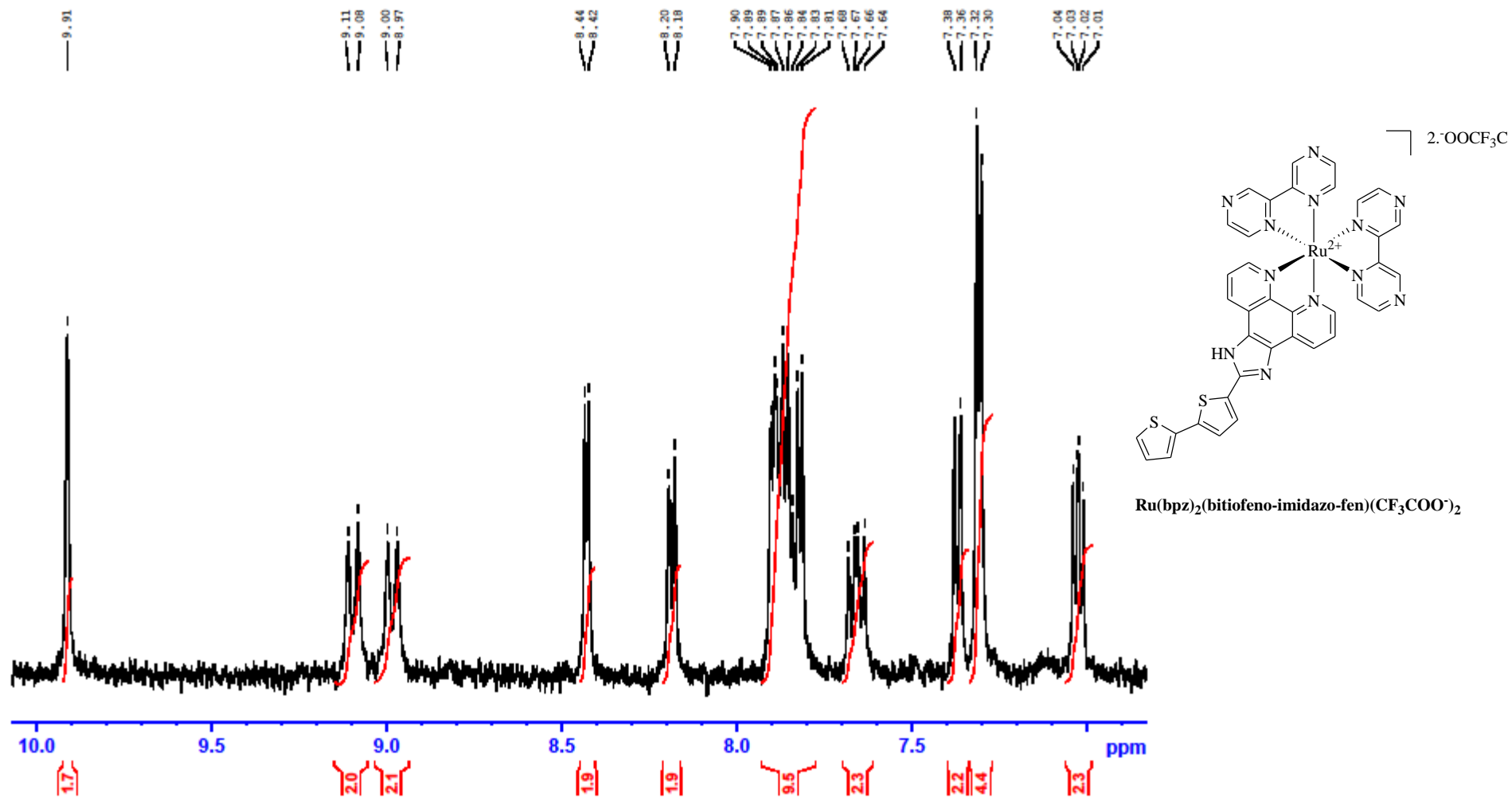


bitiofeno-imidazo-fen

Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) da bitiofeno-imidazo-fenantrolina



Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) da $\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})(\text{CF}_3\text{COO}^-)_2$

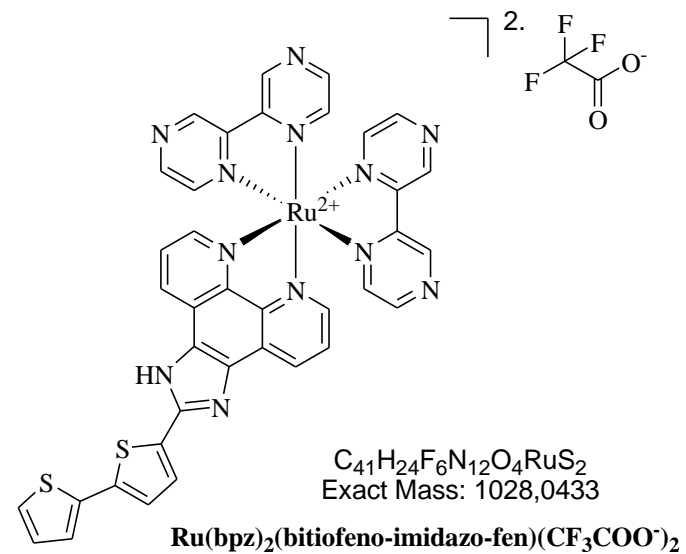
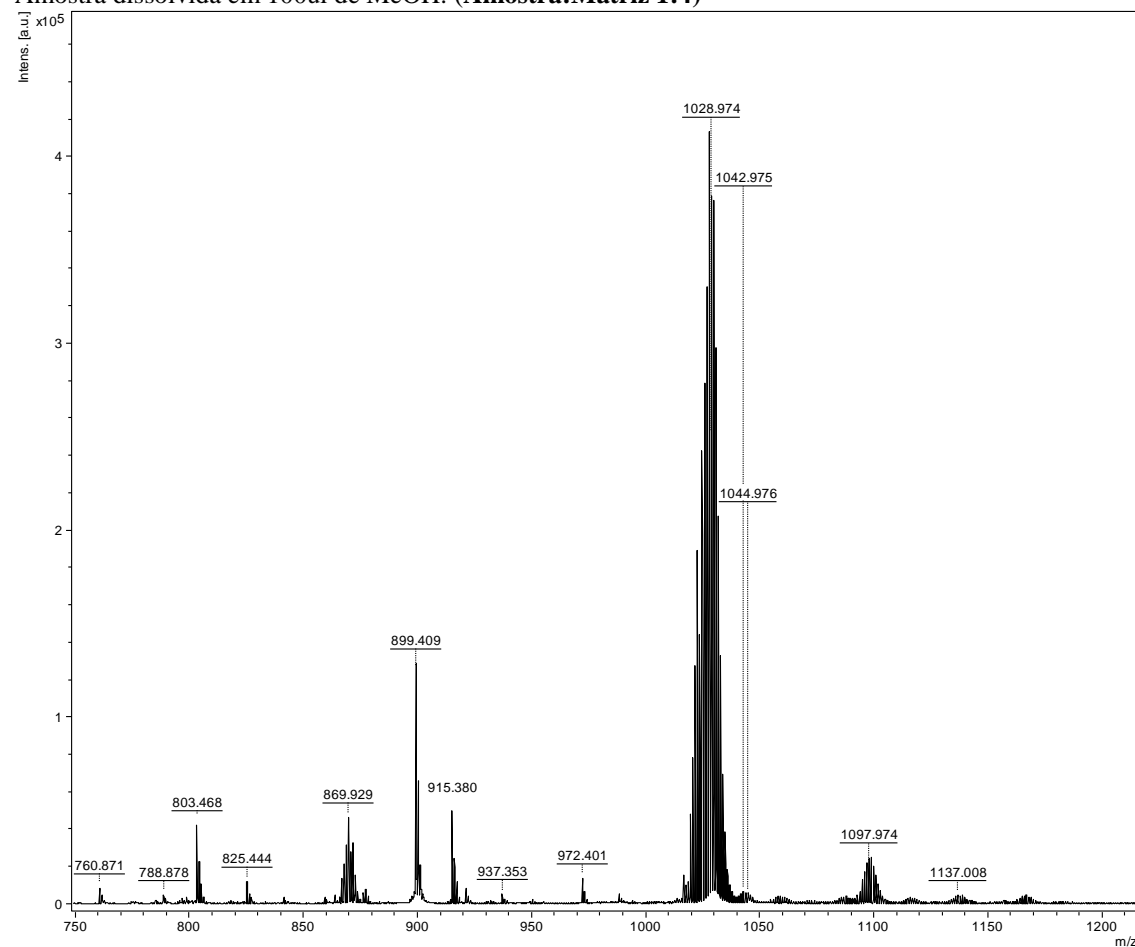


Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) da $\text{Ru}(\text{bpz})_2(\text{bitiofeno-imidazo-fen})(\text{CF}_3\text{COO})_2$

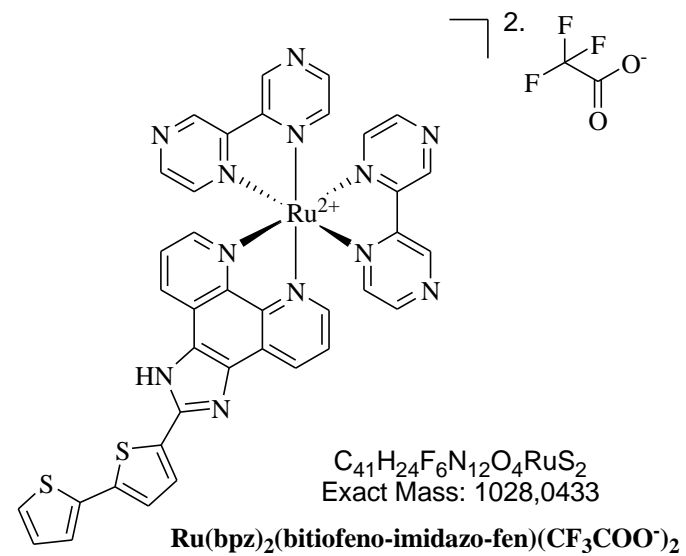
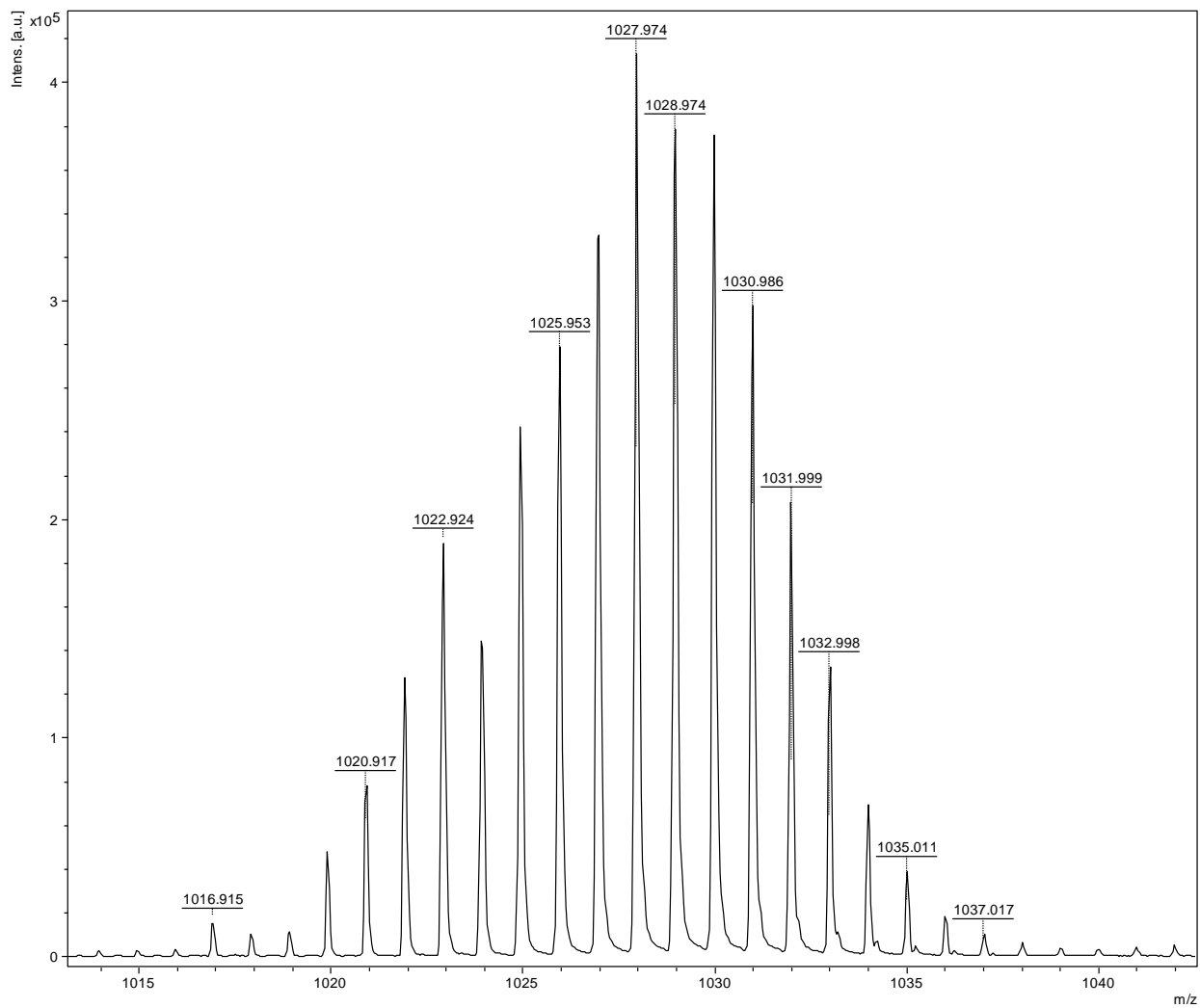
Equipamento: MALDI TOF-TOF - modelo: Ultraflextreme - Bruker

Matriz: 2,5-DHB (2,5-Dihydroxy benzoic acid - 20mg/mL em TA30) (TA30: 30% ACN/70% H₂O - 0.1% TFA)

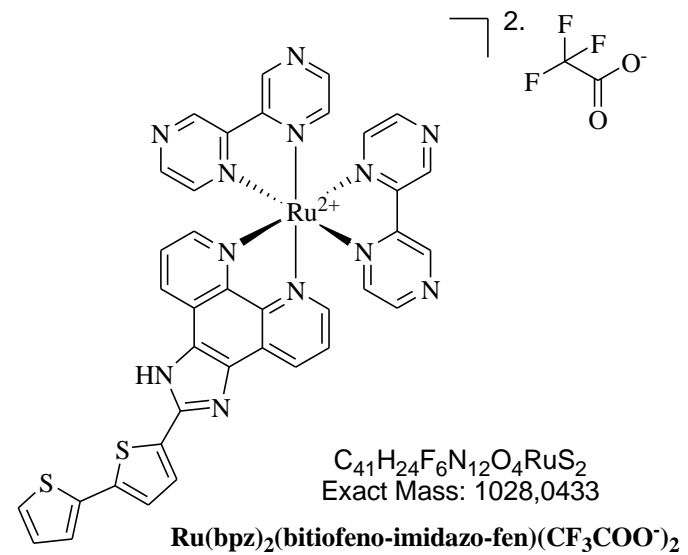
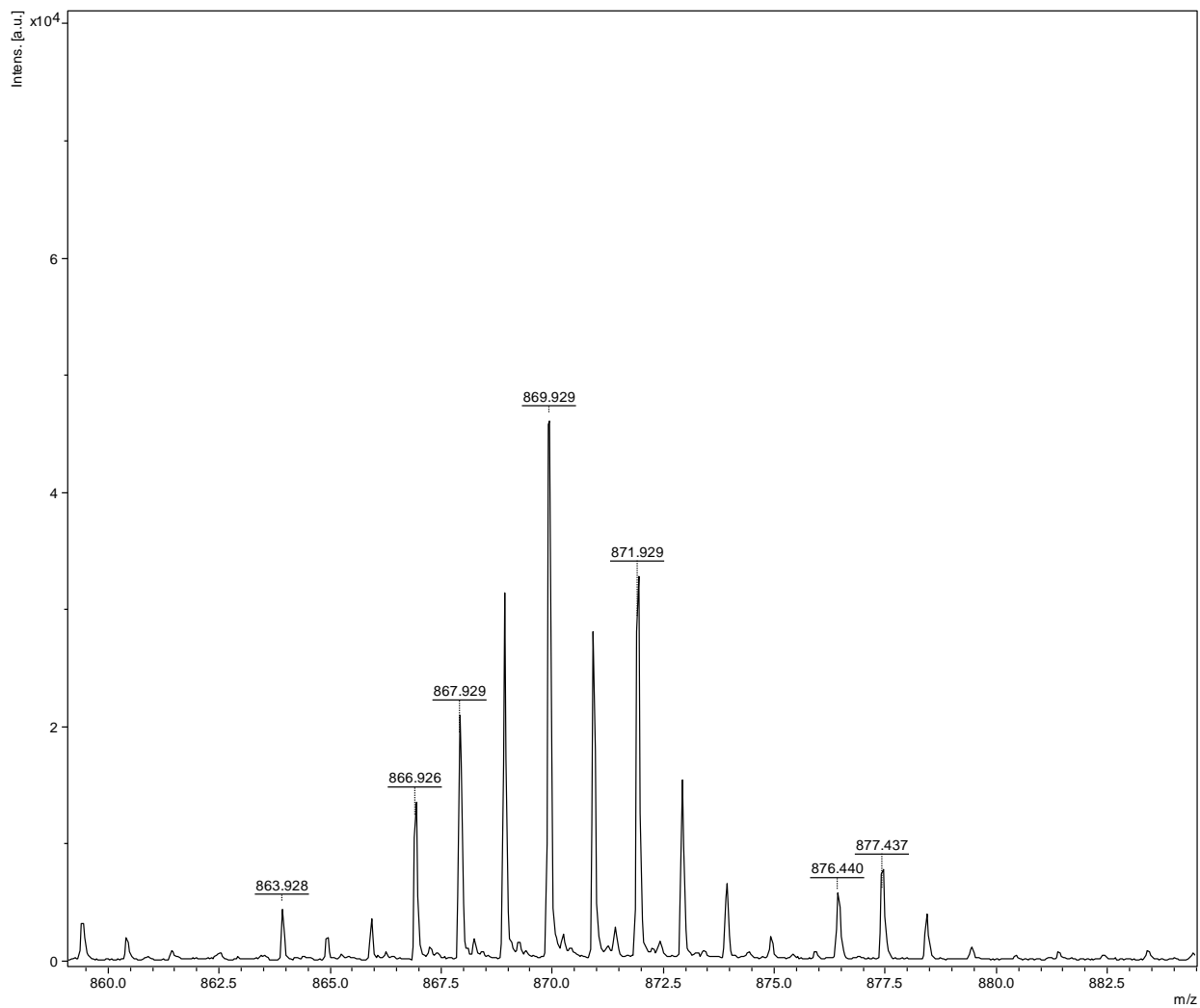
Amostra dissolvida em 100ul de MeOH. (Amostra:Matriz 1:4)



Espectro de massas de alta resolução da **Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)(CF₃COO⁻)₂**



Espectro de massas de alta resolução da **Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)(CF₃COO⁻)₂**



Espectro de massas de alta resolução da **Ru(bpz)₂(bitiofeno-imidazo-fen)(CF₃COO⁻)₂**