



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Bauru



Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

**Síntese e Aplicações de Aminoquinolinas como Sondas Fluorescentes para
Estudos de Proteínas e Micelas**

Bruna Pastrello

2021

Bruna Pastrello

Síntese e Aplicações de Aminoquinolinas como Sondas Fluorescentes para Estudos de Proteínas e Micelas

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, sob orientação do Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Bauru

2021

Pastrello, Bruna.

Síntese e aplicação de aminoquinolinas como sondas fluorescentes para estudos de proteínas e micelas / Bruna Pastrello, 2021

265 f. : il.

Orientador: Valdecir Farias Ximenes

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2021

1. Fluorescência. 2. Aminoquinolinas.
3. Solvatocromismo. 4. Albumina. 5. Surfactantes.
I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Bauru



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE BRUNA PASTRELLO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 30 dias do mês de julho do ano de 2021, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de BRUNA PASTRELLO, intitulada "**Síntese e Aplicações de Aminoquinolinas como Sondas Fluorescentes para Estudos de Proteínas e Micelas**". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru (participação por videoconferência), Prof. Dr. NELSON HENRIQUE MORGON (Participação Virtual) do(a) Departamento de Físico Química - Instituto de Química / Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. MARINONIO LOPES CORNELIO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / UNESP/Câmpus de São José do Rio Preto, Profa. Dra. DENISE FREITAS SIQUEIRA PETRI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Universidade de São Paulo (USP), Prof. Dr. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química, Faculdade de Ciências / UNESP - Câmpus de Bauru. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à família,
aos meus pais, e
aos que ainda virão

Agradecimentos

São tantas pessoas a agradecer que algumas vezes fica até difícil não esquecer de alguém ou tentar dar uma ordem de prioridade ou importância a alguém. Mas em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha família e meu orientador. O Professor Valdecir me deu a oportunidade de realizar esse trabalho, me deu todo o suporte científico e acreditou em mim, fazendo com que as discussões aqui contidas tenham muito mais valor e peso na minha vida profissional.

Minha família que me incentivou demais durante todo o processo. Meus pais Denise e Waldir que sempre se preocuparam em me dar suporte emocional e que sempre fizeram o melhor que puderam para me dar a melhor criação e os melhores estudos para que eu pudesse chegar até aqui. Minha irmã Beatriz que sempre foi a primeira pessoa a me incentivar em todos os projetos, sempre me perguntava como estavam as coisas mesmo que mais distantes do que gostaríamos (apenas em quilometragem porque no emocional sempre estaremos unidas) e que quando precisei de alento e um colo nunca me recusou, obrigada pelas ligações de horas, por ter a paciência de me ouvir quando eu estava triste e tudo parecia perdido, mas mesmo assim me disse que tudo ficaria bem.

Ao meu marido Rodrigo, que é o cara mais incrível que eu conheço, que me incentivou desde o momento em que disse que gostaria de prestar o doutorado, que chorou minhas dores sempre que precisei, me deu seu abraço mais sincero quando tudo estava desmoronando e o sorriso mais lindo em cada conquista ao longo desses anos. Sempre digo que você é tudo o que preciso, que me completa e me ama sem precedentes e sem você sei eu não teria forças para chegar tão longe. À família que você me deu, seus pais e irmão sempre me trataram como mais uma filha e me sinto muito acolhida por todos.

Aos meus colegas de bancada que se tornaram minha família ao longo do meu doutorado, Luiza, Ana Julia, Maurício, Matheus, Tainá, e também ao pessoal do laboratório de síntese Gil (que sem você minhas sínteses nunca teriam sido esse sucesso, obrigado por toda a paciência), Paula, Bruna, Mayara, Lucas, Willian, Zé. São tantas pessoas que vem e vão durante o processo, mas cada um sempre dá um valor a mais a nosso trabalho e nossa vida.

Aos meus amigos que adquiri ao longo da vida e durante esse trabalho que me incentivaram, alguns até me ajudaram a discutir e pensar sobre o trabalho, alguns me deram puxão de orelha quando precisei, alguns me deram um abraço quando o dia tinha sido apressado e pesado, se eu começar a nomear todos seria até mesmo injusto, pois cada um me ajudou de forma tão única mas que me ajudou e muito a ser o que sou hoje.

EPÍGRAFE

“É necessário se espantar, se indignar e se contaminar, só assim é possível mudar a realidade”

Nise da Silveira

Resumo

As quinolinas possuem um núcleo heterocíclico que está presente em diversas moléculas com interesse biológico e tecnológico. Quinolinas polissubstituídas podem apresentar sistema eletrônico conjugado (D- π -A), o que as torna moléculas fluorescentes e susceptíveis ao meio. Neste trabalho foram sintetizadas nitroquinolinas através de reações multicomponentes e reduzidas à aminoquinolinas fluorescentes. Estes compostos foram estudados tendo como foco suas propriedades solvatocrômicas e interação com albumina, lisozima e micelas. Estudos solvatocrômicos utilizando os modelos Lippert, Bilot-kawski, Kawski e McRae, foram realizados utilizando dezesseis solventes. O melhor resultado foi obtido utilizando a aminoquinolina com substituinte $-N(CH_3)_2$ (AQ4), onde um coeficiente de correlação de 0,8746 foi obtido para a correlação entre a somatória dos máximos de absorbância e fluorescência das aminoquinolinas e a função de polaridade de solvente $\phi(\epsilon, n)$. A partir dessa correlação foi possível estimar a constante dielétrica no interior da proteína BSA. A interação das aminoquinolinas com a proteína BSA provocou um significativo aumento no rendimento quântico das mesmas (22,5%) quando comparado ao meio aquoso (1,04%). A interação da aminoquinolina AQ4 com a proteína BSA mostrou uma constante de associação entre $2,5 \cdot 10^5$ e $4,5 \cdot 10^5$ M⁻¹ dependendo do método de utilizado, o que a caracteriza como um ligante semelhante a fármacos que se ligam à BSA. As alterações de fluorescência da AQ4 mostraram-se sensíveis a desnaturação, bem como a formação de agregados amiloides nas proteínas BSA e lisozima, o que possibilitou sua aplicação para monitorar estas alterações nas proteínas estudadas. Estudos de aplicação das aminoquinolinas para determinação de formação de micelas em meio aquoso mostraram que as mesmas podem ser utilizadas para a determinação da concentração micelar crítica (CMC) de

diferentes surfactantes. Os valores de CMC foram similares aos apresentados na literatura utilizando diferentes metodologias analíticas. Além disso, as aminoquinolinas foram capazes de detectar a carga elétrica das micelas, onde um deslocamento batocrômico intenso foi exclusivo de micelas negativas. Em conclusão, as aminoquinolinas se mostraram como sondas fluorescentes de significativa aplicabilidade para o estudo proteínas e sistemas micelares.

Abstract

Quinolines have a heterocyclic center that can be seen in several molecules of biological and technological interest. Quinolines containing several substitutions may have a conjugated electronic system (D- π -A), which makes them fluorescent and susceptible to the medium. In this work, nitroquinolines were synthesized through multicomponent reactions and then reduced to fluorescent aminoquinolines. These synthesized compounds were studied with focus on their solvatochromic properties and interaction with albumin, lysozyme and micelles. Solvatochromic studies were made using the models of Lippert, Bilot-kawski, Kawski and McRae, using sixteen solvents. The best result was obtained using aminoquinoline with substituent $-N(CH_3)_2$ (AQ4), where a correlation coefficient of 0.8746 was obtained for the linear correlation between the sum of absorbances and fluorescence maximums values of aminoquinolines and the dielectric constant for each solvent φ (ϵ , n) used. On this correlation, it was possible to estimate the dielectric constant inside the BSA protein. Besides that, the interaction of aminoquinolines with the BSA protein caused a significant increase in AQ4's quantum yield (22.5%) when compared to the aqueous medium (1.04%). Other result found in this study is that the interaction of the aminoquinoline AQ4 with the BSA protein exhibited a constant association between $2.5 \cdot 10^5$ and $4.5 \cdot 10^5$ M^{-1} depending on the method used, which is characteristic and similar values of ligands that are known to have a good bind with BSA. The fluorescence changes in AQ4 were sensitive to denaturation, as well as the formation of amyloid aggregates in BSA and lysozyme proteins, showing that AQ4 can be applied to monitor changes in the studied proteins. The studies of aminoquinolines in order to determine the formation of micelles in aqueous media have shown that these synthesized molecules can be used to determine the critical micellar concentration

(CMC) of different surfactants. The CMC values found with this new method were similar to those presented in the literature using different analytical methodologies. In addition, aminoquinolines were useful to detect the electrical charge of the micelles, once an intense bathochromic displacement was exclusive to negative micelles. In conclusion, aminoquinolines synthesized here can be use as fluorescent probes for the study of proteins and micellar systems.

Sumário

Agradecimentos	v
EPÍGRAFE	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
Sumário.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xviii
Lista de símbolos	xx
Lista de Figuras.....	xxi
Lista de Tabelas	xxxiv
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica de conceitos gerais utilizados para o desenvolvimento do trabalho	5
2.1. Transições eletrônicas.....	5
2.2. Espectroscopia de absorção e de fluorescência molecular	7
2.2.1. Tópicos e conceitos importantes sobre fluorescência	11
2.2.2. Processos de transferência de carga intermolecular (TCI ou ICT).....	13
2.2.3. Supressão de fluorescência	15
2.2.4. Fluorescência estacionária e resolvida no tempo	17
2.2.5. Dicroísmo circular.....	19
2.2.6. Absorbância e a Lei de Lambert-Beer.....	22

3. Objetivos do trabalho	25
Capítulo 1	26
Síntese das Aminoquinolinas	26
4. Quinolinas	27
4.1. Introdução	27
4.2. Materiais e equipamentos	30
4.3. Métodos e procedimentos	33
4.3.1. Procedimento geral para reações multicomponentes para a preparação de derivados 6-nitro-2,4-difenilquinolinas utilizando NbCl ₅ como catalisador.....	33
4.3.2. Procedimento geral para as reações de redução do grupo nitro para preparação de derivados de 6-amino-2,4-difenilquinolinas	34
4.4. Resultados e Discussão	36
4.4.1. Preparação de 6-nitro-2,4-difenilquinolinas utilizando NbCl ₅ como catalisador	36
4.4.2. Redução do grupo nitro para preparação de derivados de 6-amino-2,4-difenilquinolinas.....	41
4.5. Nomeação dos compostos para utilização nos estudos para aplicação.....	46
4.6. Conclusões da síntese das aminoquinolinas.....	48
Capítulo 2.....	49
Estudos Solvatocrômicos das Aminoquinolinas	49
5.1. Solventes e Solvatocromismo	50
5.1.1. Classificação de solventes	51

5.1.2. Solvatocromismo.....	53
5.2. Materiais e equipamentos	56
5.3. Métodos e procedimentos	57
5.3.1. Procedimento geral para os estudos de solvatocromismo	57
5.3.2. Procedimento geral para a determinação do rendimento quântico das substâncias	61
5.3.3. Procedimento geral para a determinação da absorvidade molar das moléculas em diferentes solventes	62
5.3.4. Procedimento geral para estudos de tempo de vida de fluorescência da sonda AQ4	63
5.4. Resultados e Discussão	63
5.4.1. Estudos de absorvidade molar dos compostos	81
5.4.2. Estudos de rendimento quântico de fluorescência das aminoquinolinas em diferentes solventes	83
5.4.3. Estudos de tempo de vida realizados com o composto AQ4	85
5.5. Conclusões dos estudos de solvatocromismo.....	88
Capítulo 3.....	90
Estudos da Interação das Aminoquinolinas com Proteínas	90
6.1. Introdução	91
6.1.1. Albumina sérica e lisozima.....	91
6.1.2. Agregados amilóides.....	95
6.2. Materiais e equipamentos	98

6.3. Métodos e procedimentos	99
6.3.1. Procedimento para a determinação da constante de associação da ligação proteína-ligante	99
6.3.2. Procedimento geral para a determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação proteína-ligante.....	105
6.3.3. Procedimento geral para a determinação do sítio de ligação onde ocorre a interação proteína-ligante utilizando fluorescência.....	107
6.3.4. Procedimento geral para a determinação do sítio de ligação onde ocorre a interação proteína-ligante utilizando CD	108
6.3.5. Procedimento geral para a determinação da quantidade de sítios em que o ligante interage com a proteína através do método Job's plot	108
6.3.6. Procedimento geral para a determinação da influência de metais na interação proteína-ligante	109
6.3.7. Procedimento geral para estudos da sonda fluorescente para determinação da desnaturação de proteínas.....	110
6.3.8. Procedimento geral para estudos da sonda fluorescente para observação da oxidação de proteína.....	111
6.3.9. Procedimento geral para a determinação do limite de detecção de proteína por AQ4 e por BCP	111
6.3.10. Procedimento geral para a determinação da quantidade de albumina no plasma humano.....	112
6.4. Resultados e discussão para os estudos com proteínas.....	113
6.4.1. Estudos sobre interação entre BSA e aminoquinolinas.....	113

6.4.2. Estudos para determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação proteína-ligante	125
6.4.3. Determinação do sítio de ligação onde ocorre a interação proteína-ligante 128	
6.4.4. Aplicação do AQ4 para Estudos de Alterações Estruturais na BSA	132
6.4.5. Resultados para a determinação do limite de detecção de proteína e determinação da quantidade de albumina no plasma humano por AQ4.....	143
6.4.6. Determinação da constante dielétrica no interior da BSA	146
6.5. Conclusões dos estudos de AQ4 com proteínas.....	149
Capítulo 4.....	151
Estudos da Interação das Aminoquinolinas com Micelas.....	151
7.1. Micelas	152
7.1.1. Introdução às micelas.....	152
7.1.2. Formação de complexos	157
7.1.3. Dímeros em estado excitado.....	159
7.2. Materiais e equipamentos utilizados nos estudos com micelas	161
7.3. Métodos e procedimentos realizados nos estudos com micelas.....	162
7.3.1. Procedimento geral para a determinação do CMC de surfactantes	162
7.3.2. Estudo da nova banda de fluorescência por aumento de concentração do fluoróforo	163
7.3.3. Estudo da interação da aminoquinolina com detergentes alterando o pH do meio	164

7.3.4. Estudos de supressão da fluorescência da aminoquinolina em meio micelar e determinação do N_{agg} de surfactantes.....	164
7.4. Resultados e discussão dos estudos com micelas.....	167
7.4.1. Determinação do CMC de surfactantes	167
7.4.2. Estudo da interação da aminoquinolina com SDS	181
7.4.3. Estudos de supressão da fluorescência da aminoquinolina em meio micelar e determinação do N_{agg} de surfactantes.....	185
7.5. Conclusões parciais dos estudos de AQ5 com micelas	191
8. Referências	193
Anexo A – Caracterização dos compostos sintetizados.....	210
Anexo B – Imagens diversas extras para auxílio dos estudos dos compostos sintetizados	224

Lista de Abreviaturas

AIE: Emissão induzida por agregação

ANS: Sal de magnésio do ácido 8-Anilino-1-naftaleno sulfônico

AQ: Aminoquinolina

BCP: Corante púrpura de bromocresol

BSA: Albumina Sérica Bovina

CD: Dicroísmo circular

CMC: Concentração Micelar Crítica

DMSO: Dimetilsulfóxido

HOMO: Orbital molecular ocupado de mais alta energia

HSA: Albumina Sérica Humana

ICD: Dicroísmo circular induzido

IV: Infravermelho

K: Decaimento radiativo

K_{nr}: Decaimento não-radiativo

LUMO: Orbital molecular não-ocupado de mais baixa energia

Lyz: Lisozima

N_{agg}: Número de agregação

NQ: Nitroquinolina

OLED: Diodo orgânico emissor de luz

PET: Transferência de carga fotoinduzida

Phe: Fenilalanina

S₀: Estado eletrônico fundamental singlete

S₁: Primeiro estado eletrônico singleto

S₂: Segundo estado eletrônico singleto

T₁: Primeiro estado eletrônico tripleto

TCI (ou ICT): Transferência de Carga Intramolecular

Th-t: tioflavina T

Trp: Triptofano

Tyr: Tirosina

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta-visível

Lista de símbolos

λ_{em} : Comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência

λ_{exc} : Comprimento de onda de excitação de fluorescência

λ_{abs} : Comprimento de onda máximo de absorção

Φ : Rendimento quântico de fluorescência

τ : Tempo de vida

ϵ : Constante dielétrica

n : Índice de refração

v : Número de onda

Lista de Figuras

Figura 1. Níveis de energia em orbitais moleculares e possíveis transições eletrônicas mais comuns em moléculas (Adaptado de: (Rouessac e Rouessac, 2007))	7
Figura 2. Diagrama de Jablonski e representação das posições relativas à absorção, fluorescência e fosforescência. (Adaptado de: (Valeur, 2001))	9
Figura 3. O processo ICT em: a) um sistema (poli)eno e b) em um sistema aromático doador-aceitador. A transferência de carga do doador (D) para o aceitador (A) ocorre no estado excitado através de uma “ponte” de elétrons- π para a formação de um estado ICT de momento de dipolo maior do que no estado fundamental (ADAPTADO DE: (Misra e Bhattacharyya, 2018)).	15
Figura 4. Esquemas representativos dos mecanismos de supressão de fluorescência mais conhecidos e discutidos na literatura. A) cruzamento intersistema, B) transferência eletrônica fotoinduzida, C) intercâmbio de elétrons (Adaptado de: (Lakowicz, 2006))	17
Figura 5. Estrutura molecular do núcleo quinolínic.....	27
Figura 6. Esquema geral de uma reação multicomponente seguida de redução do grupo nitro para a formação de aminoquinolinas polissubstituídas (Adaptado de: (Santos <i>et al.</i> , 2017))	30
Figura 7. Reação multicomponente para a produção de 6-nitro-2,4-difenilquinolinas, utilizando $NbCl_5$ como catalisador.....	33
Figura 8. Reação de produção de derivados 6-amino-2,4-difenilquinolinas.....	35
Figura 9. Mecanismo proposto para reação de formação dos derivados de 6-nitro-2,4-difenilquinolina catalisado por $NbCl_5$ (Adaptado de: (Bartolomeu <i>et al.</i> , 2018))	37
Figura 10. Visão geral das etapas da reação de formação dos derivados de 6-amino-2,4-difenilquinolina (Adaptado de: (Serna <i>et al.</i> , 2009))	42

Figura 11. Esquema representativo das moléculas do trabalho juntamente com seus nomes abreviados	47
Figura 12. Espectros de absorção das aminoquinolinas sintetizadas: a) AQ1, b) AQ2, c) AQ3, d) AQ4, e) AQ5, em 16 solventes, em ordem de polaridade. Os espectros foram feitos por varredura de $\lambda=250$ a 500nm , onde foram utilizadas soluções de $25\mu\text{M}$ cada.	65
Figura 13. Espectros de emissão de fluorescência das aminoquinolinas sintetizadas: a) AQ1, b) AQ2, c) AQ3, d) AQ4, e) AQ5, em 16 solventes, em ordem de polaridade. Os espectros foram feitos com $\lambda_{\text{exc}}=375$ e varredura de emissão de $\lambda_{\text{em}}=400$ a 650nm (com exceção do AQ1 que foi utilizado $\lambda_{\text{exc}}=340$, $\lambda_{\text{em}}=370-600\text{nm}$), onde foram utilizadas soluções de $7,5\mu\text{M}$ cada.....	66
Figura 14. Espectros de absorção (linha tracejada) e de emissão de fluorescência (linha sólida) com valores normalizados de: a) AQ1, b) AQ2, c) AQ3, d) AQ4, e) AQ5, em 16 solventes (em ordem de polaridade: ciclo-hexano, 1,4-dioxano, tolueno, acetato de heptila, acetato de hexila, acetato de etila, tetra-hidrofurano, diclorometano, 1-hetpanol, 2-propanol, acetona, etanol, metanol, acetonitrila, DMF e DMSO), mostrando o deslocamento do máximo de comprimento de onda em relação a mudança de solventes.	67
Figura 15. Correlações solvatocrômicas para a aminoquinolina AQ1. a) Modelo Lippert-Mataga, b) modelo Bilot e Kawski, c) modelo Kawski, d) modelo McRae.	76
Figura 16. Correlações solvatocrômicas para a aminoquinolina AQ2. a) Modelo Lippert-Mataga, b) modelo Bilot e Kawski, c) modelo Kawski, d) modelo McRae,	76
Figura 17. Correlações solvatocrômicas para a aminoquinolina AQ3. a) Modelo Lippert-Mataga, b) modelo Bilot e Kawski, c) modelo Kawski, d) modelo McRae.	77

- Figura 18. Correlações solvatocrômicas para a aminoquinolina AQ4. a) Modelo Lippert-Mataga, b) modelo Bilot e Kawski, c) modelo Kawski, d) modelo McRae,77
- Figura 19. Correlações solvatocrômicas para a aminoquinolina AQ5. a) Modelo Lippert-Mataga, b) modelo Bilot e Kawski, c) modelo Kawski, d) modelo McRae,78
- Figura 20. Gráficos representativos das medidas de tempo de vida para diferentes solventes, a) Solventes apróticos, b) Solventes polares apróticos e c) Solventes polares próticos. ($\lambda_{exc}=340\text{nm}$, $\lambda_{em}=475-575\text{nm}$, pulso de 100ns e contagem de 1000 fótons/s).....86
- Figura 21. Espectros de absorvância (a) e fluorescência (b) dos aminoácidos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). Trp: $\lambda_{exc}= 295\text{nm}$, $\lambda_{em}=353\text{nm}$; Tyr: $\lambda_{exc}= 275\text{nm}$, $\lambda_{em}= 304\text{nm}$; Phe: $\lambda_{exc}= 260\text{nm}$, $\lambda_{em}= 282\text{nm}$. As estruturas dos aminoácidos são observadas na parte inferior (Adaptado de:(Joshi *et al.*, 2013))....92
- Figura 22. Estruturas das proteínas: a) HSA e b) BSA com os diferentes resíduos de aminoácidos com diferente coloração, e as localizações aproximadas dos triptofanos (Trp-214, Trp-212 e Trp -134) e dos subdomínios. Obtida e adaptada do Protein data bank (ID:1e78 e 4f5s).93
- Figura 23. Figura representativa das estruturas da enzima lisozima, com a localização aproximada de seu sítio de ligação. Obtida e adaptada do Protein data bank (ID:2cds).
.....95
- Figura 24. Representação esquemática simplificada do processo de formação de proteína nativa e do possível processo de re-agregação para a formação de agregados amorfos ou organizados (fibras amilóides) (Adaptado de: (Adamcik e Mezzenga, 2018)).....97
- Figura 25. Fluorescência das aminoquinolinas em tampão fosfato na ausência e presença de BSA. a) $\lambda_{exc}=350\text{nm}$, $\lambda_{em}=370-450\text{nm}$, de b a f) $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-$

650nm. Todos os experimentos foram realizados com a abertura de slits em 5mm, filtro de polarizador de 92% de corte.....	114
Figura 26. Gráfico de Job para a associação AQ4-BSA utilizando o máximo de emissão de fluorescência como referência	116
Figura 27. a) Gráfico representativo do espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração do AQ4 (0-11 μ M) e BSA fixa (5 μ M) em tampão fosfato 50mM. λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm, b) Gráfico representativo do aumento da fluorescência com a adição de AQ4 em λ =480nm.	117
Figura 28. a) Gráfico representativo do espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração do BSA (0-30 μ M) e AQ4 fixa (5 μ M) em tampão fosfato 50mM. λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm, b) Gráfico representativo do aumento da fluorescência com a adição de BSA em λ =480nm.	118
Figura 29. Determinação da constante de associação por diferentes métodos de cálculo e seus respectivos gráficos para a obtenção do valor; a) Equação de Benesi, b) Equação de Rawel. Os dados de fluorescência para os cálculos foram utilizando λ_{exc} =375nm, λ_{em} =480nm e concentração fixa de AQ4 de 2,5 μ M.....	120
Figura 30. Determinação da constante de associação por diferentes métodos de cálculo e seus respectivos gráficos para a obtenção do valor; a) Equação de van de Weert e Stella, b) Equação de Zsila. Os dados de fluorescência para os cálculos foram utilizando λ_{exc} =375nm, λ_{em} =480nm e concentração fixa de BSA de 2,5 μ M.	121
Figura 31. a) Gráfico representativo do espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração do AQ4 (0-12 μ M) e BSA fixa (2,5 μ M) em tampão fosfato 50mM. λ_{exc} =295nm, λ_{em} =310-450nm, b) Gráfico representativo do decaimento da fluorescência com a adição de AQ4 em λ =345nm.	122

Figura 32. Determinação da constante de associação por diferentes métodos de cálculo e seus respectivos gráficos para a obtenção do valor; a) Equação de Stern-Volmer, b) Equação de van der Weert e Stella, c) Equação de Roy. Os dados de fluorescência para os cálculos foram utilizando $\lambda_{exc}=295\text{nm}$, $\lambda_{em}=345\text{nm}$ e concentração fixa de BSA de $2,5\mu\text{M}$ 124

Figura 33. Curvas representativas para diferentes temperaturas dos experimentos (curva preta para experimentos a 293K (20°C) e curva vermelha para experimentos a 313K (40°C)). a) Decaimento de fluorescência medida no máximo de emissão do complexo BSA-AQ4, b) Gráfico da equação de Stern-Volmer e determinação da respectiva constante, c) Gráfico para a equação de Stella e determinação da constante de associação do complexo, d) Gráfico para a equação de Roy e determinação da constante de associação do complexo. Os dados de fluorescência para os cálculos foram utilizando $\lambda_{exc}=295\text{nm}$, $\lambda_{em(max)}=345\text{nm}$ e concentração fixa de BSA de $1,0\mu\text{M}$. Como é realizada a determinação das constantes através dos experimentos de quenching encontra-se no tópico anterior..... 126

Figura 34. Gráficos representativos dos experimentos realizados para a determinação do sítio de ligação do AQ4 em BSA, a) Efeito do aumento da concentração de varfarina (sonda de sítio I – de 0 a $30\mu\text{M}$) sobre a fluorescência do AQ4 em uma concentração fixa ($5\mu\text{M}$) dentro da BSA ($5\mu\text{M}$) ($\lambda_{exc}=375$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$), b) Efeito do aumento da concentração de ibuprofeno (sonda de sítio II – de 0 a $30\mu\text{M}$) sobre a fluorescência do AQ4 em uma concentração fixa ($5\mu\text{M}$) dentro da BSA ($5\mu\text{M}$) ($\lambda_{exc}=375$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$), c) Efeito da varfarina+ibuprofeno (sondas de sítio I e II – de 0 a $40\mu\text{M}$) concomitantemente, sobre a fluorescência do AQ4 em uma concentração fixa ($5\mu\text{M}$) dentro da BSA ($5\mu\text{M}$) ($\lambda_{exc}=375$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$), d) Efeito do AQ4 (de 0 a $20\mu\text{M}$)

sobre a fluorescência da varfarina em uma concentração fixa ($5\mu\text{M}$) dentro da BSA ($5\mu\text{M}$) ($\lambda_{\text{exc}}=310$, $\lambda_{\text{em}}=330-450\text{nm}$)..... 129

Figura 35. Espectros de ICD para observar, a) Efeito da adição do ligante AQ4 na proteína BSA, b) Efeito da adição de varfarina no sinal de AQ4+BSA, c) Efeito da adição de ibuprofeno no sinal de AQ4+BSA. Os experimentos foram realizados com concentração 1:1 de AQ4:BSA e os espectros obtidos entre os comprimentos de onda 250-450nm. 131

Figura 36. a) Gráfico representativo dos espectros obtidos e da influência de íons metálicos para cada caso ($\lambda_{\text{exc}}=375\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=400-650\text{nm}$), b) Gráfico comparativo das áreas abaixo da curva para os diferentes efeitos de íons sobre a interação BSA-AQ4 (controle se refere ao espectro de fluorescência da interação AQ4-BSA sem íon metálicos)..... 134

Figura 37. Gráficos representativos dos experimentos de emissão de fluorescência realizados para a determinação da oxidação de BSA com HOCl e HOBr, a) para confirmação da oxidação do resíduo de triptofano do BSA ($5\mu\text{M}$) com a adição de $100\mu\text{M}$ de agente oxidante (HOBr e HOCl) ($\lambda_{\text{exc}}=295$, $\lambda_{\text{em}}=310-450\text{nm}$), b) para observação da mudança no espectro de fluorescência do AQ4 ($10\mu\text{M}$), excitando-se o triptofano ($\lambda_{\text{exc}}=295$, $\lambda_{\text{em}}=420-650\text{nm}$), c) para observação da alteração no espectro de fluorescência do AQ4 ($10\mu\text{M}$) em BSA ($5\mu\text{M}$), na excitação da sonda ($\lambda_{\text{exc}}=400$, $\lambda_{\text{em}}=420-650\text{nm}$)..... 136

Figura 38. Gráficos representativos dos experimentos realizados para a determinação da formação de agregados amiloides de BSA, a) Espalhamento Rayleigh aumentado devido a formação dos agregados amiloides ($5\mu\text{M}$) ($\lambda_{\text{exc}}=340$, $\lambda_{\text{em}}=300-400\text{nm}$), b) Efeito da formação de agregados amiloides em BSA ($5\mu\text{M}$) sobre a sonda Th-T (concentração fixa de $5\mu\text{M}$ em todos os meios) ($\lambda_{\text{exc}}=435$, $\lambda_{\text{em}}=460-545\text{nm}$), c) Efeito

da formação de agregados amiloides em BSA (5 μ M) sobre a sonda ANS (concentração fixa de 15 μ M em todos os meios) (λ_{exc} =340, λ_{em} =400-600nm), d) Efeito da formação de agregados amiloides em BSA (5 μ M) sobre AQ4 (concentração fixa de 15 μ M em todos os meios) (λ_{exc} =375, λ_{em} =400-650nm). Em todos os casos foram utilizados um comparativo entre BSA nativa (25°C) e BSA amiloide (70°C), e foram utilizadas nas mesmas concentrações para comparativo. 138

Figura 39. Estudos da desnaturação de BSA. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de Ureia (0-8M) e concentração fixa de BSA (20 μ M) e AQ4 fixa (20 μ M) em tampão fosfato 50mM pH=7,0 (λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm); b) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de Ureia (0-8M) e concentração fixa de BSA (20 μ M) e ANS fixa (20 μ M) em tampão fosfato 50mM (λ_{exc} =340, λ_{em} =400-600nm); c) Gráfico comparativo do decaimento da fluorescência máxima normalizada das sondas AQ4 e ANS devido a desnaturação da BSA (para o AQ4 λ_{exc} =375, $\lambda_{em(max)}$ =480nm, para o ANS λ_{exc} =340nm, $\lambda_{em(max)}$ =480nm). 140

Figura 40. Gráficos representativos dos experimentos realizados para a determinação da formação de agregados amiloides de Lisozima; a) Espalhamento Rayleigh aumentado devido a formação dos agregados amiloides (10 μ M) (λ_{exc} =340, λ_{em} =300-400nm); b) Efeito da formação de agregados amiloides de Lisozima (10 μ M) formados a partir de adição de SDS (300 μ M) sobre a sonda Th-T (10 μ M) (λ_{exc} =435, λ_{em} =460-545nm); c) Efeito da formação de agregados amiloides em de Lisozima (10 μ M) formados a partir da adição de SDS (300 μ M) sobre a sonda (10 μ M) (λ_{exc} =375, λ_{em} =400-650nm); d) Experimento para observar a intensidade de fluorescência através do tempo com a adição da sonda e depois levando a desnaturação da proteína, utilizando a fluorescência da sonda no meio da proteína desnaturada como

referência para os comprimentos de onda excitação e emissão fixos ($\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=480\text{nm}$)..... 143

Figura 41. Estudos da linearidade de método para a determinação de albumina (BSA e HSA) com diferentes sondas. a) Curva que mostra a linearidade do método de AQ4 ($40\mu\text{M}$) com BSA ($0-500\mu\text{M}$), pelo método da fluorescência com leitura em $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=480\text{nm}$. b) Curva que mostra a linearidade do método de AQ4 ($40\mu\text{M}$) com HSA ($0-500\mu\text{M}$), pelo método da fluorescência com leitura em $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=480\text{nm}$. c) Curva que mostra a linearidade do método de BCP ($200\mu\text{M}$) com BSA ($0-400\mu\text{M}$), pelo método da absorvância com leitura em $\lambda=610\text{nm}$. d) Curva que mostra a linearidade do método de BCP ($200\mu\text{M}$) com HSA ($0-400\mu\text{M}$), pelo método da absorvância com leitura em $\lambda=610\text{nm}$ 145

Figura 42. Gráficos representativos para a determinação da constante dielétrica da proteína. a) Gráfico de fluorescência normalizada de AQ4 em meios com diferentes polaridades comparando-se o AQ4 dentro da proteína ($\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$, b) Gráfico ilustrativo que mostra o valor aproximado de $\phi(\epsilon, n)$ em relação ao a somatória dos comprimentos de onda de absorção e emissão de fluorescência em vários solventes e o valor encontrado para AQ4 na proteína..... 147

Figura 43. Gráficos de tempo de vida de fluorescência de AQ4 em solventes com polaridades distintas e em BSA ($\lambda_{exc}=340\text{nm}$, $\lambda_{em}=475-575\text{nm}$, pulso de 100ns e contagem de 1000 fótons/s)..... 148

Figura 44. Representação esquemática das etapas de formação de micela com o aumento da concentração de surfactante. a) Esquema onde é possível observar a formação das micelas acima de um determinado valor mínimo e se pode observar sua correlação com o gráfico representativo em b) que descreve o CMC em termos de concentração de surfactante e o comportamento gráfico do processo dependendo da

metodologia utilizada para a determinação (Adaptado de: (Rizzatti, Zanette e Mello, 2009)).	155
Figura 45. Estruturas dos surfactantes utilizados no trabalho. a) SDS, b) SDBS, c) S8S, d) CTAB, e) Triton X-100 (Obtido e adaptado de: (“PubChem”, [s.d.]).	168
Figura 46. Fluorescência das aminoquinolinas e coumarina-153 em meio aquoso na ausência e presença de surfactantes. a) $\lambda_{exc}=350\text{nm}$, $\lambda_{em}=370-450\text{nm}$, de b a f) $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$, g) $\lambda_{exc}=410\text{nm}$, $\lambda_{em}=450-700\text{nm}$. Todos os experimentos foram realizados com a abertura de slits em 5mm e filtro atenuador de 92%. As concentrações de surfactantes estão acima de seus CMCs.	169
Figura 47. Determinação do CMC do Triton X-100 com AQ5 (5 μM) por fluorescência em estado estacionário. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de Triton X-100 (0, 25, 50, 75, 100, 150, 250, 300, 320, 340, 350, 400, 500, 600, 750, 1000, 2000, 4000, 8000, em μM), utilizando-se de $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700; b) Curva do aumento da fluorescência máxima relativa ao aumento da concentração de Triton no meio para a determinação do CMC do surfactante neutro (dados de máximo de fluorescência retirados do gráfico a).	171
Figura 48. Determinação do CMC do Triton X-100 com AQ5 (5 μM) por fluorescência resolvida no tempo. a) Gráfico representativo de curvas de tempo de vida de fluorescência do AQ5 com aumento da concentração do Triton X-100 (0, 200, 250, 500, 2000, em μM) com $\lambda_{exc}=340\text{nm}$, com contagem de 10000 fótons em 100ns; b) Curva do aumento do tempo de vida relativo ao aumento da concentração de Triton no meio para a determinação do CMC do surfactante neutro (dados de tempo de vida retirados do gráfico a).	171

Figura 49. Determinação do CMC do CTAB com AQ5 (5 μ M) por fluorescência em estado estacionário. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de CTAB (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0; 1,1; 1,3; 1,5; 2,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 em mM), utilizando-se de $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700; b) Curva do aumento da fluorescência máxima relativa ao aumento da concentração de CTAB no meio para a determinação do CMC do surfactante positivo (dados de máximo de fluorescência retirados do gráfico a).172

Figura 50. Determinação do CMC do CTAB com AQ5 (5 μ M) por fluorescência resolvida no tempo. a) Gráfico representativo de curvas de tempo de vida de fluorescência do AQ5 com aumento da concentração do CTAB (0, 1000, 1500, 30000, em μ M) com $\lambda_{exc}=340\text{nm}$, com contagem de 10000 fótons em 100ns; b) Curva do aumento do tempo de vida relativo ao aumento da concentração de CTAB no meio para a determinação do CMC do surfactante positivo (dados de tempo de vida retirados do gráfico a).172

Figura 51. Determinação do CMC do SDBS com AQ5 (5 μ M) por fluorescência em estado estacionário. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de SDBS (0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 40,0; 60,0 em mM), utilizando-se de $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 750; b) Curva do aumento da fluorescência máxima relativa ao aumento da concentração de SDBS no meio para a determinação do CMC do surfactante negativo (dados de máximo de fluorescência retirados do gráfico a). ...173

Figura 52. Determinação do CMC do SDBS com AQ5 (5 μ M) por fluorescência resolvida no tempo. Gráfico representativo de curvas de tempo de vida de

fluorescência do AQ5 com aumento da concentração do SDBS (0,0; 0,2; 4,0; 40,0; em mM) com $\lambda_{exc}=340\text{nm}$, com contagem de 10000 fótons em 100ns 173

Figura 53. Determinação do CMC do S8S com AQ5 ($5\mu\text{M}$) por fluorescência em estado estacionário. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de S8S (0, 40, 80, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 160 e 200 em mM), utilizando-se de $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700;..... 174

Figura 54. Determinação do CMC do SDS com AQ5 ($5\mu\text{M}$) por fluorescência em estado estacionário. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de CTAB (0, 1000, 2000, 4000, 8000, 1600, 3200, 6400, 100000, em μM), utilizando-se de $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700;..... 174

Figura 55. Fluorescências de diferentes aminoquinolinas ($5\mu\text{M}$) em SDS 10mM, em estado estacionário, utilizando-se de $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700. 175

Figura 56. Determinação do CMC do SDS com AQ5 ($5\mu\text{M}$) por fluorescência em estado estacionário. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de SDS (0, 250, 500, 750, 1000, 2000, 4000, 6000, 6500, 7250, 7500, 8000, 8500, 9000, 15000, 30000, 60000, 100000, em μM), utilizando-se de $\lambda_{exc}=445\text{nm}$, $\lambda_{em}=470-700\text{nm}$, com 7,5mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700; b) Curva do aumento da fluorescência máxima relativa ao aumento da concentração de SDS no meio para a determinação do CMC do surfactante negativo (dados de máximo de fluorescência retirados do gráfico a). ... 176

Figura 57. Gráficos de medidas espectroscópicas para o estudo da nova banda em detergentes negativos. a) Gráfico comparativo de fluorescência normalizada das

bandas de detergentes com as bandas para solvente de AQ5 (em todos os casos, AQ5 5 μ M, λ_{exc} 375nm, λ_{em} =400-700nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700), b) Gráfico comparativo de UV-Vis para AQ5 (30 μ M) em detergentes (realizando varredura de λ =300 a 550nm), c) Gráfico de fluorescência mostrando o comportamento da banda de AQ5 aumentando sua concentração em SDS 20mm (concentrações utilizadas, 1; 2; 4; 8; 15; 30 e 50 μ M), utilizando-se de λ_{exc} =445nm, λ_{em} =470-700nm, com 7,5mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700 179

Figura 58. Estudos fluorescência de AQ5 em micelas com alteração de pH. a) Espectro de fluorescência de AQ5 (5 μ M) em SDS (20mM) alterando o pH de 4 a 9 (λ_{exc} =375nm, λ_{exc} =400-750nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700), b) Espectro de fluorescência de AQ5 (5 μ M) em SDS (20mM) alterando o pH de 4 a 9 (λ_{exc} =445nm, λ_{exc} =470-750nm, com 7,5mm de abertura de slits, sem filtro de corte e fotomultiplicadora em 700), c) Espectro de fluorescência de AQ5 (5 μ M) em CTAB (6mM) alterando o pH de 4 a 9 (λ_{exc} =375nm, λ_{exc} =400-700nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700), d) Espectro de fluorescência de AQ5 (5 μ M) em Triton X-100 (4mM) alterando o pH de 4 a 9 (λ_{exc} =375nm, λ_{exc} =400-700nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700), d) Gráfico comparativo de fluorescência normalizada para os resultados obtidos 183

Figura 59. Gráficos de supressão de fluorescência de AQ4 em diferentes micelas por aumento da concentração de NNDA (0, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 μ M), a) TX-100 (4mM) (λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm), b) CTAB (6mM) (λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700), SDS (20mM) (λ_{exc} =445nm, λ_{em} =400-750nm, com 7,5mm de abertura de slits,

sem filtro de corte e fotomultiplicadora em 700). d) Estudo das intensidades de fluorescência normalizada para comparação do decaimento em diferentes ambientes.

..... 186

Figura 60. Gráficos de supressão de fluorescência de AQ4 em diferentes micelas por aumento da concentração de NCB (0, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 μ M), a) TX-100 (4mM) (λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm), b) CTAB (6mM) (λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700), SDS (20mM) (λ_{exc} =445nm, λ_{em} =400-750nm, com 7,5mm de abertura de slits, sem filtro de corte e fotomultiplicadora em 700). d) Estudo das intensidades de fluorescência normalizada para comparação do decaimento em diferentes ambientes.

..... 187

Figura 61. Determinação da eficiência de supressão de fluorescência pelo método gráfico para cálculo do Ksv, a) para SDS (utilizando 20mM de detergente + AQ5 5 μ M) e supressores (NNDA e NCB) em concentração de 0 a 4mM, b) para TX-100 (utilizando 4mM de detergente + AQ5 5 μ M) e supressores (NNDA e NCB) em concentração de 0 a 4mM, c) para CTAB (utilizando 6mM de detergente + AQ5 5 μ M) e supressores (NNDA e NCB) em concentração de 0 a 4mM) 188

Figura 62. Gráficos representativos para a determinação de Nagg, a) Gráfico da supressão de fluorescência de AQ5 (5 μ M) em SDS (20mM) (λ_{exc} =445nm, λ_{em} =400-750nm, com 7,5mm de abertura de slits, sem filtro de corte e fotomultiplicadora em 700), com adição de NNDA (0, 20, 40, 80, 120, 160, 200 e 280 μ M), b) Método do gráfico para a determinação do Nagg de SDS por fluorescência estacionária. 190

Lista de Tabelas

Tabela 1. Rendimentos das nitroquinolinas	38
Tabela 2. Massas moleculares exatas experimentais e calculadas para as nitroquinolinas.	41
Tabela 3. Rendimentos de preparação das aminoquinolinas.....	42
Tabela 4. Resultados dos valores para massas moleculares experimentais encontradas para os compostos sintetizados comparando-se com a massa molecular teórica para cada um dos compostos.....	45
Tabela 5. Nome e características (índice de refração (n) e constante dielétrica (ϵ) dos solventes utilizados no trabalho).	64
Tabela 6. Valores de máximo de absorvância das aminoquinolinas em diferentes solventes	69
Tabela 7. Valores de máximo de fluorescência das aminoquinolinas	70
Tabela 8. Valores de deslocamento de Stokes das aminoquinolinas em diferentes solventes	71
Tabela 9. Valores da somatória dos comprimentos de onda máximo de absorvância e emissão de fluorescência das aminoquinolinas em diferentes solventes.....	72
Tabela 10. Funções de polaridade dos solventes para os modelos solvatocrômicos utilizados	74
Tabela 11. Coeficiente de correlação linear (R^2) para os modelos de solvatocromismo estudados.....	79
Tabela 12. Valores dos raios de Onsager (a), variação de momento de dipolo ($\Delta\mu$) e momento de dipolo no estado excitado (μ_e) para as aminoquinolinas.....	80
Tabela 13. Valores de Absortividade molar das aminoquinolinas	82
Tabela 14. Valores de rendimento quântico de fluorescência das aminoquinolinas ..	84

Tabela 15. Valores de rendimento quântico obtidos pela equação 15, valores de tempo de vida de fluorescência obtidos pelo experimento anterior e valores dos decaimentos radiativos e não-radiativos obtidos pelo cálculo descrito acima.	87
Tabela 16. Tabela comparativa de valores de comprimento de onda máximo antes e depois da adição de BSA ao meio (relativo ao experimento observado na Figura 25) e seus relativos valores de fluorescência, bem como comparativo entre esses dois valores mostrando a variação positiva no valor de fluorescência após a adição de BSA para cada composto.....	115
Tabela 17. Parâmetros termodinâmicos encontrados para a interação AQ4-BSA.	127
Tabela 18. Valores encontrados de albumina em plasma utilizando diferentes métodos. O plasma utilizado foi de uma pessoa saudável.....	146
Tabela 19. Fluorescência integrada (AUC) das aminoquinolinas na ausência e presença de surfactantes.	170
Tabela 20. Tabela comparativa entre os resultados obtidos com AQ5 em relação a sonda de referência Coumarina-153 e com os resultados encontrados na literatura com outros métodos de obtenção dos resultados.....	180

1. Introdução

O estudo de meios biológicos e suas características é de suma importância para a compreensão do metabolismo e processos celulares, porém essa área é altamente complexa, uma vez que envolve inúmeras reações, com micro e macromoléculas em equilíbrio. Assim, o estudo de macromoléculas capazes de retratar em parte suas funções celulares é uma alternativa comum para o estudo dos meios biológicos, através da utilização de um modelo específico. Para a caracterização e detecção dessas macromoléculas é possível a utilização de diversas técnicas sendo que os métodos espectroscópicos que englobam espectroscopia de absorção UV-Vis, fluorescência e até mesmo a técnicas de infravermelho são muito utilizadas por serem versáteis e simples, capazes de dar uma resposta rápida e apresentarem características pouco invasivas para as amostras utilizadas (Jun, Chenoweth e Petersson, 2020; Ueno e Nagano, 2011).

No campo das técnicas baseadas em fluorescência molecular, as sondas fluorescentes (também chamados de fluoróforos) merecem destaque pois podem ser utilizadas para detectar biomoléculas, monitorar reações enzimáticas, detectar alterações em microambientes entre outros processos. Isto ocorre devido as sondas fluorescentes que podem ser altamente sensíveis a sistemas moleculares específicos e as características físico-químicas dos meios onde se encontram (Niu *et al.*, 2021). Muitos fluoróforos têm a capacidade de alterar seu rendimento quântico e apresentar deslocamento do comprimento de onda máximo da banda de emissão tanto a partir de mudanças estruturais das macromoléculas (por exemplo estado nativo e estado desnaturado), como também com a alteração das propriedades do meio onde está inserido, como

polaridade (muitas dessas moléculas apresentam características solvatocrômicas), tipos e concentração de íons, pH, entre outros. Além disso, mesmo quando se trata de amostras biológicas contendo uma fluorescência intrínseca (como no caso das proteínas que contêm aminoácidos aromáticos como o triptofano, tirosina e fenilalanina), a marcação dessas macromoléculas com sondas fluorescentes mostra especificidade molecular e novos valores de emissão máxima bem distintos em relação àsquelas da fluorescência intrínseca.

Dada a importância e inúmeras aplicações, várias moléculas vêm sendo desenvolvidas e aplicadas como sonda fluorescente para estudo de estrutura e função de proteínas. Nesta área destaca-se os estudos envolvendo a albumina sérica humana (HSA, *Human Serum Albumin*) pois é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, apresenta função carreadora de moléculas além de outros papéis fundamentais como a manutenção e regulação da pressão osmótica, pH, entre outras. Quando em quantidade anormal, essa proteína é normalmente associada a doenças como por exemplo diabetes, problemas renais e hepáticos (como hepatite e cirrose). Assim, uma detecção quantitativa da albumina em fluidos biológicos, vem ganhando muita importância no diagnóstico e medicina preventiva nos últimos anos, e as sondas fluorescentes apresentam potencial como utilização nesses casos. Reja e colaboradores (Reja *et al.*, 2016) desenvolveram uma sonda fluorescente para detecção diagnóstica pré-clínica de HSA no plasma sanguíneo de pacientes hipertensos em comparação com pessoas saudáveis de forma confiável e com limite de detecção baixos e linearidade alta, conseguindo até mesmo diferenciar a HSA da BSA (albumina sérica bovina) devido aos rendimentos quânticos se apresentarem distintos. Behera e colaboradores (Behera *et al.*, 2021) desenvolveram uma molécula

capaz de detectar BSA através de supressão de fluorescência estacionária, modificação do tempo de vida do fluoróforo, estudos de anisotropia com valores da termodinâmica de complexação favoráveis e confirmados por estudos teóricos, além de se específico ao sítio hidrofóbico do subdomínio IIA.

Outra aplicação importante das sondas fluorescentes se dá na área de sistemas supramoleculares como membranas celulares, lipossomas e micelas. Nestes casos, a dinâmica rotacional, vibracional e forças intermoleculares entre a sonda e o meio são fundamentalmente diferentes do meio externo (aquoso). Dessa maneira, a presença e características físico-químicas dessas estruturas poderão ser detectadas por alterações em rendimento quântico, anisotropia, transferência de energia ressonante, tempo de vida de estados excitados entre outras características do fluoróforo. Uma molécula orgânica fluorescente normalmente é solúvel em meio micelar devido aos sítios hidrofóbicos próximos à interface que são favoráveis para solubilização. Esse conceito é encontrado em trabalhos como o Uchiyama e colaboradores (Uchiyama *et al.*, 2019), que estudaram uma série de compostos fluorescentes com características solvatocrômicas a fim de desenvolver uma sonda de mapeamento de surfactantes de diferentes cargas e consequente identificação de diferentes ambientes de membranas celulares complexas *in vivo*. Guan e colaboradores (Guan, Yang e Lu, 2020) realizaram um trabalho utilizando diversos corantes fluorescentes como base para um estudo da localização de moléculas orgânicas nas micelas usando como base o conceito da transferência de energia ressonante (RET) e o deslocamento da banda de emissão por agregação (AIE) onde os doadores foram ancorados nas micelas e os aceptores adicionados em solução. Além disso, devido a mudança repentina nas propriedades da solução

na formação de micelas e sabendo-se que fluoróforos são sensíveis a essas mudanças no ambiente, uma sonda fluorescente pode ser utilizada para a determinação de parâmetros relacionados à formação de uma micela como a concentração mínima necessária para a formação das micelas (concentração micelar crítica, CMC) e o número de moléculas necessárias para a formação de uma micela (ou o número de agregação, ou N_{agg}). (Fluksman e Benny, 2019; Lin, H. *et al.*, 2017; Niu *et al.*, 2019; Wu, Tachiya e Yan, 2015)

Considerando o exposto e a importância do tema, este trabalho teve como objetivo a síntese e estudo aplicados de novas sondas fluorescentes baseadas em sistemas quinolínicos polissubstituídos (Santos *et al.*, 2017a). Foram aplicadas como sonda para diferenciar o meio em que se encontra, seja ele solventes com diferentes polaridades, seja para o estudo do meio proteico nativo e desnaturado ou ainda para a o estudo de meio micelar formado por diferentes tensoativos. O trabalho apresenta uma revisão bibliográfica dos conceitos gerais utilizados e depois é dividido em capítulos onde as diferentes aplicações são apresentadas. Mostraremos a eficiência pela qual as sondas desenvolvidas foram capazes de interagir com proteínas como albumina e lisozima, bem como sua utilização para caracterizar a carga de sistemas micelares.

2. Revisão bibliográfica de conceitos gerais utilizados para o desenvolvimento do trabalho

2.1. Transições eletrônicas

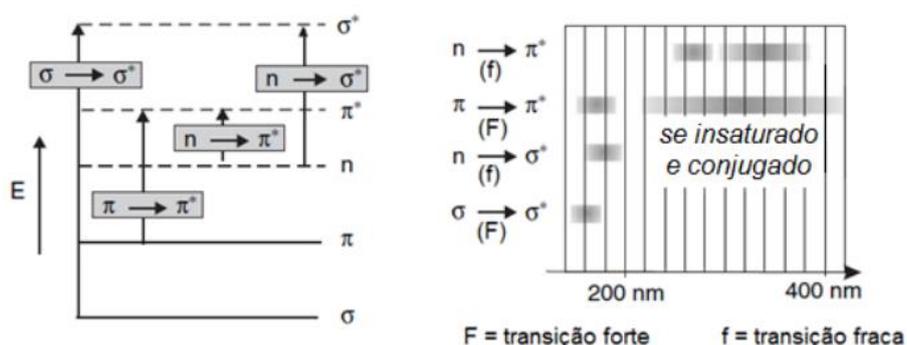
Quando uma molécula está em seu estado fundamental, ela pode ser incidida por uma radiação eletromagnética que a faz passar para o estado excitado. A radiação absorvida pela molécula tem um valor igual à diferença entre esses estados, ou seja, a fotoexcitação só ocorre em comprimentos de onda específicos e o processo é chamado transição eletrônica. Em situações experimentais e análise de dados, como por exemplo nas espectroscopias de absorção e de fluorescência, a transição eletrônica que ocorre do orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO – do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*) para o orbital molecular não ocupado de menor energia (LUMO – do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) é a mais importante para ser estudada (Pavia *et al.*, 2008; Valeur, 2001).

Assim, dependendo do tipo de orbital (σ , π ou n), para que uma molécula seja fotoexcitada será necessária uma energia diferente para promover um elétron que esteja localizado em cada um dos casos. A representação de um elétron no estado excitado em um orbital é feita pela letra do orbital adicionado do símbolo * para os orbitais σ e π (representados ao final por σ^* , π^*).

As transições do tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ são as que apresentam os elétrons mais fortemente atraídos pelo núcleo, necessitando assim de radiação de maior energia para a excitação e conseqüentemente com menores comprimentos de onda (entre 200 e 100nm); as moléculas que apresentam esse tipo de transição são os hidrocarbonetos saturados. As transições do tipo $n \rightarrow \sigma^*$ são menos energéticas do que as anteriores, podendo ser excitadas com energias relativas

aos comprimentos de onda entre 150 e 250nm. Para que esse tipo de transição ocorra é necessário par de elétrons não ligantes (n), e os exemplos mais comuns são compostos contendo átomos como O, N, S e halogênios (Valeur, 2001). Os elétrons que estão nos orbitais n e π podem ser excitados em faixas de maiores comprimentos de onda (250-380nm), sendo que as transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ são as que apresentam um maior número de estudos na literatura, pois dão aos compostos com essas características propriedades fotofísicas de transição próximas ao comprimento de onda do visível, além de característica de transferência de carga, que pode levar ao aumento no momento de dipolo da molécula quando no estado excitado em relação ao seu estado fundamental (Rouessac e Rouessac, 2007; Valeur, 2001). As transições $\pi \rightarrow \pi^*$ são observadas principalmente em compostos com insaturações conjugadas e anéis aromáticos, necessitando de menores energias para a transição e apresentando maiores comprimentos de onda para que ocorra, mostrando muitas vezes compostos que emitem cor na faixa de comprimentos de onda no visível (380-740nm) (Rouessac e Rouessac, 2007). As diferentes energias entre os orbitais moleculares das transições eletrônicas citadas podem ser observadas comparativamente na Figura 1.

Figura 1. Níveis de energia em orbitais moleculares e possíveis transições eletrônicas mais comuns em moléculas (Adaptado de: (Rouessac e Rouessac, 2007))

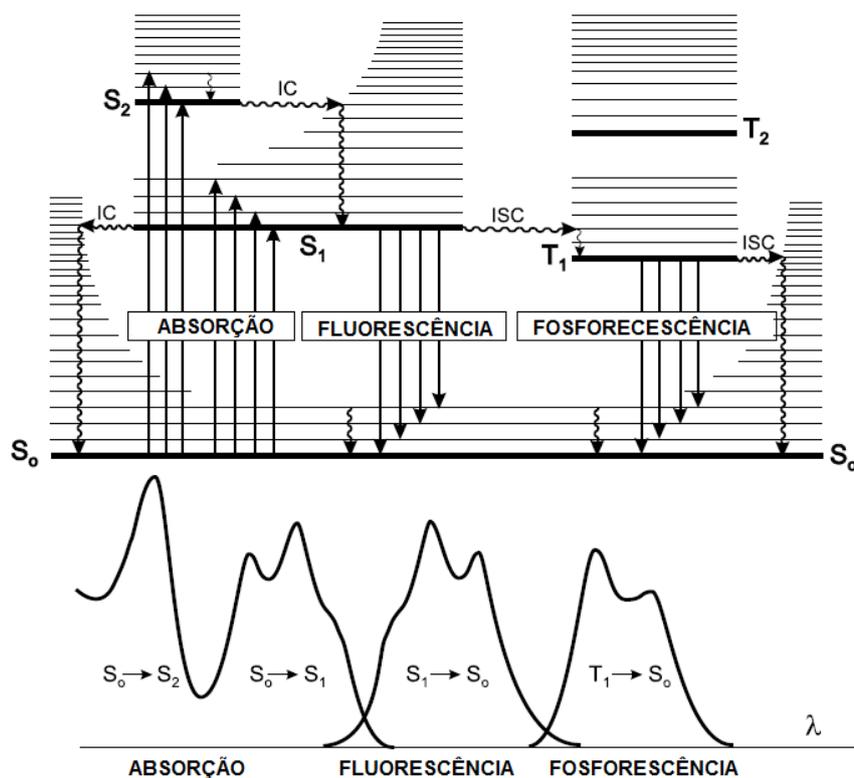


2.2. Espectroscopia de absorção e de fluorescência molecular

Em temperatura ambiente, a maioria das moléculas ocupa o estado vibracional de mais baixa energia. Quando a molécula é excitada, ela pode alcançar qualquer subnível vibracional associado com um estado eletrônico e resultar em diferentes energias absorvidas, que vão depender da estrutura da molécula. Como moléculas podem apresentar diferentes orbitais moleculares com subníveis vibracionais e rotacionais distintos, os espectros não apresentam uma linha discreta, mas sim o aspecto de uma banda. Além disso, a maioria dos compostos apresentará mais de uma banda no espectro de absorção, exceto por aqueles que apresentarem níveis rotacionais restritos, como por exemplo, estruturas planares e compostos aromáticos sem substituintes (Rhys Williams, 2000). As bandas de absorção apresentam um valor de comprimento de onda onde ocorre a máxima absorção de energia, que corresponde à energia necessária para que ocorra a transição eletrônica, e a intensidade dessa banda vai depender da interação entre a energia incidente e o sistema eletrônico (Pavia *et al.*, 2008).

Átomos ou moléculas podem emitir luz quando elétrons que estão no estado excitado decaem radiativamente ao estado fundamental. Os processos que podem ocorrer entre a absorção e emissão de luz são demonstrados no chamado Diagrama de Jablonski (Figura 2). Esse diagrama é normalmente utilizado para estudos iniciais de espectroscopia devido a ser uma forma simples de visualizar diversos processos como a absorção de um fóton, conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistema, fosforescência, transições do tipo triplete-triplete entre outros processos. Os estados do tipo singlete estão chamados de S, sendo que o S_0 representa o estado eletrônico fundamental e $S_1, S_2...$ são estados singletes (S) excitados. Há também a representação dos estados triplete (T), que só ocorrem no estado excitado e são chamados de $T_1, T_2,...$ Além disso, é possível observar os níveis vibracionais associados a cada nível eletrônico (representadas pelas linhas mais finas e horizontais) (Valeur, 2001).

Figura 2. Diagrama de Jablonski e representação das posições relativas à absorção, fluorescência e fosforescência. (Adaptado de: (Valeur, 2001))



As linhas verticais apontando para cima representam as absorções de fóton que ocorrem do nível S_0 para os estados mais energéticos que são os estados eletrônicos descritos como 0, 1, 2, etc. Dentro de cada nível eletrônico existem os níveis vibracionais onde as moléculas podem estar (Lakowicz, 2006); quando as moléculas são excitadas para esses estados eletrônicos as mesmas perdem rapidamente qualquer excesso de energia vibracional, relaxam para o nível de mais baixa energia daquele estado eletrônico, e esse processo não radiante é conhecido como relaxação vibracional. A excitação direta para o estado tripleto é um processo que envolve mudança na multiplicidade do spin eletrônico, e a probabilidade que isso ocorra é muito remota, portanto sendo chamada de transição proibida (Skoog, Holler e Crouch, 2018). Ao analisarmos

a absorção no Diagrama de Jablonski, é possível observar que esse o processo depende apenas da excitação dos compostos, sendo mais rápido do que o processo de relaxação dos compostos, por isso as medidas de absorção apresentam comprimentos de onda mais baixos do que as medidas de fluorescência e fosforescência.

Como pode ser observado no Diagrama da Figura 2, o processo de de-excitação pode ocorrer de várias formas, desde processos chamados de conversão interna, cruzamento intersistemas, e até mesmo sendo possível observar a emissão de fluorescência ou fosforescência das moléculas (Lakowicz, 2006; Valeur, 2001); porém nesse momento maiores explicações serão dadas sobre a fluorescência molecular. Denomina-se fluorescência a um processo de emissão onde estão envolvidos spins eletrônicos de mesma multiplicidade. É importante ressaltar que para que a fluorescência ocorra é necessária uma diferença entre os estados vibracionais S_1 e S_0 relativamente grande, pois uma diferença pequena entre os estados pode levar à sobreposição de níveis vibracionais, o que leva à molécula excitada a relaxar por um processo de relaxação vibracional chamado de cruzamento interno (CI, ou como representado na Figura 2 por IC) que ocorre sem a emissão de fóton e conseqüentemente sem emissão de fluorescência. Assim, a molécula precisa ter uma estrutura apropriada e estar em um meio que favoreça a desativação radiativa $S_1 \rightarrow S_0$ e a conseqüente fluorescência da mesma. É complicado prever se uma molécula apresentará essas características sem saber qual o valor da diferença de energia relativa entre os estados, porém observa-se que moléculas rígidas e com grande quantidade de elétrons π (como por exemplo, moléculas aromáticas) apresentam um grande potencial de apresentarem fluorescência

uma vez que estruturas moleculares com maiores restrições de liberdade vibracional têm o processo não radiativo de CI minimizado e a planaridade da molécula favorece a interação e a conjugação entre os sistemas de elétrons π (Demchenko, 2015; Ingle e Crouch, 1988).

2.2.1. Tópicos e conceitos importantes sobre fluorescência

Considerando-se todos os conceitos sobre espectroscopia de fluorescência discutidos até o momento, e considerando a importância da técnica para o trabalho realizado, haverá a discussão de alguns aspectos teóricos importantes para complementar o que foi mostrado até o momento.

Ao analisarmos o diagrama de Jablonski, no item 2.2 foi possível observar que a fluorescência apresenta espectro de emissão em comprimentos de onda maiores do que a absorbância. Essa observação tem seus fundamentos no Princípio de Franck-Condon que diz que o tempo para uma transição eletrônica ocorrer é muito menor do que o necessário para haver movimentação dos núcleos atômicos, e devido a isso uma transição eletrônica provável será aquela que não envolva mudanças no núcleo atômico. Esse princípio vem da aproximação de Born-Oppenheimer, da mecânica quântica, que descreveu que a movimentação dos elétrons é muito mais rápida do que aquelas que ocorrem no núcleo. A diferença do comprimento de onda máximo de emissão (λ_{em}) e absorção (λ_{abs}) para um mesmo sistema e condições é chamado de Deslocamento de Stokes. Outra observação é que, como as diferenças entre os níveis vibracionais são semelhantes no estado fundamental e no estado excitado, os espectros de fluorescência frequentemente tem sua forma

semelhante à banda de absorção relativa à excitação da molécula (Pavia *et al.*, 2008; Valeur, 2001).

Um outro conceito importante e correlacionado são as medidas de tempo de vida discutido. O tempo de vida do estado excitado é definido como sendo o tempo médio que a molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Sabendo que, matematicamente, o tempo de vida é o inverso da soma de todas as velocidades que desativam o estado, e lembrando que a fluorescência (processo radiativo) concorre com processos não-radiativos, o tempo de vida descrito anteriormente é chamado de tempo de vida experimental (τ_s). Se o único caminho para a desativação do estado excitado fosse o processo emissão de fóton (ou seja, apenas o decaimento radiativo) seria possível se encontrar o tempo de vida intrínseco (τ_n) do fluoróforo, como pode ser observado nas Equações:

$$\tau_s = \frac{1}{K_r + K_{nr}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\tau_n = \frac{1}{K_r} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: K_r é o decaimento radiativo

K_{nr} é o decaimento não-radiativo

Além disso, o conceito de rendimento quântico de fluorescência (ϕ) se correlaciona com o conceito de tempo de vida, uma vez que é definido como a

razão entre a velocidade de desativação do processo de fluorescência (decaimento radiativo, K_r) pela velocidade de desativação total do estado excitado (K_r+K_{nr}). Se todos os processos não-radiativos fossem desprezíveis ($K_{nr}\approx 0$) o rendimento quântico seria 1 (ou 100%), e é possível também pensar no rendimento quântico de fluorescência como a razão entre τ_s e τ_n (Lakowicz, 2006; Schulman, 1979; Valeur, 2001).

2.2.2. Processos de transferência de carga intermolecular (TCI ou ICT)

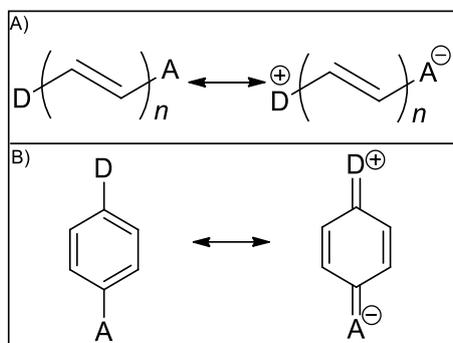
A transferência de carga e a transferência eletrônica nas moléculas tem grande importância em diversos processos químicos e biológicos como a fotossíntese, o metabolismo, entre outros. Mais especificamente nesse contexto, os processos de transferência de carga eletrônica de um doador (D) rico em elétrons para um aceitador (A) deficiente de elétrons são divididos basicamente em duas grandes categorias: transferência quando D e A estão em diferentes moléculas (transferência de carga intermolecular) e a transferência quando D e A se apresentam na mesma molécula (transferência de carga intramolecular).

A transferência de carga intramolecular (TCI) (também chamado de ICT, pois advém do inglês *Intramolecular Charge Transfer*) ocorre quando a molécula em questão é fotoexcitada e os seus elétrons são transferidos de uma parte para a outra da molécula; como consequência desse movimento eletrônico a distribuição de carga no estado excitado da molécula tem uma distribuição dos elétrons de forma diferente daquela no estado fundamental. O fenômeno do ICT ocorre em moléculas onde o grupo doador e o grupo aceitador é conectado através de ligações conjugadas do tipo π (Figura 3); essas moléculas que

contem essa conjugação são normalmente as derivadas de benzeno, estilbenos, polienos, polifenis, oligotiofenos, entre outros sistemas encontrados na literatura (Misra e Bhattacharyya, 2018).

Conforme há um aumento da quantidade de conjugações do tipo π conectando o doador e o aceitador nesse sistema, há normalmente a observação do aumento nas alterações dos valores do momento de dipolo do estado excitado, aumentando assim os valores de $\Delta\mu$ que é a diferença entre o momento de dipolo no estado excitado e no estado fundamental de uma dada molécula (Blanchard-Desce et al., 1995). Devido aos fatores anteriormente discutidos, materiais baseados nessas moléculas orgânicas tem grande potencial para aplicações em diversas áreas como estudos para OLEDs, transistores de efeito de campo, células solares fotosensibilizadas, além de possibilitarem o estudo de processos de transferência eletrônica em biomoléculas (Misra e Bhattacharyya, 2018). Assim sendo, moléculas que apresentam esse tipo de sistema conjugado são utilizadas como sensores de polaridade, viscosidade e outras propriedades do meio, pois essas alterações físico-químicas podem causar alterações “on-off” no sinal de fluorescência desses compostos (Han *et al.*, 2018). Um exemplo é a sonda de polaridade ácido 1-sulfônico-8-anilinaftaleno (ANS) que tem sua fluorescência aumentada quando está dentro do sítio hidrofóbico da proteína e devido a essa característica é utilizada para monitorar a mudanças estruturais na proteína (Barros *et al.*, 2015).

Figura 3. O processo ICT em: a) um sistema (poli)eno e b) em um sistema aromático doador-aceitador. A transferência de carga do doador (D) para o aceitador (A) ocorre no estado excitado através de uma “ponte” de elétrons- π para a formação de um estado ICT de momento de dipolo maior do que no estado fundamental (ADAPTADO DE: (Misra e Bhattacharyya, 2018)).



2.2.3. Supressão de fluorescência

Qualquer processo que cause uma diminuição na intensidade de fluorescência é chamado de supressão. A supressão pode ser pela dissipação da energia eletrônica do fluoróforo através do calor, pela transferência de energia de um doador para um aceitador que pode ser ou não fluorescente, porém ao final a fluorescência sofrerá modificação em relação à inicial.

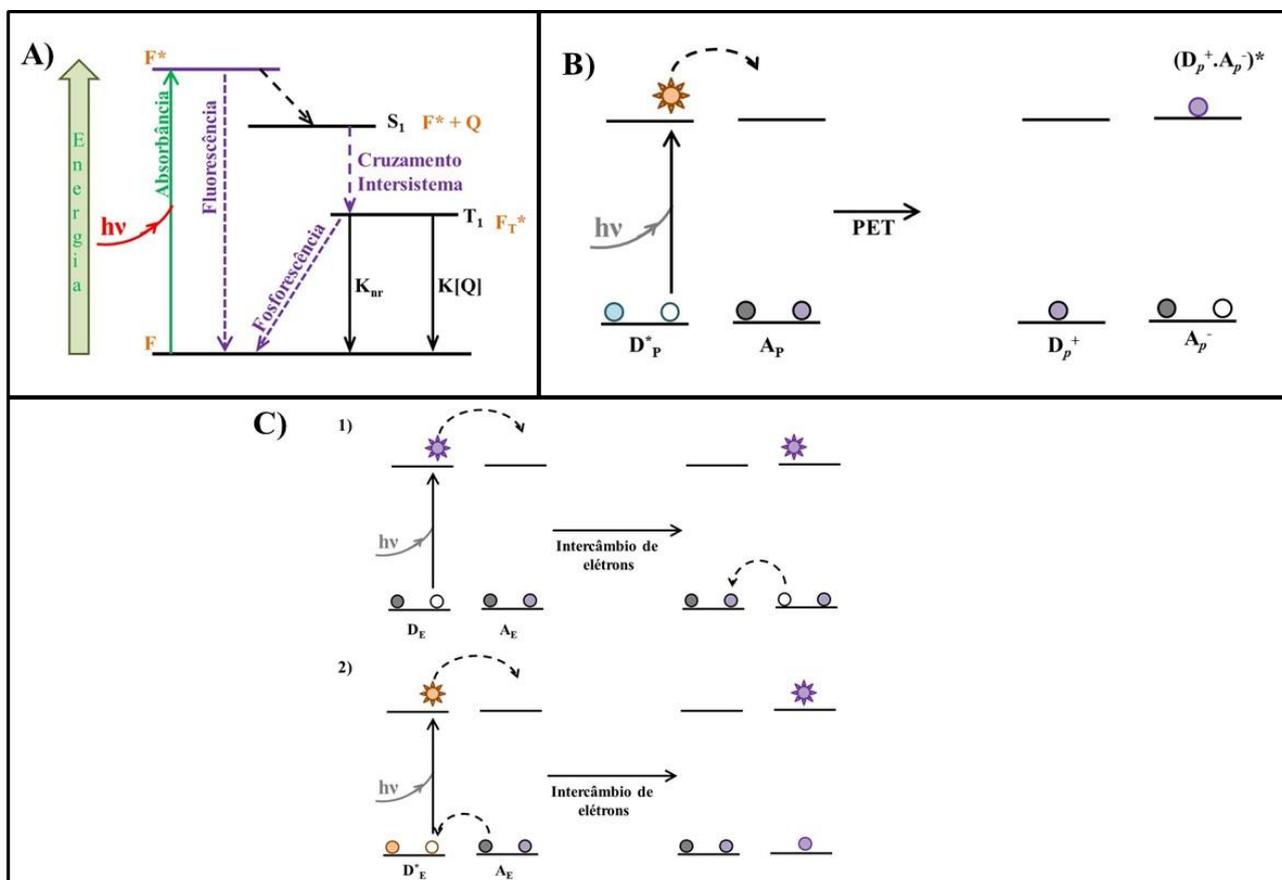
A supressão pode ocorrer por diversas formas de mecanismo, sendo que três delas são as mais comuns: i) cruzamento intersistema (ou efeito de metal pesado), ii) intercâmbio de elétrons (ou interações de Dexter), iii) transferência eletrônica fotoinduzida (PET, do inglês *Photoinduced Electron Transfer*) e em alguns casos é difícil conseguir saber exatamente qual o mecanismo está ocorrendo prioritariamente, uma vez que estudos indicam que a supressão ocorre por uma combinação desses mecanismos, um mecanismo não irá excluir o outro necessariamente (Lakowicz, 2006).

O cruzamento intersistema é normalmente ligado a supressão por halogênios de alto peso molecular e oxigênio, uma vez que o encontro com um átomo pesado ou uma molécula de oxigênio triplete, uma vez que esse fenômeno depende de uma conversão do spin no estado excitado singlete ao triplete, o que aumenta o tempo de vida desse fluoróforo podendo gerar fosforescência e um deslocamento para maiores comprimentos de onda (com menores energia); além disso, como a transição do estado triplete para o estado singlete é proibida há uma queda no rendimento quântico (Figura 4A).

O mecanismo de supressão por intercambio de elétrons ocorre por uma troca simultânea de dois elétrons entre doador e receptor através dos LUMOs ($D_e^* \rightarrow A_e$) e HOMOs ($A_e \rightarrow D_e^*$) propagada através dos orbitais do ligante de ponte, para que ocorra é necessária uma distância muito curta e com sobreposição de orbitais entre as espécies (Figura 4C) (Valeur, 2001).

O processo de PET é quando um complexo ($D_p^+A_p^-$) é formado entre o doador de elétrons (D_p) e o aceitador de elétrons (A_p), esse complexo pode retornar ao estado fundamental sem a emissão de um fóton, mas em alguns casos a emissão de exciplexo é observada. Ao final, o elétron extra do acceptor retorna para a o doador (Figura 4B). A terminologia do PET pode ser confusa devido ao fluoróforo excitado poder ser tanto o doador como o receptor de elétrons. A direção da transferência de elétrons no estado excitado é determinada pelo potencial de redução das moléculas quando ainda no estado fundamental. Na PET o termo doador ou acceptor não identifica qual espécie está inicialmente no estado excitado, porém a situação mais comum é quando o estado excitado do fluoróforo tem caráter aceitador de elétrons (Lakowicz, 2006).

Figura 4. Esquemas representativos dos mecanismos de supressão de fluorescência mais conhecidos e discutidos na literatura. A) cruzamento intersistema, B) transferência eletrônica fotoinduzida, C) intercâmbio de elétrons (Adaptado de: (Lakowicz, 2006))



2.2.4. Fluorescência estacionária e resolvida no tempo

As medidas de fluorescência podem ser divididas de forma geral em dois tipos: estacionária e resolvida no tempo. As medidas de fluorescência estacionária são as mais comumente encontradas e são realizadas através de uma excitação e observação constante do fenômeno uma vez que a amostra é colocada em um feixe de luz ininterrupto pelo tempo do experimento enquanto o espectro de intensidade de fluorescência é medido. Quando realizado esse tipo de medida, o espectro obtido é a distribuição de comprimentos de onda de uma emissão medida em um comprimento de onda de excitação único e constante

(que normalmente é o valor do comprimento de onda onde a amostra apresenta o maior valor de absorção). O segundo tipo de medida é a de fluorescência resolvida no tempo, utilizada para a medição de decaimento de intensidade de fluorescência. Para isso, a amostra é exposta à um pulso luminoso com tempo menor do que o tempo de decaimento de fluorescência observado para aquele sistema, e a intensidade de fluorescência obtida através da medida é dada pelo número de fótons emitidos por unidade de tempo e unidade de solução. A técnica mais utilizada atualmente para a realização da fluorescência resolvida no tempo é a contagem de fótons, que utiliza uma contagem sucessiva de fótons correlacionados no tempo, e ao final se obter um histograma que apresenta a probabilidade da distribuição de intensidade de fluorescência no tempo para os fótons emitidos como resultado da excitação da amostra. Assim, cada contagem individual de fóton detectado deve ser vinculada a um pulso de excitação e o histograma é resultado da acumulação de um grande número de pulsos de excitação da amostra. A medida é então realizada ao se excitar a amostra com pulsos de luz e o decaimento da intensidade de fluorescência é adquirido com o acúmulo do número de contagens (Lakowicz, 2006; Valeur, 2001).

Ao correlacionar as medidas de estado estacionário e resolvidas no tempo, é observado que a medida no estado estacionário é uma média do que ocorre no fenômeno observado nas medidas resolvidas no tempo. Enquanto que as medidas de estado estacionário são simples, medidas resolvidas no tempo requerem uma instrumentação mais complexa e cara, porém essa última pode fornecer informações de processos fotoquímicos que não podem ser observadas nas medidas de estado estacionário, principalmente sobre a interação do fluoróforo com a sua vizinhança (microambiente do fluoróforo), e assim torna-se

possível estudos de: colisões efetivas entre fluoróforo e supressor, formação de dímeros e excímeros, distâncias moleculares e difusão rotacional, velocidade de transferência de energia, além das observação de reações em estado excitado, entre outros. Além disso, uma mudança nos tempos de decaimento de fluorescência pode indicar que o fluoróforo está em diferentes microambientes ou que está ocorrendo processos distintos de estado excitado, uma vez que o tempo de vida estabelece essa janela temporal durante a qual outros processos de estado excitado podem alterar a emissão e serem detectados (Connor e Phillips, 1984; Lakowicz, 2006; Valeur, 2001).

2.2.5. Dicroísmo circular

Outra técnica utilizada neste trabalho e encontrada na literatura para o estudo de macromoléculas (como as proteínas) é o dicroísmo circular (CD). Antes da discussão sobre a técnica se faz necessário uma discussão sobre a natureza eletromagnética da luz, além de um aprofundamento no tema sobre luz polarizada e circularmente polarizada.

A luz é basicamente uma onda eletromagnética, ou seja, é constituída de um campo elétrico e um campo magnético que oscilam perpendicularmente uma em relação a outra. As fontes comuns de luz produzem ondas eletromagnéticas em que o campo elétrico (e o magnético) oscilam em todas as direções no plano perpendicular à direção de propagação, não havendo uma direção preferencial de oscilação, isso ocorre porque à medida que a luz “caminha” esses dois planos (elétrico e magnético) giram em torno do seu próprio eixo de propagação; esse tipo de luz é chamada de luz não polarizada. Quando utilizamos um filtro

polarizador é possível selecionar ondas que oscilem em um único plano, que são conhecidas como luz polarizada.

A polarização das ondas eletromagnéticas pode ser classificada em três categorias: linear, circular e elíptica. Os nomes se referem à figura desenhada no plano perpendicular à direção de propagação, por exemplo, se o vetor que descreve o campo elétrico em um ponto do espaço como uma função do tempo está sempre em uma mesma direção, a onda é dita linearmente polarizada.

Moléculas orgânicas opticamente ativas (quirais) são capazes de girar o plano de polarização ao absorverem luz linearmente polarizada, e assim a luz que emerge de uma solução contendo uma molécula quiral tem sua polarização modificada, o que pode ser medido através da técnica de polarimetria. Uma onda eletromagnética plana monocromática é circularmente polarizada se, num ponto qualquer, o vetor campo elétrico (e conseqüentemente o vetor magnético) mantiver seu módulo constante ao longo do tempo, mas sua direção variar de forma que ele descreva periodicamente um círculo com período igual ao da onda. Sabendo que uma onda linearmente polarizada pode ser descrita como uma combinação de duas ondas circularmente polarizadas, uma à direita e uma à esquerda, essas duas componentes interagirão de forma distinta quando ocorrer a rotação da polarização em moléculas quirais (Flemming e Rosa, 2015; Sreerama e Woody, 2004).

Considerando esses princípios, uma amostra que é irradiada por uma luz polarizada circularmente, pode ser transformada em uma luz elíptica, se houver uma diferença na absorção de luz polarizada circularmente para a direita (RHCP, da sigla em inglês *Right Hand Circularly Polarized*) e luz polarizada circularmente

para a esquerda (LHCP, da sigla em inglês *Left Hand Circularly Polarized*), o que ocorre em amostras que contém moléculas quirais. A técnica de CD é capaz de identificar a mudança na polarização da luz, ou seja, é capaz de medir a dispersão da rotação ótica. Um sinal de CD pode ser positivo ou negativo; se a luz polarizada circularmente para a esquerda é absorvida numa extensão maior do que a luz polarizada circularmente para a direita se tem um sinal positivo de CD, e for oposto (luz para esquerda em menor escala) há o aparecimento de um sinal negativo de CD (Fasman, 1996).

A espectroscopia de CD pode ser utilizada para estudos de proteínas e as faixas analisadas são normalmente divididas em três, baseadas na energia de transição eletrônica que caracteriza cada faixa: 1) UV distante (abaixo de 250nm), 2) UV próximo (250-300nm) e 3) UV-visível próximo (300-700nm). Na faixa (1) há a contribuição dos resíduos de amida dos peptídeos dos aminoácidos e é observada a estrutura secundária, na faixa (2) há a contribuição dos grupos aromáticos dos aminoácidos e a observação da estrutura terciária e na faixa (3) há a contribuição de cromóforos extrínsecos (Sreerama e Woody, 2004). Assim, a técnica de CD pode ser utilizada para auxiliar na determinação de estruturas e identificação de novas proteínas. Por exemplo, proteínas que contem estruturas do tipo α -hélice tem bandas negativas em comprimentos de onda próximos a 208 e 222nm e banda positiva próxima a 193nm, enquanto que proteínas com estruturas do tipo folhas- β antiparalelas apresentam banda negativa em torno de 208nm e banda positiva em torno de 195nm, enquanto que proteínas desestruturadas apresentam uma diminuição do sinal de dicroísmo próximo de 210nm (Greenfield, 2007).

Dentro da técnica de CD, é possível também a observação de um fenômeno chamado dicroísmo circular induzido (ICD) que ocorre quando há a indução de atividade ótica de um composto aquiral (ligante) a partir de sua colocação em um meio quiral (molécula indutora de quiralidade). Esse fenômeno é observado nos espectros de CD a partir do aparecimento ou deslocamento de uma banda onde antes da complexação das duas unidades não havia sinal. Quando colocado em um meio quiral, a molécula pode sofrer desde interações com o meio anisotrópico ou até mesmo restringir seu grau de liberdade, entre outros efeitos, e assim apresentar esse novo sinal. Por isso, o ICD vem sendo utilizado na literatura a fim de se estudar as interações de moléculas orgânicas quirais em sistemas como polímeros, em ambiente de macromoléculas como proteínas e estruturas supramoleculares como micelas, entre outros. Além disso, através da espectroscopia de ICD é possível se obter parâmetros termodinâmicos de ligação, informações sobre a estequiometria e o constante de afinidade entre o ligante e a molécula indutora de sinal. Porém, para a obtenção desses dados é necessário haver o sinal de ICD, que só será possível se houver interações específicas orientando mútua e independentemente a natureza das duas espécies de forma que as forças rotacionais não sejam sobrepostas ou anuladas por orientações aleatórias (Allenmark, 2003; Gawroński e Grajewski, 2003).

2.2.6. Absorbância e a Lei de Lambert-Beer

Um dos princípios da espectroscopia de absorção nos mostra que quanto maior for o número ou a capacidade das moléculas de absorver luz em um determinado comprimento de onda, mais intensa será a absorção. Através do

tratamento matemático das medidas de absorvência é possível relacionar medidas experimentais de intensidade de absorção com propriedades espectroscópicas da matéria; a equação que correlaciona esses parâmetros é chamada de Lei de Lambert-Beer, que diz que “sucessivos aumentos no número de moléculas absorventes idênticas no caminho de um raio de luz monocromático absorvem frações iguais da energia radiante que as atravessa” e é expresso simplificadaamente pela Equação 3, em um certo comprimento de onda:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: A é a absorvência da amostra

I_0 é a intensidade de luz que é incidida na amostra

I é a intensidade de luz que emerge da amostra

c é a concentração molar do soluto na amostra (em mol.L⁻¹)

l é o comprimento da cubeta na direção onde se incide a luz (em cm)

ε é o coeficiente de absorvência molar da molécula observada (L.mol⁻¹.cm⁻¹)

A absorvência molar (também conhecida como coeficiente de extinção molar) é uma propriedade da molécula que passa por uma transição eletrônica e não depende dos parâmetros variáveis envolvidos na preparação de uma

solução. É definida como a capacidade que um mol de uma substância tem em atenuar luz incidida sobre ela em um determinado comprimento de onda ou ainda o quão fortemente uma substância absorve radiação de uma determinada frequência. Assim, altos valores de absortividade molar indicam uma molécula que apresentará uma alta absorbância máxima em determinados comprimentos de onda, mesmo em baixas concentrações de solução (Pavia *et al.*, 2008; Skoog, Holler e Crouch, 2018).

Apesar de muito utilizada na literatura e para meios didáticos, a Lei de Lambert-Beer apresenta limitações como: deve haver apenas uma espécie que gera a absorção observada e em baixas concentrações (abaixo de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ normalmente) uma vez que, na prática, absorbâncias com valores de intensidade maiores que dois perdem a correlação experimental direta entre a absorbância e a concentração (Pavia *et al.*, 2008; Perkampus, 1992).

3. Objetivos do trabalho

- Sintetizar aminoquinolinas polissubstituídas por meio de Reações Multicomponentes (RMC) a fim de realizar estudos nos seguintes contextos:
- Sondas solvatocrômicas para o estudo de interação com as proteínas albumina sérica e lisozima.
- Aplicação para estudos de agregados amiloides proteicos.
- Aplicação para estudos de formação de micelas.

Capítulo 1

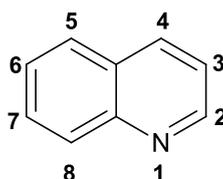
Síntese das Aminoquinolinas

4. Quinolininas

4.1. Introdução

O núcleo quinolínico (Figura 5) é encontrado em diversas moléculas que possuem aplicações práticas, uma vez que esse tipo de sistema heterocíclico são unidades estruturais chave para a atividade de medicamentos e compostos com ação biológica ativa no organismo. Esse sistema vem sendo estudado, por exemplo, para medicamentos antimaláricos, anti-HIV, anticâncer e antituberculose (Ryabukhin e Vasilyev, 2016).

Figura 5. Estrutura molecular do núcleo quinolínico



Os derivados quinolínicos, além de ter as aplicações citadas anteriormente na área da saúde, também vêm sendo estudados para utilização em corantes, inibidores de corrosão, na área cosmética, no desenvolvimento de novos diodos orgânicos emissores de luz e na utilização em sondas de meio. Além disso, compostos quinolínicos polissubstituídos são comuns em sondas fluorescentes e o desenvolvimento de novas aminoquinolininas vem recebendo atenção e novas aplicações a cada ano. Isso é evidenciado, por exemplo, com a procura das palavras-chaves “quinolines” e “fluorescence” no site *Web of Science*, que apresenta mais de 500 publicações nos últimos cinco anos. Esse sucesso é devido as aminoquinolininas polissubstituídas apresentarem o efeito transferência de carga intermolecular, que é uma propriedade fotofísica de

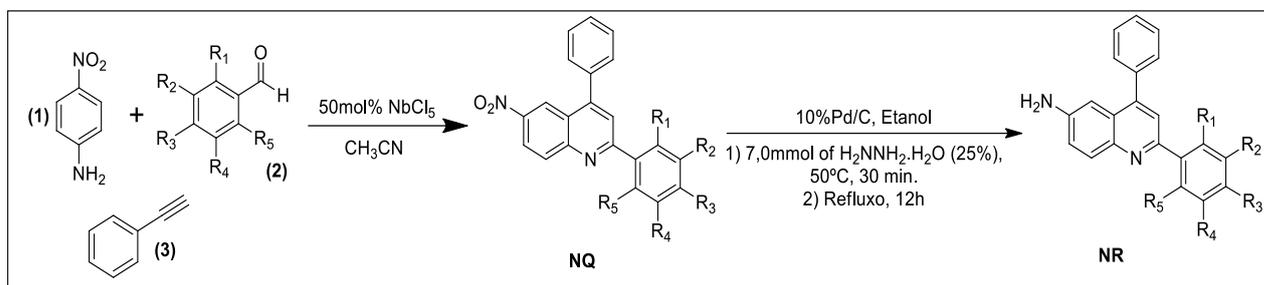
algumas moléculas que apresentam grupos elétrons-doadores e elétrons-receptores em um sistema eletrônico conjugado (D- π -A), que leva a uma transferência de carga interna e um conseqüente aumento no momento de dipolo no estado excitado quando esse sistema é fotoexcitado; essa alteração no valor do momento de dipolo faz com que essas moléculas sejam sensíveis ao meio em que estão inseridas (esse assunto foi abordado anteriormente nesse trabalho de forma mais aprofundada no tópico 2.2.2) (Han *et al.*, 2018).

O exemplos de sua utilização na literatura são muitos e dentre eles podemos citar o trabalho de Fuchi e colaboradores (Fuchi *et al.*, 2019) que realizaram um trabalho com quinolinas polissubstituídas apresentando efeito ICT e desenvolveram uma sonda de lipofilicidade que apresentou cerca de 100nm de deslocamento batocrômico entre o solvente menos polar (hexano) e o mais polar (DMSO) da série utilizada no estudo, sendo observados grandes diferenças de rendimentos quânticos dependendo do meio, tendo assim os compostos estudados uma potencial aplicação como corantes para células em microscopia de fluorescência. Além de utilização em polaridade de meio, as aminoquinolinas vêm sendo aplicadas como sondas de pH; por exemplo, Mandal e colaboradores (Mandal *et al.*, 2018) observaram o aparecimento de uma nova banda de fluorescência e diminuição do rendimento quântico de fluorescência com o aumento do pH do meio, o que leva essa molécula a ter um potencial na utilização em estudos para a diferenciação de células normais em relação à células cancerígenas (que apresenta uma diminuição de seu pH em relação às células normais).

Devido aos potenciais aplicações das aminoquinolinas em diversos campos interdisciplinares, a síntese desses heterocíclicos vem chamando a

atenção dos químicos da área de síntese orgânica. Desde a primeira síntese publicada em 1880 por Skraup, diversos métodos foram desenvolvidos para a síntese do núcleo quinolínico (Pericherla, Kumar e Jha, 2013). Um exemplo é Povarov, que conhecendo o poder catalítico dos ácidos de Lewis, desenvolveu um método para sintetizar derivados quinolínicos que consistia em utilizar iminas (Bases de Schiff) como substratos para reações do tipo aza-Diels-Alder. Este método caracterizou-se como uma síntese multicomponente onde a imina gerada pela reação entre um aldeído e uma anilina poderia ser formada no próprio meio reacional (Kouznetsov, 2009). Mais recentemente, foram descritos novos métodos para a obtenção de derivados quinolínicos polissubstituídos utilizando ácidos de Lewis como FeCl_3 (Zhang, Li e Wang, 2011) e NbCl_5 (Andrade, de, Santos, dos e Silva-Filho, da, 2015). Este último envolve uma reação multicomponente entre aldeídos aromáticos, derivados de anilina e fenilacetileno à temperatura ambiente e atmosfera de ar para a obtenção de núcleos quinolínicos com diversos tipos de substituintes. Após esse estudo preliminar, Santos e colaboradores (Santos *et al.*, 2017) realizaram a continuação para a obtenção de nitroquinolinas polissubstituídas com grupos fenil nas posições 2 e 4, sendo que o fenil ligado à posição 2 do grupo quinolínico continha diversos substituintes em diferentes posições do anel benzênico; além da obtenção dessas primeiras estruturas foram realizadas as reduções do grupo nitro para a obtenção de aminoquinolinas (Figura 6). Esse estudo de Santos e colaboradores foi utilizado como referência para as moléculas sintetizadas nesse estudo.

Figura 6. Esquema geral de uma reação multicomponente seguida de redução do grupo nitro para a formação de aminoquinolinas polissubstituídas (Adaptado de: (Santos *et al.*, 2017))



4.2. Materiais e equipamentos

Para as sínteses foram utilizados os reagentes *p*-nitroanilina (O₂NC₆H₄NH₂), fenilacetileno (C₅H₅CCH), benzaldeído (C₆H₅CHO), *p*-anizaldeído (CH₃OC₆H₄CHO), 4-dimetilamino-benzaldeído ((CH₃)₂NC₆H₄CHO), 4-dimetiltio-benzaldeído (CH₃SC₆H₄CHO), paládio sobre carbono (Pd/C), monohidrato de hidrazina (NH₂NH₂), agente filtrante Celite® 545, hidreto de sódio (NaH), iodometano (CH₃I), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de magnésio anidro (MgSO₄), hidreto de cálcio (CaH₂), óxido de cálcio (CaO), ácido sulfúrico (H₂SO₄), cloreto de cálcio (CaCl₂) e brometo de potássio (KBr), os quais foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, USA). O reagente pentacloreto de nióbio (NbCl₅) foi obtido por doação da Companhia Brasileira e Mineração e Metalurgia (CBMM). Esses reagentes foram utilizados como recebidos. Os solventes utilizados foram: acetato de etila (CH₃COOC₂H₅), acetonitrila (CH₃CN), etanol (C₂H₅OH), dimetilformamida (DMF – HCON(CH₃)₂), diclorometano (CH₂Cl₂), clorofórmio (CHCl₃), hexano (C₆H₁₄), éter etílico (CH₃CH₂)₂O e metanol (CH₃OH), os quais foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Os solventes, para os quais a purificação e remoção de

água não foram necessárias, foram utilizados como recebidos. Para os demais foram utilizadas as metodologias descritas por Armarego & Perrin (Armarego e Perrin, 1996), como segue:

- Acetonitrila: Refluxado e destilado sobre CaH_2 durante 6 horas.
- Etanol: Refluxado e destilado sobre CaO durante 6 horas.
- Dimetilformamida: CaH_2 foi adicionado ao solvente e mantido sob agitação por 12 horas. A mistura foi filtrada e o DMF anidro é utilizado para as sínteses
- Diclorometano: Primeiramente o solvente foi lavado com porções de H_2SO_4 concentrado sob constante agitação até a mudança da coloração da mistura. Depois a mistura coloidal foi lavada com água e NaHCO_3 até que o pH volte a ter o valor de 7, e após isso é realizada uma pré-secagem com CaCl_2 , e então filtrado. Ao final, foi refluxado e destilado sobre CaH_2 durante 6 horas.
- Clorofórmio: Primeiramente o solvente foi lavado com porções de H_2O para retirada de resíduos de etanol. Após isso, o produto restante foi seco utilizando-se CaCl_2 , e filtrado. Ao final, foi refluxado e destilado sobre CaH_2 durante 6 horas.
- Hexano: Primeiramente o solvente foi lavado com porções de H_2SO_4 concentrado sob constante agitação. Depois a mistura coloidal é decantada para a separação do alceno, no qual na sequência é realizado secagem com CaCl_2 e filtrado. Ao final, o solvente foi refluxado e destilado sobre CaH_2 durante 6 horas.

Para o acompanhamento das reações foi utilizado cromatografia por camada delgada (CCD). Sílica-gel 60 F₂₅₄ 0,2 mm depositada sobre folha de alumínio

(Merck, Alemanha) e utilizando-se como revelador uma lanterna de emissão de irradiação com UV-365nm (Boitton Instrumentos, Rio Grande do Sul, Brasil).

Para evaporação dos solventes foi utilizado o evaporador rotatório R-215 equipado com banho de água com controlador de temperatura B-491, bomba de vácuo V-700, controlador de pressão do sistema V-850 (Büchi, Saint Gall, Suíça). Para a retirada de resíduos de solvente foi utilizado uma bomba de alto vácuo com traps e filtro, com vácuo máximo no valor de $1 \cdot 10^{-2}$ torr e com vacuômetro manual da Marconi (São Paulo, Brasil).

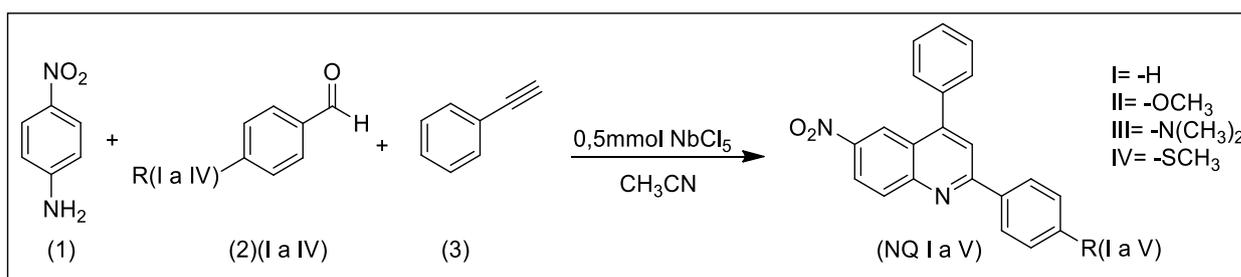
Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H , 400 MHz) foram obtidos em um espectrômetro Bruker (Massachusetts, EUA) DRX-400 do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP). Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS) utilizado como padrão interno para ^1H , e clorofórmio deuterado (CDCl_3) como padrão interno para ^{13}C . A constante de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e o número de hidrogênios foram deduzidos da integral relativa. Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Jasco (Maryland, EUA) modelo FT/IR-4600 do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências de Bauru (UNESP). As medidas foram realizadas no intervalo entre 4000 e 400cm^{-1} , com a utilização de pastilhas de KBr. Os espectros de massa foram obtidos em um equipamento Bruker micrOTOF, com a utilização de um detector ESI-TOF, do Departamento de Farmácia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP).

4.3. Métodos e procedimentos

4.3.1. Procedimento geral para reações multicomponentes para a preparação de derivados 6-nitro-2,4-difenilquinolinas utilizando NbCl_5 como catalisador

O procedimento para a síntese de 6-nitro-2,4-difenilquinolinas foi realizado utilizando-se como base a síntese proposta por Santos e colaboradores (Santos *et al.*, 2017). O procedimento esquemático para síntese de 6-nitro-2,4-difenilquinolinas está representada na Figura 7.

Figura 7. Reação multicomponente para a produção de 6-nitro-2,4-difenilquinolinas, utilizando NbCl_5 como catalisador.



Descrição do procedimento:

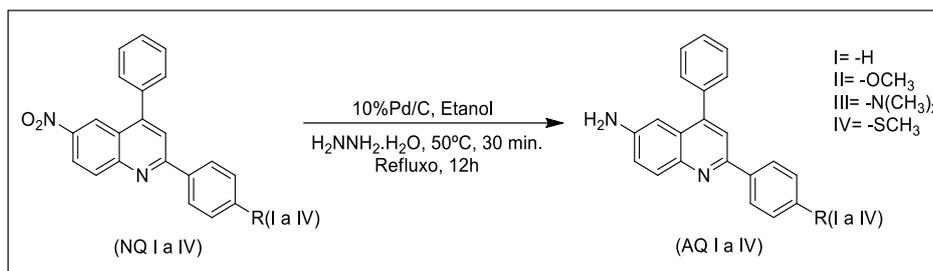
Foram adicionados 1,0mmol dos derivados de benzaldeído correspondentes (2I-IV), 1,0mmol de *p*-nitroanilina (1), e 1,1mmol de fenilacetileno (3) dissolvidos em 3,0mL de acetonitrila anidra. À mistura foi adicionada 0,5mmol de NbCl_5 suspensos em 2,0mL de acetonitrila anidra. A reação foi realizada em atmosfera de ar, em temperatura ambiente e sob constante agitação. O tempo reacional foi de 96h e a reação monitorada em CCD pelo consumo de *p*-nitroanilina, utilizando como solventes de eluição hexano:acetato de etila (7:3) e como revelador

lanterna UV-365nm. A reação foi cessada adicionando-se água destilada e extraída com acetato de etila (3x20mL), as fases foram separadas, e a fase orgânica lavada com soluções saturadas de NaHCO₃ (2x10mL) e de NaCl (2x10mL). A secagem da fase orgânica foi realizada utilizando-se MgSO₄ anidro e posteriormente filtrado e evaporada a pressão reduzida. A mistura resultante obtida foi recristalizada em metanol anidro, filtrada, e o sólido contendo o produto puro coletado em papel filtro. Em alguns casos, o líquido sobrenadante que restou foi submetido a uma nova recristalização para obtenção de maiores rendimentos de produtos puros. O sólido resultante foi deixado em atmosfera ambiente e baixa pressão em bomba de vácuo para secagem do solvente e posteriormente guardado.

4.3.2. Procedimento geral para as reações de redução do grupo nitro para preparação de derivados de 6-amino-2,4-difenilquinolinas

As reações dos derivados 6-nitro-2,4-difenilquinolinas para a obtenção de 6-amino-2,4-difenilquinolinas foram realizadas utilizando como base o experimento descrito na literatura por Nedeltchev e colaboradores (Nedeltchev, Han e Bhowmik, 2010). O procedimento para síntese de 6-amino-2,4-difenilquinolinas está representada na Figura 8.

Figura 8. Reação de produção de derivados 6-amino-2,4-difenilquinolinas.



Descrição do procedimento:

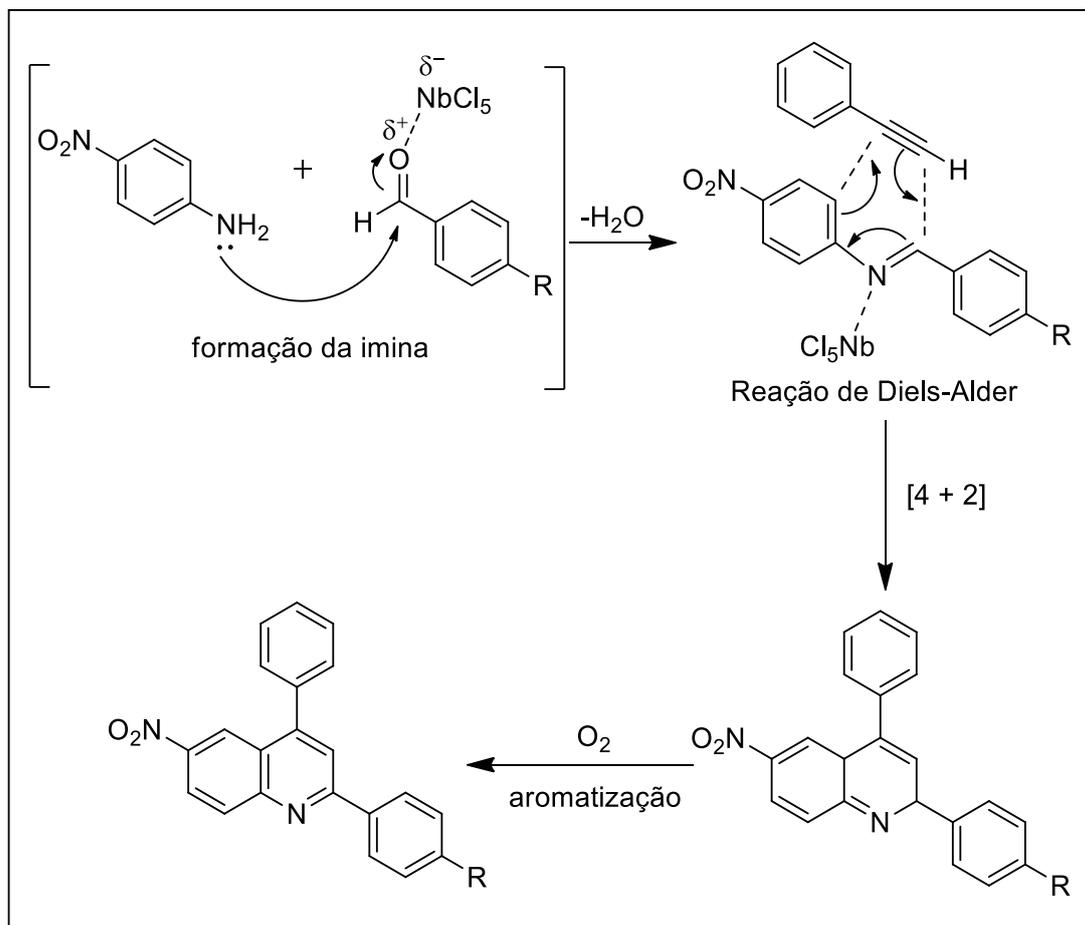
Foram adicionados 1,0mmol de derivado de 6-nitro-2,4-difenilquinolinas (NQ I-IV) na presença de 0,05g de Pd/C em uma solução contendo 20mL de etanol anidro. A mistura foi aquecida à 50°C em banho de imersão em óleo por 30 minutos. Após esse tempo, foram adicionados à mistura 3,0mL de NH₂NH₂.H₂O (25%) e a mistura foi mantida em constante agitação, em refluxo e sob atmosfera ambiente por 12 horas. A reação foi monitorada em CCD pelo consumo do derivado de 6-nitro-2,4-difenilquinolina, utilizando como solventes de eluição hexano:acetado de etila (1:1) e como revelador lanterna UV-365nm. Após esse tempo, a mistura foi filtrada utilizando clorofórmio sobre Celite® 545 para a remoção do catalisador Pd/C. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto bruto lavando-se com porções de mistura de éter etílico:hexano (1:1) e éter etílico puro. O sólido resultante, levado à bomba de vácuo para retirada de resíduos de solvente.

4.4. Resultados e Discussão

4.4.1. Preparação de 6-nitro-2,4-difenilquinolinas utilizando NbCl_5 como catalisador

A síntese de 6-nitro-2,4-difenilquinolina inicia-se pela formação *in situ* de uma base de Schiff entre um derivado de benzaldeído e a *p*-nitroanilina. Supõe-se que o NbCl_5 leve à ativação do benzaldeído pela coordenação à carbonila facilitando o ataque nucleofílico da amina. Esse processo de condensação leva à formação de uma imina (Figura 9). A imina atua como um dieno em uma reação de aza-Diels-Alder tendo o fenilacetileno como dienófilo, ocorrendo uma reação concertada com cicloadição [4+2] (uma vez que dos seis elétrons envolvidos no estado cíclico, quatro são provenientes do dieno e dois são provenientes do dienófilo), e ocorre uma reação de Diels-Alder com demanda inversa de elétrons onde o dieno apresenta uma substituição com grupo retirador de elétrons (nesse caso $-\text{NO}_2$) e o dienófilo apresenta um grupo doador de elétrons (nesse caso o grupo fenil) (Kobayashi e Jorgensen, 2001). Esse tipo de reação ocorre como resultado da sobreposição de orbitais em fase entre o orbital HOMO do dienófilo com o LUMO do dieno. Além disso, com a coordenação anteriormente discutida (do grupo carbonila com o NbCl_5) que ocorre com a molécula que contém o grupo retirador de elétrons, há uma diminuição da energia do orbital LUMO na formação do dieno, o que auxilia na cicloadição devido a melhor interação do dieno com o dienófilo rico em elétrons (Constantino *et al.*, 2004; Woodward e Hoffmann, 1969). Após a formação desse intermediário cíclico, este sofre o processo de aromatização através da reação com o oxigênio, formando o núcleo o quinolínico desejado.

Figura 9. Mecanismo proposto para reação de formação dos derivados de 6-nitro-2,4-difenilquinolina catalisado por NbCl_5 (Adaptado de: (Bartolomeu *et al.*, 2018))



O acompanhamento da reação por CCD mostrou a formação de dois subprodutos, a base de Schiff, e o produto principal. Na reação a etapa lenta é a cicloadição de Diels-Alder, pois a formação da imina (dieno) catalisada por NbCl_5 acontece em poucos minutos, como descrito e discutido na literatura (Silva, Da, Martins e Silva-Filho, Da, 2012). Após a extração da reação, a CCD revelou os mesmos componentes e para a obtenção apenas do produto de interesse foi realizada uma recristalização com metanol. Os resultados para a síntese de derivados 6-nitro-2,4-difenilquinolina pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimentos das nitroquinolinas

Benzaldeído	R	Rendimento reação bruta	Rendimento reação após purificação*	Cor do sólido obtido
2-I	H	81%	60%	Branco amarelado
2-II	OCH ₃	64%	27%	Amarelo
2-III	N(CH ₃) ₂	73%	53%	Vermelho
2-IV	SCH ₃	76%	33%	Amarelo alaranjado

* Purificação realizada a partir de recristalização com CH₃OH puro.

A Tabela 1 apresenta os resultados de rendimentos obtidos ao fim de cada reação de síntese realizada e pode-se observar que para o produto bruto todos os rendimentos apresentaram valores semelhantes. Nos rendimentos para o produto purificado pode-se observar que o composto NQ-I apresenta os maiores valores, isso pode ser devido a essa molécula não conter nenhum grupo no substituinte do anel aromático do reagente que fosse susceptível de reagir com o pentacloreto de nióbio (que tem como característica ser oxofílico (Oh e Knabe, 2009) e consequente formação de intermediários que não levarão a formação do composto de interesse. Após a recristalização, foram obtidos os produtos puros que foram caracterizados por métodos espectroscópicos e espectrométricos (RMN-¹H, RMN-¹³C, IV e MS). A descrição resumida dos resultados das caracterizações encontra-se abaixo e as imagens obtidas estão no Anexo A (Figura A- 1 a Figura A-13).

✓ Para NQ-I:

- RMN ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,87 (d, $J=2,4\text{Hz}$; 1H); 8,50 (dd, $J_1=9,1\text{Hz}$, $J_2=2,4\text{Hz}$, 1H); 8,35 (d, $J=9,1\text{Hz}$, 1H); 8,27-8,25(m, 2H); 7,99 (s, 1H); 7,65-7,54 (m, 8H).
- RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3): δ (ppm) 160,1 (C); 151,3 (C); 151,1 (C); 145,4 (C); 138,5 (C); 136,9 (CH); 131,8 (C); 130,5 (2CH); 129,5 (2CH); 129,3 (CH); 129,2 (2CH); 129,1 (2CH); 127,9 (CH); 129,8 (CH); 123,1 (CH); 122,9 (C); 120,89 (CH).

✓ Para NQ-II:

- RMN ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,85 (d, $J=2,5\text{Hz}$; 1H); 8,48 (dd, $J_1=9,0\text{Hz}$, $J_2=2,5\text{Hz}$, 1H); 8,35 (d, $J=9,1\text{Hz}$, 1H); 8,26-8,24(m, 2H); 7,94 (s, 1H); 7,89-7,87 (m, 1H); 7,63-7,56 (m, 4H); 7,09-7,07 (m, 2H); 7,03-7,01 (d, $J=9,0\text{Hz}$, 1H); 3,92 (s, 3H).
- RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3): δ (ppm) 161,8 (C); 151,0 (C); 137,2 (C); 131,5 (C); 131,2 (C); 130,9 (C); 129,5 (CH); 129,4 (C); 129,2 (2CH); 129,1 (2CH); 125,1 (2CH); 124,5 (CH); 123,1 (CH); 122,9 (CH); 121,3 (C); 120,2 (2CH); 114,5 (CH); 55,5 (CH_3).
- IV (KBr): $\bar{\nu}(\text{cm}^{-1})$ 1599, 1503 e 3413 (ligações insaturadas do tipo aromáticas); 1310 (ligações C–N); 1029 cm^{-1} (ligações C–O); 835 cm^{-1} (ou menores) (deformações angulares de esqueletos de anéis aromáticos)

✓ Para NQ-III:

- RMN ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,78 (d, $J=2,6\text{Hz}$; 1H); 8,46 (dd, $J_1=9,1\text{Hz}$, $J_2=2,6\text{Hz}$, 1H); 8,29-8,20 (m, 3H); 7,91 (s, 1H); 7,63-7,56 (m, 5H); 6,84 (d, $J=9,1\text{Hz}$, 2H), 3,09 (s, 6H).
- RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3): δ (ppm) 153,5 (C); 151,0 (C); 146,6 (C); 143,3 (C); 139,1 (C); 135,6 (C); 130,6 (CH); 129,4 (C); 128,5 (2CH); 128,1 (2CH); 127,9 (2CH); 121,2 (CH); 119,0 (CH); 112,3 (C); 106,0 (2CH); 102,6 (CH); 40,4 (2CH₃).
- IV (KBr): $\bar{\nu}(\text{cm}^{-1})$ 1577 e 1503 (ligações insaturadas aromáticas); 1312 e 1079 (ligações C–N); 813 (ou menores) (deformações angulares de esqueletos de anéis aromáticos)

✓ Para NQ-IV:

- RMN ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,85 (d, $J=2,5\text{Hz}$, 1H); 8,50 (dd, $J_1=9,3\text{Hz}$, $J_2=2,5\text{Hz}$, 1H); 8,34 (d, $J=9,3\text{Hz}$, 1H); 8,22-8,20 (m, 2H); 7,96 (s, 1H); 7,64-7,56 (m, 5H); 7,42-7,40 (m, 2H); 2,58 (s, 3H)
- RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3): δ (ppm) 152,8 (C); 146,8 (C); 145,6 (C); 143,9 (C); 139,4 (C); 138,9 (C); 136,6 (CH); 131,3 (C); 129,5 (2CH); 128,4 (2CH); 128,1 (2CH); 127,4 (CH); 127,2 (CH); 126,5 (CH); 121,5 (C); 119,3 (2CH); 105,8 (CH); 15,7 (CH₃).
- IV (KBr): $\bar{\nu}(\text{cm}^{-1})$ 1583 e 1483 (ligações insaturadas aromáticas); 1330 e 1300 (ligações C–N); 808 (ou menores) (deformações angulares de esqueletos de anéis aromáticos); 2840 (ligação C–S).

Tabela 2. Massas moleculares exatas experimentais e calculadas para as nitroquinolinas.

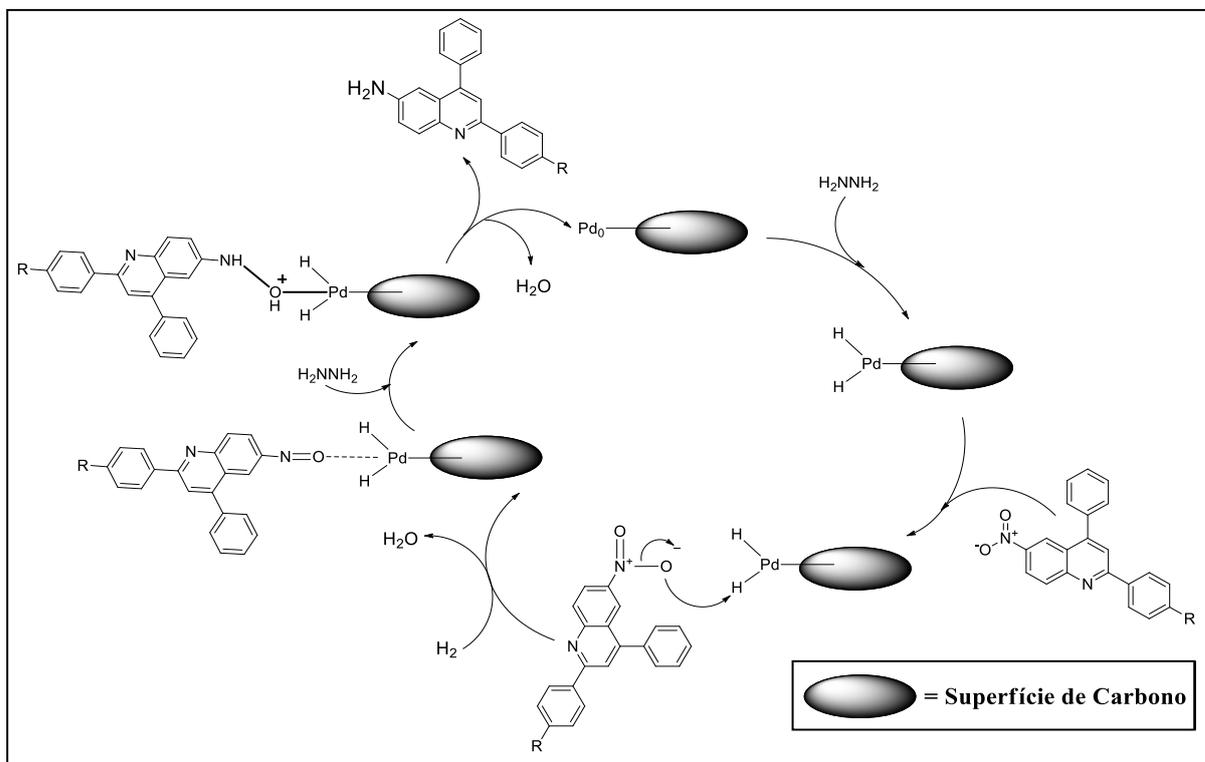
Derivado nitroquinolínico	R	Massa molecular exata protonada teórica	Massa molecular exata encontrada na espectrometria*
NQ-I	H	327,1128	327,1129
NQ-II	OCH ₃	357,1234	357,1245
NQ-III	N(CH ₃) ₂	369,1477	369,1606
NQ-IV	SCH ₃	3723,1005	373,1005

* Em Figura A- 10 a Figura A- 13 do Anexo A

4.4.2. Redução do grupo nitro para preparação de derivados de 6-amino-2,4-difenilquinolinas

A reação de redução do grupo nitro dos derivados quinolínicos foi realizado utilizando-se o método de Nedeltchev e colaboradores (Nedeltchev, Han e Bhowmik, 2010). Mecanicamente, a reação inicia-se com a ligação do nitrobenzeno com o catalisador hidrogenado (Pd/C nesse caso) para a retirada de átomos do hidrogênio da superfície do catalisador, gerando água como subproduto e um intermediário nitrosobenzeno na primeira etapa, que sofre transferência de hidrogênio rápida do catalisador para a ligação N=O, formando um intermediário ArNH-OH, que após a adição de outra molécula de hidrogênio dá a amina como produto final. Uma visão geral para as etapas de reação da redução dos compostos 6-nitro-2,4-difenilquinolina está descrita na Figura 10.

Figura 10. Visão geral das etapas da reação de formação dos derivados de 6-amino-2,4-difenilquinolina (Adaptado de: (Serna *et al.*, 2009))



Os resultados obtidos para a redução das moléculas e obtenção dos produtos reduzidos síntese são descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimentos de preparação das aminoquinolinas.

Derivado nitroquinolínico	R	Rendimento reação	Cor do sólido obtido
NQ-I	H	93%	Laranja claro
NQ-II	OCH ₃	95%	Amarelo escuro
NQ-III	N(CH ₃) ₂	93%	Marrom avermelhado
NQ-IV	SCH ₃	96%	Laranja escuro

Como pode ser observado pelos resultados descritos na Tabela 3, todos os derivados quinolínicos amino substituídos foram obtidos com altos rendimento utilizando-se o método descrito. Esse resultado era esperado uma vez que é um procedimento largamente utilizado e encontrado na literatura, de fácil execução e altos rendimentos. Os produtos puros obtidos foram caracterizados por métodos espectroscópicos e espectrométricos (RMN-¹H, RMN-¹³C, IV e MS). A descrição resumida dos resultados das caracterizações encontra-se abaixo e as imagens obtidas estão no Anexo A (Figura A- 14 a Figura A- 26).

✓ Para AQ-I:

- RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8,16-8,14 (m, 3H); 7,72 (s, 1H); m 7,55-7,53 (m, 5H); 7,51-7,44 (m, 3H); 7,20 (dd, $J_1=8,8\text{Hz}$, $J_2=2,5\text{Hz}$, 1H); 6,99 ($J=2,5\text{Hz}$, 1H); 3,92 (s, 2H).
- RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃): δ (ppm) 153,5 (C); 146,6 (C); 144,6 (C); 143,9 (C); 139,9 (C); 138,9 (CH); 131,4 (C); 129,5 (2CH); 128,8 (2CH); 128,7 (CH); 128,6 (2CH); 128,1 (2CH); 127,2 (CH); 121,5 (CH); 119,7 (CH); 116,8 (C); 105,7 (CH).
- IV (KBr): $\bar{\nu}(\text{cm}^{-1})$ 1493, 1614 e 3179 (ligações insaturadas do tipo aromáticas); 1360 (ligações C–N); 3429, 3297 e 821 (aminas primárias); 755 (ou menores) (deformações angulares de esqueletos de anéis aromáticos).

✓ Para AQ-II:

- RMN ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,11-8,09 (m, 2H); 8,05 (d, $J=8,8\text{Hz}$, 1H); 7,66 (s, 1H); 7,55-7,50 (m, 5H); 7,17 (dd, $J_1=8,8\text{Hz}$, $J_2=2,5\text{Hz}$, 2H); 7,04-7,02 (m, 2H); 6,97 ($J=2,5\text{Hz}$, 1H); 3,89 (s, 5H).
- RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3): δ (ppm) 160,4 (C); 153,1 (C); 146,8 (C); 144,3 (C); 143,7(C); 138,9 (C); 132,4 (CH); 131,0 (C); 129,4 (2CH); 128,5 (2CH); 128,4 (2CH); 128,1 (CH); 126,9 (CH); 121,4 (CH); 119,3 (C); 114,1 (2CH); 105,9 (CH); 55,4 (CH_3).
- IV (KBr): $\bar{\nu}(\text{cm}^{-1})$ 1625, 1516 e 3189 (ligações insaturadas do tipo aromáticas); 1244 (ligações C–N); 1027 (ligações C–O); 3471, 3375 e 831 (aminas primárias); 712 (ou menores) (deformações angulares de esqueletos de anéis aromáticos).

✓ Para AQ-III:

- RMN ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,07 (d, $J=9,0\text{Hz}$, 3H); 7,86 (s, 1H); 7,55-7,49 (m, 5H); 7,15 (dd, $J_1=9,0\text{Hz}$, $J_2=2,6\text{Hz}$, 1H); 6,95 (d, $J=2,6\text{Hz}$); 6,84-6,82 (m, 2H); 3,85 (s, 2H); 3,04ppm (s, 6H).
- RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3): δ (ppm) 153,5 (C); 150,9 (C); 146,6 (C); 143,9 (C); 139,1 (C); 135,6 (C); 130,6 (CH); 129,4 (C); 128,5 (2CH); 128,1 (2CH); 127,9 (2CH); 126,6 (CH); 121,2 (CH); 119,0 (CH); 112,3 (C); 106,0 (2CH); 102,6 (CH); 40,4 (2CH_3).
- IV (KBr): $\bar{\nu}(\text{cm}^{-1})$ 1612 e 1539 (ligações insaturadas aromáticas); 1364 e 1189 (ligações C–N); 3472, 3375 e 810 (aminas primárias); 712 (ou menores) (característicos de deformações angulares de esqueletos de anéis aromáticos).

✓ Para AQ-IV:

- RMN ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,10-8,07 (m, 2H); 8,05-8,03 (d, $J=8,9\text{Hz}$, 1H); 7,68 (s, 1H); 7,55-7,50 (m, 5H); 7,39-7,36 (m, 2H); 7,19 (dd, $J_1=8,9\text{Hz}$, $J_2=2,5\text{Hz}$, 1H); 6,97 (d, $J=2,5\text{Hz}$, 1H); 3,90 (s, 2H); 2,55 (s, 3H).
- RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3): δ (ppm) 177,3 (C); 162,3 (C); 158,2 (C); 150,6 (C); 144,3 (C); 136,7 (C); 130,4 (CH); 128,4 (C); 128,2 (2CH); 127,1 (2CH); 125,2 (2CH); 123,7 (CH); 122,2 (CH); 121,9 (CH); 119,3 (C); 112,9 (2CH); 109,5 (CH); 14,2 (CH_3).
- IV (KBr): $\bar{\nu}(\text{cm}^{-1})$ 1635 e 3038 (ligações insaturadas aromáticas); 1493 e 1093 (ligações C–N); 3462, 3375 e 820 (aminas primárias); 712 (ou menores) (deformações angulares de esqueletos de anéis aromáticos); 3038 (ligação C–S).

Tabela 4. Resultados dos valores para massas moleculares experimentais encontradas para os compostos sintetizados comparando-se com a massa molecular teórica para cada um dos compostos

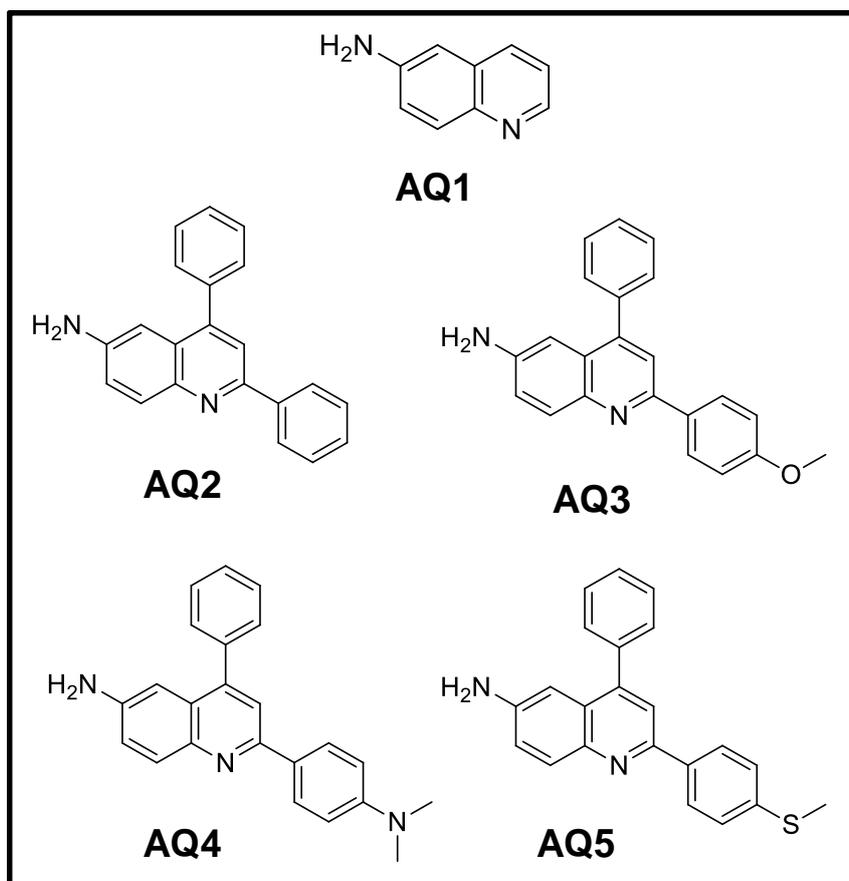
Derivado aminoquinolínico	R	Massa molecular exata protonada teórica	Massa molecular exata encontrada na espectrometria*
AQ-I	H	297,1386	297,1388
AQ-II	OCH_3	327,1492	327,1503
AQ-III	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	340,1808	340,1800
AQ-IV	SCH_3	343,1263	343,1266

* Em Figura A-23 a Figura A-26 do Anexo A

4.5. Nomeação dos compostos para utilização nos estudos para aplicação

Os compostos sintetizados foram utilizados para a realização de estudos solvatocrômicos, de interação com a proteína BSA e suas modificações e dos estudos com micelas. Assim, para fins comparativos, foram realizados juntamente com as moléculas sintetizadas, estudos com uma molécula comercial que contém apenas o núcleo quinolínico com uma amina primária ligado à posição 6. Para tanto, as mesmas foram nomeadas de forma a ficar mais simples sua identificação, com o núcleo aminoquinolínico representado apenas pelas letras "AQ" e a numeração seguindo a ordem em que foram sintetizados os produtos, como anteriormente descrito, seguindo o esquema abaixo (Figura 11).

Figura 11. Esquema representativo das moléculas do trabalho juntamente com seus nomes abreviados



4.6. Conclusões da síntese das aminoquinolinas

A síntese de nitroquinolinas polissubstituídas pela reação multicomponente mostrou-se eficiente e com rendimentos de reação de chegarem a 60% de produto recristalizado e puro ao final, sem a necessidade de realização de coluna cromatográfica para separação dos componentes da mistura, o que auxilia para que o produto seja obtido de forma eficiente. A reação de redução para a obtenção das aminoquinolinas após a primeira etapa apresentou um procedimento rápido e rendimentos altos (acima de 90%) com a sua purificação realizada de forma eficiente. Assim, quantidades necessárias para a realização dos demais experimentos foram obtidas de forma rápida, simples e altamente reprodutível com o método encontrado na literatura da qual nos baseamos.

Capítulo 2

Estudos Solvatocrômicos das Aminoquinolinas

5.1. Solventes e Solvatocromismo

Diferentes solventes podem levar à uma alteração do espectro de absorção no UV-Visível (excitação eletrônica) e/ou do espectro de emissão de fluorescência (desativação eletrônica) se o fluoróforo sendo observado apresentar efeito ICT (Item 2.2.2) e isso é devido à diferença na solvatação nos estados excitado e fundamental dos solutos. Essa diferença acontece quando há uma diferença significativa na distribuição de cargas no estado fundamental e excitado, que é frequentemente acompanhada de uma mudança no momento de dipolo (propriedade que descreve a distribuição dos elétrons ao redor de uma molécula), e o conhecimento da distribuição de carga e dos momentos de dipolo em uma molécula é importante para entender processos físico-químicos que ocorrem na solução. O momento de dipolo representa uma medida direta da distribuição eletrônica em uma molécula com uma de geometria conhecida e é uma constante física que pode ser obtida por métodos experimentais e teóricos. Apesar de existir diferentes métodos de determinar o momento de dipolo no estado fundamental e no estado excitado, métodos solvatocrômicos são os mais utilizados (Thipperudrappa *et al.*, 2017; Tiwari *et al.*, 2014); esses métodos são baseados em uma correlação linear entre o número de onda relativo ao máximo de absorção ou de emissão com os chamados de funções de polarizabilidade do solvente. Dentre as funções encontradas na literatura, as mais utilizadas são aquelas que foram desenvolvidas por Lippert-Mataga, Bilot e Kawski (Kawski, 1992; Lippert, 1957; Mataga, Kaifu e Koizumi, 1956). Todas essas teorias são baseadas nas observações de Onsager sobre as interações eletrostáticas não específicas (Onsager, 1936). Após essa breve e geral introdução geral ao tema, cada um dos tópicos será discutida de forma mais detalhada a seguir.

5.1.1. Classificação de solventes

De forma simplificada, soluções são definidas por misturas homogêneas contendo mais de uma substância em diferentes concentrações, sendo que ao final essa mistura está em fase líquida e uma das substâncias é chamada de solvente (que pode também ser uma mistura homogênea de líquidos, e normalmente está em maior quantidade na solução) e a outra é chamada de soluto (que normalmente está em menor quantidade na solução). Ao longo da história, foi percebido que um solvente não deve ser considerado apenas um meio macroscópico contínuo caracterizado somente por suas constantes físicas (densidade, constante dielétrica, índice de refração, etc.), mas um meio intermitente que consiste em moléculas individuais que interagem mutuamente. Além disso, os solventes podem interagir com o soluto através de interações químicas como as forças de dispersão de London, de ligações de hidrogênio e de interações do tipo dipolo-dipolo, entre outras, o que vai influenciar processos químicos e físicos das soluções.

Assim, conseguir prever qual será a influência de uma troca de solvente ou a escolha do solvente ideal para uma determinada situação experimental muitas vezes não é uma tarefa trivial, e por isso foram desenvolvidas escalas de solventes para ajudar os químicos a entender melhor as propriedades do meio. Essas escalas classificam os solventes de diversas formas como através da polaridade, da acidez, das propriedades doadoras ou aceitadoras de prótons, de equações que correlacionam propriedades físicas e químicas, além de escalas empíricas onde os valores advêm de medidas de cinética ou de espectroscopia de compostos em determinados solventes, entre outros tipos de escala. Mesmo existindo uma variedade de escalas, nem todos os solventes conseguem estar

inclusos em todas elas, uma vez que algumas conseguem abranger apenas alguma faixa de polaridade de solvente ou ainda ter limitações experimentais (por exemplo, insolubilidade e instabilidade dos compostos nos solventes para a realização das medidas) (Katritzky *et al.*, 2004).

Uma classificação muito utilizada para solventes orgânicos é a de Parker (Parker, 1961), que dividiu os solventes em três grupos de acordo com a capacidade de agir como doadores de ligações de hidrogênio e correlacionando com a constante dielétrica, que são: solventes apolares, solventes polares apróticos e solventes polares próticos. Um solvente apolar é caracterizado por apresentar baixos valores de constante dielétrica ($\epsilon < 15$) e não agir como um doador de ligação de hidrogênio além de interagir fracamente com o soluto devido à atuação apenas de forças não específicas direcionais de indução e dispersão nesses sistemas; nesse grupo estão incluídos solventes como os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos e seus derivados halogênicos, aminas terciárias e o dissulfeto de carbono. Os solventes polares apróticos por sua vez apresentam valores mais altos de constante dielétrica ($\epsilon > 15$) e também não agem como doadores de ligação de hidrogênio uma vez que ligações do tipo C-H não são suficientemente polarizadas, porém apresentam característica de solvatar cátions devido à presença de par de elétrons livres na molécula; entre os solventes polares apróticos mais comuns estão a acetona, acetonitrila, N,N-dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO). Solventes polares próticos são os que apresentam altos valores de constante dielétrica e capacidade de ser um doador de ligações de hidrogênio uma vez que apresentam em suas moléculas átomos altamente eletronegativos como flúor, nitrogênio e oxigênio principalmente ligados a átomos de hidrogênio; nessa classe de solventes

encontram-se água, amônia, álcoois, ácidos carboxílicos e as amidas primárias (Reichardt, 2003).

Um ponto interessante é que essa classificação de solventes apresenta certa flexibilidade, como por exemplo, existirem solventes que não podem ser colocados em nenhum desses grupos, como os éteres, ésteres, aminas primárias e secundárias e as N-amidas monosubstituídas. Outro exemplo é o valor de constante dielétrica que divide os solventes apolares dos polares, pois alguns solventes podem apresentar valores abaixo de 15 e ainda assim apresentarem características para se classificarem como polares apróticos. Apesar de suas limitações, essa escala nos dá informações sobre a capacidade de solvatação de íons por solventes, uma vez que é verificado que solventes polares são particularmente bons solvadores de ânions, sendo que nos próticos ocorre devido a sua habilidade de fazer ligação de hidrogênio, enquanto nos solventes polares apróticos a solvatação dos ânions ocorre principalmente devido às forças íon-dipolo e íon-dipolo induzido (Reichardt, 2003).

5.1.2. Solvatocromismo

Como anteriormente discutido, as interações entre solvente e soluto podem influenciar situações experimentais, onde podemos incluir nesse momento a posição e intensidade de bandas de técnicas como UV-vis, infravermelho, RMN e outras técnicas espectroscópicas. E é nesse princípio de alteração nas bandas espectroscópicas que se baseia o solvatocromismo, um termo introduzido há cerca de 100 anos (1922) por Hanstzsch, que o utilizou para relatar mudanças de cor em soluções sem haver quebra e/ou formação de

ligações químicas. O solvatocromismo é um processo que resulta da solvatação diferencial dos estados fundamental e excitado da molécula ao se absorver luz, sendo que essa diferença ocorre devido a uma alteração na distribuição de carga dos dois estados, o que leva aos chamados deslocamentos solvatocrômicos, e que pode ser acompanhada por uma mudança no valor de momento de dipolo (Reichardt, 1994).

Mais especificamente para as medidas de emissão, o solvatocromismo não pode ser separado da dinâmica do soluto-solvente em estado excitado uma vez que o solvente pode se organizar ao redor do soluto em seu novo estado (redistribuição orientacional do solvente), além da ocorrência de situações distintas como o soluto ficar mobilizado em uma determinada região do solvente ou sofrer difusão, o que pode levar a uma alteração na interação soluto-solvente que afetará o sinal de emissão espectroscópica do soluto em termos de posição e forma do pico ou até mesmo levando a um aumento ou diminuição do rendimento quântico de fluorescência dependendo do meio. Considerando que o fenômeno da emissão de fluorescência (que advém da relaxação vibracional com liberação de fóton após a excitação molecular) leva um tempo maior para ocorrer do que o fenômeno da absorção (que advém apenas no processo de excitação da molécula) (já discutido no item 2.2), normalmente deslocamentos solvatocrômicos são mais evidentes nas bandas advindas de medidas de emissão de fluorescência do que em medidas de absorção (Marini *et al.*, 2010). Devido a esses conceitos pré-estabelecidos, hoje, o termo solvatocromismo é usualmente utilizado para descrever alteração na posição, forma ou intensidade de uma banda de absorção e/ou emissão de um soluto devido sua interação com o meio/solvente (Demchenko, 2015).

Moléculas solvatocrômicas são aquelas susceptíveis à solvatocromismo, e para que as moléculas consigam diferenciar o meio onde estão incluídas devem apresentar características específicas, que fazem com que suas interações intermoleculares sejam sensíveis a pequenas alterações no meio onde estão incluídas. Esses sistemas moleculares normalmente apresentam o efeito ICT, ou seja, há uma redistribuição eletrônica quando a molécula é excitada que leva a um aumento do momento de dipolo no estado excitado em relação ao estado fundamental (como discutido no item 2.2.2). Devido às suas características, essas moléculas têm diversas aplicações e podem ser utilizadas como sensores de polaridade, viscosidade e outras propriedades do meio, pois essas alterações físico-químicas no solvente podem causar alterações do tipo “*on-off*” no sinal de fluorescência desses compostos solvatocrômicos (Han *et al.*, 2018). Assim, o solvatocromismo pode e vem sendo utilizado em campos de pesquisa de química e biologia para estudar a estrutura e polaridade local de macrossistemas como membranas ou ainda a conformação e ligação de proteínas (Marini *et al.*, 2010).

Para tentar descrever matematicamente e simplificadaamente essas alterações do soluto em relação ao solvente, ao longo dos anos foram desenvolvidas diversas escalas de solvente e métodos teórico-experimentais para tentar correlacionar valores de deslocamento de Stokes do soluto com as propriedades dos solventes. A teoria geral dos efeitos de solvente surgiu dessa necessidade e descreve o soluto fluorescente como sendo um dipolo em um meio de constante dielétrica uniforme e não considera nenhuma interação química entre soluto e solvente, como por exemplo, ligação de hidrogênio ou a formação de estados de transferência de carga no estado excitado, uma vez que

os solventes são descritos apenas por suas propriedades físicas (normalmente constante dielétrica e índice de refração). Quando ocorre alguma interação química, a mesma é analisada como um desvio do método geral. Isso nos mostra que o método que descreve de forma geral as interações soluto-solvente pode dar um bom embasamento para análise dos deslocamentos solvatocrômicos, apesar da complexidade desse fenômeno que envolve uma grande variedade de forças intermoleculares que são afetadas por processos dinâmicos que envolvem tanto as propriedades dos solventes como a dos solutos (Marini *et al.*, 2010).

5.2. Materiais e equipamentos

Para a realização dos estudos de solvatocromismo foram utilizados os seguintes solventes: ciclo-hexano (C_6H_{12}), dioxano ($C_4H_8O_2$), tolueno (C_7H_8), acetato de heptila ($CH_3COOC_7H_{15}$), acetato de hexila ($CH_3COOC_6H_{13}$), acetato de etila ($CH_3COOC_2H_5$), tetra-hidrofurano (THF – C_4H_8O), diclorometano (CH_2Cl_2), 1-heptanol ($C_7H_{15}OH$), isopropanol (C_3H_7OH), propanona (acetona – C_3H_6O), etanol (C_2H_5OH), metanol (CH_3OH), acetonitrila (CH_3CN), dimetilformamida (DMF – $HCON(CH_3)_2$), dimetilsulfóxido (DMSO – $(CH_3)_2SO$), os quais se apresentavam em grau analítico, adquiridos na Sigma-Aldrich (Missouri, USA) e utilizados como recebidos.

Realizou-se os estudos espectroscópicos de UV-Vis em um equipamento Perkin-Elmer, Lambda 35 (Massachusetts, EUA) em cubeta de quartzo de 10mm. Realizaram-se os testes de fluorescência em um espectrômetro de fluorescência da Perkin-Elmer, LS55 (Massachusetts, EUA) em cubeta de

quartzo de 10mm e velocidade de escaneamento de 200nm/min. As medidas foram realizadas em comprimentos de onda de excitação e emissão dependente do tipo de amostra e serão especificados ao longo do trabalho. Para a realização das medidas de tempo de vida foi utilizado um equipamento Edinburgh Instruments, Mini- τ (Livingston, Escócia) em cubeta de quartzo de 10mm.

5.3. Métodos e procedimentos

5.3.1. Procedimento geral para os estudos de solvatocromismo

Para a realização dos estudos de solvatocromismo foram realizadas medições de espectro de UV-Vis em comprimento de onda variando de 250 a 500nm (com exceção da propanona onde a varredura foi realizada nos comprimentos de onda de 330 a 500nm devido forte absorção desse solvente na região abaixo do valor de 330nm) em soluções com concentração final de 25 μ M das aminoquinolinas nos diferentes solventes. A partir dos dados obtidos nas medições anteriores foi possível determinar o comprimento de onda de excitação para a realização dos espectros de emissão de fluorescência. Os experimentos de fluorescência foram realizados com $\lambda_{exc}=375$ nm e $\lambda_{em}=400$ a 650nm (com exceção do composto AQ1, onde foi utilizado $\lambda_{exc}=350$ nm e $\lambda_{em}=370$ a 650nm), onde a concentração final dos compostos foi de 7,5 μ M. No espectrofluorímetro, o polarizador apresentava filtro atenuador de 92% de fluorescência e a abertura dos slits em 5nm. A partir dos máximos de absorção e de fluorescência se fez a aplicação os vários modelos matemáticos de solvatocromismo utilizados neste trabalho e descritos abaixo (Bilot e Kawski, 1963; Dobkowski, Rettig e Waluk,

2002; Kawski, 1992; Lippert, 1957; Mataga, Kaifu e Koizumi, 1956; McRae, 1957).

- Descrição das funções de polarizabilidade de solvente:
- Lippert-Mataga

$$\Delta f = \frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1} - \frac{n^2-1}{2n^2+1} \quad (\text{Equação 4})$$

- Bilot e Kawski

$$f(\varepsilon, n) = \left(\frac{\varepsilon-1}{\varepsilon+2} - \frac{n^2-1}{n^2+2} \right) \cdot \left(\frac{2n^2+1}{n^2+2} \right) \quad (\text{Equação 5})$$

- Kawski

$$\varphi(\varepsilon, n) = \left[\left(\frac{\varepsilon-1}{\varepsilon+2} - \frac{n^2-1}{n^2+2} \right) \cdot \left(\frac{2n^2+1}{n^2+2} \right) + \frac{3(n^4-1)}{(n^2+2)^2} \right] \quad (\text{Equação 6})$$

- McRae

$$F = \frac{\varepsilon-1}{\varepsilon+2} - \frac{n^2-1}{2n^2+1} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde: ε é a constante dielétrica dos solventes e n é o índice de refração dos solventes

A partir das funções de polaridade dos solventes, esses autores desenvolveram equações solvatocrômicas para correlacioná-los aos parâmetros espectroscópicos das moléculas (valores de número de onda máximos de absorção e emissão advindas das medidas realizadas), bem como aos momentos de dipolo no estado fundamental (μ_G) e excitado (μ_E) ou a diferença entre os mesmos ($\mu_E - \mu_G = \Delta\mu$). A correlação de todos esses parâmetros é feita através de gráficos e sua montagem e utilização serão descritos na seção de resultados e discussão, porém as diversas equações que correlacionam todos os parâmetros podem ser observadas abaixo:

- Lippert-Mataga

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = m_{LM} \cdot \Delta f \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

$$m_{LM} = \frac{2 \cdot (\mu_E - \mu_G)^2}{h \cdot c \cdot \alpha^3} \quad (\text{Equação 9})$$

- Bilot-Kawski

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = m_1 \cdot f(\epsilon, n) \quad (\text{Equação 10})$$

- Kawski

$$\bar{\nu}_A + \bar{\nu}_F = -m_2 \cdot \varphi(\epsilon, n) \quad (\text{Equação 11})$$

Onde:

$$m_1 = \frac{2 \cdot (\mu_E - \mu_G)^2}{h \cdot c \cdot a^3} \quad (\text{Equação 12})$$

$$m_2 = \frac{2(\mu_E^2 - \mu_G^2)}{h \cdot c \cdot a^3} \quad (\text{Equação 13})$$

- McRae

$$\bar{\nu}_F = \nu_F^0 - m_F \cdot F \quad (\text{Equação 14})$$

Onde:

$$m_F = \frac{2\mu_E^2}{h \cdot c \cdot a^3} \quad (\text{Equação 15})$$

Para todas as equações acima descritas, $\bar{\nu}_A$ é o número de ondas no máximo de absorção da molécula em estudo em cada solvente, $\bar{\nu}_F$ é o número de ondas no máximo de emissão de fluorescência da molécula em estudo em cada solvente, h é a constante de Planck ($6,63 \cdot 10^{-27}$ erg.s), c é a velocidade da luz ($3 \cdot 10^{10}$ cm.s⁻¹), a é raio de Onsager da molécula do soluto no estado fundamental, μ_G é momento de dipolo da molécula em estudo no estado fundamental, μ_E é o momento de dipolo da molécula em estudo no estado excitado, $\mu_E - \mu_G$ (ou $\Delta\mu$) é a diferença entre os momentos de dipolo no estado

excitado e no estado fundamental da molécula em estudo e m é o coeficiente angular da reta obtida pelos pontos.

5.3.2. Procedimento geral para a determinação do rendimento quântico das substâncias

Para cada uma das soluções de aminoquinolinas na concentração final $7,5\mu\text{M}$ foram realizadas medidas de fluorescência nas condições descritas anteriormente e absorvância no comprimento de onda de 375nm (comprimento de onda de excitação utilizado para a fluorescência), com exceção do composto AQ1 onde foi utilizado $\lambda=350\text{nm}$ para a realização da medida (os valores de absorvância nesses comprimentos de onda estava sempre abaixo de $0,1$). As medidas de rendimento quântico foram realizadas utilizando como referência o composto coumarina-102 ($2,5\mu\text{M}$) dissolvido em acetonitrila ($\lambda_{\text{exc}}=375\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=390-650\text{nm}$ e absorvância em $\lambda=375\text{nm}$, espectro de emissão pode ser observado na Figura B-1 no Anexo B), de modo que a concentração do compostos escolhido leve à uma absorvância menor do que $0,1$.

Em todos os experimentos, no espectrofluorímetro, o polarizador apresentava filtro de corte de 92% de fluorescência e abertura dos slits em 5nm . Após a realização dos experimentos e com os dados obtidos, foi possível calcular o rendimento quântico relativo das amostras por meio da Equação 16 (Brouwer, 2011).

$$\frac{\phi_S}{\phi_R} = \frac{I_S}{I_R} \cdot \frac{(1-10^{-A_R})}{(1-10^{A_S})} \cdot \frac{n_S^2}{n_R^2} \quad (\text{Equação 16})$$

Onde:

ϕ_S é o rendimento quântico do composto em estudo

ϕ_R é o rendimento quântico do composto de referência (nesse caso, coumarina102 em acetonitrila)

I_S é a área do espectro de fluorescência da amostra

I_R é a área do espectro de fluorescência da referência

A_S é o valor de absorvância no comprimento de onda de excitação de fluorescência da amostra

A_R é o valor de absorvância no comprimento de onda de excitação de fluorescência da referência

n_S é o valor de índice de refração da amostra

n_R é o valor de índice de refração da referência

5.3.3. Procedimento geral para a determinação da absorvância molar das moléculas em diferentes solventes

Para a determinação da absorvância molar dos compostos utilizados no estudo utilizou-se dos espectros de absorvância dos experimentos anteriormente realizados no item 5.3.1, e utilizando-se da Lei de Lambert-Beer (Equação 1, no item 2.2.5) que correlaciona a absorvância com a concentração

da solução, e sabendo-se que a cubeta utilizada tem um caminho ótico fixo de 1cm, é possível encontrar o valor de absorvidade molar do composto em cada solvente sabendo-se a absorbância no $\lambda_{(\max)\text{exc}}$ e a concentração de cada composto no momento da medida (nesse caso, 25 μ M)

5.3.4. Procedimento geral para estudos de tempo de vida de fluorescência da sonda AQ4

Para os experimentos de tempo de vida foram utilizadas soluções nas mesmas concentrações (7,5 μ M) e solventes utilizadas anteriormente para os estudos de fluorescência resolvida no tempo (item 5.3.1). A excitação foi realizada por meio de um LED (340nm) com intervalo de pulso de 100 ns e a emissão obtida por meio de filtro de interferência (475-575 nm). Para os experimentos foi utilizada uma cubeta de quartzo de 3mL e 10mm de caminho ótico.

5.4. Resultados e Discussão

Os estudos de solvatocromismo foram realizados utilizando-se 16 solventes. A nomeação dos solventes e algumas de suas propriedades físicas podem ser observadas na Tabela 5 (Lide, 2009).

Tabela 5. Nome e características (índice de refração (n) e constante dielétrica (ϵ) dos solventes utilizados no trabalho).

Solvente	Abreviaturas	ϵ	n
Ciclo-hexano	CH	2,02	1,4235
Dioxano	Diox	2,22	1,4224
Tolueno	Tol	2,38	1,4961
Acetato de heptila	A. Hept	4,20	1,4150
Acetato de hexila	A. Hex	4,42	1,4092
Acetato de etila	A. Et	6,08	1,3723
THF	THF	7,52	1,4050
Diclorometano	Dclm	8,93	1,4242
Heptanol	HepI	11,75	1,4249
Isopropanol	Ispp	20,18	1,3776
Acetona	Actn	21,01	1,3588
Etanol	EtnI	25,30	1,3611
Metanol	MtnI	33,00	1,3288
Acetonitrila	ACN	36,64	1,3442
DMF	DMF	38,25	1,4305
DMSO	DMSO	47,24	1,4793

Para iniciarmos os estudos das propriedades fotofísicas das aminoquinolinas foram realizadas medidas de absorvância e emissão de fluorescência nos 16 solventes. Os gráficos representativos desses experimentos podem ser observados na Figura 12 (UV-Vis) e na Figura 13

(Fluorescência), enquanto que os gráficos com os valores normalizados das medidas podem ser observados na Figura 14.

Figura 12. Espectros de absorção das aminoquinolinas sintetizadas: a) AQ1, b) AQ2, c) AQ3, d) AQ4, e) AQ5, em 16 solventes, em ordem de polaridade. Os espectros foram feitos por varredura de $\lambda=250$ a 500nm, onde foram utilizadas soluções de 25 μ M cada.

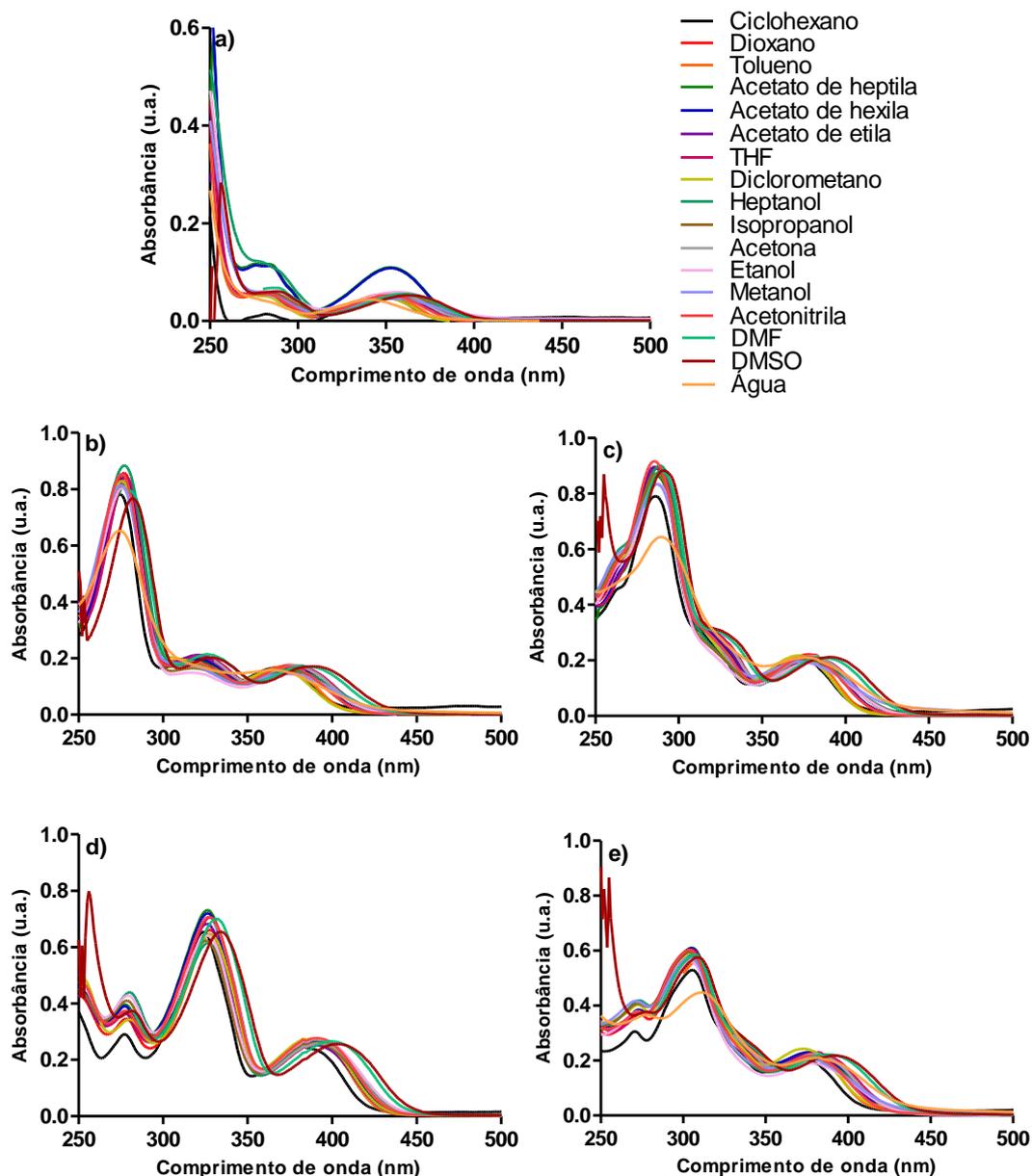


Figura 13. Espectros de emissão de fluorescência das aminoquinolinas sintetizadas: a) AQ1, b) AQ2, c) AQ3, d) AQ4, e) AQ5, em 16 solventes, em ordem de polaridade. Os espectros foram feitos com $\lambda_{exc}=375$ e varredura de emissão de $\lambda_{em}=400$ a 650nm (com exceção do AQ1 que foi utilizado $\lambda_{exc}=340$, $\lambda_{em}=370-600$ nm), onde foram utilizadas soluções de 7,5 μ M cada.

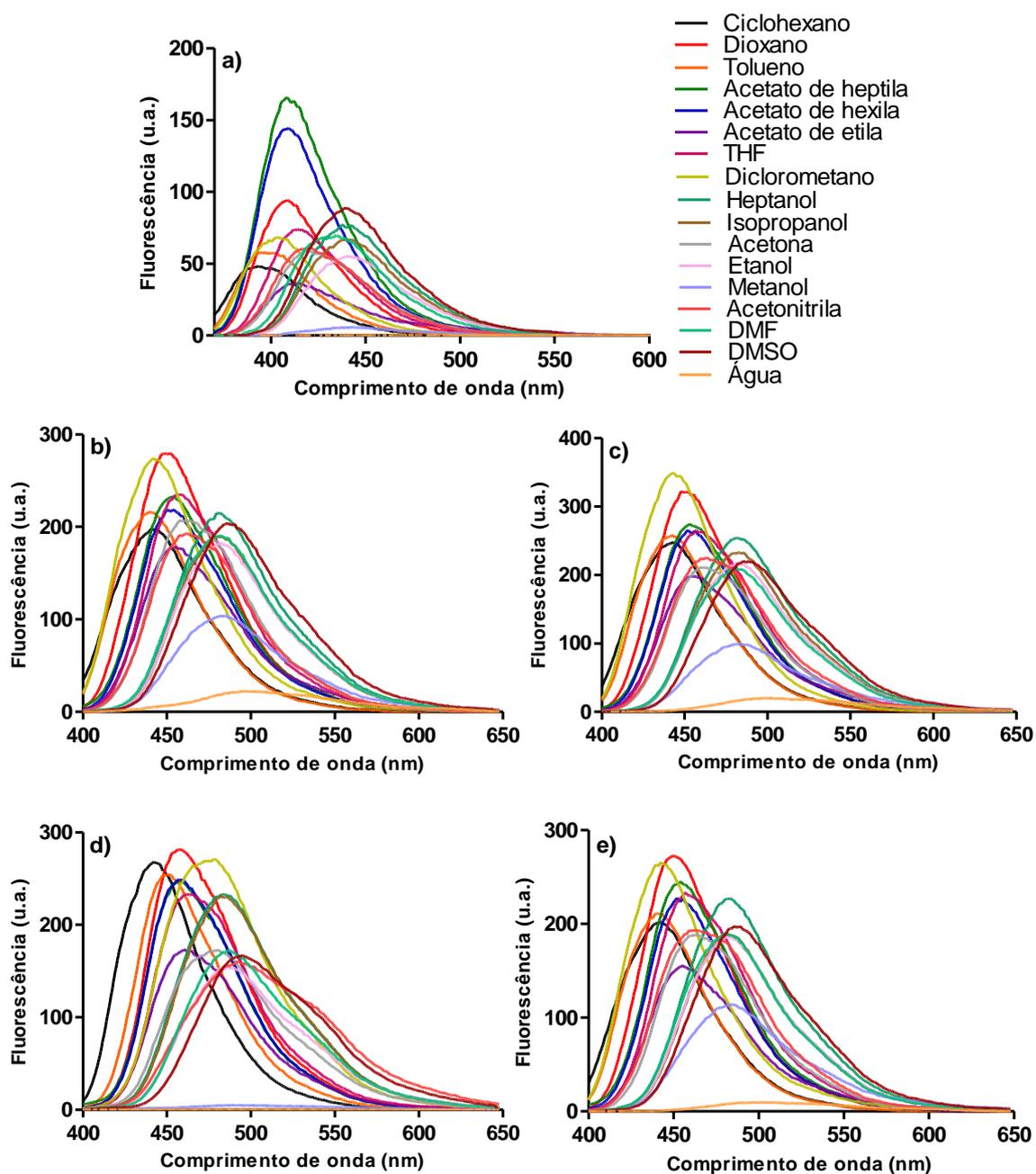
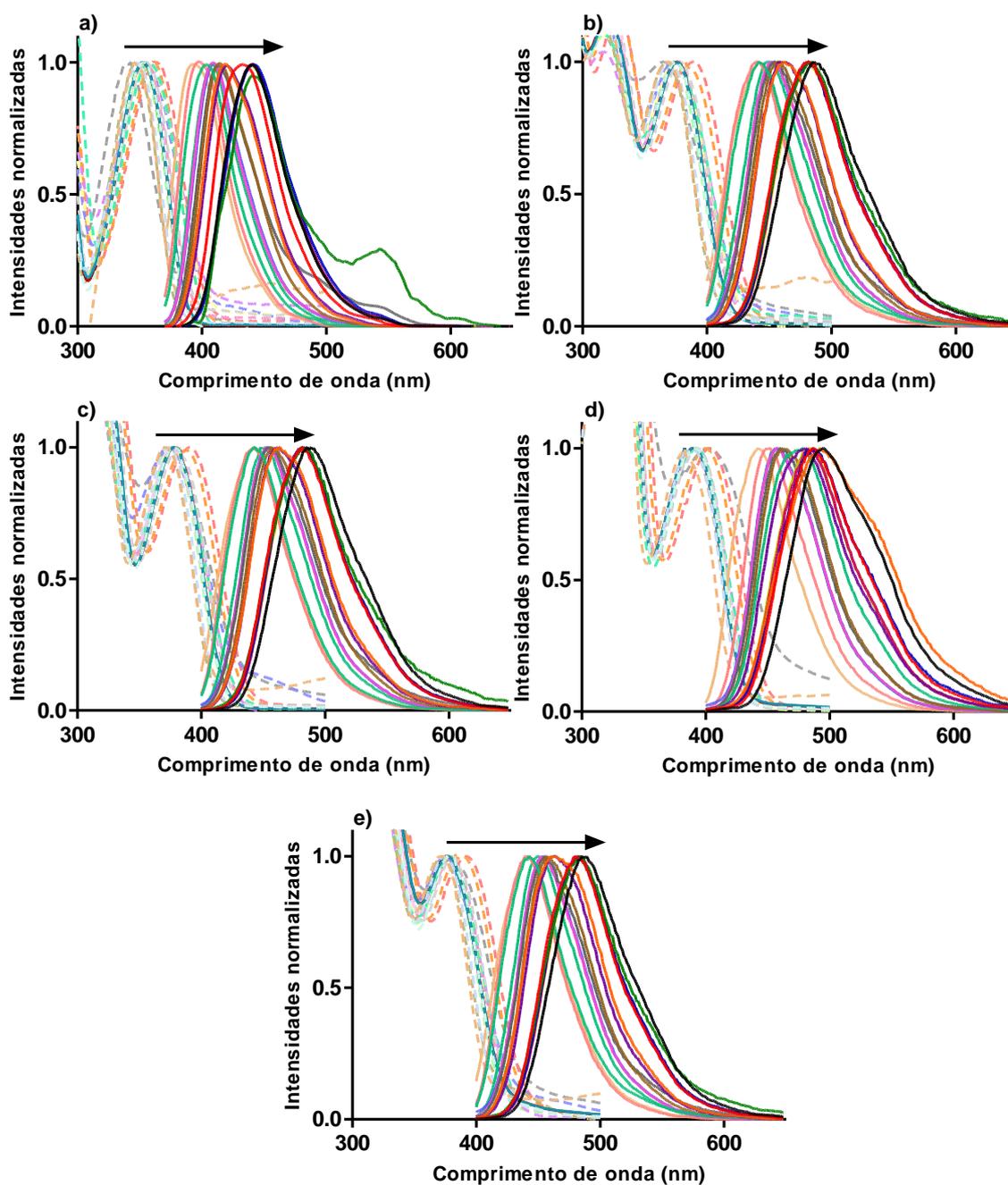


Figura 14. Espectros de absorção (linha tracejada) e de emissão de fluorescência (linha sólida) com valores normalizados de: a) AQ1, b) AQ2, c) AQ3, d) AQ4, e) AQ5, em 16 solventes (em ordem de polaridade: ciclo-hexano, 1,4-dioxano, tolueno, acetato de heptila, acetado de hexila, acetato de etila, tetra-hidrofurano, diclorometano, 1-hetpanol, 2-propanol, acetona, etanol, metanol, acetonitrila, DMF e DMSO), mostrando o deslocamento do máximo de comprimento de onda em relação a mudança de solventes.



Como pode ser observado na Figura 12, as aminoquinolinas apresentam 3 bandas de absorção, independente do solvente sendo utilizado, com os máximos próximos a 280, 325 e 375nm, sendo que esse último valor utilizado como base para a excitação dos compostos no experimento de emissão de fluorescência (com exceção de AQ1 que apresenta apenas 2 bandas bem definidas no intervalo de comprimentos de onda utilizados no experimento e a excitação realizada em 340nm para os experimentos de fluorescência). Na Figura 13 pode-se observar que as aminoquinolinas sintetizadas apresentam uma maior fluorescência do que a comercial, mostrando assim que as aminoquinolinas polissubstituídas sintetizadas podem apresentar propriedades interessantes nos estudos que serão realizados a seguir. Na Figura 14 é possível tanto observar de forma qualitativa o deslocamento batocrômico dos espectros quando há o aumento da polaridade dos solventes, como um maior deslocamento dos espectros de fluorescência quando comparado aos espectros de absorbância, como já largamente observado na literatura (Cao *et al.*, 2018; Kawski, Bojarski e Kukliński, 2008; Techert *et al.*, 2000; Thipperudrappa *et al.*, 2017) e discutido anteriormente no item 5.1.2.

Para uma observação de forma quantitativa dos comprimentos de onda e deslocamentos, pode-se observar na Tabela 6 os valores de comprimento de onda máximos de absorbância de cada composto nos diferentes solventes e na Tabela 7 pode ser observado os valores de comprimento de onda máximos de emissão de fluorescência de cada composto nos diferentes solventes; e a partir dos valores obtidos nas duas tabelas (Tabela 6 e Tabela 7), é possível a realização do cálculo do deslocamento de Stokes e a observação de sua variação ao alterar os solventes (Tabela 8), bem como o cálculo da somatória do

máximo dos comprimentos de onda de excitação e emissão e a variação dos valores ao mudar os solventes (Tabela 9).

Tabela 6. Valores de máximo de absorbância das aminoquinolinas em diferentes solventes

S	AQ1		AQ2		AQ3		AQ4		AQ5	
	nm	cm ⁻¹								
CH	345	28986	369	27100	371	26954	383	26110	372	26882
Diox	354	28249	375	26667	377	26525	391	25575	377	26525
Tol	348	28736	370	27027	374	26738	383	26110	375	26667
A. Hept	352	28409	377	26525	378	26455	389	25710	377	26525
A. Hex	353	28329	375	26667	378	26455	390	25641	376	26596
A. Et	355	28169	375	26667	377	26525	389	25707	377	26525
THF	355	28169	378	26455	383	26110	393	25445	383	26110
Dclm	345	28986	367	27248	371	26954	383	26110	373	26810
HepI	355	28169	376	26596	378	26455	393	25445	379	26385
Ispp	357	28011	374	26738	378	26455	390	25641	377	26525
Actn	354	28249	377	26525	380	26316	393	25445	383	26110
EtnI	357	28011	376	26596	377	26525	392	25510	377	26525
MtnI	355	28169	374	26738	373	26810	477	20964	374	26738
ACN	352	28409	374	26738	378	26455	391	25575	378	26455
DMF	361	27701	383	26110	383	26110	399	25063	389	25707
DMSO	361	27701	389	25707	391	25575	403	24814	392	25510

* S → Solventes

Tabela 7. Valores de máximo de fluorescência das aminoquinolinas

S	AQ1		AQ2		AQ3		AQ4		AQ5	
	nm	cm ⁻¹								
CH	392,5	25478	441,0	22676	443,0	22573	442,5	22599	442,5	22599
Diox	408,5	24480	452,0	22124	448,0	22321	458,0	21834	450,0	22222
Tol	394,5	25349	439,0	22779	442,5	22599	451,0	22173	439,5	22753
A. Hept	408,0	24510	454,0	22026	453,0	22075	456,0	21930	454,0	22026
A. Hex	409,0	24450	453,5	22051	452,0	22124	457,0	21882	452,0	22124
A. Et	414,5	24126	455,0	21978	456,0	219030	460,5	21716	455,5	21954
THF	414,0	24155	456,0	21930	457,0	21882	462,0	21645	457,0	21882
Dclm	403,5	24783	442,0	22624	443,0	22573	478,0	20921	442,5	22599
Hepl	437,5	22857	481,5	20768	482,0	20747	484,5	20640	483,0	20704
Ispp	440,5	22702	481,0	20790	483,0	20704	482,0	20747	481,5	20768
Actn	418,0	23923	458,0	21834	462,5	21622	480,5	20812	463,5	21575
Etnl	440,0	22727	482,0	20747	481,5	20768	486,5	20555	483,5	20683
Mtnl	443,0	22573	482,0	20747	484,0	20661	494,0	20243	484,0	20661
ACN	421,0	23753	462,0	21645	462,5	21622	492,0	20325	461,5	21669
DMF	434,5	23015	481,5	20768	481,0	20790	486,5	20555	480,0	20833
DMSO	440,5	22702	486,0	20576	488,5	20471	495,0	20202	485,5	20597

* S → Solventes

Tabela 8. Valores de deslocamento de Stokes das aminoquinolinas em diferentes solventes

S	AQ1		AQ2		AQ3		AQ4		AQ5	
	nm	cm ⁻¹	nm	cm ⁻¹	nm	cm ⁻¹	nm	cm ⁻¹	nm	cm ⁻¹
CH	47,5	210526	72,0	138889	72,0	138889	59,5	168067	70,5	141844
Diox	54,5	183486	77,0	129870	71,0	140845	67,0	149254	73,0	136986
Tol	46,5	215054	69,0	144928	68,5	145985	68,0	147059	64,5	155039
A. Hept	56,0	178571	77,0	129870	75,0	133333	67,0	149254	77,0	129870
A. Hex	56,0	178571	78,5	127389	74,0	135135	67,0	149254	76,0	131579
A. Et	59,5	168067	80,0	125000	79,0	126582	71,5	139860	78,5	127389
THF	59,0	169492	78,0	128205	74,0	135135	69,0	144928	74,0	135135
Dclm	58,5	170940	75,0	133333	72,0	138889	95,0	105263	69,5	143885
HepI	82,5	121212	105,5	94787	104	96154	91,5	109290	104	96154
Ispp	83,5	119761	107,0	93458	105	95238	92,0	108696	104	95694
Actn	64,0	156250	81,0	123457	82,5	121212	87,5	114286	80,5	124224
EtnI	83,0	120482	106,0	94340	104	95694	94,5	105820	106	93897
MtnI	88,0	113636	108,0	92593	111	90090	17,0	588235	110	90909
ACN	69,0	144928	88,0	113636	84,5	118343	101	99010	83,5	119761
DMF	73,5	136054	98,5	101523	98,0	102041	87,5	114286	91,0	109890
DMSO	79,5	125786	97,0	103093	97,5	102564	92,0	108696	93,5	106952

* S → Solventes

Tabela 9. Valores da somatória dos comprimentos de onda máximo de absorvância e emissão de fluorescência das aminoquinolinas em diferentes solventes

S	AQ1		AQ2		AQ3		AQ4		AQ5	
	nm	cm ⁻¹								
CH	737,5	54463	810,0	49776	814,0	49528	825,5	48709	814,5	49481
Diox	762,5	52728	827,0	48791	825,0	48847	849,0	47410	827,0	48747
Tol	742,5	54084	809,0	49806	816,5	49337	834,0	48283	814,5	49420
A. Hept	760,0	52919	831,0	48552	831,0	48530	845,0	47637	831,0	48552
A. Hex	762,0	52779	828,5	48717	830,0	48579	847,0	47523	828,0	48720
A. Et	769,5	52295	830,0	48645	833,0	48451	849,5	47423	832,5	48479
THF	769,0	52324	834,0	48385	840,0	47992	855,0	47090	840,0	47992
Dclm	748,5	53769	809,0	49872	814,0	49528	861,0	47030	815,5	49409
Hepl	792,5	51026	857,5	47364	860,0	47202	877,5	46085	862,0	47089
Ispp	797,5	50713	855,0	47528	861,0	47159	872,0	46388	858,5	47294
Actn	772,0	52172	835,0	48359	842,5	47937	873,5	46257	846,5	47685
Etnl	797,0	50739	858,0	47343	858,5	47294	878,5	46065	860,5	47208
Mtnl	798,0	50742	856,0	47485	857,0	47471	971,0	41207	858,0	47399
ACN	773,0	52162	836,0	48383	840,5	48077	883,0	45901	839,5	48124
DMF	795,5	50716	864,5	46878	864,0	46900	885,5	45618	869,0	46540
DMSO	801,5	50402	875,0	46283	879,5	46047	898,0	45016	877,5	46108

* S → Solventes

Como pode ser observado na Tabela 6 e Tabela 7 (e anteriormente discutido ao se observar a Figura 14), as aminoquinolinas sofreram

deslocamentos batocrômicos em função do aumento da polaridade dos solventes. Estes resultados mostram o caráter ICT das aminoquinolinas (Lakowicz, 2006). A estabilização do estado ICT transitório depende de propriedades dielétricas dos solventes e leva a um deslocamento batocrômico do espectro de fluorescência com o aumento da polaridade do solvente. O deslocamento para o comprimento de onda máximo maiores ocorre com o aumento da constante dielétrica do solvente (Techert *et al.*, 2000; Valeur, 2001).

Utilizando os índices de refração e constantes dielétricas dos solventes (Tabela 5) e aplicando as Equações de 4 a 7 foram obtidos os valores das funções de polaridade dos solventes nos diferentes modelos estudados (Tabela 10).

Tabela 10. Funções de polaridade dos solventes para os modelos solvatocrômicos utilizados

Solvente	Δf^1	F^2	$f(\epsilon, n)^3$	$\phi(\epsilon, n)^4$
Ciclo-hexano	-0,00075	0,05060	-0,00148	0,57332
Dioxano	0,02150	0,08634	0,04361	0,61695
Tolueno	0,01347	0,08896	0,02959	0,69929
Acetato de heptila	0,14016	0,31586	0,33225	0,89579
Acetato de hexila	0,14927	0,33442	0,35596	0,91181
Acetato de etila	0,20072	0,44341	0,49254	0,99915
THF	0,20963	0,48802	0,54756	1,09783
Diclorometano	0,21710	0,52216	0,59029	1,16601
Heptanol	0,23518	0,57822	0,66069	1,23733
Isopropanol	0,27652	0,67753	0,78054	1,29425
Acetona	0,28478	0,68927	0,79252	1,28101
Etanol	0,28973	0,70891	0,81682	1,30840
Metanol	0,30863	0,74531	0,85551	1,30353
Acetonitrila	0,30492	0,74748	0,86098	1,32981
DMF	0,27519	0,72001	0,83932	1,42337
DMSO	0,26327	0,71806	0,84129	1,48924

¹ Lippert-Mataga, ² McRae, ³ Bilot-Kawski, ⁴ Kawski

A partir dos dados de deslocamentos de Stokes para cada composto nos solventes estudados (Tabela 8), e os valores da somatória dos comprimentos de onda máximos de absorbância e fluorescência (Tabela 9), e os valores de

diversas funções de polarizabilidade de solvente (Tabela 10) e aplicação das Equações 8, 10, 11 e 14 foi plotado os gráficos das correlações solvatocrômicas nos modelos estudados (Figura 15 a Figura 19). Este tipo de estudo tem por objetivo obter a sensibilidade do fluoróforo à polaridade do meio e, conseqüentemente, sua aplicabilidade como sonda solvatocrômica. Os gráficos foram plotados com a diferença do comprimento de onda máximo de absorção e emissão (deslocamento de Stokes (em cm^{-1})) (referente às Equações 8 e 10); a soma dos comprimentos de onda máximo de absorção e emissão (em cm^{-1}) (referente a Equação 11); e comprimento de onda máximo de emissão (em cm^{-1}) (referente a Equação 14).

Figura 15. Correlações solvatocrômicas para a aminoquinolina AQ1. a) Modelo Lippert-Mataga, b) modelo Bilot e Kawski, c) modelo Kawski, d) modelo McRae.

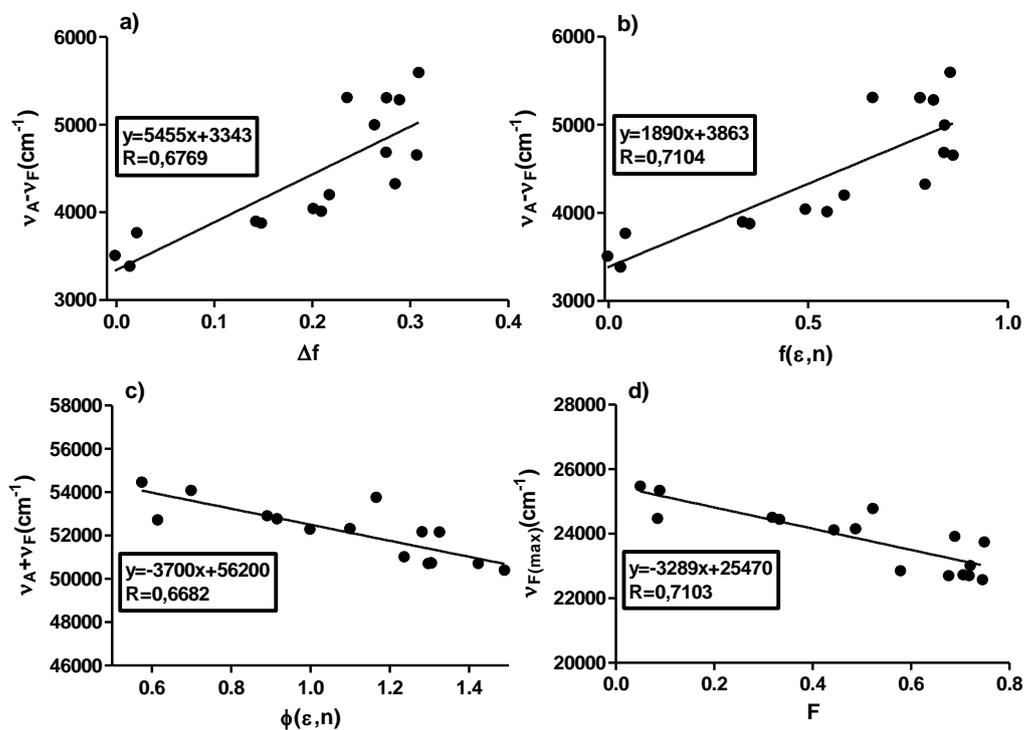


Figura 16. Correlações solvatocrômicas para a aminoquinolina AQ2. a) Modelo Lippert-Mataga, b) modelo Bilot e Kawski, c) modelo Kawski, d) modelo McRae,

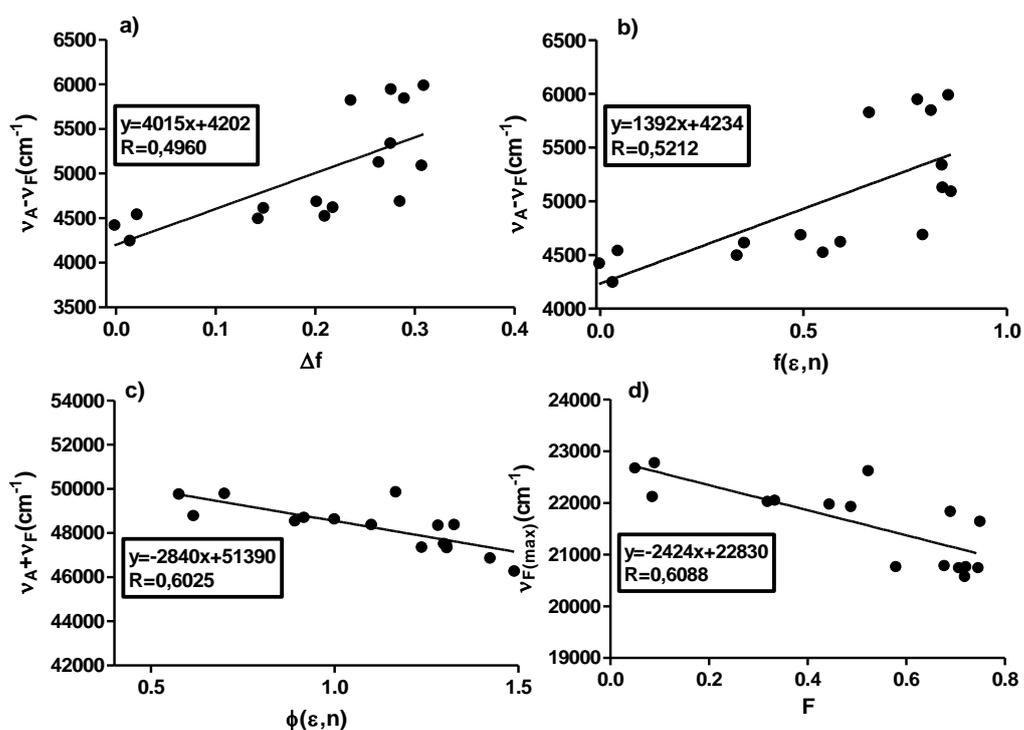


Figura 17. Correlações solvatocrômicas para a aminoquinolina AQ3. a) Modelo Lippert-Mataga, b) modelo Bilot e Kawski, c) modelo Kawski, d) modelo McRae.

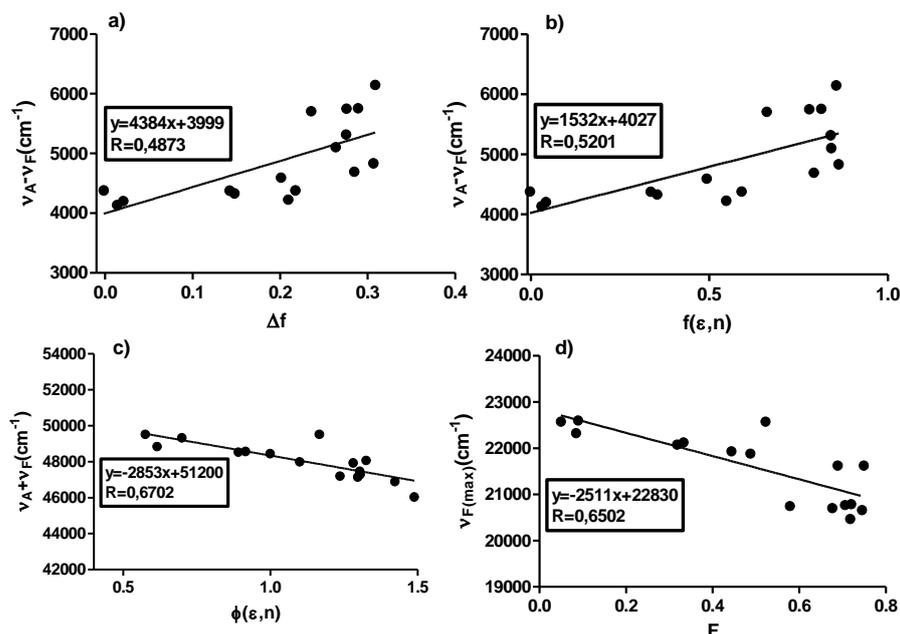


Figura 18. Correlações solvatocrômicas para a aminoquinolina AQ4. a) Modelo Lippert-Mataga, b) modelo Bilot e Kawski, c) modelo Kawski, d) modelo McRae,

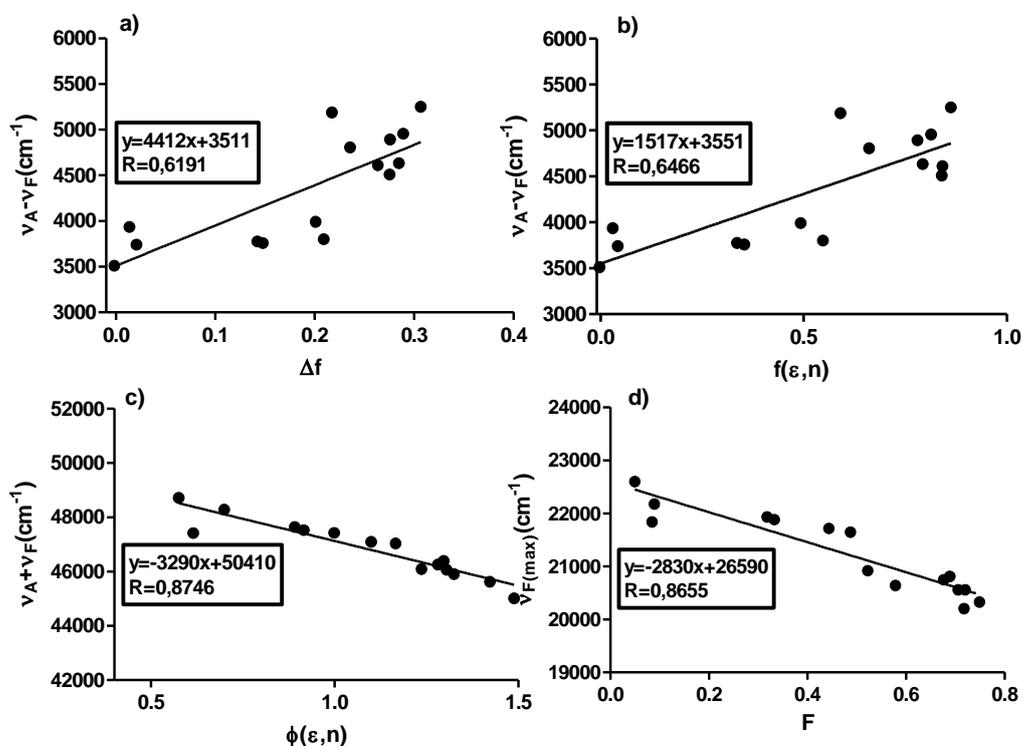
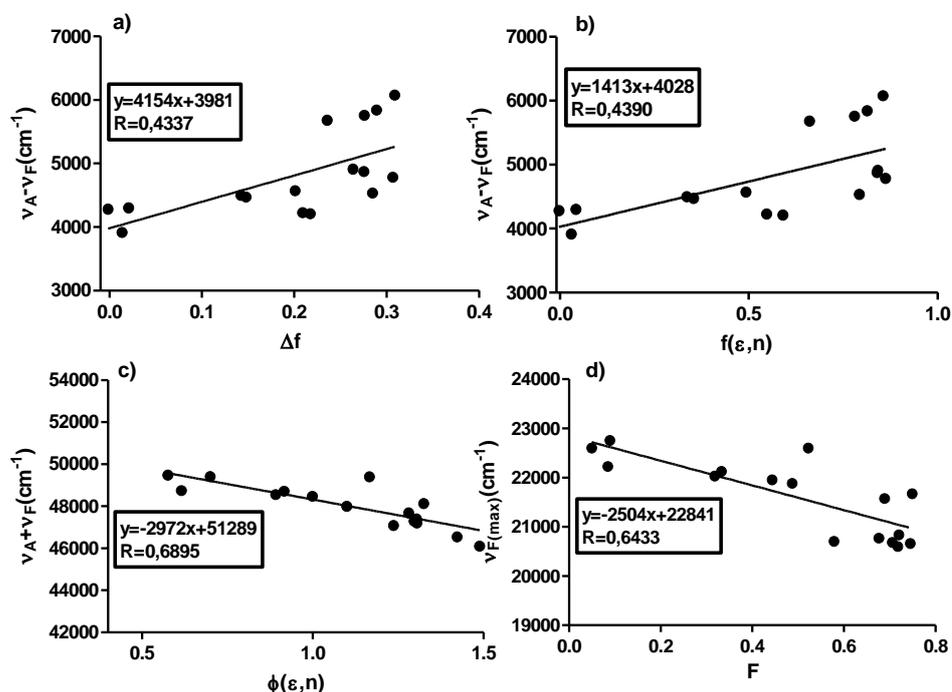


Figura 19. Correlações solvatocrômicas para a aminoquinolina AQ5. a) Modelo Lippert-Mataga, b) modelo Bilot e Kawski, c) modelo Kawski, d) modelo McRae,



Todos os gráficos plotados como descrito anteriormente, juntamente com o coeficiente linear, coeficiente angular e coeficiente de correlação linear são mostrados da Figura 15 a Figura 19. Conforme esperado para sondas solvatocrômicas houve um aumento no valor do deslocamento de Stokes conforme houve aumento da polaridade do solvente onde os compostos estão inseridos. Para todos os gráficos, a regressão linear foi feita com o software GraphPrism 5.0. Na Tabela 11 é possível se observar os valores dos coeficientes de correlação linear (R^2) para cada modelo de cálculo e cada substância utilizada, uma vez que esse parâmetro é de grande importância para a observação de qual são as sondas mais promissoras para os estudos solvatocrômicos. O que se pode concluir ao observar os valores é que AQ4 apresenta os melhores valores de R^2 em relação as outras aminoquinolinas

independente do modelo de cálculo utilizado, sendo esse composto tem grande potencial como sonda de polaridade de meio.

Tabela 11. Coeficiente de correlação linear (R^2) para os modelos de solvatocromismo estudados.

Modelo de cálculo	Aminoquinolinas				
	AQ1	AQ2	AQ3	AQ4	AQ5
LM ¹	0,6769	0,4960	0,4873	0,6191	0,4337
BK ²	0,7104	0,5212	0,5201	0,6466	0,4390
Kawski	0,6682	0,6025	0,6702	0,8746	0,6895
McRae	0,7103	0,6088	0,6502	0,8655	0,6433

¹ Lipert-Mataga, ² Bilot-Kawski

Os valores dos momentos de dipolo no estado fundamental (μ_G), excitado (μ_E) e o valor da diferença ($\Delta\mu$) determinados para as diversos modelos, bem como o raio de Onsager das aminoquinolinas podem ser observadas na Tabela 12. O raio de Onsager foi calculado utilizando o software Gaussview 5.0, onde é possível encontrar o valor do comprimento da molécula e, partir deste, o valor do raio que mesma ocupa quando inserida no solvente (uma vez que os modelos matemáticos utilizados no estudo consideram que a molécula de soluto ocupa uma cavidade esférica dentro do meio/solvente).

Tabela 12. Valores dos raios de Onsager (a), variação de momento de dipolo ($\Delta\mu$) e momento de dipolo no estado excitado (μ_e) para as aminoquinolinas

Composto	a (Å)	$\Delta\mu$ LM ¹ (D)	$\Delta\mu$ BK ² (D)	μ_e Mc ³ (D)
AQ1	3,9	4,57	2,74	3,88
AQ2	5,9	9,08	5,36	7,53
AQ3	7,0	11,72	6,95	9,86
AQ4	7,0	12,00	7,01	10,59
AQ5	6,9	11,66	6,83	10,01

¹LM: Calculado a partir da equação de Lippert-Mataga (Equação 9)

²BK: Calculado a partir da equação de Bilot-Kawski (Equação 12)

³Mc: Calculado a partir da equação de McRae (Equação 15)

A Tabela 12 mostra que os valores encontrados para a diferença no momento de dipolo das moléculas se apresentam sempre maiores quando é utilizado a equação LM quando comparado com o método utilizando as equações BK. Isso é um fenômeno comum em resultados obtidos por diversos autores na literatura (Khattab *et al.*, 2017; Sidarai *et al.*, 2017; Tangod *et al.*, 2015; Thipperudrappa *et al.*, 2017; Tiwari *et al.*, 2014), porém suas causas são pouco discutidas, mas pode-se inferir que os resultados obtidos por BK estejam mais próximos do valor exato uma vez que os gráficos apresentam melhores coeficientes de correlação linear entre os parâmetros de solvente e os dados espectroscópicos obtidos experimentalmente (como pode ser observado na Tabela 11). Além disso, esses parâmetros de solvente descrevem melhor o meio onde a molécula está inserida do que a equação de Lippert, que supõe apenas os efeitos mais gerais dos solventes e suas interações com a molécula inserida

(Kawski e Bojarski, 2011; Lakowicz, 2006). O modelo de McRae resulta apenas no valor de μ_E , mas corrobora com os resultados que os resultados mais exatos para $\Delta\mu$ é utilizando-se o valor encontrado com o método BK.

Em resumo, estes resultados mostraram que as aminoquinolinas, principalmente AQ3 à AQ5, apresentaram maior variação no momento de dipolo quando excitadas se comparado a comercial AQ1. Portanto, o fenômeno ITC é mais significativo para as mesmas, tornando-as mais úteis para estudos solvatocrômicos, e mostrando mais uma vez que as aminoquinolinas polissubstituídas sintetizadas apresentam um maior potencial de aplicação na área de estudos com diferentes polaridades de meio e fluorescência, justificando assim a realização da síntese. A molécula AQ2 apresentar um valor abaixo do que as demais sintetizadas mostra que o caráter ICT aumenta com a colocação do substituinte, uma vez que para as moléculas utilizadas no estudo o substituinte do fenil substituinte do grupo quinolínico atua como o doador de elétrons, e o núcleo quinolínico funciona como o aceitador de elétrons, o que já foi observado em outros estudos na literatura (Tan *et al.*, 2013).

5.4.1. Estudos de absorvidade molar dos compostos

As aminoquinolinas sintetizadas também apresentaram valores mais altos de coeficientes de absorvidade molar se comparado a comercial (Tabela 13) (Figura B- 2 do Anexo B). Os valores de absorvidade molar das aminoquinolinas mostram que houve um aumento dos valores em função da inclusão dos sistemas conjugados (nas posições 2 e 4 do núcleo quinolínico) e substituintes (que estão ligados na posição 3 do grupo fenil da posição 2 do núcleo

quinolínicos). Isso pode ser evidenciado quando se compara o AQ1, que contém apenas o substituinte na posição 6 do núcleo quinolínico e o AQ2 que contém substituinte fenil ligado ao núcleo quinolínico. Estes apresentam os menores valores de absorvidade molar em relação aos demais. Em conclusão, o aumento na absorvidade molar foi mais um indicativo de melhoras nas propriedades fotofísicas de moléculas sintetizadas e seu potencial uso como sondas espectroscópicas.

Tabela 13. Valores de Absortividade molar das aminoquinolinas

Solventes	Absortividade Molar ($M^{-1}cm^{-1}$)				
	AQ1	AQ2	AQ3	AQ4	AQ5
Ciclo-hexano	1992	6680	8200	10096	8204
Dioxano	2180	7044	8864	10124	9064
Tolueno	2188	6748	8492	10396	9056
Acetato de heptila	2196	6628	8048	10816	9240
Acetato de hexila	2162	6736	8224	10656	9220
Acetato de etila	2080	6548	8364	10100	8964
THF	2276	6976	8476	10292	9232
Diclorometano	2012	6456	8712	11044	9728
Heptanol	1884	6376	8228	10548	8020
Isopropanol	2100	5996	7988	10424	8252
Acetona	2212	7016	8668	10320	8968
Etanol	2364	5756	7576	10960	7584
Metanol	1828	5836	7820	8648	8320
Acetonitrila	2104	6772	8580	11068	8692
DMF	2224	6964	8440	10636	8864
DMSO	2104	6852	8480	10236	8728

5.4.2. Estudos de rendimento quântico de fluorescência das aminoquinolinas em diferentes solventes

Outro aspecto importante no que diz respeito ao desenvolvimento de sondas fluorescentes e suas respostas em função do meio é seu rendimento quântico de fluorescência. Os valores de rendimento quântico calculado pela Equação 13 utilizando-se Coumarina-102 em acetonitrila como referência (A Figura B- 1 do Anexo B mostra o espectro de fluorescência do padrão descrito em uma concentração do fluoróforo de 2,5 μ M) (Jones *et al.*, 1985) para os diferentes compostos podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de rendimento quântico de fluorescência das aminoquinolinas

Solventes	Rendimento Quântico (%)				
	AQ1	AQ2	AQ3	AQ4	AQ5
Ciclohexano	32,7	70,3	64,6	51,2	49,9
Dioxano	66,9	87,7	81,2	65,1	64,0
Tolueno	48,0	76,8	62,5	59,0	48,5
Acetato de heptila	69,0	81,2	72,1	61,1	56,2
Acetato de hexila	62,3	79,5	72,9	59,3	55,2
Acetato de etila	33,0	58,9	52,6	41,2	37,3
THF	59,0	80,7	52,6	67,1	54,9
Diclorometano	49,7	92,1	82,3	65,4	61,1
Heptanol	76,6	89,8	78,7	69,7	67,1
Isopropanol	63,0	73,0	67,4	60,2	53,0
Acetona	58,9	69,4	54,5	49,5	47,1
Etanol	55,3	66,3	62,8	42,0	52,5
Metanol	6,6	32,5	30,3	1,70	32,6
Acetonitrila	54,8	62,7	61,1	52,9	51,5
DMF	70,6	83,0	73,7	65,3	59,4
DMSO	89,8	90,4	87,2	81,1	73,1
Água	0,4	18,8	9,7	0,1	3,8

Utilizando-se como padrão (referência) a Coumarina-102, com 91% de rendimento em acetonitrila (Obtido de: (Jones *et al.*, 1985))

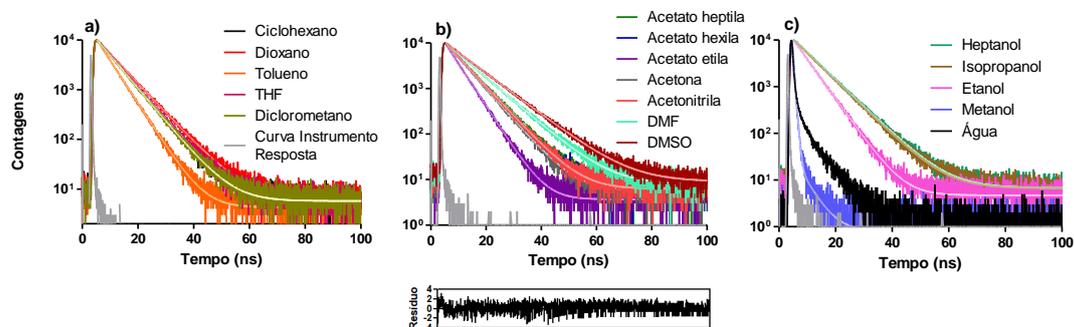
Como pode ser observado, todos os compostos sintetizados apresentaram altos valores de rendimento quântico e maiores do que os valores

encontrados para a aminoquinolina comercial. Também é possível a observação de uma queda nos valores para os solventes metanol e água, provavelmente relacionados a baixa solubilidade em nestes solventes. Destacamos também o aumento no rendimento quando se compara os álcoois etanol e metanol com o heptanol, provavelmente um reflexo da maior solubilidade neste último devido sua menor polaridade quando comparado aos outros álcoois, tanto que a mesma tendência foi observada comparando o acetato de hexila com o acetato de etila. Os valores mais altos encontrados (acima de 85%) foram para os solventes dioxano (solvente apolar) e DMSO (solvente polar aprótico).

5.4.3. Estudos de tempo de vida realizados com o composto AQ4

O rendimento quântico de um composto está ligado aos valores de tempo de vida de fluorescência através dos decaimentos radiativos e não radiativos. Uma vez que o composto AQ4 se apresentou como um forte candidato a ser utilizado como sonda solvatocrômica, seja devido a apresentar altos valores de correlação linear entre seus valores de absorbância a fluorescência, seja por seus altos valores de absorvidade molar e rendimento quântico, o mesmo foi selecionado para a realização de experimentos de tempo de vida de fluorescência nos solventes utilizados no trabalho. Para isso foram realizados experimentos como descrito no item 5.3.4, e os gráficos obtidos podem ser observados na Figura 20.

Figura 20. Gráficos representativos das medidas de tempo de vida para diferentes solventes, a) Solventes apróticos, b) Solventes polares apróticos e c) Solventes polares próticos. ($\lambda_{exc}=340nm$, $\lambda_{em}=475-575nm$, pulso de 100ns e contagem de 1000 fótons/s).



Através dos valores de regressão exponencial realizada pelo software do próprio equipamento é possível a obtenção dos valores de tempo de vida médio do AQ4 em diferentes solventes através das seguintes equações:

- Equação 2. Equação do tempo de vida experimental (τ_s) (anteriormente discutida no item 2.2.1).

$$\tau_s = \frac{1}{Kr + Knr}$$

- Equação 17. Equação do rendimento quântico (ϕ)

$$\phi = \frac{Kr}{Kr + Knr}$$

Onde: K_r é o decaimento radiativo

K_{nr} é o decaimento não radiativo

Tabela 15. Valores de rendimento quântico obtidos pela equação 15, valores de tempo de vida de fluorescência obtidos pelo experimento anterior e valores dos decaimentos radiativos e não-radiativos obtidos pelo cálculo descrito acima.

Solvente	ϕ	$\tau(\text{ns})$	$K_r(\text{ns})$	$K_{nr}(\text{ns})$
Ciclohexano	0,512	6,66	0,07687	0,07328
Dioxano	0,651	7,31	0,08904	0,04776
Tolueno	0,590	5,03	0,11731	0,08149
Acetato de heptila	0,611	6,87	0,08898	0,05658
Acetato de hexila	0,593	6,59	0,08992	0,06182
Acetato de etila	0,412	4,65	0,08859	0,12646
THF	0,671	6,76	0,09926	0,04867
Diclorometano	0,654	6,53	0,10017	0,05297
Heptanol	0,697	7,52	0,09264	0,04034
Isopropanol	0,602	7,38	0,08161	0,05389
Acetona	0,495	6,34	0,07804	0,07969
Etanol	0,420	5,13	0,08182	0,11312
Metanol	0,017	8,44	0,00197	0,11655
Acetonitrila	0,529	6,69	0,07905	0,07043
DMF	0,653	8,37	0,07807	0,04141
DMSO	0,811	9,54	0,08503	0,01979
Água	0,001	1,55	0,00057	0,64450

Através dos dados obtidos pode-se observar que os solventes com os maiores valores para rendimento quântico também apresentaram maiores valores de tempo de vida, o que leva a valores de taxa de decaimento radiativo

mais altas. De uma maneira geral houve um aumento do tempo de vida quando há o aumento da polaridade do meio e solventes polares próticos foram o que apresentaram maiores valores de decaimento não-radiativo da sequência de solventes.

5.5. Conclusões dos estudos de solvatocromismo

Os estudos com solventes mostram que as moléculas de aminoquinolinas sintetizadas apresentam valores de rendimento quântico superiores em relação à molécula comercial não substituída. Na maioria dos solventes utilizados nesse trabalho os valores de rendimento quântico se apresentaram com valores acima de 50% com exceção da água e metanol onde esses compostos apresentam baixa solubilidade. Além disso, a absorvidade molar dos compostos nos solventes apresentou também um aumento significativo de valores (principalmente AQ4) quando comparado com o composto comercial. Esses resultados mostram uma otimização nas propriedades fotofísicas da molécula quando adicionadas as substituições em relação apenas ao núcleo quinolínico contendo apenas o grupo amino na posição 6.

Os experimentos de tempo de vida para AQ4 demonstram que a queda nos valores do rendimento quântico da molécula em determinados solventes é devido ao aumento do decaimento não radiativo nesses meios e em meio aquoso também houve uma queda significativa do tempo de vida do fluoróforo.

Os estudos de solvatocromismo mostram um deslocamento batocrômico do máximo de banda de absorção e emissão, caracterizados por moléculas que possuem a propriedade ICT, o que caracteriza as mesmas como boas sondas

solvatocrômicas, o que é evidenciado pela diferença no valor do momento de dipolo no estado fundamental e excitado. Além disso, responderam de modo satisfatório (valores de coeficiente linear acima de 0,7 para os cálculos com modelo de Kawski) aos diferentes modelos solvatocrômicos estudados, o que pode possibilitar a utilização desse modelo de cálculo mais eficiente com a sonda AQ4 para estimar até mesmo a constante dielétrica no interior da proteína BSA (esse experimento será mostrado e mais profundamente discutido no próximo capítulo).

Capítulo 3

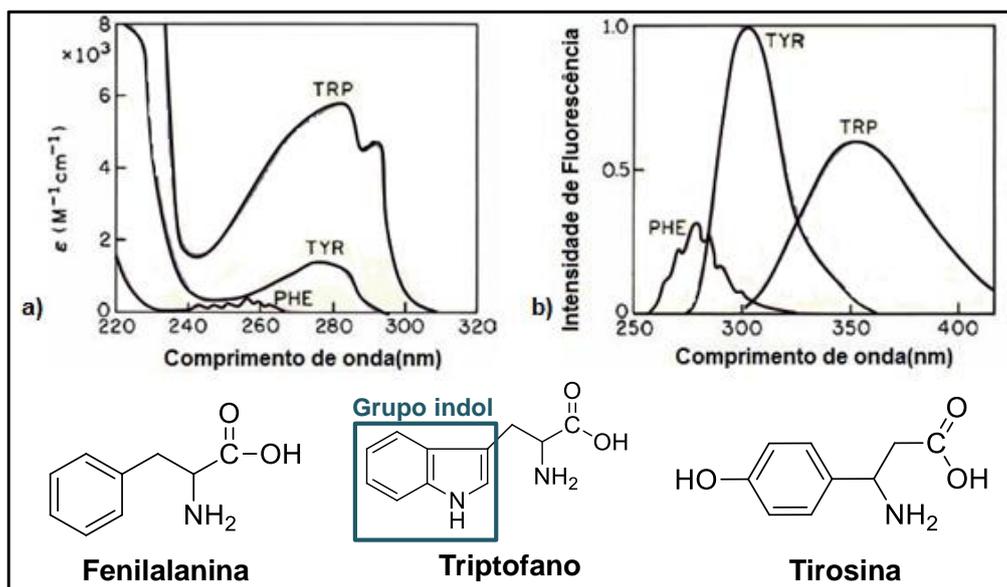
Estudos da Interação das Aminoquinolinas com Proteínas

6.1. Introdução

6.1.1. Albumina sérica e lisozima

As proteínas são as biomoléculas que apresentam a maior diversidade estrutural e funcional nos seres vivos, e como consequência são intensamente estudadas sob diversos aspectos biológicos (Francis, 2010; Lin, Y. *et al.*, 2017; Moraes *et al.*, 2013). Além disso, as proteínas apresentam uma vantagem em relação às outras biomoléculas, pois tem como uma de suas características experimentais fluorescência intrínseca que advém de três aminoácidos: triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) (Figura 21). O grupo indol do triptofano é o maior responsável pela sua capacidade de absorver radiação UV e pode ser seletivamente excitado, pois possui uma forte absorção entre 280-300nm, enquanto que os demais fluoróforos são excitáveis em comprimentos de onda menores. A fluorescência intrínseca facilita o estudo das interações das proteínas; um exemplo disso é o fato da emissão de fluorescência do triptofano ser sensível ao grau de polaridade do meio, permitindo assim que essas medidas possam ser utilizadas em estudos de mudanças conformacionais de proteínas (Loving, Sainlos e Imperiali, 2010).

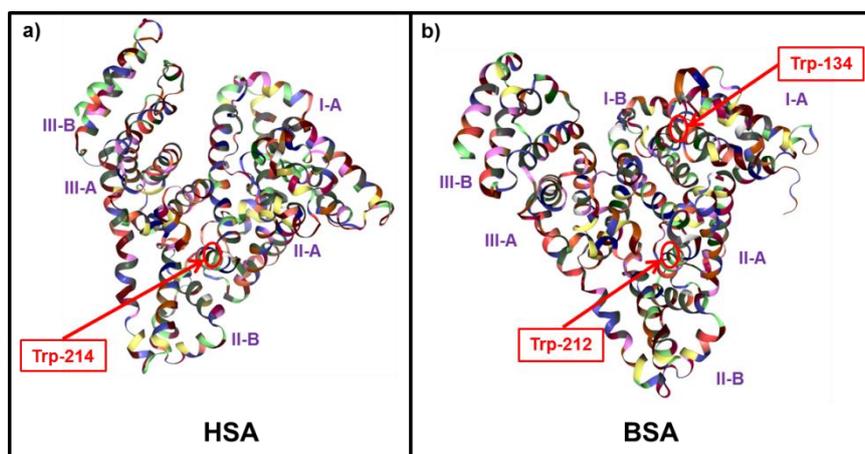
Figura 21. Espectros de absorvância (a) e fluorescência (b) dos aminoácidos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). Trp: $\lambda_{\text{ex}}= 295\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=353\text{nm}$; Tyr: $\lambda_{\text{ex}}= 275\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 304\text{nm}$; Phe: $\lambda_{\text{ex}}= 260\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 282\text{nm}$. As estruturas dos aminoácidos são observadas na parte inferior (Adaptado de:(Joshi *et al.*, 2013)).



Dentre as proteínas, destacam-se as albuminas séricas que foram utilizadas como modelos biológicos nesse estudo. Trata-se das proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo e auxiliam no transporte e distribuição de medicamentos, íons metálicos, metabólitos e ácidos graxos no organismo, além de serem importantes na manutenção do pH e pressão osmótica do sangue. Embora existam diferentes tipos de albuminas, as mais estudadas são: a albumina sérica humana (HSA) e a albumina sérica bovina (BSA). Essas duas proteínas possuem 76% de semelhança em suas sequências de aminoácidos e peso molecular de cerca de 66kD (Francis, 2010). Ambas possuem um resíduo de cisteína livre na posição 34 (Cys-34) que levam à atividade antioxidante dessas proteínas e 17 ligações de dissulfeto que auxiliam na estabilidade da estrutura terciária. A HSA é composta por 585 resíduos de aminoácidos e possui

apenas um resíduo de triptofano, o Trp-214, localizado no subdomínio II-A (Figura 22a). A BSA é composta por 583 resíduos de aminoácidos e apresentam dois resíduos de triptofano, que são o Trp-134 e o Trp-212, localizados nos subdomínios I-B e II-A, respectivamente (Figura 22b) (Belatik *et al.*, 2012; Lin, Y. *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2015). Assim, a utilização de BSA em estudos é justificada, pois apresenta grande semelhança com a HSA e um custo mais baixo para a realização dos experimentos.

Figura 22. Estruturas das proteínas: a) HSA e b) BSA com os diferentes resíduos de aminoácidos com diferente coloração, e as localizações aproximadas dos triptofanos (Trp-214, Trp-212 e Trp -134) e dos subdomínios. Obtida e adaptada do Protein data bank (ID:1e78 e 4f5s).

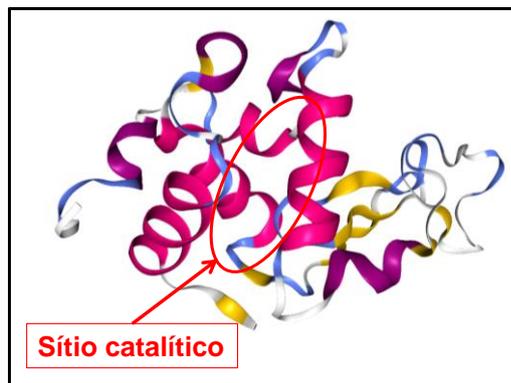


Sabe-se que a albumina tem a capacidade de se ligar rapidamente e com grande afinidade a vários ligantes diferentes e de alterar sua conformação interna de modo rápido (equilíbrio HSA-ligante podem se apresentar na ordem de 1 microssegundo). Grupos substituintes carregados e hidrofobicidade podem auxiliar os ligantes a se fixarem na proteína. Porém, a capacidade de alteração conformacional tem um limite e o próprio ligante tem que preencher requisitos

estéricos para ligações com alta afinidade (Kragh-Hansen, 1990; Kratochwil *et al.*, 2002). Como discutido anteriormente, proteínas podem conter uma fluorescência intrínseca (como o caso da albumina), porém alguns experimentos exigem que a emissão esteja mais deslocada em relação à emissão dos resíduos de aminoácidos fluorescentes e para isso é necessário à utilização de fluoróforos externos (ou extrínsecos) que podem se ligar em locais específicos na proteína (Loving, Sainlos e Imperiali, 2010).

Outra proteína que é largamente encontrada na literatura e utilizada nesse trabalho é a enzima lisozima, que tem seu nome derivado da sua função de lisar (ou dissolver) a parede celular de algumas famílias de bactérias (principalmente as bactérias gram positivas), uma vez que consegue catalisar (promover) a hidrólise da cadeia glicosídica dessas bactérias o que afeta a integridade estrutural da parede celular das mesmas; sendo assim, essa proteína é conhecida por sua função bactericida (Bhattacharjya e Balaram, 1997; Chipman e Sharon, 1969). Essa enzima é encontrada na clara de ovo, nas lágrimas e em outras secreções e é largamente distribuída na natureza. Estruturalmente, a lisozima contém uma cadeia polipeptídica muito menor do que a albumina, com 129 resíduos de aminoácido e peso molecular aproximadamente 14,5kD, formando uma proteína globular de tamanho aproximado de 26x45Å, sendo que 40% desses resíduos estão em uma formação do tipo α -hélice que formam uma fenda em um dos lados da molécula e é o sítio ativo (catalítico) dessa proteína (Figura 23) (Canfield, 1963).

Figura 23. Figura representativa das estruturas da enzima lisozima, com a localização aproximada de seu sítio de ligação. Obtida e adaptada do Protein data bank (ID:2cds).



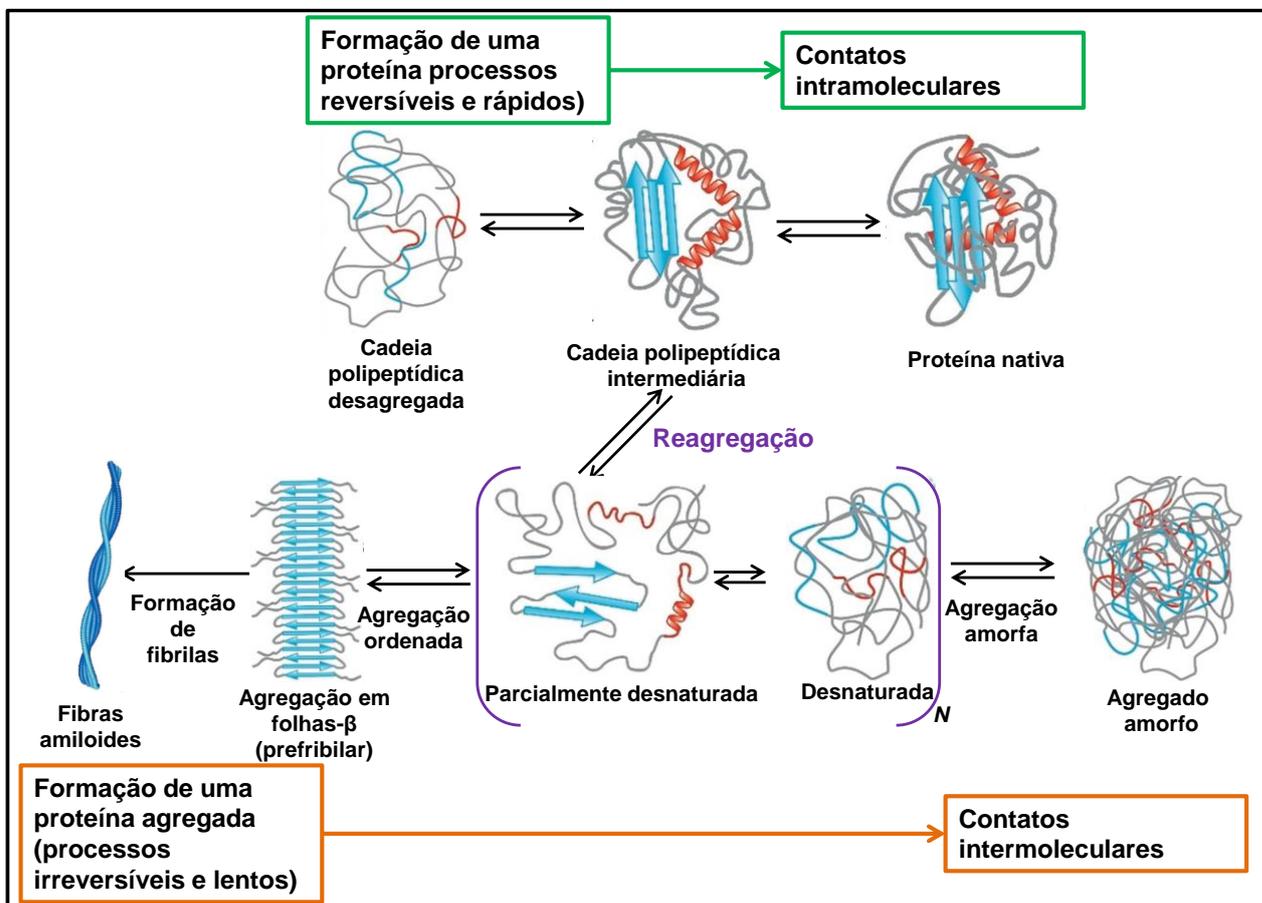
6.1.2. Agregados amiloides

Além das proteínas em sua forma natural (ou nativa), há também na biologia molecular diversos estudos sobre o mecanismo de degradação e agregação de proteínas. O processo de agregação correto da cadeia polipeptídica para a formação de proteína na sua forma nativa segue um caminho específico, porém se ocorrer algum problema com esse caminho pode haver a formação de agregados que vão desde cadeias polipeptídicas desnaturadas desorganizadas até estruturas agregadas altamente organizadas. A formação das proteínas nativas é um processo espontâneo guiado por interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações eletrostáticas, sendo que a primeira citada é a uma das forças envolvidas mais importantes. Assim, formações desestruturadas são consideradas falhas no processo de formação de proteínas e proteínas parcialmente desnaturadas apresentam tipicamente resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos e cadeias polipeptídicas desestruturadas voltadas para a parte aquosa, fazendo com que as ligações hidrofóbicas comecem a ter uma maior importância na estrutura final. Enquanto que para a correta agregação das

proteínas as ligações hidrofóbicas apresentam característica intramolecular e ajudam na estabilização e formação dos sítios proteicos, no caso das proteínas desnaturadas essas forças ajudam na agregação e organização das estruturas amorfas de forma intermolecular, levando a agregados que são definidos como estruturas supramoleculares montadas de cadeias polipeptídicas sem uma forma definida (Figura 24) (Adamcik e Mezzenga, 2018).

Agregados de proteínas desnaturadas nem sempre apresentam uma conformação desordenada, e de fato essas rotas que levam à formação dessas estruturas desnaturadas podem seguir por um caminho de agregados altamente organizados, e um exemplo clássico desse tipo de estrutura são as fibras amilóides (pois possuem uma forma que lembra fibras altamente organizadas) (Figura 24), sendo que depósitos dessas fibras são comumente encontrados em pacientes com doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington e podem estar diretamente relacionados a um enovelamento defeituoso das proteínas, o que leva a uma falha nos mecanismos de controle de qualidade das células e a deposição dessas proteínas defeituosas em tecidos do corpo (Adamcik e Mezzenga, 2018; Dobson, 2004; Godoi Contessoto *et al.*, 2018; Mahler *et al.*, 2009; Nilsson, 2004).

Figura 24. Representação esquemática simplificada do processo de formação de proteína nativa e do possível processo de re-agregação para a formação de agregados amorfos ou organizados (fibras amilóides) (Adaptado de: (Adamcik e Mezzenga, 2018)).



A formação de fibras amilóides é uma propriedade genérica das cadeias polipeptídicas, que ocorre quando a estrutura nativa de uma proteína é desestabilizada, favorecendo o desdobraimento parcial e culminando em uma conformação parcialmente desdobrada (Dobson, 2004). Podemos induzir a formação de fibras amilóides *in vitro* através de diversas técnicas, como variação de temperatura (por exemplo, congelando e descongelando, ou ainda aumentando a temperatura), estresse mecânico (agitação, por exemplo), bombeando, assim como alterando o ambiente da solução onde a proteína se encontra (mudando pH, força iônica, espécies do tampão, adição de excipientes,

etc), com a adição de ozônio e também a utilização de radiação UV. Devido a todos esses fatores discutidos até aqui, a análise e caracterização desses agregados é de fundamental importância para a biologia molecular e diversos métodos foram desenvolvidos nos últimos anos com intuito de quantificar, caracterizar e até mesmo estimar o tamanho desses agregados. Para a quantificação e/ou estimativa de tamanho existem técnicas desde as de microscopia e de separação (como o HPLC, eletroforese, centrifugação) até técnicas espectroscópicas (espalhamento de luz estático ou dinâmico, medidas de UV-Vis) e para a caracterização é utilizado dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência (intrínseca e extrínseca em relação a proteína), FT-IR, Raman e RMN (Mahler *et al.*, 2009; Nilsson, 2004).

6.2. Materiais e equipamentos

Para a realização dos estudos com a proteína albumina sérica bovina (BSA), albumina sérica humana (HSA) e lisozima (Lyz) foi utilizado solução tampão de fosfato 50mM em pH=7,0 com a utilização dos reagentes fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) e fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4). Para estudos de alteração estrutural de proteínas foram utilizados ácido hipocloroso (HOCl), ácido hipobromoso (HOBr), o detergente SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$), ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) e os seguintes sais metálicos: sulfato de ferro (III) $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, sulfato de manganês (MnSO_4), acetato de cobre ($\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$), acetato de zinco ($\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$), cloreto de cálcio (CaCl_2), cloreto de estanho (SnCl_2), cloreto de mercúrio (II) (HgCl_2) e acetato de chumbo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$). Para a determinação da concentração de albumina por meio da técnica de absorvância foi utilizado o corante púrpura de bromocresol (BCP - $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$).

Realizou-se espectroscopia de UV-Vis em um equipamento Perkin-Elmer, Lambda 35 (Massachusetts, EUA) em cubeta de quartzo de 10mm. Realizaram-se os testes de fluorescência em um espectrômetro de fluorescência da Perkin-Elmer, LS55 (Massachusetts, EUA) em cubeta de quartzo de 10mm e velocidade de escaneamento de 200nm/min. Realizaram-se os testes de espectroscopia de CD em espectropolarímetro Jasco J-815 (Tóquio, Japão) em cubeta de quartzo de 10mm com velocidade de escaneamento de 50nm/min. As medidas foram realizadas em comprimentos de onda de excitação e emissão dependente do tipo de amostra e serão especificados ao longo do trabalho. Para a realização das medidas de tempo de vida foi utilizado um equipamento Edinburgh Instruments, Mini- τ (Livingston, Escócia) em cubeta de quartzo de 10mm. Para os experimentos realizados em microplacas foi utilizado o equipamento Biotek, Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (Vermont, EUA).

6.3. Métodos e procedimentos

6.3.1. Procedimento para a determinação da constante de associação da ligação proteína-ligante

Foram realizadas medidas de emissão fluorescência com todas as aminoquinolinas ($5\mu\text{M}$) em tampão fosfato 50mM (pH=7,0), na ausência e presença de BSA ($5\mu\text{M}$) para que fosse possível observar qual dos compostos respondia melhor a adição da proteína. Após essa primeira análise foi escolhida como a sonda a ser estudada o composto AQ4. Para a determinação da constante de associação do sistema proteína-ligante foram realizados diferentes tipos de experimento:

1) *Observação do aumento de fluorescência com aumento da concentração de proteína.* Nesses experimentos as amostras foram excitadas em $\lambda=375\text{nm}$ e realizou-se a varredura de emissão em comprimentos de onda de 400 a 650nm. Para isso foi realizado uma titulação na cubeta de 3mL e caminho ótico de 10mm contendo uma solução de concentração fixa de AQ4 e aumentando-se a concentração de BSA a cada adição e intervalo de medida.

2) *Observação do aumento de fluorescência com aumento da concentração do ligante.* Nestes experimentos as amostras foram excitadas em $\lambda=375\text{nm}$ e realizou-se a varredura de emissão em comprimentos de onda de 400 a 650nm. Para isso foi realizado uma titulação na cubeta de 3mL e caminho ótico de 10mm contendo uma solução de concentração fixa de BSA e aumentando-se a concentração de AQ4 a cada adição e intervalo de medida.

3) *Experimento de quenching de fluorescência.* Nestes experimentos as amostras foram excitadas em $\lambda=295\text{nm}$ e realizou-se a varredura de emissão em comprimentos de onda de 310 a 450nm. Para isso foi realizado uma titulação na cubeta de 3mL e caminho ótico de 10mm contendo uma solução de concentração fixa de BSA e aumentando-se a concentração de AQ4 a cada adição e intervalo de medida.

O experimento (1) foi realizado utilizando-se tanto BSA sem ácidos graxos como BSA com ácidos graxos ligados aos seus sítios e a determinação da constante de associação foi realizada em ambos os casos para fins comparativos e para observar a influência dos ácidos graxos na interação ligante-proteína.

Para a correção dos valores de fluorescência devido à absorvância (atenuação do efeito de filtro interno que ocorre nos experimentos de *quenching*) para o experimento realizado em (3) utiliza-se a seguinte equação (Roy, 2004):

- Cálculo da fluorescência corrigida

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \cdot 10^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}}/2)} \quad (\text{Equação 18})$$

Onde:

F_{corr} = Fluorescência corrigida

F_{obs} = Fluorescência observada

A_{ex} = Absorvância encontrada pra o comprimento de onda de excitação de fluorescência

A_{em} = Absorvância encontrada pra o comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência

Para todos os experimentos, no espectrofluorímetro, o polarizador apresentava filtro de corte de 92% de fluorescência, a abertura dos slits em 10nm.

Para a determinação da constante de associação proteína-ligante foram utilizadas equações que correlacionam a intensidade de fluorescência do complexo nas diversas concentrações, que podem ser observadas abaixo (Hildebrand e Benesi, 1949; Lakowicz, 2006; Rawel, Meidtner e Kroll, 2005; Roy, 2004; Zsila, Hazai e Sawyer, 2005)

1.1) Para experimentos do aumento de fluorescência com aumento da concentração de proteína

- Benesi Hildebrand

$$\frac{F_{\infty} - F_0}{F - F_0} = 1 + \frac{1}{K_a} \cdot \frac{1}{[P]} \quad (\text{Equação 19})$$

Onde:

F_0 , F and F_{∞} são a intensidade de fluorescência do ligante na ausência de proteína, em uma concentração intermediária de proteína e na concentração de saturação máxima de proteína (proteína em uma concentração infinita), respectivamente, K_a é a constante de associação proteína-ligante.

- Rawel

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{max} \cdot [P]}{K_d + [P]} \quad (\text{Equação 20})$$

Onde:

ΔF é a diferença entre as emissões de fluorescência do complexo proteína-ligante em diferentes concentrações e a emissão do ligante livre, ΔF_{max} é a diferença da emissão do complexo proteína ligante na saturação máxima de concentração de proteína, $[P]$ é a concentração de proteína em cada medida, e K_d é a constante de dissociação proteína-ligante.

1.2) Para experimentos do aumento de fluorescência com aumento da concentração do ligante

- Van de Weert e Stella

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{[P] + [L] + K_d - \sqrt{([P] + [L] + K_d)^2 - 4 \cdot [P] \cdot [L]}}{2 \cdot [P]} \quad (\text{Equação 21})$$

Onde:

F é a fluorescência medida a cada adição de ligante, F₀ é a fluorescência inicial da proteína sem a adição de ligante, F_c é a fluorescência da proteína totalmente complexada com a adição máxima de ligante, K_d é a constante de dissociação do complexo proteína-ligante, [P] é a concentração fixa de proteína utilizada inicialmente, [L] é a concentração final de ligante a cada medida.

- Zsila

$$\Delta F = \frac{k}{2} \left[[P] + [L] + K_D - \sqrt{([P] + [L] + K_D)^2 - 4 \cdot [P] \cdot [L]} \right] \quad (\text{Equação 22})$$

Onde:

ΔF é a diferença entre as emissões de fluorescência do complexo proteína-ligante em diferentes concentrações e a emissão do ligante livre, k é uma constante relacionada a dados espectroscópicos (como atividade ótica de uma determinada proteína e o caminho ótico da cubeta utilizada para a medida), [P] é a concentração de proteína em cada medida, [L] é a concentração de ligante utilizada e K_d é a constante de dissociação proteína-ligante.

1.3) Para experimentos de quenching de fluorescência

- Stern-Volmer

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (\text{Equação 23})$$

Onde:

F_0 and F são a intensidade de fluorescência do BSA na ausência e presença de ligante, respectivamente, K_{SV} é a constante de Stern-Volmer $[Q]$ é a concentração do ligante (quencher).

- Roy

$$\frac{F}{F_0} = 1 - \phi \frac{[(K_d + [P] + [L]) - \sqrt{(K_d + [P] + [L])^2 - 4 \cdot [P] \cdot [L]}]}{2 \cdot [P]} \quad (\text{Equação 24})$$

Onde:

F é a fluorescência medida a cada adição de ligante, F_0 é a fluorescência inicial da proteína sem a adição de ligante, e, portanto F/F_0 é a razão de fluorescência observada a cada concentração, ϕ é a razão de fluorescência no máximo de concentração ($1 - F_{\text{razão(infinito)}}$) onde $F_{\text{razão(infinito)}}$ é a razão de fluorescência em uma concentração infinita de ligante, K_d é a constante de dissociação do complexo proteína-ligante, $[P]$ é a concentração fixa de proteína utilizada inicialmente, $[L]$ é a concentração final de ligante a cada medida.

- Van de Weert e Stella

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{[P] + [L] + K_d - \sqrt{([P] + [L] + K_d)^2 - 4 \cdot [P] \cdot [L]}}{2 \cdot [P]} \quad (\text{Equação 21})$$

Onde:

F é a fluorescência medida a cada adição de ligante, F_0 é a fluorescência inicial da proteína sem a adição de ligante, F_c é a fluorescência da proteína totalmente complexada com a adição máxima de ligante, K_d é a constante de dissociação do complexo proteína-ligante, $[P]$ é a concentração fixa de proteína utilizada inicialmente, $[L]$ é a concentração final de ligante a cada medida.

6.3.2. Procedimento geral para a determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação proteína-ligante

Para a determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação proteína-ligante utilizou-se o método de Van't Hoff onde primeiramente determina-se a constante de associação referente a ligação proteína-ligante em diferentes temperaturas (20°C e 40°C) através do experimento de quenching de fluorescência como descrito anteriormente na seção 6.3.1 (Item 3) Após a determinação das constantes de associação os parâmetros são determinados a partir das equações (Suryawanshi *et al.*, 2016):

- Entalpia

$$\Delta H = \frac{\ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right) \cdot R}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \quad (\text{Equação 25})$$

Onde:

ΔH = Entalpia padrão da interação proteína-ligante (em J/mol)

k_2 = constante de associação proteína-ligante na maior temperatura (em M^{-1})

k_1 = constante de associação proteína-ligante na menor temperatura (em M^{-1})

R = constante universal dos gases (em J/K.mol)

T_1 = temperatura mais baixa em que foram realizados os experimentos (em K)

T_2 = temperatura mais alta em que foram realizados os experimentos (em K)

- Energia livre de Gibbs

$$\Delta G = -R.T.\ln K \quad (\text{Equação 26})$$

Onde:

ΔG = energia livre de Gibbs padrão da interação proteína-ligante (em J/mol)

R = constante universal dos gases (em J/K.mol)

T = temperatura em que foram realizados os experimentos (em K)

k = constante de associação proteína-ligante na temperatura quando realizado o experimento (em M^{-1})

- Entropia

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (\text{Equação 27})$$

Onde:

ΔS = entropia padrão da interação proteína-ligante (em J/mol.K)

ΔH = entalpia padrão da interação proteína-ligante (em J/mol)

ΔG = energia livre de Gibbs da interação proteína-ligante (em J/mol)

T= temperatura em que foram realizados os experimentos (em K)

6.3.3. Procedimento geral para a determinação do sítio de ligação onde ocorre a interação proteína-ligante utilizando fluorescência

A determinação do sítio de ligação onde a sonda sintetizada está localizado na proteína foi realizada utilizando as como concorrente de sítio as moléculas varfarina (para o sítio I) e ibuprofeno (para o sítio II). O experimento foi realizado em tampão fosfato 50mM (pH=7,0) e comprimentos de onda de excitação em 375nm e de emissão na varredura de 400 a 650nm. Uma cubeta de quartzo de 3mL e caminho ótico de 10mm foi utilizada como recipiente para a titulação que foi realizada adicionando-se as sondas concorrentes de sítio (varfarina ou ibuprofeno) a uma concentração fixa de BSA+AQ4 e observando o efeito do aumento da concentração da sonda específica de um sítio da proteína na fluorescência do ligante. Além desse experimento, foi monitorada a fluorescência da varfarina ($\lambda_{exc}=310\text{nm}$, $\lambda_{em}=330-450\text{nm}$), onde se manteve a

quantidade de BSA+Varfarina fixo e adicionando-se alíquotas de AQ4 e se observou qual efeito dessa adição na fluorescência da varfarina.

Para todos os experimentos, no espectrofluorímetro, o polarizador apresentava filtro de corte de 92% de fluorescência, a abertura dos slits em 10nm.

6.3.4. Procedimento geral para a determinação do sítio de ligação onde ocorre a interação proteína-ligante utilizando CD

Outra forma de se determinar os sítios de ligação onde o AQ4 se liga ao BSA é utilizando a técnica de UV-CD. O experimento foi realizado no mesmo meio reacional (tampão) e se assemelha ao descrito na seção 6.3.3 (acima) onde se compara os espectros de CD do BSA sozinho, do complexo BSA-ligante e variando-se a concentração da sonda específica de cada sítio (varfarina ou ibuprofeno).

O experimento foi realizado por varredura na faixa de 250-450nm em cubeta de quartzo de 3mL e 10mm de caminho ótico a temperatura e atmosfera ambiente. A medida do tampão foi utilizada como referência de linha base para todas as medidas.

6.3.5. Procedimento geral para a determinação da quantidade de sítios em que o ligante interage com a proteína através do método Job's plot

O procedimento foi realizado utilizando-se medidas de fluorescência como técnica a fim de encontrar qual é a proporção de proteína em relação à sonda fluorescente no equilíbrio durante a associação. Em tampão fosfato 50mM

(pH=7,0), foram preparadas 10 soluções onde a concentração final BSA+Ligante fosse igual a $11\mu\text{M}$, seguindo-se as seguintes proporções ([BSA]:[AQ4], em μM): 10:1, 9:2, 8:3, 7:4, 6:5, 5:6, 4:7, 3:8, 2:9, 1:10. As medidas foram realizadas no $\lambda_{\text{exc}}=375\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=480\text{nm}$ (máximo de fluorescência, determinado em experimentos anteriores). O polarizador no espectrofluorímetro apresentava filtro de corte de 92% de fluorescência, e foi utilizada a abertura dos slits em 10nm.

Com os valores de emissão de fluorescência foi construído um gráfico de fração molar do ligante vs fluorescência no comprimento de onda máximo de emissão do complexo para a obtenção dos pontos e descobrir a questão discutida no tópico.

6.3.6. Procedimento geral para a determinação da influência de metais na interação proteína-ligante

Os experimentos foram realizados utilizando-se concentrações de BSA $5\mu\text{M}$, AQ4 $15\mu\text{M}$ e íon metálico em uma concentração de $50\mu\text{M}$, em tampão fosfato 50mM (pH=7,0). As medidas foram realizadas com $\lambda_{\text{exc}}=375\text{nm}$ e varredura em $\lambda_{\text{em}}=400-650$, polarizador no espectrofluorímetro apresentava filtro de corte de 92% de fluorescência, e foi utilizada a abertura dos slits em 10nm, cubeta de quartzo de 3mL e caminho ótico de 10mm. Para a realização dos experimentos foram utilizados sais dos seguintes íons: Ca^{2+} , Fe^{3+} , Sn^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} .

6.3.7. Procedimento geral para estudos da sonda fluorescente para determinação da desnaturação de proteínas

Para o estudo da desnaturação foram realizados experimentos para formação de agregados amiloides de BSA através do aquecimento até 70°C durante 3 horas. E a desnaturação de proteínas foi realizada através do método químico com ureia, ambos em tampão fosfato 50mM (pH=7,0). Para o estudo da alteração estrutural da lisozima foi utilizado SDS para a formação de fibras amiloides em tampão glicina 50mM (pH=9,0).

Os experimentos de fluorescência foram realizados monitorando a fluorescência do AQ4 em $\lambda_{exc}=375\text{nm}$ e $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$, mantendo-se a concentração do ligante fixa e aumentando a concentração de proteína até a saturação da intensidade de fluorescência. Além disso, para a confirmação da formação dos agregados amiloides foram realizados experimentos de espalhamento Rayleigh ($\lambda_{exc}=340\text{nm}$, $\lambda_{em}=300-400\text{nm}$), com a sonda tioflavina (Th-T) ($\lambda_{exc}=435\text{nm}$, $\lambda_{em}=460-545\text{nm}$) e com a sonda ANS ($\lambda_{exc}=340\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-600\text{nm}$).

Para os experimentos realizados com AQ4 (tanto para a BSA como para a lisozima) o polarizador no espectrofluorímetro apresentava filtro de corte de 92% de fluorescência, e foi utilizada a abertura dos slits em 10nm. Para os experimentos com Th-T (BSA e Lisozima) não foi utilizado nenhum tipo de filtro para a leitura da emissão e abertura dos slits em 10nm e para os experimentos do espalhamento de luz do tipo Rayleigh para o BSA foi utilizado filtro de corte no polarizador de 92% e abertura dos slits em 5nm (para esse tipo de experimento para a lisozima foi utilizado um filtro de corte no monocromador de

99% e slits em 5nm). Em todos os experimentos foi utilizada cubeta de quartzo de 3mL e caminho ótico de 10mm.

6.3.8. Procedimento geral para estudos da sonda fluorescente para observação da oxidação de proteína

Para os estudos de oxidação de BSA foram utilizados dois agentes oxidantes (HOCl e HOBr) em uma concentração final para reação de 100 μ M para 5 μ m de proteína e essa solução foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse tempo foi adicionado metionina (200 μ M) e a solução deixada por 5 minutos em repouso antes das medidas.

Os experimentos de fluorescência foram realizados monitorando a fluorescência do AQ4 em $\lambda_{exc}=400\text{nm}$ e $\lambda_{em}=420-650\text{nm}$, mantendo-se a concentração do ligante fixa e aumentando a concentração de proteína até a saturação da intensidade de fluorescência. Além disso, para a confirmação da oxidação do triptofano foram realizados experimentos de fluorescência desse resíduo de aminoácido utilizando os seguintes comprimentos de onda $\lambda_{exc}=295\text{nm}$ e $\lambda_{em}=310-450\text{nm}$.

6.3.9. Procedimento geral para a determinação do limite de detecção de proteína por AQ4 e por BCP

Para a determinação do limite de detecção das proteínas BSA e HSA por AQ4 foi realizada medidas de fluorescência utilizando AQ4 em uma concentração fixa e as proteínas em uma concentração variável a fim de se determinar uma faixa linear de detecção das proteínas em relação à sua

concentração, em tampão fosfato 50mM pH=7,0. O equipamento utilizado foi de microplaca com 96 poços e 200 μ L de volume final para cada solução analisada, utilizando os comprimentos de onda em $\lambda_{exc}=375\text{nm}$ e $\lambda_{em}=480\text{nm}$.

Para fins comparativos foi determinado o limite de detecção das proteínas anteriormente citadas por medidas de absorbância da sonda já utilizada na literatura para determinar concentrações de BSA, o BCP. Nesses experimentos, a sonda foi utilizada em concentração fixa e as proteínas em concentração variável a fim de se determinar linearidade e detecção do método utilizando BCP em tampão acetato 75mM pH=5,2 (Assink *et al.*, 1984). O equipamento utilizado foi de microplaca com 96 poços e 200 μ L de volume final para cada solução analisada, utilizando $\lambda=610\text{nm}$.

O limite de detecção do equipamento foi dado pela concentração do analito que produz de 3 a 5 vezes a razão sinal ruído do equipamento e o limite de detecção do método foi realizado utilizando-se dos valores de regressão linear dos dados obtidos na curva de calibração (Shrivastava e Gupta, 2011).

6.3.10. Procedimento geral para a determinação da quantidade de albumina no plasma humano

A determinação de albumina no plasma foi realizada utilizando-se os métodos de determinação da albumina em solução, sabendo-se o limite de detecção e curva de calibração na concentração fixa de AQ4 ou BCP e nas condições anteriormente estudadas, conforme descrito na seção 6.3.9. O equipamento utilizado foi de microplaca com 96 poços e 200 μ L de volume final

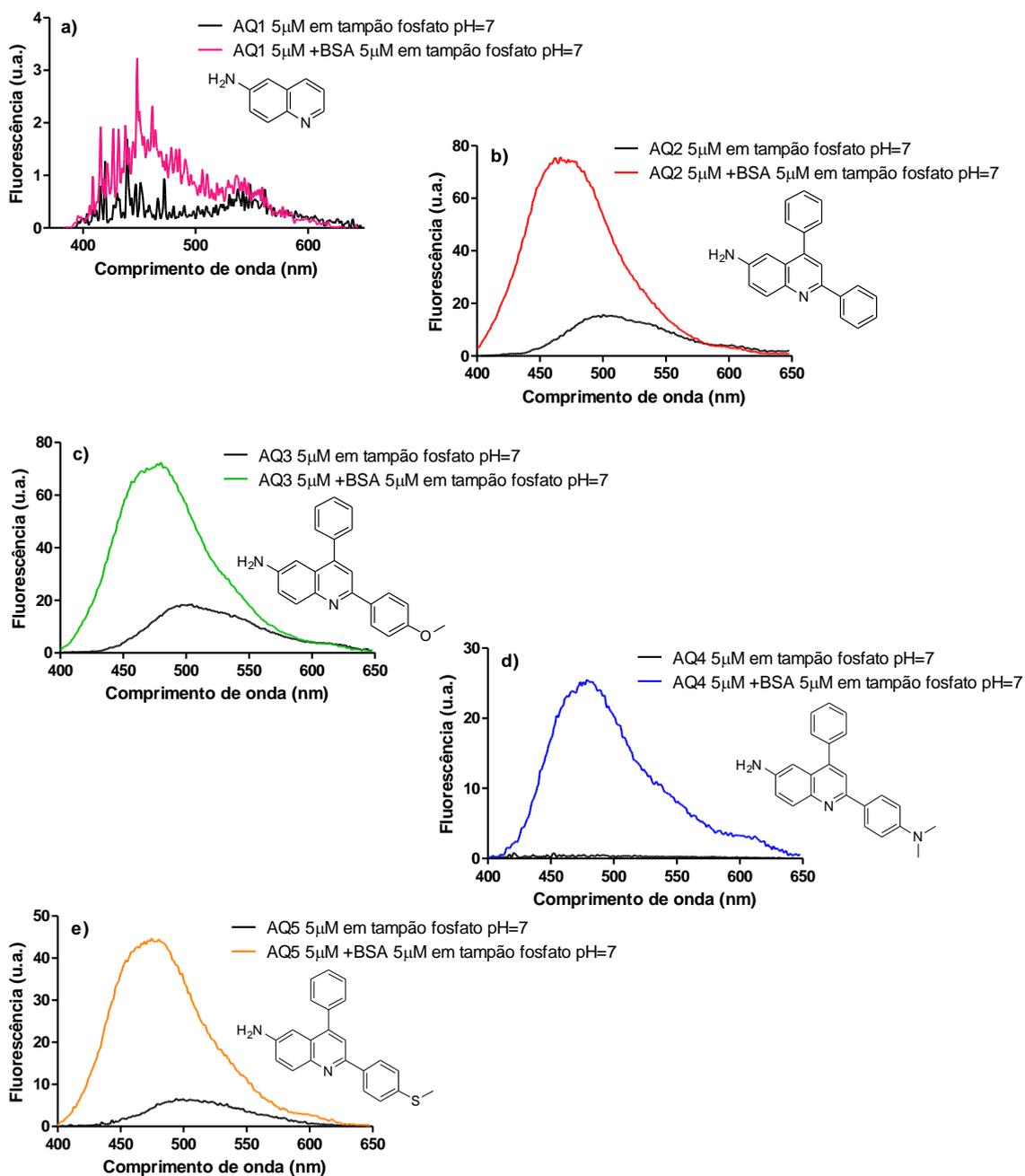
para cada solução analisada. Para cada análise foi utilizada uma alíquota de 10 μ L de plasma de uma pessoa saudável.

6.4. Resultados e discussão para os estudos com proteínas

6.4.1. Estudos sobre interação entre BSA e aminoquinolinas

Primeiramente foi realizado um teste preliminar para identificar qual seria a aminoquinolina mais adequada para os estudos das interações proteína-ligante. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato pH=7,0, onde foi avaliado a fluorescência do composto livre (aminoquinolinas) à uma concentração de 5 μ M e quando adicionada à solução uma concentração equivalente de proteína (5 μ M), e os resultados podem ser vistos na Figura 25.

Figura 25. Fluorescência das aminoquinolinas em tampão fosfato na ausência e presença de BSA. a) $\lambda_{exc}=350\text{nm}$, $\lambda_{em}=370\text{-}450\text{nm}$, de b a f) $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400\text{-}650\text{nm}$. Todos os experimentos foram realizados com a abertura de slits em 5mm, filtro de polarizador de 92% de corte.



A partir dos gráficos foi possível a montagem de uma tabela (Tabela 16) comparando-se os valores de fluorescência máxima bem como a diferença entre esses valores para a confirmação de qual seria a melhor composto para dar continuidade aos estudos.

Tabela 16. Tabela comparativa de valores de comprimento de onda máximo antes e depois da adição de BSA ao meio (relativo ao experimento observado na Figura 25) e seus relativos valores de fluorescência, bem como comparativo entre esses dois valores mostrando a variação positiva no valor de fluorescência após a adição de BSA para cada composto

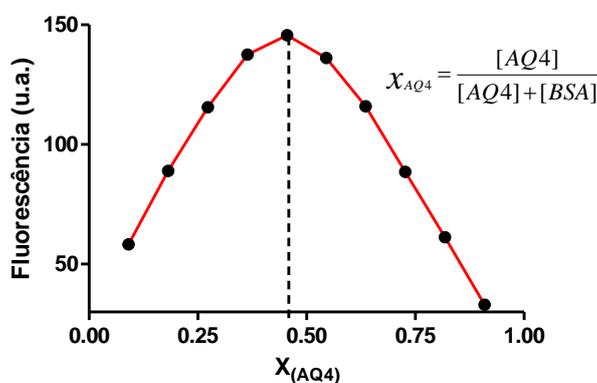
Composto	λ_{\max} em H₂O (nm)	λ_{\max} em BSA (nm)	Fluorescência em λ_{\max} (H₂O)	Fluorescência em λ_{\max} (BSA)	Aumento da fluorescência após a adição de BSA
AQ1	439	448	1,7	3,2	1,8
AQ2	497	462	15	75	5
AQ3	502	480	18	72	4
AQ4	516	479	0,9	25	28
AQ5	500	475	6,5	45	7

Ao fazer uma análise dos dados obtidos na Figura 25 e Tabela 16, pode-se observar que o composto comercial AQ1 não apresentou fluorescência significativa na ausência ou presença de BSA, isso mostra que o anel quinolínico polissubstituído nas posições 2 e 4 trazem um ganho para que haja uma melhor interação entre BSA. Os compostos AQ2, AQ3 e AQ5 apresentaram aumentos de intensidade de fluorescência máxima cerca de 5, 4 e 7 vezes respectivamente e um deslocamento hipsocrômico quando ligados à proteína em relação à

molécula livre em água, o que era esperado, uma vez que os sítios das proteínas contêm aminoácidos hidrofóbicos, ou seja, mais apolares do que o meio aquoso, e esses compostos apresentam maiores valores de rendimento quântico de fluorescência quando em meios mais apolares (como anteriormente visto e discutido no item 5.3.2). O composto AQ4 apresentou um aumento de cerca de 28 vezes de intensidade de fluorescência máxima dentro da proteína em relação ao seu estado livre em água, além disso apresentava grande potencial como sonda de meio nos estudos de solvatocromismo que já haviam sido realizados e por esse motivo foi o selecionado para os demais estudos com proteína para esse estudo.

Após a escolha da molécula a ser estudada (AQ4), foram realizados ensaios para determinar a relação estequiométrica da associação BSA-AQ4 através do experimento do Job's plot (gráfico de Job) (Renny *et al.*, 2013), seguindo o experimento descrito no Item 6.3.5, e o gráfico obtido ser observado na Figura 26.

Figura 26. Gráfico de Job para a associação AQ4-BSA utilizando o máximo de emissão de fluorescência como referência



É possível observar através do gráfico que a fração molar em que o AQ4 apresenta a maior intensidade de fluorescência ocorreu no valor próximo a 0,5, indicando assim que a associação proteína-ligante ocorre na proporção de 1:1 (AQ4:BSA) e assim pode-se utilizar as Equações de 19 a 24 (descritas no Item 6.3.1) para o cálculo da constante de associação BSA-AQ4 (Hildebrand e Benesi, 1949).

Para a continuidade dos estudos, foram realizados experimentos para descobrir qual seria a concentração máxima de saturação do AQ4 em relação a uma concentração fixa de BSA ($5\mu\text{M}$), e depois qual seria a concentração máxima de saturação do BSA em relação a uma concentração fixa de AQ4 ($5\mu\text{M}$). Os resultados desses experimentos podem ser vistos nas Figura 27 e Figura 28.

Figura 27. a) Gráfico representativo do espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração do AQ4 (0 a $11\mu\text{M}$) e BSA fixa ($5\mu\text{M}$) em tampão fosfato 50mM . $\lambda_{\text{exc}}=375\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=400\text{-}650\text{nm}$, b) Gráfico representativo do aumento da fluorescência com a adição de AQ4 em $\lambda=480\text{nm}$.

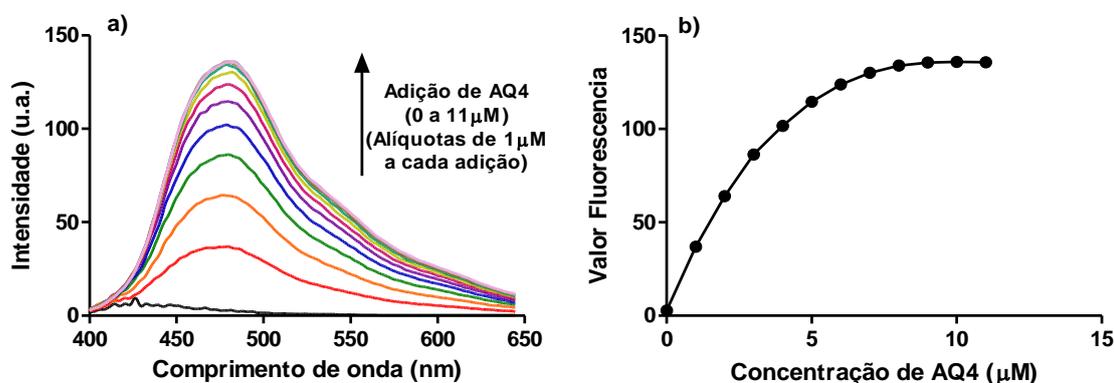
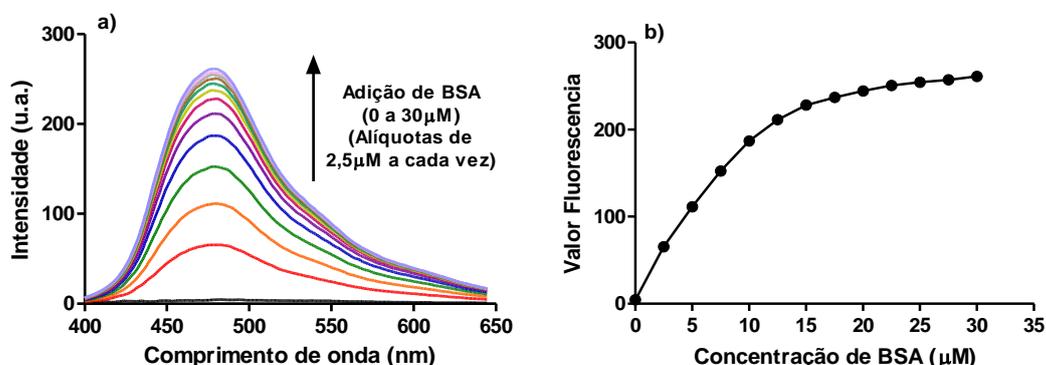


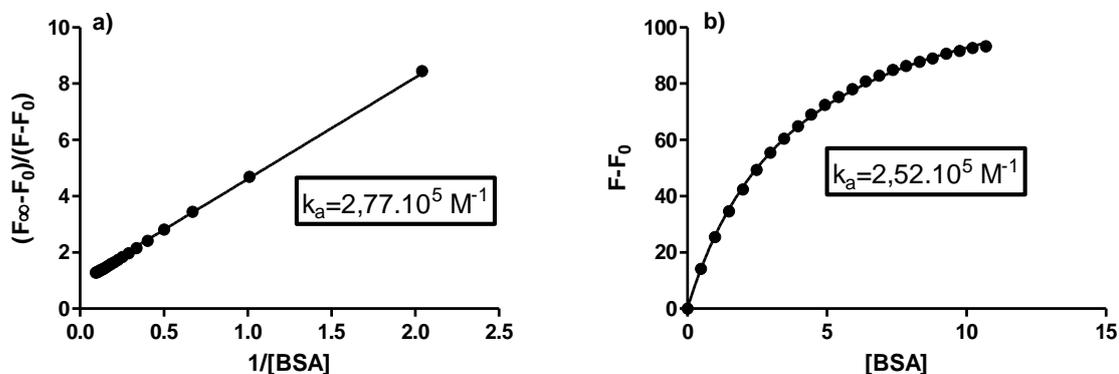
Figura 28. a) Gráfico representativo do espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração do BSA (0-30 μ M) e AQ4 fixa (5 μ M) em tampão fosfato 50mM. λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm, b) Gráfico representativo do aumento da fluorescência com a adição de BSA em λ =480nm.



Como pode ser visto, a intensidade de fluorescência do AQ4 aumenta cerca de 30 vezes quando no máximo de concentração em proteína (30 μ M, ou seja, uma concentração 6 vezes maior do que a concentração fixa do ligante), porém em uma concentração de 20 μ M da proteína (4 vezes maior do que a concentração fixa do ligante), observa-se o início da saturação da intensidade de fluorescência e uma mesma quantidade adicionada de proteína que no início acarretava um aumento de fluorescência de cerca de 10 vezes, quando se inicia uma saturação não acarreta significativas mudanças de valor de fluorescência. Quando se aumenta a quantidade de ligante em relação a uma concentração fixa de proteína, observa-se um aumento cerca de 15 vezes na saturação da intensidade de fluorescência em uma concentração de AQ4 2,5 vezes maior do que a quantidade de proteína fixa e o início da saturação se dá com uma quantidade de AQ4 1,5 vezes maior do que a quantidade de proteína fixa. Para ambos os casos pode-se observar que o máximo de fluorescência para o AQ4 complexado a BSA se dá em λ =480nm.

Através da utilização dos dados dos gráficos obtidos acima, pode-se obter os valores da intensidade de fluorescência em $\lambda=480\text{nm}$ e assim poder utilizar As Equações 19 e 20 para a determinação do valor da constante de associação do complexo BSA-AQ4 através da construção de gráficos que representem as equações. Para a equação de Benesi primeiramente foi necessário a determinação do valor de F^∞ , que foi realizado através da construção do gráfico de $1/[\text{BSA}]$ vs $1/F$ e quando se faz a regressão linear dos pontos, o coeficiente linear da reta nos dá o valor de $1/F^\infty$ e a partir disso é possível encontrar o valor de F^∞ para se fazer o gráfico $1/[\text{BSA}]$ vs $\frac{F^\infty - F_0}{F - F_0}$ que a partir da regressão linear forçando o coeficiente linear a ser igual a 1, nos dá o valor de K_a que é o valor do coeficiente angular da reta. Para a equação de Rawel o valor de K_a é determinado pelo gráfico de $[\text{BSA}]$ vs $F - F_0$ (ΔF) que nos dá um gráfico e a partir do valor de constante da regressão não linear através da equação descrita. Os gráficos com os respectivos valores de k_a encontrado para as diferentes equações pode ser observado na Figura 29.

Figura 29. Determinação da constante de associação por diferentes métodos de cálculo e seus respectivos gráficos para a obtenção do valor; a) Equação de Benesi, b) Equação de Rawel. Os dados de fluorescência para os cálculos foram utilizando $\lambda_{exc}=375nm$, $\lambda_{em}=480nm$ e concentração fixa de AQ4 de $2,5\mu M$.

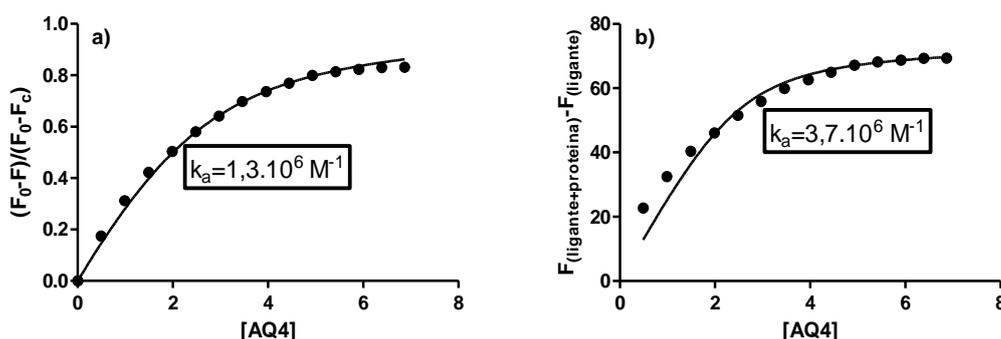


Para ambos os casos os valores da constante de associação para o complexo BSA-AQ4 deram valores muito semelhantes e bons coeficientes de correlação do gráfico com a equação que estão sendo comparadas ($R=0,99$ para ambos os casos). Esses valores se assemelham a constante de associação de fármacos como a varfarina ($3,4 \cdot 10^5 M^{-1}$) e a azapropazona ($2,8 \cdot 10^5 M^{-1}$), que são reconhecidamente bons ligantes para a albumina (Yamasaki *et al.*, 2013).

Novamente, foram utilizados os valores da intensidade de fluorescência em $\lambda=480nm$ e assim poder utilizar as Equações 21 e 22 para a determinação do valor da constante de associação do complexo BSA-AQ4 através da construção de gráficos que representam as equações. Para a equação de van der Weert e Stella, primeiramente foi necessário a determinação do valor de F_c , que foi realizado através da construção do gráfico de $1/[AQ4]$ vs $1/F$ e quando se faz a regressão linear dos pontos, o coeficiente linear da reta nos dá o valor de $1/F_c$ e a partir disso é possível encontrar o valor de F_c para se fazer o gráfico

$1/[AQ4]$ vs $\frac{F_0-F}{F_0-F_c}$ que a partir da regressão não linear através da interpretação da equação descrita é possível determinar o valor de K_a . Para a equação de Zsila é construído um gráfico de $[AQ4]$ vs $F-F_0$ (ΔF) e a determinação de K_a é dado pela regressão não linear da equação descrita. Os gráficos representativos para a determinação dos valores de k_a para os respectivos métodos pode ser observado na Figura 30.

Figura 30. Determinação da constante de associação por diferentes métodos de cálculo e seus respectivos gráficos para a obtenção do valor; a) Equação de van de Weert e Stella, b) Equação de Zsila. Os dados de fluorescência para os cálculos foram utilizando $\lambda_{exc}=375nm$, $\lambda_{em}=480nm$ e concentração fixa de BSA de $2,5\mu M$.

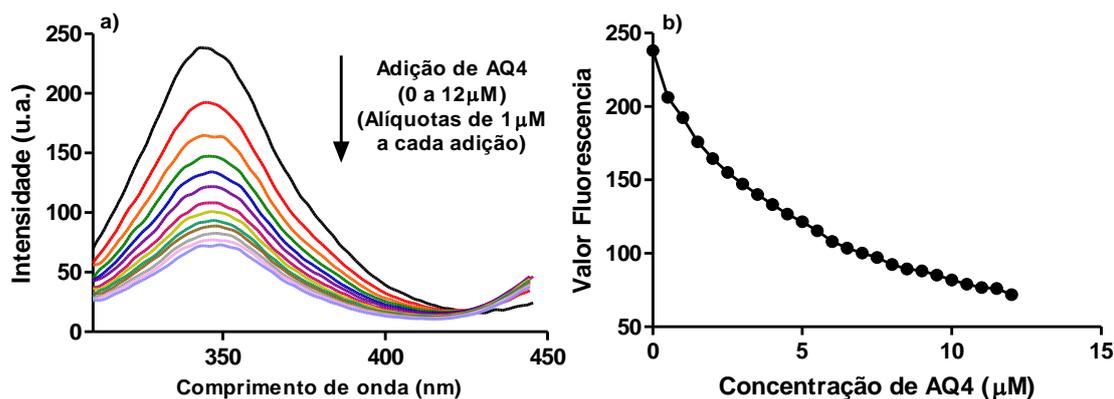


Para ambos os casos os valores da constante de associação para o complexo BSA-AQ4 deram valores muito semelhantes e bons coeficientes de correlação do gráfico com a equação que estão sendo comparadas ($R=0,99$ e $0,93$, para a o gráfico a e b, respectivamente). Como pode ser observado, os valores para esse método apresentaram-se um pouco mais elevados do que para os métodos anteriores, e os coeficientes de correlação se apresentavam um pouco inferiores em relação aos anteriores e portanto, para uma melhor

elucidação dessa questão também foi realizado o experimento de supressão (quenching) de fluorescência onde é possível também calcular o valor da constante de ligação de complexos.

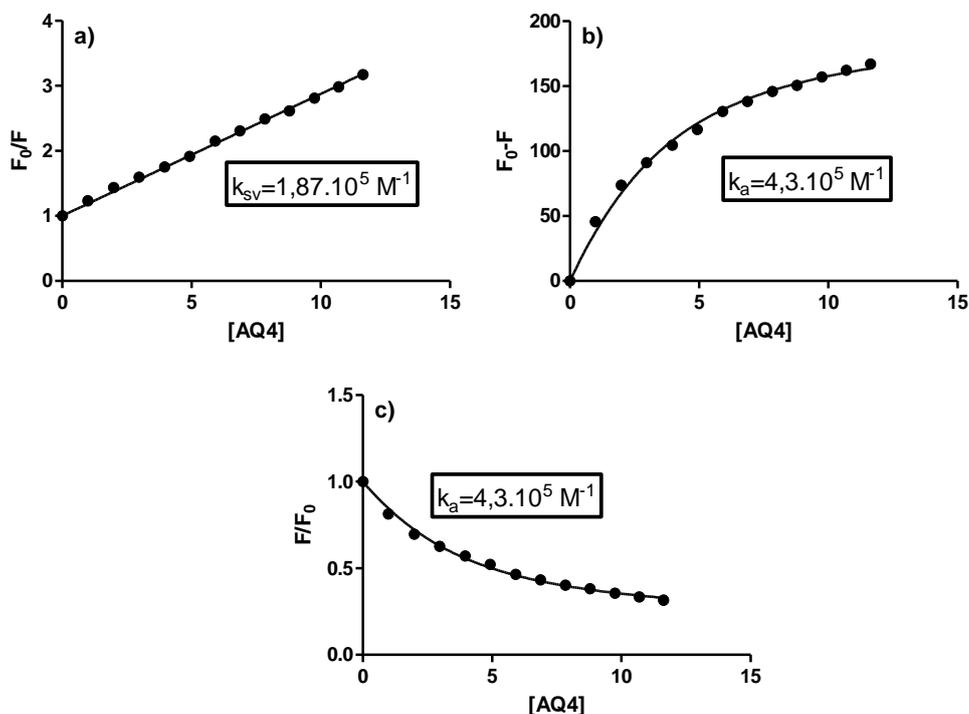
No método da supressão da fluorescência é observado o valor máximo de fluorescência da proteína ao ir se adicionando um ligante não fluorescente ou que apresente banda de emissão em um comprimento de onda de excitação e emissão bem diferente da proteína (como o caso do AQ4). Nesse tipo de experimento, diferentemente do que ocorria anteriormente, observa-se uma diminuição da fluorescência da proteína conforme é adicionado o ligante, conforme pode ser observado na Figura 31.

Figura 31. a) Gráfico representativo do espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração do AQ4 (0-12 μ M) e BSA fixa (2,5 μ M) em tampão fosfato 50mM. λ_{exc} =295nm, λ_{em} =310-450nm, b) Gráfico representativo do decaimento da fluorescência com a adição de AQ4 em λ =345nm.



Para esses experimentos, foram utilizados os valores da intensidade de fluorescência em $\lambda=345\text{nm}$ (corrigida pela Equação 18) e assim poder utilizar as Equações 19, 21 e 22 e determinar do valor da constante de associação do complexo BSA-AQ4 através da construção de gráficos que representem as equações. Para a equação de Stern-Volmer, o valor da constante foi determinado através da construção do gráfico de $[\text{AQ4}]$ vs F_0/F e quando se faz a regressão linear dos pontos, e sabendo-se que o valor do coeficiente linear da reta nos dá o valor de K_{SV} . Para a equação de van de Weert e Stella foi construído um gráfico de $[\text{AQ4}]$ vs F_0-F e a partir da regressão não linear através da interpretação da equação descrita é possível determinar o valor de K_a e F_c . Para a equação de Roy é construído um gráfico de $[\text{AQ4}]$ vs F/F_0 e a determinação de K_a é dado pela regressão não linear da equação descrita. Os gráficos representativos para a determinação dos valores de constante de associação proteína-ligante para os respectivos métodos podem ser observados na Figura 32.

Figura 32. Determinação da constante de associação por diferentes métodos de cálculo e seus respectivos gráficos para a obtenção do valor; a) Equação de Stern-Volmer, b) Equação de van der Weert e Stella, c) Equação de Roy. Os dados de fluorescência para os cálculos foram utilizando $\lambda_{exc}=295nm$, $\lambda_{em}=345nm$ e concentração fixa de BSA de $2,5\mu M$.

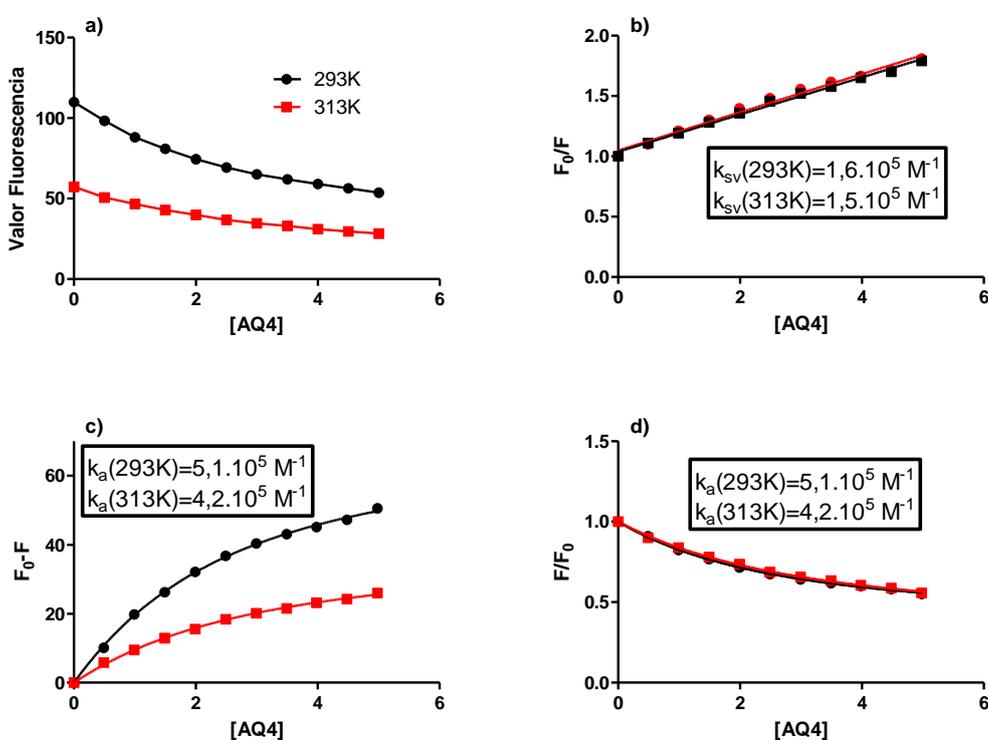


Para ambos os casos os valores da constante de associação para o complexo BSA-AQ4 deram valores muito semelhantes e bons coeficientes de correlação do gráfico com a equação que estão sendo comparadas ($R=0,99$ todos os gráficos representados). Como pode ser observado, os valores obtidos pelo método de supressão de fluorescência se apresentaram semelhante ao método dos experimentos realizados com a adição de proteína e sendo assim confirmando que a associação AQ4-BSA possui uma alta afinidade e se assemelham a fármacos já descritos na literatura como bons ligantes de BSA.

6.4.2. Estudos para determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação proteína-ligante

As interações que ocorrem entre um ligante e uma proteína podem ser de diferentes tipos e podem ser caracterizadas pela magnitude e sinais dos parâmetros termodinâmicos. As forças de interação AQ4-BSA foram estudadas com base nos cálculos dos parâmetros termodinâmicos ΔG° , ΔH° , ΔS° e o experimento realizado bem como as equações utilizadas para a determinação dos valores como descrito no Item 6.3.2. Os gráficos obtidos em diferentes temperaturas e os valores de K_a para cada um dos casos pode ser observado na Figura 33.

Figura 33. Curvas representativas para diferentes temperaturas dos experimentos (curva preta para experimentos a 293K (20°C) e curva vermelha para experimentos a 313K (40°C)). a) Decaimento de fluorescência medida no máximo de emissão do complexo BSA-AQ4, b) Gráfico da equação de Stern-Volmer e determinação da respectiva constante, c) Gráfico para a equação de Stella e determinação da constante de associação do complexo, d) Gráfico para a equação de Roy e determinação da constante de associação do complexo. Os dados de fluorescência para os cálculos foram utilizando $\lambda_{exc}=295nm$, $\lambda_{em(max)}=345nm$ e concentração fixa de BSA de $1,0\mu M$. Como é realizada a determinação das constantes através dos experimentos de quenching encontra-se no tópico anterior.



Como pode ser observado há uma diminuição nos valores de fluorescência máxima e dos valores das constantes o que indica que a interação AQ4-BSA é estática (com formação de complexo) e o aumento da temperatura leva à desestabilização desse complexo e isso se reflete em um menor valor de constante de associação (Lakowicz, 2006). Os valores da constante de Stern-Volmer ao se modificar a temperatura do experimento varia muito pouco,

mostrando que a interação que ocorre pode ser melhor representada pelas outras equações utilizadas no trabalho. Assim sendo, a partir dos diferentes valores de constante de associação a utilização das Equações 25, 26 e 27 foi possível o cálculo dos parâmetros termodinâmicos referentes a interação AQ4-BSA, e os valores obtidos foram sintetizados na Tabela 17.

Tabela 17. Parâmetros termodinâmicos encontrados para a interação AQ4-BSA

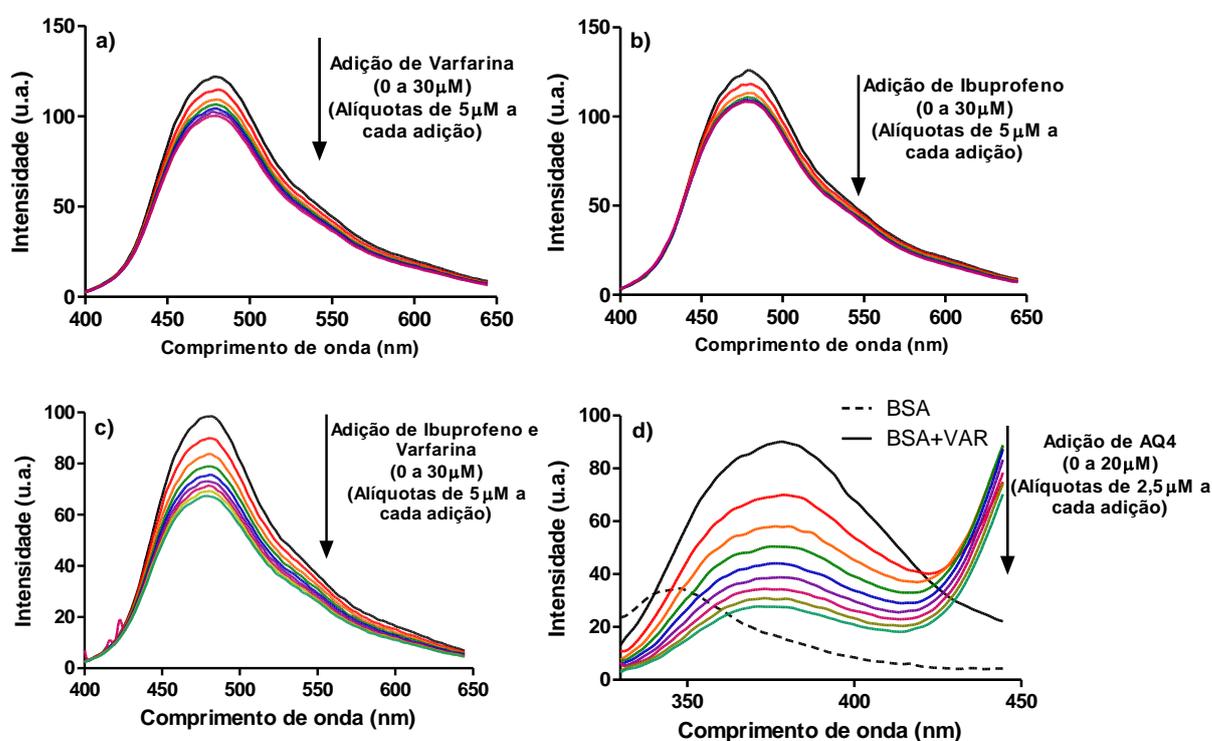
T(K)	ΔH (kJ.mol⁻¹)	ΔS (J.mol⁻¹.K⁻¹)	ΔG (KJ.mol⁻¹)
293	-7,73	82,9	-32,02
313		82,9	-33,66

Os valores de ΔG° negativos mostram que o processo de interação é espontâneo, e com uma alta afinidade representada por um valor alto e negativo de ΔH° , e ocorre com a formação de complexo devido a um valor alto e positivo de ΔS° . Além disso, o valor de ΔH° demonstra que a reação é exotérmica e que há ligações de hidrogênio entre a proteína e o ligante e valores positivos de ΔS° demonstram que ocorre interações hidrofóbicas, pois devido a entrada do ligante na proteína ocorre uma desorganização das moléculas de água dentro dos sítios da BSA. Portanto, tanto interações hidrofóbicas como ligações de hidrogênio e forças de Van de Waals são as responsáveis pela interação ligante-proteína e o valor negativo de ΔG advém das contribuições de ΔH e ΔS (Suryawanshi *et al.*, 2016).

6.4.3. Determinação do sítio de ligação onde ocorre a interação proteína-ligante

Para a determinação do sítio de ligação onde ocorreria a interação BSA-AQ4 foram utilizados tanto a técnica de fluorescência estacionária como a técnica de dicroísmo circular induzido. Como descrito anteriormente o experimento consiste em deslocar o ligante (AQ4) através de compostos que são reconhecidamente ligantes de sítios específicos da BSA, como a Varfarina (Sítio I) e o Ibuprofeno (Sítio II) e observando se há alguma diferença no sinal, o que indicaria que o ligante foi expulso de um determinado sítio e estaria livre em água, que acaba levando à diminuição do sinal. Os experimentos foram realizados utilizando uma concentração BSA:AQ4 (1:1) e adicionando uma quantidade do fármaco de sítio específico a cada medida (titulação) e observando o efeito na medida, além da observação do efeito da adição de AQ4 na fluorescência da varfarina. Gráficos representativos das medidas de fluorescência estacionária pode ser observada na Figura 34.

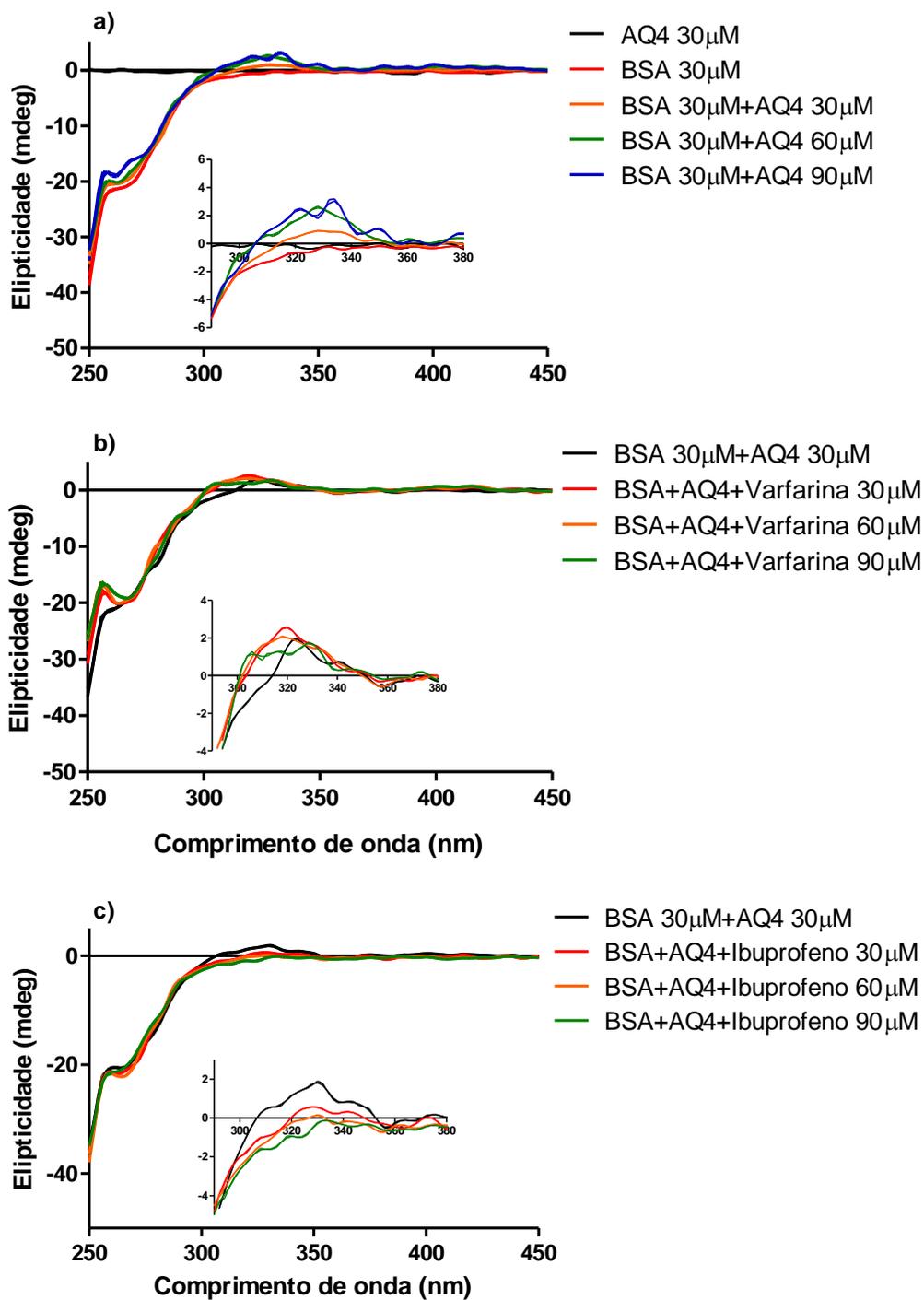
Figura 34. Gráficos representativos dos experimentos realizados para a determinação do sítio de ligação do AQ4 em BSA, a) Efeito do aumento da concentração de varfarina (sonda de sítio I – de 0 a 30 μ M) sobre a fluorescência do AQ4 em uma concentração fixa (5 μ M) dentro da BSA (5 μ M) (λ_{exc} =375, λ_{em} =400-650nm), b) Efeito do aumento da concentração de ibuprofeno (sonda de sítio II – de 0 a 30 μ M) sobre a fluorescência do AQ4 em uma concentração fixa (5 μ M) dentro da BSA (5 μ M) (λ_{exc} =375, λ_{em} =400-650nm), c) Efeito da varfarina+ibuprofeno (sondas de sítio I e II – de 0 a 40 μ M) concomitantemente, sobre a fluorescência do AQ4 em uma concentração fixa (5 μ M) dentro da BSA (5 μ M) (λ_{exc} =375, λ_{em} =400-650nm), d) Efeito do AQ4 (de 0 a 20 μ M) sobre a fluorescência da varfarina em uma concentração fixa (5 μ M) dentro da BSA (5 μ M) (λ_{exc} =310, λ_{em} =330-450nm).



Os experimentos realizados mostraram que há uma diminuição da fluorescência do AQ4 na presença tanto de varfarina quanto de ibuprofeno de forma semelhante em uma mesma concentração e quando adicionadas juntas essas sondas apresentam uma saturação da fluorescência do AQ4 em concentrações das mesmas a partir de 25 μ M até 40 μ M (última concentração a

ser medida), o que pode evidenciar que o AQ4 se liga a diferentes sítios da proteína sendo difícil definir em qual seria o preferencial. Pode-se observar também que a diminuição da fluorescência da varfarina ao adicionar AQ4 é um indicativo que o composto concorre com a vafarina para se ligar ao sítio I. A fim de tentar elucidar melhor o sítio de ligação do AQ4, foram realizados experimentos de ICD, e os espectros obtidos podem ser observados na Figura 35.

Figura 35. Espectros de ICD para observar, a) Efeito da adição do ligante AQ4 na proteína BSA, b) Efeito da adição de varfarina no sinal de AQ4+BSA, c) Efeito da adição de ibuprofeno no sinal de AQ4+BSA. Os experimentos foram realizados com concentração 1:1 de AQ4:BSA e os espectros obtidos entre os comprimentos de onda 250-450nm.



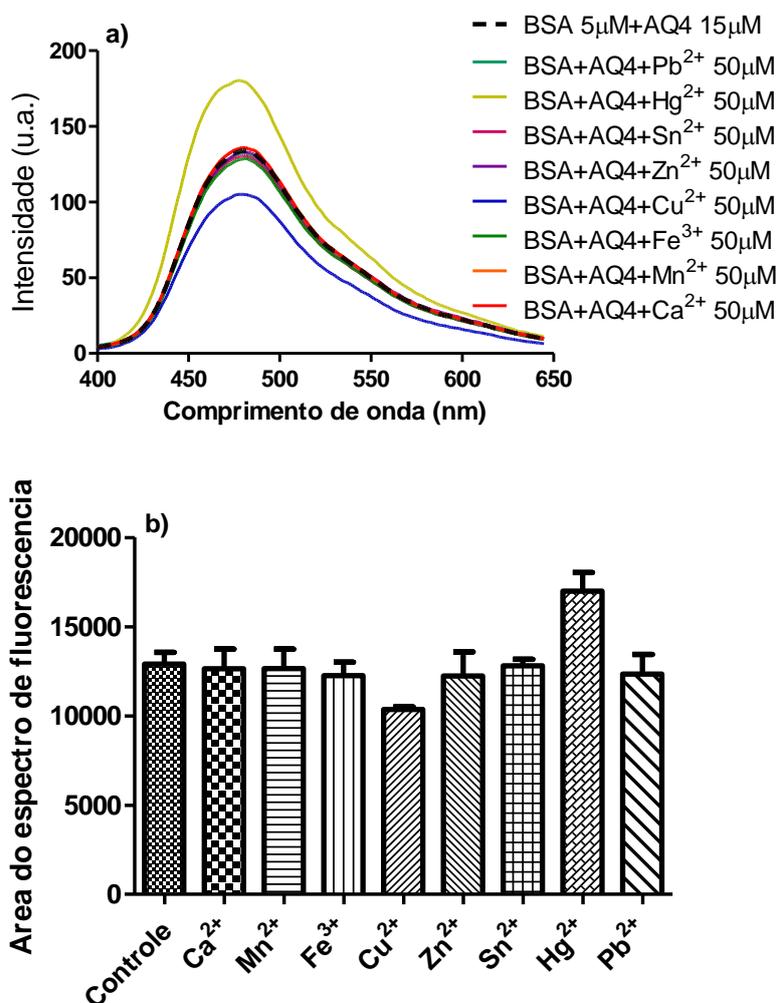
Os espectros de ICD mostram que o efeito de AQ4 sobre o sinal de BSA é pequeno, porém há um leve aumento de intensidade próximo de 320nm. Considerando essa região do aumento, há uma pequena diminuição do sinal de ICD quando é adicionado o ibuprofeno (sonda de sítio II) ao sistema AQ4+BSA. Porém, ao observarmos os resultados obtidos anteriormente o efeito do ibuprofeno e da varfarina se apresentaram semelhantes para a fluorescência. O efeito que ocorreu nesse experimento pode ser devido ao tamanho dos sítios que estão sendo estudados. O sítio I é um sítio maior e assim quando AQ4 se liga a ele, o que leva à uma diminuição de seu grau de liberdade, aparece um sinal de ICD e com a adição da varfarina ao sistema a mesma consegue se ligar ao sítio I, porém não expulsa o AQ4 uma vez haveria espaço para esses dois ligantes ao mesmo tempo; enquanto isso para o sítio II haveria espaço para apenas um dos ligantes que concorrem ao sítio, e, portanto o ibuprofeno expulsa o AQ4 e o sinal de ICD se perde. Assim sendo, novamente, observamos que o AQ4 não apresenta especificidade por apenas um dos sítios da BSA (no caso dos sítios I e II aqui apresentados e estudados).

6.4.4. Aplicação do AQ4 para estudos de alterações estruturais na BSA

Após a verificação da interação BSA-AQ4, iniciou-se estudos para avaliar a capacidade do AQ4 em identificar alterações na BSA. Inicialmente foram estudados os efeitos da presença de íons metálicos. A interação entre aminoácidos das proteínas e íons metálicos é interessante para o estudo de modificação de proteínas, pois acontece em um número restrito número de sítios e o que conseqüentemente leva a uma importância na função fisiológica e estrutural da proteína. A albumina transporta íons metálicos como Ca^{2+} e Mg^{2+}

além de conter sítios com afinidade para Cu(II), Sn(II), Ni(II) e Fe(III) em dois sítios específico majoritariamente (embora existam outros de menor afinidade distribuídos ao longo da macromolécula) que são o sítio V (localizado no subdomínio IIB e que contém o resíduo de aminoácido Cys-34) e o sítio VI (localizado entre os subdomínios IIA e IIIA, contendo os três primeiros resíduos da cadeia N-terminal, com a His-3 sendo o resíduo onde ocorre o maior número de interações com metais) (Witkowska e Rowińska-Żyrek, 2019). Os gráficos apresentam uma concentração fixa de BSA e AQ4 (onde se encontraria o maior valor de fluorescência da interação AQ4-BSA anteriormente estudada). A esses sistemas foram adicionados íons metálicos em concentração fixa em cada solução de forma individual e verificação da influência de cada um deles no espectro de fluorescência da interação. Os gráficos obtidos podem ser observados na Figura 36.

Figura 36. a) Gráfico representativo dos espectros obtidos e da influência de íons metálicos para cada caso ($\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400\text{-}650\text{nm}$), b) Gráfico comparativo das áreas abaixo da curva para os diferentes efeitos de íons sobre a interação BSA-AQ4 (controle se refere ao espectro de fluorescência da interação AQ4-BSA sem íon metálicos).

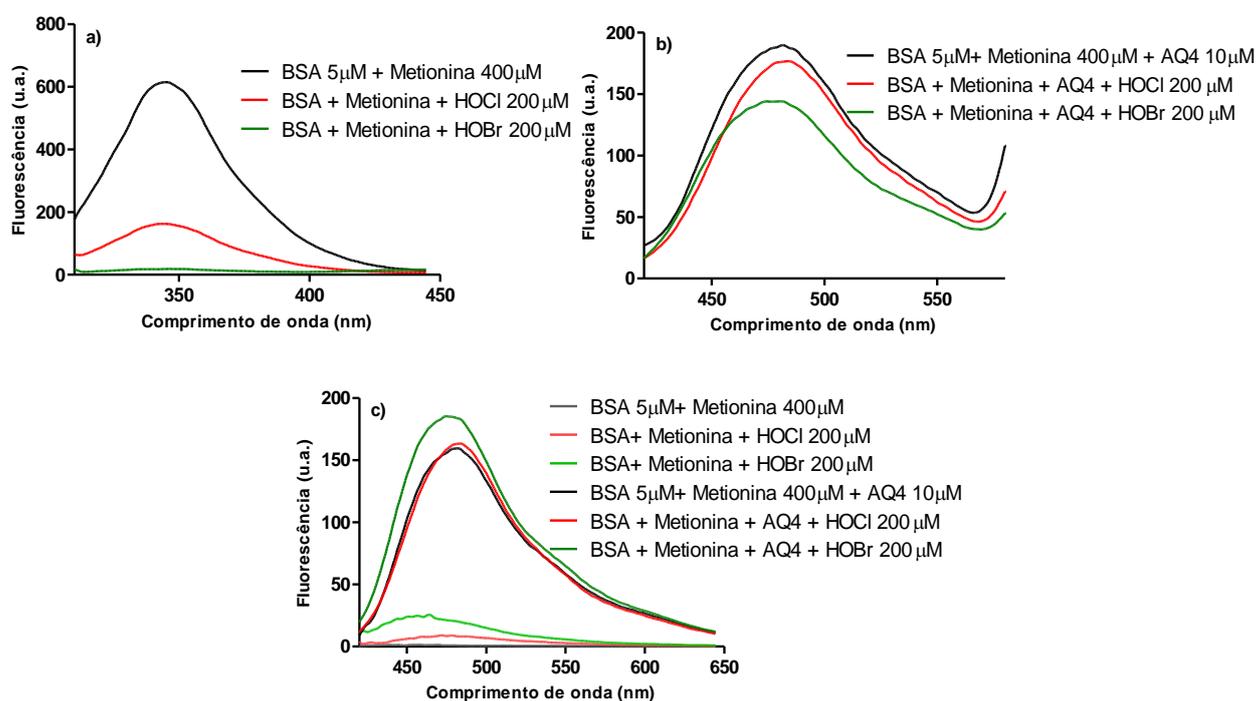


A sonda utilizada mostrou alterações significativas apenas para os íons Hg²⁺ e Cu²⁺. O Hg²⁺ é um íon que tem interação principalmente com a Cys-34 e o Cu²⁺ tem interação fraca com Cys-34 e uma forte interação com a His-3. O restante dos íons trabalhados não apresentam sítios específicos na albumina (Rotilio, 1980; Witkowska e Rowińska-Żyrek, 2019) o que pode explicar a não

alteração da fluorescência do AQ4 em relação à modificação estrutural ocorrida na proteína devido a esses íons. A alteração observada na presença de Hg^{+2} será investigada posteriormente, pois poderá se configurar em um método para estudar alterações em proteínas causadas por este metal altamente tóxico.

Para dar prosseguimento aos estudos com a sonda AQ4, foram realizados estudos para observar se essa molécula poderia funcionar como uma sonda capaz de identificar alterações causadas pela oxidação na proteína. A oxidação do BSA foi feita a partir do uso de HOCl e HOBr conforme descrito na seção 6.3.8. Para a confirmação da oxidação da proteína foi monitorado a depleção dos resíduos de triptofano excitando em 295nm e leitura de emissão entre 310 e 450nm, uma vez que o triptofano quando oxidado perde sua fluorescência intrínseca (Giudice, Del *et al.*, 2016). Com a confirmação da formação, os mesmos foram colocados na presença de AQ4 para observar o efeito na fluorescência desse composto, assim como se haveria diferença com a interação de AQ4 e BSA nativa, e os resultados obtidos podem ser observada na Figura 37.

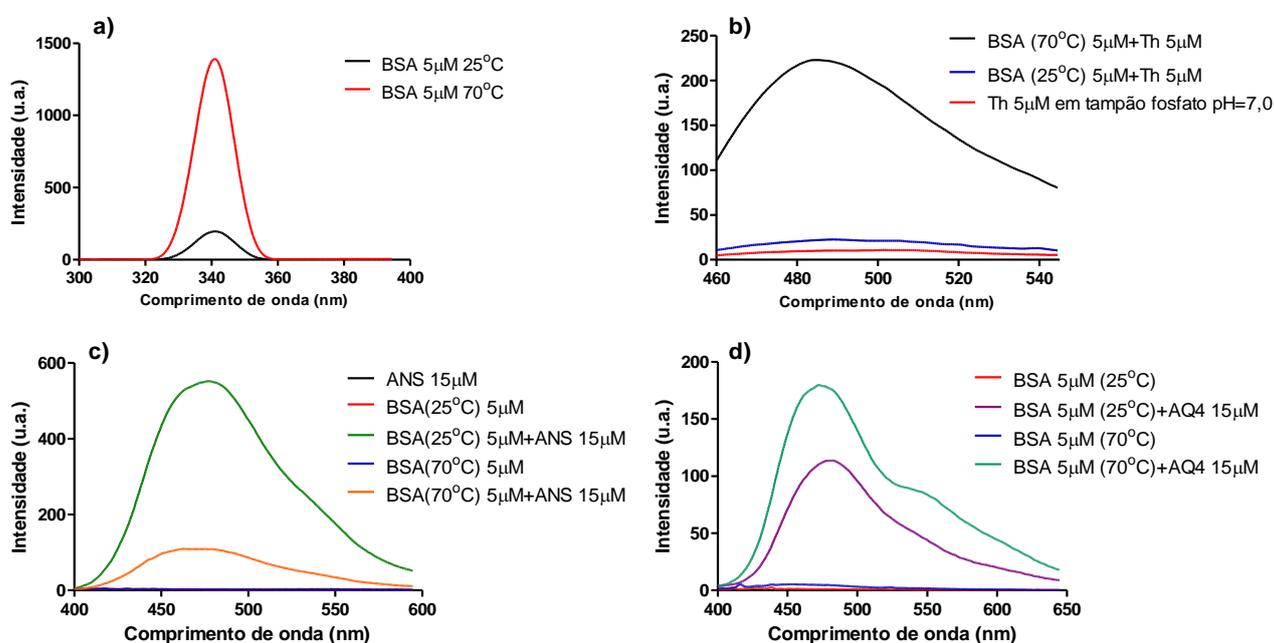
Figura 37. Gráficos representativos dos experimentos de emissão de fluorescência realizados para a determinação da oxidação de BSA com HOCl e HOBr, a) para confirmação da oxidação do resíduo de triptofano do BSA (5 μ M) com a adição de 100 μ M de agente oxidante (HOBr e HOCl) (λ_{exc} =295, λ_{em} =310-450nm), b) para observação da mudança no espectro de fluorescência do AQ4 (10 μ M), excitando-se o triptofano (λ_{exc} =295, λ_{em} =420-650nm), c) para observação da alteração no espectro de fluorescência do AQ4 (10 μ M) em BSA (5 μ M), na excitação da sonda (λ_{exc} =400, λ_{em} =420-650nm).



Como pode ser observado pelos gráficos acima, a oxidação ocorreu de forma eficaz, uma vez que há a alteração significativa da intensidade de fluorescência do resíduo de triptofano quando a proteína está nativa e após a adição do agente oxidante. Porém, há pouca diferença nos espectros de emissão AQ4-BSA quando o BSA está ou não oxidado, principalmente ao compararmos com a diminuição da fluorescência do triptofano ao ser oxidado, mostrando que o AQ4 não seria uma boa sonda para determinação desse tipo de alteração.

Outra forma de se alterar a proteína é através de sua desnaturação e formação de fibras amiloides através do aumento temperatura (Taboada *et al.*, 2006). Foram feitos estudos para avaliar se o AQ4 conseguiria ser sensível a esse tipo de alteração estrutural. Primeiramente foi realizada a alteração de BSA por temperatura conforme descrito na seção 6.3.7 para a formação de agregados amilóides. Para a confirmação da formação realizou-se experimento de espalhamento de luz do tipo Rayleigh, e sua interação com tioflavina T (Th-t) e ANS, como ser observado na Figura 38 (a, b e c, respectivamente). Com a confirmação da formação, os mesmos foram colocados na presença de AQ4 para observar o efeito na fluorescência, assim como se haveria diferença com a interação de AQ4 e BSA nativa, que pode ser observada na Figura 38 (d).

Figura 38. Gráficos representativos dos experimentos realizados para a determinação da formação de agregados amiloides de BSA, a) Espalhamento Rayleigh aumentado devido a formação dos agregados amiloides ($5\mu\text{M}$) ($\lambda_{\text{exc}}=340$, $\lambda_{\text{em}}=300-400\text{nm}$), b) Efeito da formação de agregados amiloides em BSA ($5\mu\text{M}$) sobre a sonda Th-T (concentração fixa de $5\mu\text{M}$ em todos os meios) ($\lambda_{\text{exc}}=435$, $\lambda_{\text{em}}=460-545\text{nm}$), c) Efeito da formação de agregados amiloides em BSA ($5\mu\text{M}$) sobre a sonda ANS (concentração fixa de $15\mu\text{M}$ em todos os meios) ($\lambda_{\text{exc}}=340$, $\lambda_{\text{em}}=400-600\text{nm}$), d) Efeito da formação de agregados amiloides em BSA ($5\mu\text{M}$) sobre AQ4 (concentração fixa de $15\mu\text{M}$ em todos os meios) ($\lambda_{\text{exc}}=375$, $\lambda_{\text{em}}=400-650\text{nm}$). Em todos os casos foram utilizados um comparativo entre BSA nativa (25°C) e BSA amiloide (70°C), e foram utilizadas nas mesmas concentrações para comparativo.

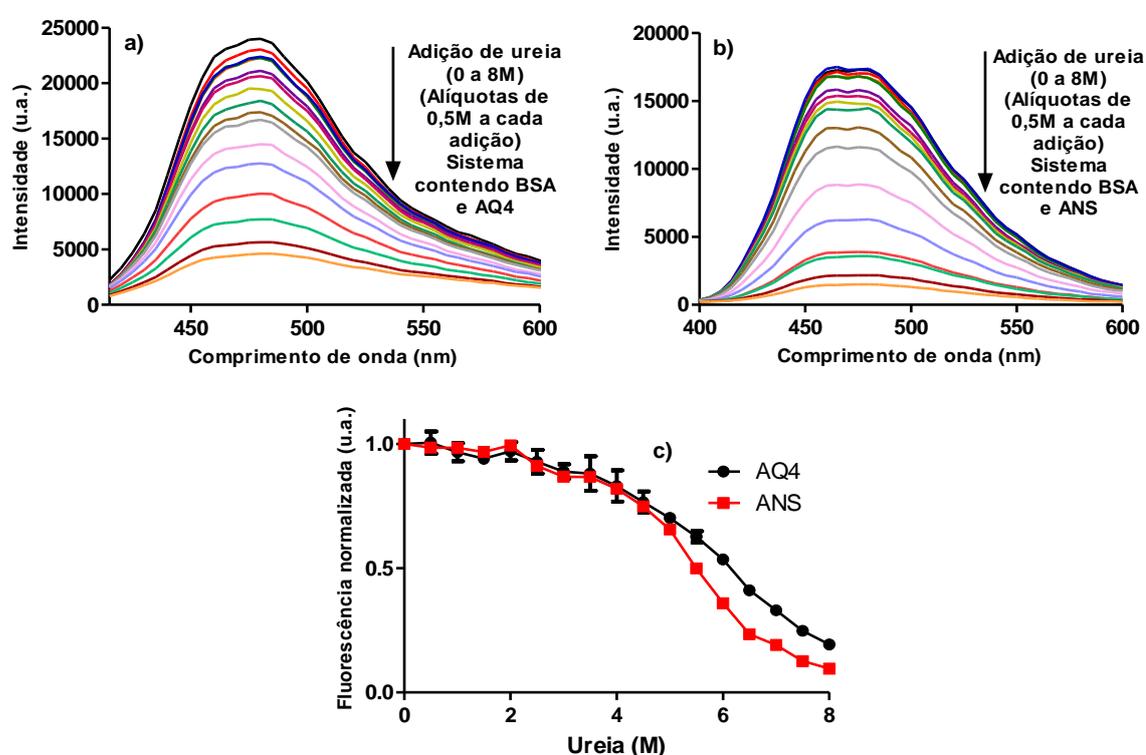


Assim, pode-se observar que todos os testes mostraram que havia a formação dos agregados amilóides (aumento do espalhamento de luz, aumento da fluorescência da Th-T e diminuição da fluorescência do ANS como observado na literatura e utilizado para a confirmação de formação de agregados amiloides). A Figura 38 (d) mostra que há um aumento na fluorescência do AQ4 ao entrar em contato com agregados amilóides e um pequeno deslocamento

hipsocrômico (8nm) do máximo da banda de emissão em relação a sua interação com BSA nativa. As alterações no espectro, no máximo de emissão e na intensidade de fluorescência mostra que o AQ4 apresenta comportamento semelhante à sonda Th-T e, portanto, poderia ser utilizada para estudar a formação de agregados amilóides.

Além da formação de agregados amilóides por temperatura, é possível a desnaturação de proteína por meio químicos, que também induzem mudanças no ambiente proteico. O ANS é uma sonda utilizada para a determinação dessas mudanças na proteína, pois quando em contato com a fase nativa se liga em seus sítios hidrofóbicos e tem sua fluorescência aumentada, e quando a proteína começa a ser desnaturada, a mesma perde a capacidade de se ligar à sonda devido a perda da estrutura terciária e consequente perda da forma dos sítios hidrofóbicos (Barros *et al.*, 2015). Portanto, para fins comparativos foi realizada a desnaturação da proteína através da adição de diferentes concentrações de ureia utilizando-se AQ4 e ANS em experimentos separados para observar a eficiência do AQ4 para detecção das mudanças na proteína ao se desnaturar, como pode ser observado na Figura 39.

Figura 39. Estudos da desnaturação de BSA. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de Ureia (0-8M) e concentração fixa de BSA (20 μ M) e AQ4 fixa (20 μ M) em tampão fosfato 50mM pH=7,0 (λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm); b) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de Ureia (0-8M) e concentração fixa de BSA (20 μ M) e ANS fixa (20 μ M) em tampão fosfato 50mM (λ_{exc} =340, λ_{em} =400-600nm); c) Gráfico comparativo do decaimento da fluorescência máxima normalizada das sondas AQ4 e ANS devido a desnaturação da BSA (para o AQ4 λ_{exc} =375, $\lambda_{em(max)}$ =480nm, para o ANS λ_{exc} =340nm, $\lambda_{em(max)}$ =480nm).



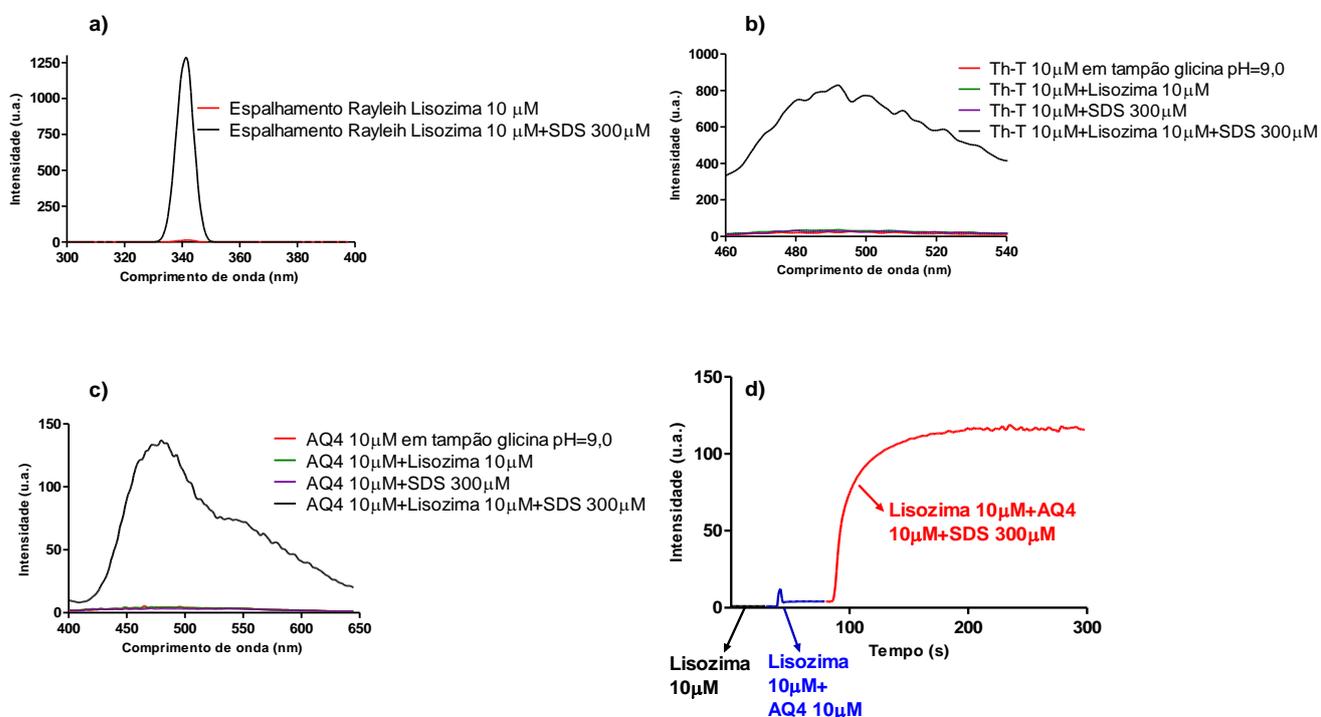
A desnaturação de proteínas globulares por ureia é um dos métodos mais antigos e mais utilizados para estudos da desagregação de proteínas e seus mecanismos (Almarza *et al.*, 2009; Gordon e Warren, 1968). É possível encontrar na literatura trabalhos que afirmam que a desnaturação de albumina por ureia se dá através de duas fases de reação e a formação de um estado intermediário (em concentrações de ureia entre 4,6 e 5,2M), onde a alteração do domínio III é

o mais significativo para a formação desse estado (Khan, Agarwal e Hangloo, 1987; Muzammil, Kumar e Tayyab, 2000; Tanaka, Nishizawa e Kunugi, 1997). As alterações que ocorrem nas concentrações de 0-4M de ureia são um desenovelamento do domínio III (que é o domínio mais instável nesse tipo de desnaturação), uma alteração pouco significativa do domínio II da proteína e um distanciamento entre os domínios I e II, porém não é possível se observar nos estudos com ANS o que mostra que não há alteração significativa nos fragmentos hidrofóbicos nesse estado intermediário formado (Muzammil, Kumar e Tayyab, 2000). Assim sendo, o AQ4 também não consegue diferenciar esses três estados da desnaturação da proteína, uma vez que nessas concentrações comentadas até o momento apresenta uma curva muito semelhante ao ANS. Em concentrações de ureia acima de 5M é possível observar uma diferença mais significativa no domínio II da proteína, e em concentrações acima de 10M de ureia a proteína já se encontra irreversivelmente desnaturada em forma de espiral desordenada (Khan, Agarwal e Hangloo, 1987; Muzammil, Kumar e Tayyab, 2000; Tanaka, Nishizawa e Kunugi, 1997). Nos estudos realizados nesse trabalho, houve uma diferença maior entre os resultados encontrados para o ANS e o AQ4 em concentrações de ureia acima de 5M, e considerando as observações realizadas acima é possível inferir que o ANS consegue ser uma melhor sonda para a observação dos resíduos hidrofóbicos presentes no domínio II do que o AQ4. Assim sendo, observando-se os resultados obtidos na Figura 39, o AQ4 consegue mostrar as alterações da BSA quando desnaturada com ureia, porém de forma menos efetiva que o ANS. Porém, o AQ4 consegue diferenciar uma proteína desnaturada de uma proteína quando já está formada as fibras amilóides, uma vez que no primeiro caso é observado uma diminuição

da fluorescência máxima, no segundo há um aumento, e o ANS não é capaz de sentir essa diferença uma vez que diminui em ambos os casos.

Além da proteína BSA, foram realizados estudos com a proteína lisozima, que foi induzida à formação de agregados amilóides pela adição de SDS (Qu *et al.*, 2009) (Figura 40). Como pode ser observado, o AQ4 conseguiu detectar a formação de fibras amilóides da lisozima de forma eficiente, aumentando sua fluorescência em relação a lisozima nativa em cerca de 30 vezes e apresentando seu máximo de emissão em 480nm. Assim sendo, o AQ4 mostrou-se uma boa sonda para a determinação da desnaturação da proteína BSA e Lisozima.

Figura 40. Gráficos representativos dos experimentos realizados para a determinação da formação de agregados amiloides de Lisozima; a) Espalhamento Rayleigh aumentado devido a formação dos agregados amiloides (10 μ M) (λ_{exc} =340, λ_{em} =300-400nm); b) Efeito da formação de agregados amiloides de Lisozima (10 μ M) formados a partir de adição de SDS (300 μ M) sobre a sonda Th-T (10 μ M) (λ_{exc} =435, λ_{em} =460-545nm); c) Efeito da formação de agregados amiloides em de Lisozima (10 μ M) formados a partir da adição de SDS (300 μ M) sobre a sonda (10 μ M) (λ_{exc} =375, λ_{em} =400-650nm); d) Experimento para observar a intensidade de fluorescência através do tempo com a adição da sonda e depois levando a desnaturação da proteína, utilizando a fluorescência da sonda no meio da proteína desnaturada como referência para os comprimentos de onda excitação e emissão fixos (λ_{exc} =375nm, λ_{em} =480nm).

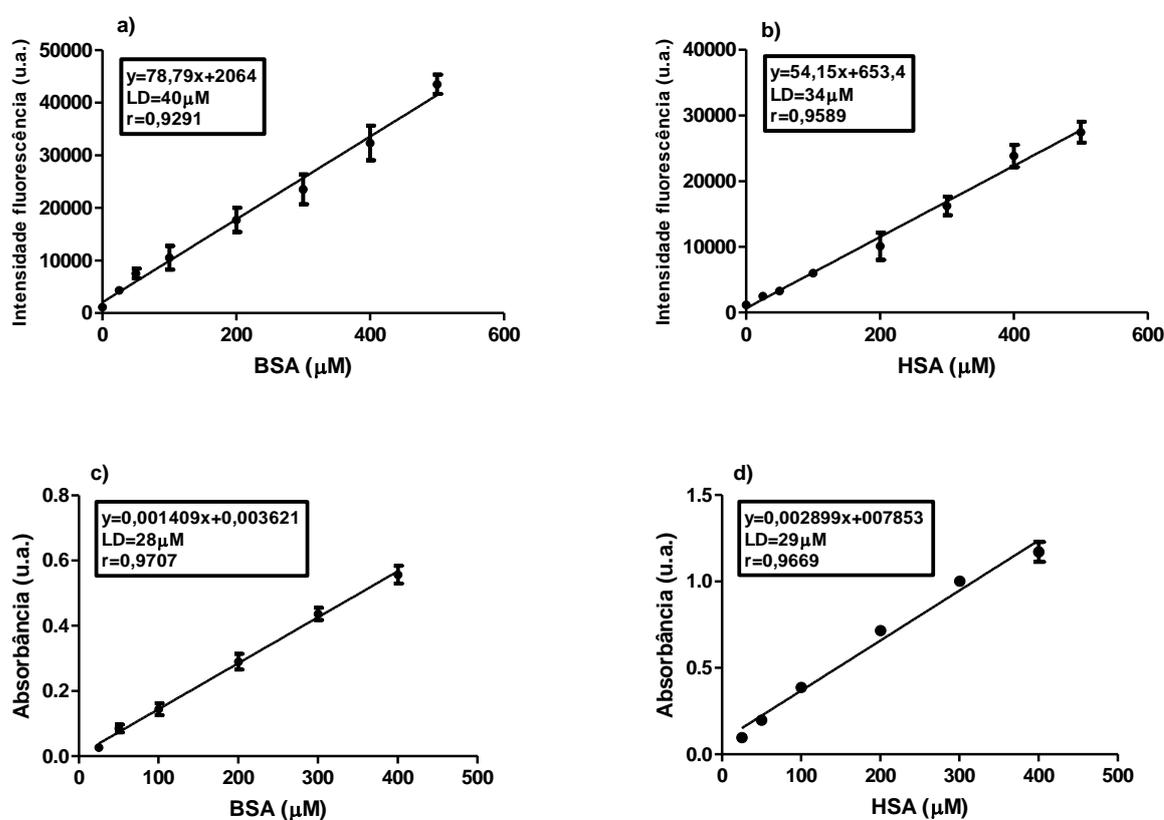


6.4.5. Resultados para a determinação do limite de detecção de proteína e determinação da quantidade de albumina no plasma humano por AQ4

Considerando-se a interação efetiva do AQ4 com albumina nativa e que no plasma há cerca de 700 μ M de albumina no sangue de uma pessoa saudável (Assink *et al.*, 1984), foram feitos estudos para avaliar se o AQ4 poderia ser

utilizado na detecção da mesma no plasma. Porém, para se realizar essa medida é necessário primeiramente saber se há uma relação linear entre a concentração de albumina e a fluorescência observada, qual seria a faixa de concentração onde ocorreria essa linearidade e qual seria a concentração mínima de proteína que a sonda poderia detectar em uma concentração fixa de sonda. Assim sendo, foram realizadas medidas onde houve a variação da concentração da proteína em relação a uma concentração fixa da sonda para observar se haveria as condições necessárias para a realização da determinação de albumina no plasma. Além disso, foram realizados os estudos utilizando tanto BSA quanto HSA, como pode ser observado na Figura 41. Para fins de comparação foram realizados estudos com o BCP, que é reconhecidamente uma sonda de detecção de albumina por absorbância, utilizando-se o protocolo descrito no item 6.3.9).

Figura 41. Estudos da linearidade de método para a determinação de albumina (BSA e HSA) com diferentes sondas. a) Curva que mostra a linearidade do método de AQ4 (40 μ M) com BSA (0-500 μ M), pelo método da fluorescência com leitura em $\lambda_{exc}=375$ nm, $\lambda_{em}=480$ nm. b) Curva que mostra a linearidade do método de AQ4 (40 μ M) com HSA (0-500 μ M), pelo método da fluorescência com leitura em $\lambda_{exc}=375$ nm, $\lambda_{em}=480$ nm. c) Curva que mostra a linearidade do método de BCP (200 μ M) com BSA (0-400 μ M), pelo método da absorvância com leitura em $\lambda=610$ nm. d) Curva que mostra a linearidade do método de BCP (200 μ M) com HSA (0-400 μ M), pelo método da absorvância com leitura em $\lambda=610$ nm.



Como pode ser observado, todos os métodos apresentaram linearidade e limite de detecção muito semelhantes, e coeficiente de linearidade (R) acima de 0,9 o que indica uma boa correlação entre os parâmetros analisados. Como em nenhum dos métodos o valor encontrado de albumina no sangue está dentro da faixa linear, foram feitas diluições do plasma em tampão PBS para utilização da

alíquota para observação dos valores. Os valores encontrados para o método utilizando-se BCP e AQ4 estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Valores encontrados de albumina em plasma utilizando diferentes métodos. O plasma utilizado foi de uma pessoa saudável.

Concentração encontrada para o método BCP (μM)	Concentração média encontrada para o método BCP (μM)	Concentração encontrada para o método AQ4 (μM)	Concentração média encontrada para o método AQ4 (μM)
666	671 \pm 7	1100	1325 \pm 179
664		1200	
683		1500	
674		1500	

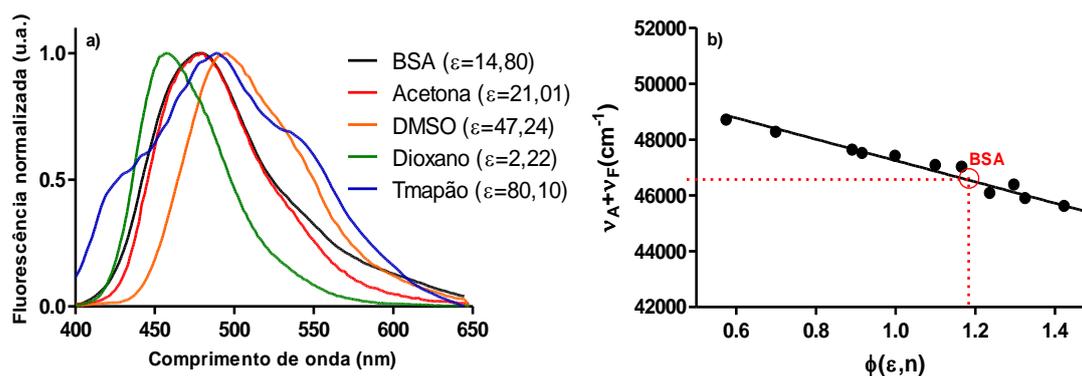
Como pode ser observado pelos resultados da Tabela acima, o AQ4 não foi uma boa sonda para detecção de albumina em plasma, uma vez que resultou em valores cerca de duas vezes maior comparado ao método padrão. Acreditamos que este resultado seja consequência de uma inespecificidade da sonda AQ4 para a proteína albumina, ou seja, outras proteínas presentes no plasma sanguíneo também possam se ligar a essa sonda.

6.4.6. Determinação da constante dielétrica no interior da BSA

Dado a efetiva interação entre a sonda AQ4 e a proteína BSA e a potencialidade dessa molécula como sonda solvatocrômica, foram realizados estudos para estimar a constante dielétrica no interior da proteína. O princípio do

método foi medir os máximos de absorção e fluorescência da AQ4 complexada a proteína (Espectros de absorbância e fluorescência desse sistema está na Figura B- 3 do Anexo B) e aplicar estes valores ao modelo de Kawski (Equações 6 e 11), onde obteve-se a melhor correlação entre a função de polaridade dos solventes e os dados espectrais da AQ4. Em função da equação de reta obtida com os solventes e os dados espectrais da proteína, pode-se estimar o valor de $\phi(\epsilon, n)$ para a proteína (Figura 42). Aplicando este valor na Equação 6 e considerando que o índice de refração é similar ao da água, pode-se calcular o valor da constante dielétrica no interior da proteína.

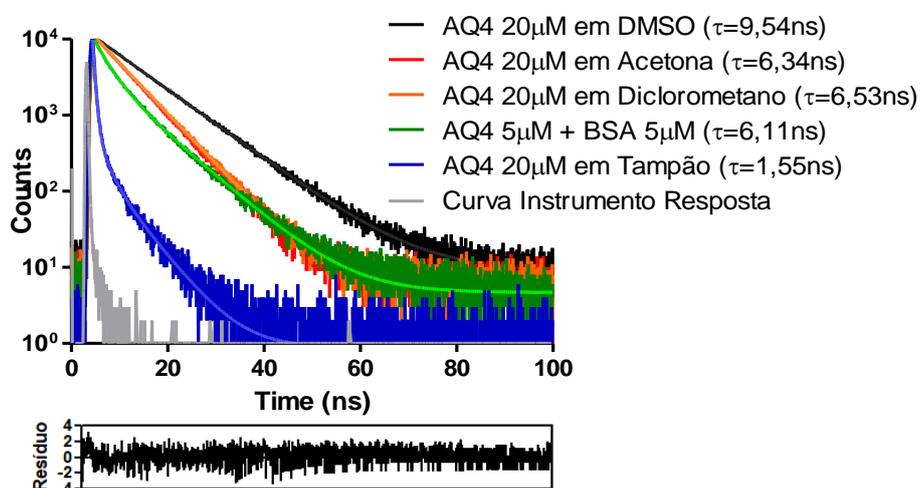
Figura 42. Gráficos representativos para a determinação da constante dielétrica da proteína. a) Gráfico de fluorescência normalizada de AQ4 em meios com diferentes polaridades comparando-se o AQ4 dentro da proteína ($\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$, b) Gráfico ilustrativo que mostra o valor aproximado de $\phi(\epsilon, n)$ em relação ao a somatória dos comprimentos de onda de absorção e emissão de fluorescência em vários solventes e o valor encontrado para AQ4 na proteína.



O valor estimado foi de 14,8, o que condiz com os valores encontrados anteriormente na literatura (Ercelen, Klymchenko e Demchenko, 2003). Esse valor é intermediário entre os valores dos solventes diclorometano ($\epsilon=8,93$) e

acetona ($\epsilon=21,01$). Além desse experimento descrito acima, foram realizados experimentos de tempo de vida do composto em diferentes solventes (Item 5.4.2) e também do composto em BSA e para que fosse possível comparar os valores dos mesmos (Figura 43); o que foi observado é que os tempos de vida de solventes com valores de constante dielétrica semelhante aos da BSA apresentam valores parecidos, mostrando mais uma vez que ocorre uma interação efetiva entre a sonda e a proteína e que AQ4 é um composto com características solvatocrômicas, podendo assim ser utilizado como sonda para diferenciação dos meios em que está contido.

Figura 43. Gráficos de tempo de vida de fluorescência de AQ4 em solventes com polaridades distintas e em BSA ($\lambda_{exc}=340\text{nm}$, $\lambda_{em}=475\text{-}575\text{nm}$, pulso de 100ns e contagem de 1000 fótons/s).



6.5. Conclusões dos estudos de AQ4 com proteínas

Dentre as aminoquinolinas sintetizadas, a AQ4 foi a selecionada para os estudos com proteínas. Os estudos mostraram que AQ4 tem uma interação efetiva com a proteína BSA, como pode ser observado pela constante de associação obtida ($3,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) que é similar aquelas obtidas com fármacos que se ligam a albumina como a varfarina. Além disso, ocorre uma associação 1:1 na complexação BSA-AQ4 e de forma espontânea como pode ser observado pelos valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos. A associação ocorre através de ligações de hidrogênio e hidrofóbicas dentro de diversos sítios da proteína e é possível a obtenção da constante dielétrica média da BSA utilizando os resultados de solvatocromismo.

O AQ4 também demonstrou sensibilidade à diferentes concentrações de albumina, porém quando em contato com solução contendo outras proteínas como o plasma a sonda se mostrou pouco específica e ineficiente para o uso.

Os estudos de AQ4 com proteínas modificadas mostraram que a sonda não é eficiente para a detecção de mudanças conformacionais decorrentes da adição de íons metálicos ou da oxidação de aminoácidos da BSA. Porém, há um aumento da fluorescência de AQ4 quando está em contato com agregados amiloides de BSA e uma diminuição da fluorescência de AQ4 quando a desnaturação é feita com a adição de ureia.

Quando em contato com lisozima (Lys) nativa, o AQ4 apresentou baixo rendimento quântico e não foi possível a determinação dos parâmetros de complexação para o sistema, porém quando ocorre a formação de agregados amiloides de Lys por SDS há um aumento significativo da fluorescência de AQ4

nesse meio, o que mostra um potencial uso dessa sonda para detecção de formação de agregados amiloides de proteínas.

Capítulo 4

Estudos da Interação das Aminoquinolinas com Micelas

7.1. Micelas

7.1.1. Introdução às micelas

Ao se misturar um soluto ao solvente, observa-se comumente três tipos de dispersões que podem ser formadas desse conjunto: soluções, coloides e suspensões. As soluções são homogêneas, ou seja, apresentam apenas uma fase tanto a olho nu como microscopicamente, seus componentes não podem ser separados por processos físicos, e o tamanho das partículas dispersas são menores do que 1nm. Do lado oposto às soluções estão as suspensões, que apresentam duas ou mais fases heterogêneas, seus componentes são facilmente separados por processos físicos (filtração por exemplo) e apresentam partículas dispersas no solvente com tamanhos a 1000nm (1 μ M). Os coloides apresentam características intermediárias entre esses dois extremos, ou seja, não é possível identificar mais de uma fase a olho nu, mas em microscópio sim, o tamanho das partículas dispersas varia entre 1 e 1000nm e elas não se sedimentam facilmente com a gravidade, além de suas partículas ficarem dispersas em toda a extensão da dispersão; para a sua separação é necessário utilizar métodos mais refinados como centrifugação. Assim, por definição, coloides são misturas heterogêneas com pelo menos duas fases, sendo que em uma delas a matéria está finamente dividida (sólido, líquido ou gás) que é chamada de fase dispersa, misturada com a fase contínua (sólido, líquido ou gás), denominada meio de dispersão e o estudo desses sistemas se dão onde pelo menos um dos componentes da mistura se encontra em dimensão de 1 a 1000nm (Schukin, Pertsov e Améline, 1988; Shah, 1998; Shaw, 1975).

Considerando os conceitos acima, soluções de macromoléculas são misturas homogêneas, porém também são consideradas coloides uma vez que

o tamanho das moléculas se apresenta na faixa coloidal e como tal apresentam as propriedades características dos coloides. Por exemplo, os detergentes são macromoléculas que quando associadas resultam nas chamadas micelas, que nada mais é que agregados moleculares na faixa de tamanho de coloides (Bradburn e Bittinger, 2014). Quimicamente os detergentes são substâncias sintéticas com propriedades tensoativas, ou seja, alteram a tensão interfacial quando dissolvidas em um solvente. A tensão interfacial está relacionada com o trabalho necessário para manter as moléculas de uma fase na superfície ou interface. Também denominadas surfactantes (do inglês *surface active agents* = *surfactants*), detergentes são obtidos da saponificação do óleo e gordura como o sabão.

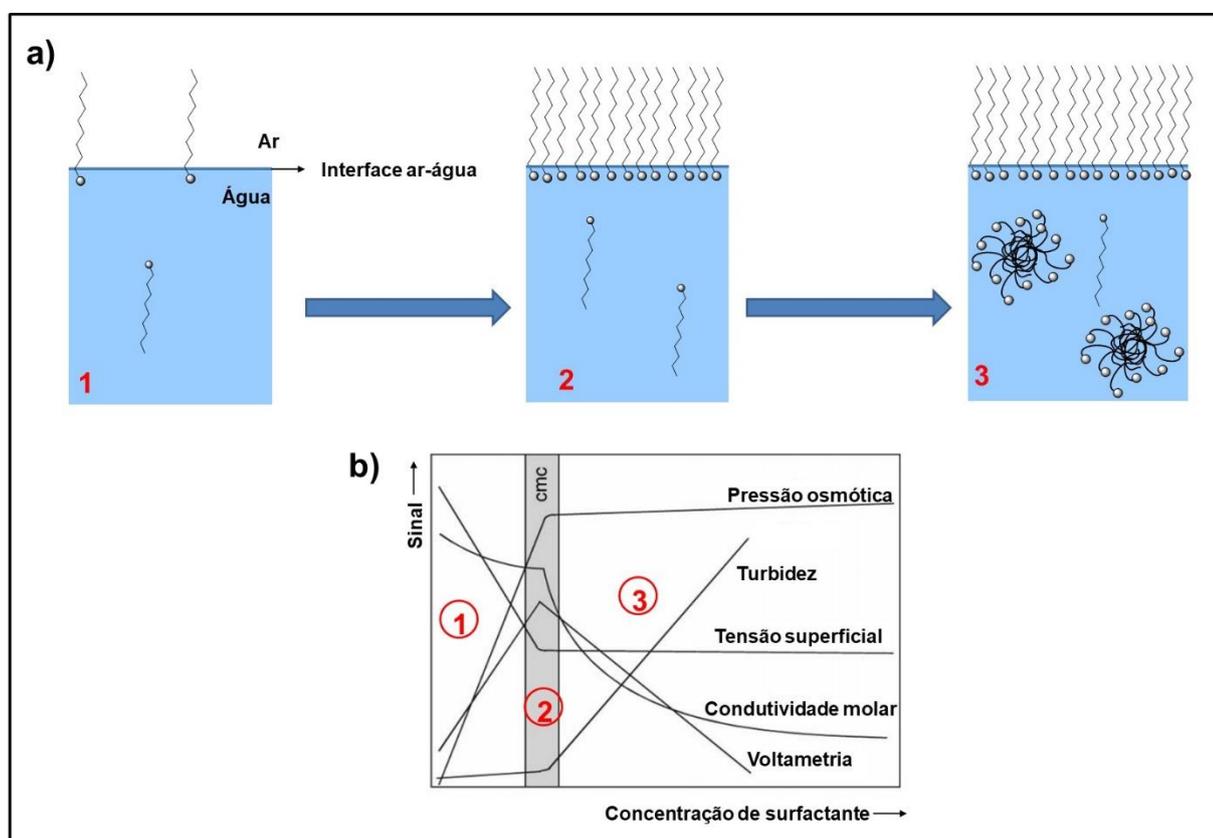
Os surfactantes podem ser do tipo iônico, não iônico e zwitteriônico de acordo com o tipo de cabeça hidrofílica que apresenta. Surfactantes iônicos podem ser do tipo aniônico que apresentam em sua cabeça carga negativa sendo que os grupos funcionais mais comumente encontrados para esse caso são os sulfatos, sulfonatos, carboxilatos e fosfatos e do tipo catiônico que apresentam carga positiva em sua cabeça e dentre os grupos funcionais positivos os mais normalmente encontrados são as aminas e o cátion trimetilamônio como a parte hidrofílica da molécula. Os surfactantes não iônicos mais comuns estão os álcoois de cadeia carbônica longa, moléculas contendo alquil éteres e copolímeros de bloco e os surfactantes zwitteriônico possuem em sua cabeça os centros catiônicos (aminas primárias, secundárias, terciárias ou cátions quaternários amônio) e aniônicos (sulfonatos, sultainas, betainas e fosfatos) ligados à mesma molécula (Clint, 1992).

Independentemente do tipo de surfactante sendo estudado ocorre a associação das moléculas em solução, sendo assim esses sistemas moleculares também são chamados de coloides de associação, além disso a concentração onde o fenômeno se torna mais evidente depende do surfactante sendo estudado. O comportamento desse sistema se dá da seguinte forma: em baixas concentrações as moléculas de surfactantes têm a capacidade de se dissolver em água formando uma monocamada de surfactante na interface água/ar (Figura 44). Conforme a concentração de monômeros aumenta há uma súbita transição de propriedades dos surfactantes, chamada de concentração micelar crítica (CMC), que corresponde à concentração na qual a formação de agregados é termodinamicamente favorável (Figura 44) e há a formação de estruturas cuja estrutura final que dependem da forma e tamanho da molécula (Figura 44). Por exemplo, moléculas com uma cadeia carbônica apolar longa e única ou duas cadeias apolares curtas levam à formação de micelas, já moléculas com duas cadeias carbônicas longas levam a formação de agregados em bicamadas que apresentam uma forma de estrutura esférica e fechada comumente chamadas vesículas ou lipossomas (Ferreira *et al.*, 2005; N Hanafy, El-Kemary e Leporatti, 2018).

Essa transição de propriedades dos surfactantes pode ser observada por diversos métodos que sejam capazes de detectar a diferença nas propriedades entre o monômero em água e a formação dos agregados, e algumas vezes podem ocorrer mudanças nos valores de concentração encontrados em diferentes métodos (Figura 44); entre os métodos mais comumente encontrados na literatura estão a tensão superficial, densidade, viscosidade, condutividade,

espalhamento de luz e fluorescência através de sondas extrínsecas (Zana, 2005; Zdziennicka *et al.*, 2012).

Figura 44. Representação esquemática das etapas de formação de micela com o aumento da concentração de surfactante. a) Esquema onde é possível observar a formação das micelas acima de um determinado valor mínimo e se pode observar sua correlação com o gráfico representativo em b) que descreve o CMC em termos de concentração de surfactante e o comportamento gráfico do processo dependendo da metodologia utilizada para a determinação (Adaptado de: (Rizzatti, Zanette e Mello, 2009)).



Outro fator importante no processo de micelização é o chamado número de agregação micelar (N_{agg}) que nada mais é do que o número médio de moléculas que formam o agregado. A utilização do número médio se dá devido ao sistema micelar ser dinâmico, ocorrendo associação e dissociação dos

monômeros a todo o momento. Considerando-se a geometria da formação micelar é possível observar que o N_{agg} aumenta com o aumento do grupo hidrofóbico da molécula de surfactante e diminui com o aumento da área superficial do grupo hidrofílico ou do volume da parte hidrofóbica da molécula. Por exemplo, para surfactantes iônicos, a formação da micela vai depender do equilíbrio eletrostático dos monômeros constituintes da micela, uma vez que em solução aquosa ocorre a dissociação iônica do surfactante, formando-se um contra-íon que ajuda na estabilização elétrica do agregado. Na literatura são encontrados diversos métodos para a determinação desse parâmetro como espalhamento de nêutron a baixo ângulo (SANS), ponto de fusão, pressão de vapor e sondas fluorescentes (Clint, 1992; Rosen e Kunjappu, 2012).

Por fim, sabe-se que a maioria das reações bioquímicas ocorrem dentro de compartimentos celulares ou membranas lipídicas, e as interações de uma substância com membranas biológicas vai refletir diretamente em sua disponibilidade no organismo, uma vez que essas membranas são um dos aspectos mais importantes na organização biológica. Essas interações dependem tanto das propriedades das membranas como pelas propriedades físico-químicas da própria molécula que está interagindo. Assim, compreender os sistemas biológicos requer uma familiaridade com os aspectos químicos e físicos das membranas biológicas, a fim de obter um maior conhecimento e aperfeiçoamento das estruturas biológicas (N Hanafy, El-Kemary e Leporatti, 2018). Sabendo-se disso, houve um aumento no desenvolvimento e na pesquisa de sistemas anfifílicos que conseguem reproduzir as funções peculiares de sistemas naturais porém com maior reprodutibilidade apesar do sistema a ser estudado não ser necessariamente idêntico e funcional como nos sistemas vivos

(Scrimin e Tecilla, 1999). Os modelos de biomembranas mais comumente encontrados são as micelas e os lipossomas, pois conseguem ilustrar a interação de compostos com as biomembranas uma vez que esses micro-agregados apresentam um ambiente químico e anisotrópico observado nas membranas biológicas, além de apresentar um manuseio fácil, reproduzível, ter preparo simples e com obtenção de soluções homogêneas e terem suas características físico-químicas melhor definidas do que as membranas de células e tecidos animais *in vivo* (Ferreira *et al.*, 2005).

7.1.2. Formação de complexos

O estudo dos complexos começou pelo interesse para o entendimento da estrutura molecular, principalmente aquelas estruturas onde o número de valência característico dos compostos simples não é observado. Muitos complexos estudados são aqueles contendo metais, mas desde a metade do século XIX já se conhecia exemplos de substâncias estáveis que eram capazes de reagir com outras substâncias também estáveis resultando em produtos com novas propriedades e a essas associações foi dado o nome de “complexos moleculares”, um nome genérico e de difícil definição por ser empregado desde para compostos de coordenação estáveis como para as fracas auto-associações (Foster, 1980; Mulliken e Person, 1969). Muitos modelos foram propostos ao longo do tempo na literatura tentando explicar a natureza dos complexos moleculares, mas a ideia de interações doador-aceptor (D-A) sempre permeava as discussões dos autores. Outro fator sempre observado é um deslocamento de bandas espectroscópicas que não está relacionado a nenhum dos componentes em separado.

Diversos estudos foram realizados a fim de encontrar uma teoria para ocorrência dessas interações. Como exemplos temos o trabalho realizado por Bennett e Willis (Bennett e Willis, 1929) que propuseram ligações covalentes para descrever essas interações mas que pode ser refutada pelo fato da energia de ativação necessária para esse fenômeno ser muito menor do que as presentes na formação de ligações covalentes e a distância entre o doador e o receptor ser maior do que a esperada para esse tipo de situação), Já Briegleb e Schachowskoy (Briegleb and T. Schachowskoy, 1932) entenderam e descreveram os fenômenos observados por uma teoria de polarização por indução, porém ela não é capaz de explicar a complexação de compostos que não apresentam momento dipolar. Weiss (Weiss, 1963) descreveu a interação em termos de transferência de elétrons e formação de complexo iônico e Woodward explicou o vínculo D-A como uma ligação semipolar intermolecular, porém para esse último pode ser criticado pelo fato desse modelo apresentar os valores das entalpias para esse fenômeno muito abaixo do que para os processos de formação de sais se baseia a teoria; já o modelo de Brackmann (Brackmann, 1949) indica que apenas um caráter iônico parcial seria necessário para a formação do complexo através de um processo parecido às interações ácido-base de Lewis onde o doador compartilha um par de elétrons com o receptor e Bayliss e Brackenridge (Bayliss e Brackenridge, 1955) acreditavam que as mudanças observadas no espectro eletrônico desses complexos eram devido apenas a interações físicas, causadas pela solvatação do cromóforo em um solvente. Todas essas teorias levaram a R. S. Mulliken a publicar uma série de trabalhos que caracterizavam teoricamente os complexos, que ao final transpuseram todas as teorias em termos mecânico quântico e postula que um

complexo doador-aceptor 1:1 no estado fundamental pode ser descrito por uma função de onda que envolve contribuição do estado não ligado e uma contribuição dativa e estabeleceu os nomes de “complexos doador-receptor” ou “complexos de transferência de carga” (Faria e Santos, 1993; Mulliken e Person, 1969). Apesar de importante e a mais aceita hoje em dia, essa teoria envolve cálculos complexos que não serão descritos aqui por sua difícil compreensão e discussão e, portanto, citadas apenas para sua contextualização histórica e introdutória para a discussão dos próximos tópicos.

7.1.3. Dímeros em estado excitado

Os dímeros são moléculas compostas por duas partes iguais, sendo que podem estar ligadas covalentemente como no caso de polímeros e açúcares (dímeros químicos) ou até mesmo dizerem respeito as interações intermoleculares entre duas moléculas, como por exemplo, a interação que ocorre entre duas moléculas de ácido carboxílico. Quando há a formação desse dímeros em estado fundamental, assim como discutido para os complexos, é possível a detecção dos mesmos a partir dos espectros de absorção, emissão e excitação, e normalmente ocorre um deslocamento para maiores comprimentos de onda com alargamento das bandas e diminuição do coeficiente de extinção (molar para o caso da absorção) e do rendimento quântico (no caso da emissão) (Holmberg *et al.*, 2003).

O termo excímero é usado para designar uma espécie neutra formada no estado eletrônico excitado entre dois cromóforos idênticos. Essa palavra advém da língua inglesa, onde a junção das palavras “*excited*” e “*dimmer*” origina a

palavra “*excimer*” que significa “dímero excitado”. O excímero ocorre quando um par de moléculas idênticas que possuem interação repulsiva no estado eletrônico fundamental, mas se tornam atrativas se uma das moléculas for excitada. O termo exciplexo é semelhante ao excímero (do inglês a junção das palavras “*excited*” e “*complex*” que se transforma em “*exciplex*”), mas se refere a espécies moleculares diferentes onde esse par de moléculas possui interação repulsiva no estado eletrônico fundamental, mas vem a ser atrativa se uma delas for excitada (Lakowicz, 2006; Valeur, 2001).

Fluoróforos podem sofrer agregação (ou formação de complexos) quando diluídos em soluções líquidas. Essa agregação pode levar a uma supressão causada por agregação (ACQ do inglês *aggregation-caused quenching*) ou ainda levar fluoróforos que não emitem luz em solução a terem sua emissão induzida por agregação (AIE, do inglês *aggregation-induced emission*) (Ang *et al.*, 2019). Mais especificamente sobre o fenômeno AIE, sabe-se que é capaz de levar a uma ativação ou transformação da faixa de absorção e emissão de um fluoróforo, devido ao fenômeno da restrição das rotações intramoleculares (RRI). Uma vez que as moléculas que normalmente tem fluorescência apresentam diversos anéis aromáticos interligados com carbonos com ligações simples, é possível que esses anéis sofram rotação molecular quando em meio líquido (livre), e essa rotação das partes da molécula consomem a energia do estado excitado, permitindo que a energia possa decair rapidamente sem emissão, porém ao sofrer agregação as interações intramoleculares entre as moléculas potencialmente fluorescentes fazem com que as moléculas não consigam rotacionar (perdem grau de liberdade), fazendo com que as moléculas excitadas decaiam pelos canais radiativos, e isso leva ao aparecimento da fluorescência

ou o aumento do comprimento de onda onde a banda aparece. Esse mecanismo não é o único a acontecer, porém é o mais estudado e aceito na literatura (Leung *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2008).

Considerando que a luminescência em estado sólido pode ser aumentada por um estímulo externo (como o aumento de pressão, temperatura ou até mesmo da irradiação da luz), é possível a utilização de métodos que podem mudar a forma das moléculas de se empacotarem, porém sem a mudança na estrutura molecular (Ang *et al.*, 2019). Por todas essas características expostas até o momento, moléculas que tem potencial como sondas AIE são utilizadas para fabricação de OLEDs e tem grande potencial como material para sensores que são capazes de detectar desde vapores orgânicos até mesmo polímeros biológicos e pH em uma escala altamente sensível (Qin *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2014).

7.2. Materiais e equipamentos utilizados nos estudos com micelas

Para a realização dos estudos em micelas foram utilizadas soluções dos surfactantes Triton X-100 ($C_{16}H_{26}O_2$), CTAB ($C_{19}H_{42}BrN$), SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$), SDBS ($C_{18}H_{29}NaO_3S$), S8S ($C_8H_{17}O_4S$), realizadas e estudadas em água ultra-pura, além dos supressores N,N-dimetilanilina (NNDA) e naftaleno -2-carbonitrila (NCB). Para ajuste de pH das soluções foram utilizadas as soluções de 0,1M de HCl e NaOH.

Realizou-se espectroscopia de UV-Vis em um equipamento Perkin-Elmer, Lambda 35 (Massachusetts, EUA) em cubeta de quartzo de 10 mm. Realizaram-se os testes de fluorescência em um espectrômetro de fluorescência da Perkin-

Elmer, LS55 (Massachusetts, EUA) em cubeta de quartzo de 10 mm e velocidade de escaneamento de 200 nm/min. As medidas foram realizadas em comprimentos de onda de excitação e emissão dependente do tipo de amostra e serão especificados ao longo do trabalho. Para a realização das medidas de tempo de vida foi utilizado um equipamento Edinburgh Instruments, Mini-τ (Livingston, Escócia) em cubeta de quartzo de 10mm.

7.3. Métodos e procedimentos realizados nos estudos com micelas

7.3.1. Procedimento geral para a determinação do CMC de surfactantes

Primeiramente foram realizados testes preliminares contendo uma solução de aminoquinolina a 5 μ M em água e depois adicionado os surfactantes em diferentes concentrações (todos os detergentes se apresentavam em concentrações acima dos valores de CMC encontrados na literatura) para que fosse possível observar qual dos compostos respondia melhor no meio contendo micelas. Após essa primeira análise foi escolhida como a sonda a ser utilizada o composto AQ5.

Para cada detergente utilizado para os estudos (aniônico, catiônico ou neutro) foram feitas soluções estoques concentradas e depois feitas diluições em diferentes concentrações finais e adicionado AQ5 em uma concentração fixa para cada concentração de detergente. Cada uma das soluções foi medida por fluorescência do AQ5 em $\lambda_{exc}=375\text{nm}$ e $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$. Além disso, para fins comparativos foi utilizada a sonda fluorescente Coumarina-153, sendo essa uma molécula utilizada para determinação de CMC na literatura (Prazeres *et al.*,

2012) utilizando-se uma concentração fixa da sonda e variável dos surfactantes em $\lambda_{exc}=410\text{nm}$, $\lambda_{em}=450-700\text{nm}$.

Os experimentos foram realizados em cubeta de quartzo de 3mL e 10mm de caminho ótico a temperatura e atmosfera ambiente. A abertura de slits, sensibilidade da fotomultiplicadora e filtros de fluorescência para as medidas variaram dependendo do experimento e serão descritas nos gráficos dos resultados.

Além disso, para o AQ5 foram realizados experimentos de tempo de vida da sonda em diferentes concentrações de surfactantes para se observar se haveria ou não como encontrar o valor de CMC dos surfactantes a partir da mudança dos valores nos dados de tempo da molécula no meio sem e com a formação das micelas. Para os experimentos de tempo de vida foram utilizadas as mesmas soluções já descritas acima. A fonte de luz utilizada para a excitação foi $\lambda=340\text{nm}$, emitindo em $\lambda=475-575\text{nm}$ com duração de pulso nominal de pelo tempo de 100ns e contagem de 1000 fótons por segundo. Para os experimentos foi utilizada uma cubeta de quartzo de 3mL e 10mm de caminho ótico.

7.3.2. Estudo da nova banda de fluorescência por aumento de concentração do fluoróforo

Uma solução de concentração fixa do detergente SDS foi colocada com a aminoquinolina selecionada (AQ5) em concentrações variáveis por titulação sob constante agitação magnética e deixando a cada adição do fluoróforo por cerca de dois minutos para completa homogeneização da solução antes da leitura da fluorescência do sistema, sendo que para a mesma foram utilizadas os

parâmetros $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-700\text{nm}$. Os experimentos foram realizados em cubeta de quartzo de 3mL e 10mm de caminho ótico a temperatura e atmosfera ambiente. A abertura de slits, sensibilidade da fotomultiplicadora e filtros de fluorescência para as medidas variaram dependendo do experimento e serão descritas nos gráficos dos resultados.

7.3.3. Estudo da interação da aminoquinolina com detergentes alterando o pH do meio

Os estudos da aminoquinolina selecionada (AQ5) com SDS foi realizado alterando-se o pH do meio (os pHs utilizados foram: 4, 5, 6 7, 8 e 9), realizando-se as alterações em meio micelar e com a adição de HCl ou NaOH diluídos dependendo do caso. Em uma concentração fixa de AQ5 e SDS foram realizadas medidas de fluorescência estacionária utilizando-se dois parâmetros diferentes: $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-700\text{nm}$ e $\lambda_{exc}=445\text{nm}$, $\lambda_{em}=470-700\text{nm}$. Os experimentos foram realizados em cubeta de quartzo de 3mL e 10mm de caminho ótico a temperatura e atmosfera ambiente. A abertura de slits, sensibilidade da fotomultiplicadora e filtros de fluorescência para as medidas variaram dependendo do experimento e serão descritas nos gráficos dos resultados.

7.3.4. Estudos de supressão da fluorescência da aminoquinolina em meio micelar e determinação do N_{agg} de surfactantes

Primeiramente a sonda fluorescente e o surfactante são colocados juntos e ambos em uma concentração fixa e em meio aquoso de tal forma que a concentração do surfactante esteja acima de CMC (o que dá ao fluoróforo o seu

máximo de fluorescência), parâmetros esses determinados para cada caso a partir das análises dos gráficos obtidos em experimentos anteriores. Essa mistura foi deixada em constante agitação magnética por dois minutos para completa homogeneização antes da leitura de fluorescência. Após a primeira leitura foram colocadas concentrações variáveis do supressor de fluorescência por titulação; para cada adição do supressor a solução era deixada em constante agitação magnética por dois minutos para completa homogeneização antes da leitura da intensidade de fluorescência. Os valores de fluorescência no máximo de emissão foram utilizados para se encontrar a eficiência da supressão pelo método da constante de Stern-Volmer (já descrito no Item 6.3.1, Equação 23).

Os valores de número de agregação (N_{agg}) dos surfactantes do estudo foram obtidos pelo método de supressão de fluorescência estacionária de uma sonda fluorescente, realizando os experimentos como descrito acima. Os valores de fluorescência no máximo de emissão foram utilizados para se encontrar a concentração de micelas em solução, $[mic]$, como descrito pela equação abaixo (Equação 28):

$$\ln \frac{I_0}{I_Q} = \frac{[Qmic]}{[mic]} \quad (\text{Equação 28})$$

Onde:

I_0 é a intensidade máxima de emissão da sonda fluorescente em ambiente micelar antes da adição do supressor

I_Q é a intensidade no mesmo comprimento de onda máximo com a adição de cada concentração de supressor

$[Qmic]$ é a concentração total do supressor ao final cada adição

Com esses valores é possível a construção de um gráfico onde serão colocados os valores de $\ln \frac{I_0}{I_Q}$ vs $[Q_{mic}]$ e onde a partir da regressão linear dele é possível encontrar o valor de $[mic]$. O valor de $[mic]$ será utilizado para o cálculo do valor de N_{agg} pela equação 29:

$$N_{agg} = \frac{[S_{tot}] - cmc}{[mic]} \quad (\text{Equação 29})$$

Onde:

cmc é o valor da concentração molar crítica encontrada com a sonda fluorescente em estudo

$[S_{tot}]$ é a concentração total de surfactante utilizado para a medida

Para a utilização dessas equações é necessário assumir algumas considerações: 1) não ocorre a migração da sonda nem do supressor, 2) a supressão é efetiva e advém apenas do sistema micela+sonda, 3) as concentrações de sonda e de supressor apresentam uma distribuição randômica no sistema micelar e 4) as moléculas de sonda e supressor têm que ser suficientemente pequenas para serem agregadas e absorvidas pelas micelas. Assim, utilizamos as equações como apresentadas, assumindo as considerações apresentadas ao avaliar os dados experimentais. Além das considerações já apresentadas, tem que se ter em mente que a utilização da primeira equação (Equação 28) só é possível se imaginarmos uma mistura perfeita entre o supressor e as micelas, e que a concentração total de supressor adicionada se encontra dentro da micela. Além disso, os supressores não podem

formar micelas, o que não acontece com as moléculas utilizadas nesse trabalho (Stam, Van, Depaemelaere e Schryver, De, 1998; Tummino e Gafni, 1993; Turro e Yekta, 1978).

7.4. Resultados e discussão dos estudos com micelas

7.4.1. Determinação do CMC de surfactantes

Primeiramente foi realizado ensaios preliminares para identificar qual seria a aminoquinolina mais satisfatória para os estudos de detecção de CMC para diferentes surfactantes. Os experimentos foram realizados em água ultrapura, onde foi avaliado a fluorescência do composto livre em uma concentração de 5 μ M e quando adicionado os surfactantes em concentrações acima de seus valores de CMC já encontrados na literatura (Figura 46) (Bielska, Sobczyńska e Prochaska, 2009; Goldsipe e Blankschtein, 2005; Lavkush Bhaisare *et al.*, 2015; Lin, H. *et al.*, 2017; Pérez-Rodríguez *et al.*, 1998; Shi, Luo e Li, 2011; Singh, Kaur e Mahajan, 2017; Tehrani-Bagha, Singh e Holmberg, 2013; Vasu e Kanvah, 2017). A partir dos gráficos foram obtidos os valores de área abaixo da curva para fins comparativos e para escolher qual sonda seria a mais adequada para os estudos com os surfactantes; os valores obtidos estão na Figura 46 e Tabela 19. Na Figura 45 abaixo são mostradas as estruturas de cada surfactante.

Figura 45. Estruturas dos surfactantes utilizados no trabalho. a) SDS, b) SDBS, c) S8S, d) CTAB, e) Triton X-100 (Obtido e adaptado de: ("PubChem", [s.d.]).

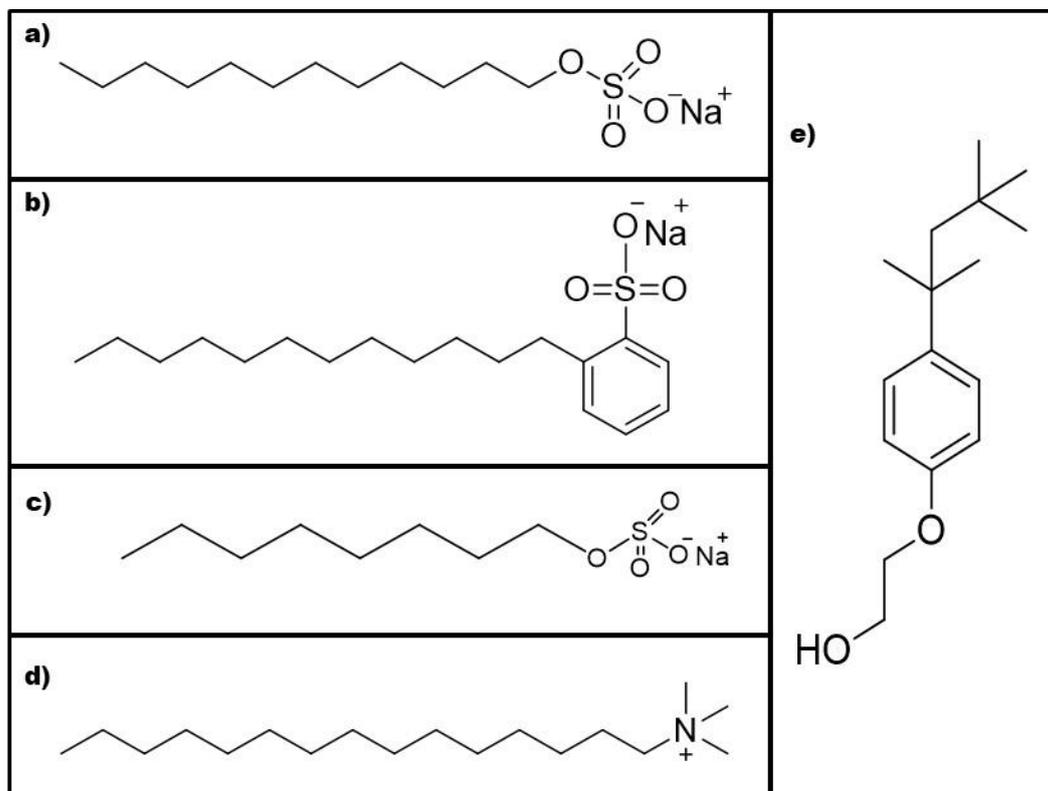


Figura 46. Fluorescência das aminoquinolinas e coumarina-153 em meio aquoso na ausência e presença de surfactantes. a) $\lambda_{exc}=350\text{nm}$, $\lambda_{em}=370\text{-}450\text{nm}$, de b a f) $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400\text{-}650\text{nm}$, g) $\lambda_{exc}=410\text{nm}$, $\lambda_{em}=450\text{-}700\text{nm}$. Todos os experimentos foram realizados com a abertura de slits em 5mm e filtro atenuador de 92%. As concentrações de surfactantes estão acima de seus CMCs.

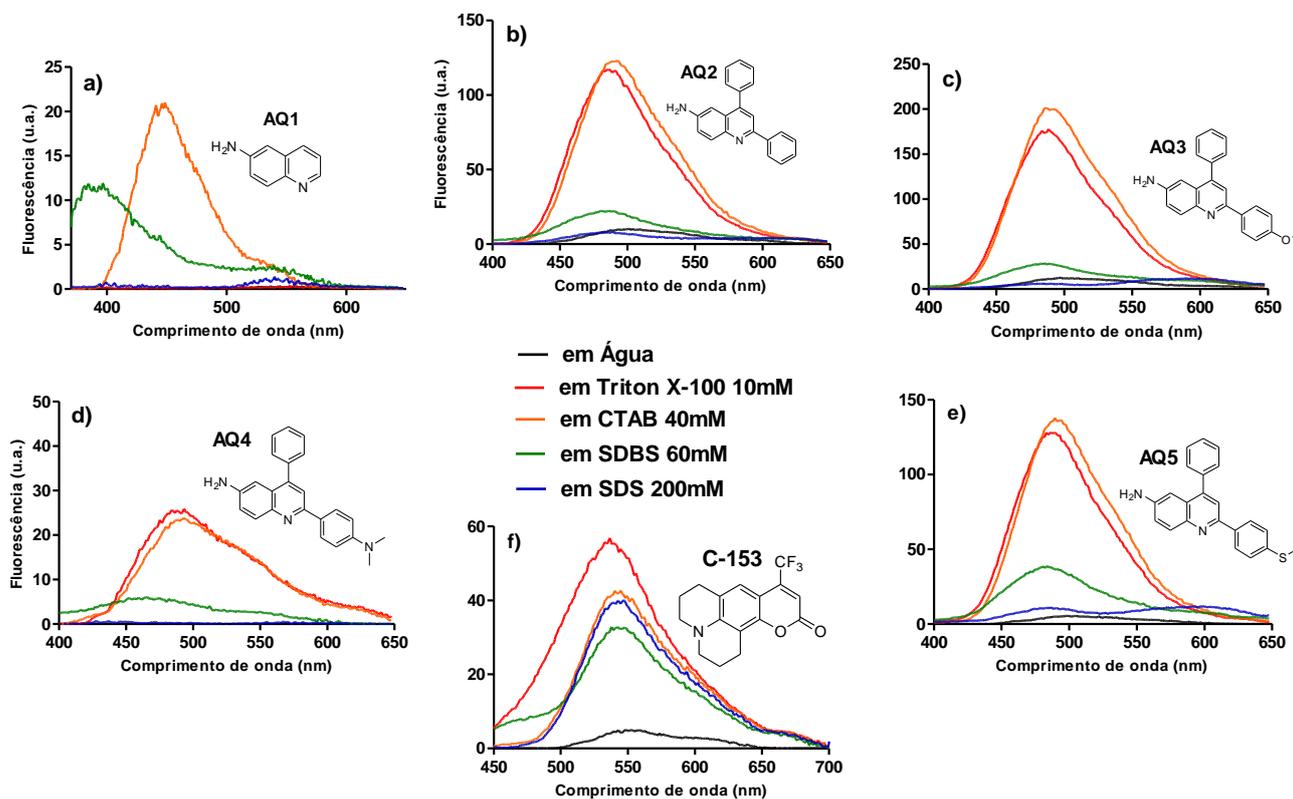


Tabela 19. Fluorescência integrada (AUC) das aminoquinolinas na ausência e presença de surfactantes.

	AQ1	AQ2	AQ3	AQ4	AQ5	C-153
H₂O	28	983	1325	3	499	408
TX-100	34	9788	14936	2678	10747	5782
CTAB	1483	10439	17144	2501	11499	3931
SDBS	1046	2339	3242	697	3922	3376
SDS	106	992	1535	45	1922	3612

A partir da análise dos dados na Figura 46 e Tabela 19 concluímos que o AQ5 foi a sonda mais adequada para estes estudos. Além de apresentar um significativo aumento de fluorescência quando comparado ao meio sem surfactante, apresentou também os valores mais altos para os surfactantes negativos (SDS e SDBS), que de modo geral apresentarem uma queda do rendimento quântico das aminoquinolinas nesse meio.

Assim sendo, iniciou-se os experimentos de determinação de CMC de surfactantes utilizando-se AQ5 como sonda e comparando-se o seu desempenho com o da sonda Coumarina-153 (Figura B- 4, Anexo B) como padrão. Como visto anteriormente as fluorescências em detergentes negativos são menores e então se iniciou os estudos com os detergentes neutros e positivos, e os resultados podem ser observados nas Figura 47 a Figura 52.

Figura 47. Determinação do CMC do Triton X-100 com AQ5 ($5\mu\text{M}$) por fluorescência em estado estacionário. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de Triton X-100 (0, 25, 50, 75, 100, 150, 250, 300, 320, 340, 350, 400, 500, 600, 750, 1000, 2000, 4000, 8000, em μM), utilizando-se de $\lambda_{\text{exc}}=375\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=400\text{-}650\text{nm}$, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700; b) Curva do aumento da fluorescência máxima relativa ao aumento da concentração de Triton no meio para a determinação do CMC do surfactante neutro (dados de máximo de fluorescência retirados do gráfico a).

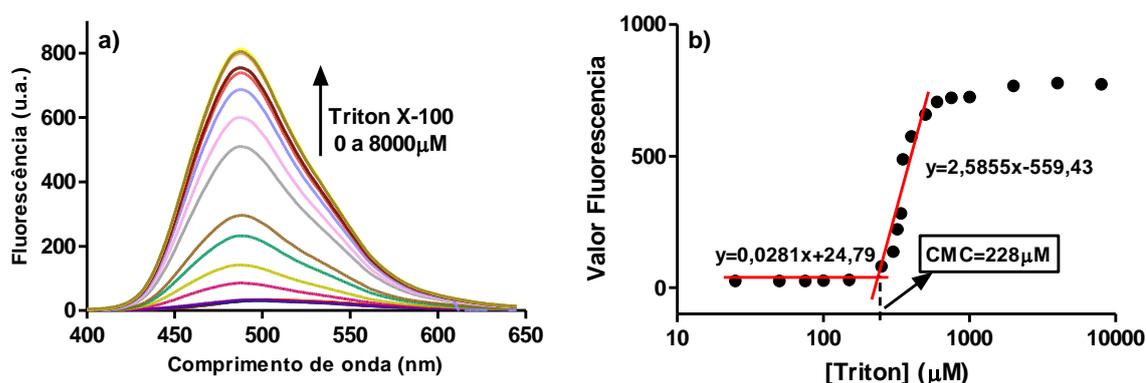


Figura 48. Determinação do CMC do Triton X-100 com AQ5 ($5\mu\text{M}$) por fluorescência resolvida no tempo. a) Gráfico representativo de curvas de tempo de vida de fluorescência do AQ5 com aumento da concentração do Triton X-100 (0, 200, 250, 500, 2000, em μM) com $\lambda_{\text{exc}}=340\text{nm}$, com contagem de 10000 fótons em 100ns; b) Curva do aumento do tempo de vida relativo ao aumento da concentração de Triton no meio para a determinação do CMC do surfactante neutro (dados de tempo de vida retirados do gráfico a).

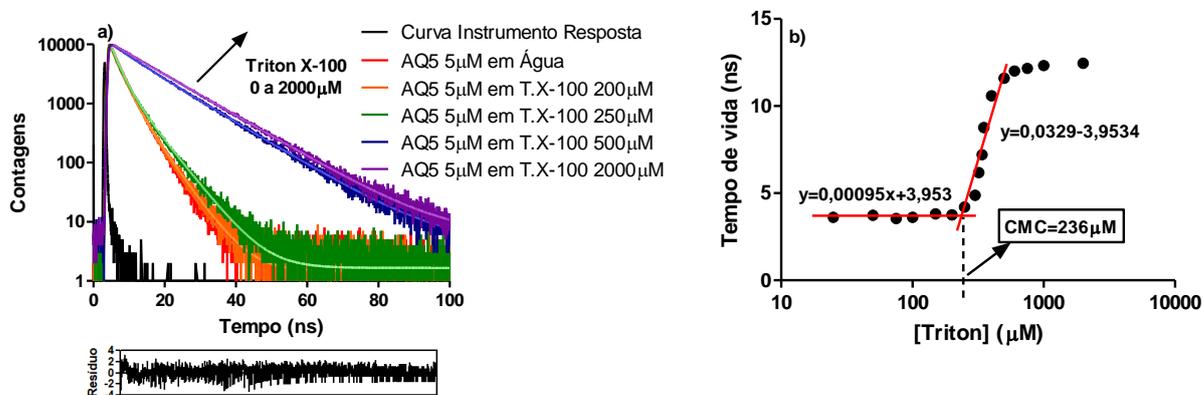


Figura 49. Determinação do CMC do CTAB com AQ5 ($5\mu\text{M}$) por fluorescência em estado estacionário. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de CTAB (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0; 1,1; 1,3; 1,5; 2,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 em mM), utilizando-se de $\lambda_{\text{exc}}=375\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=400\text{-}650\text{nm}$, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700; b) Curva do aumento da fluorescência máxima relativa ao aumento da concentração de CTAB no meio para a determinação do CMC do surfactante positivo (dados de máximo de fluorescência retirados do gráfico a).

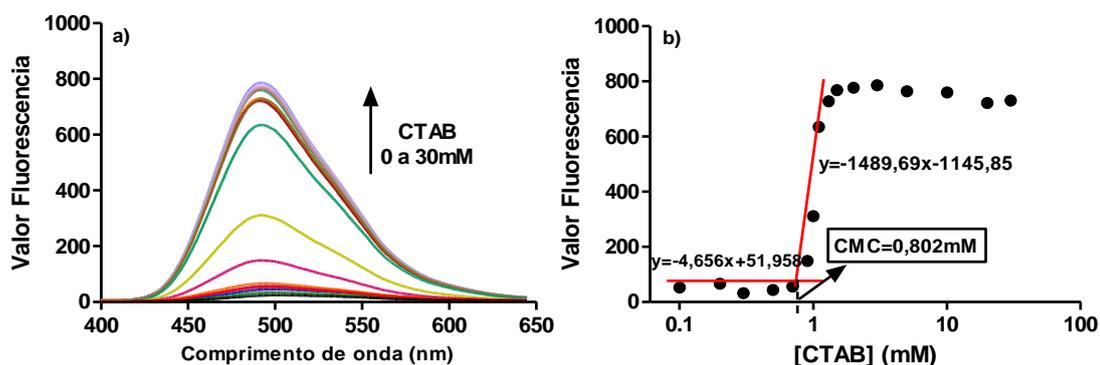


Figura 50. Determinação do CMC do CTAB com AQ5 ($5\mu\text{M}$) por fluorescência resolvida no tempo. a) Gráfico representativo de curvas de tempo de vida de fluorescência do AQ5 com aumento da concentração do CTAB (0, 1000, 1500, 30000, em μM) com $\lambda_{\text{exc}}=340\text{nm}$, com contagem de 10000 fótons em 100ns; b) Curva do aumento do tempo de vida relativo ao aumento da concentração de CTAB no meio para a determinação do CMC do surfactante positivo (dados de tempo de vida retirados do gráfico a).

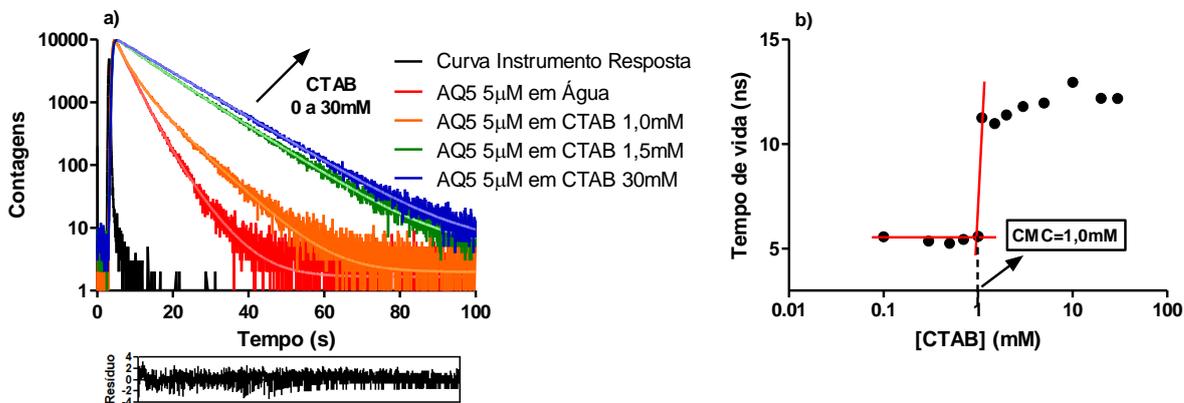


Figura 51. Determinação do CMC do SDBS com AQ5 ($5\mu\text{M}$) por fluorescência em estado estacionário. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de SDBS (0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 40,0; 60,0 em mM), utilizando-se de $\lambda_{\text{exc}}=375\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=400\text{-}650\text{nm}$, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 750; b) Curva do aumento da fluorescência máxima relativa ao aumento da concentração de SDBS no meio para a determinação do CMC do surfactante negativo (dados de máximo de fluorescência retirados do gráfico a).

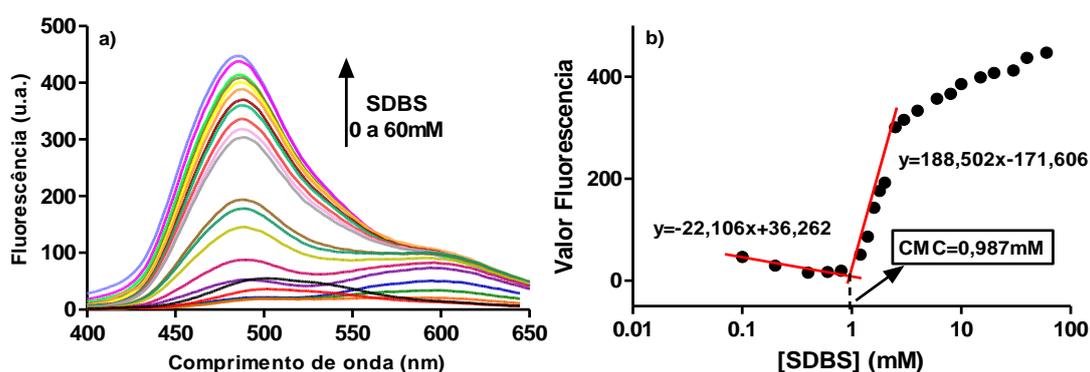
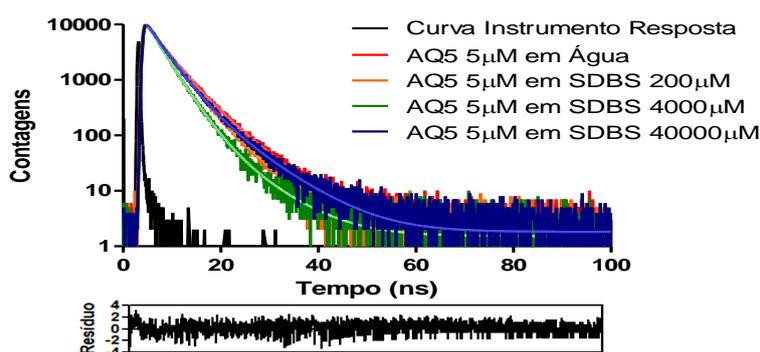


Figura 52. Determinação do CMC do SDBS com AQ5 ($5\mu\text{M}$) por fluorescência resolvida no tempo. Gráfico representativo de curvas de tempo de vida de fluorescência do AQ5 com aumento da concentração do SDBS (0,0; 0,2; 4,0; 40,0; em mM) com $\lambda_{\text{exc}}=340\text{nm}$, com contagem de 10000 fótons em 100ns



Como pode ser observado na Figura 52 não foi possível determinar o CMC do SDBS pelos dados de tempo de vida em relação ao aumento da concentração devido a não haver aumento tempo de vida do AQ4

independentemente da concentração de SDBS. Assim sendo, foi realizado uma nova tentativa de determinar o CMC de outros detergentes negativos, o SDS e o S8S, conforme pode ser observado nas Figura 53 e Figura 54.

Figura 53. Determinação do CMC do S8S com AQ5 (5 μ M) por fluorescência em estado estacionário. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de S8S (0, 40, 80, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 160 e 200 em mM), utilizando-se de $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700;

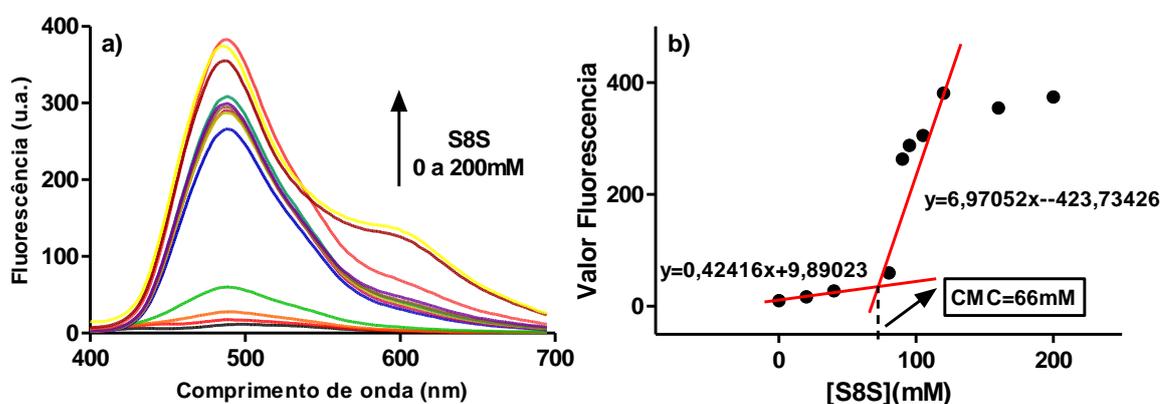
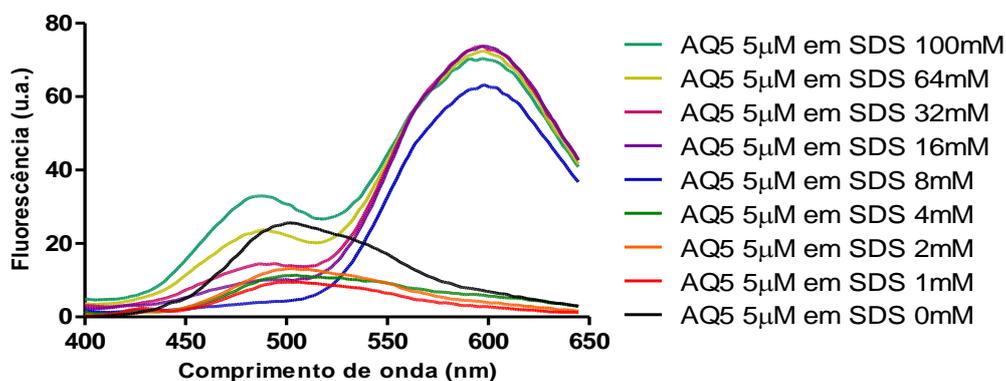
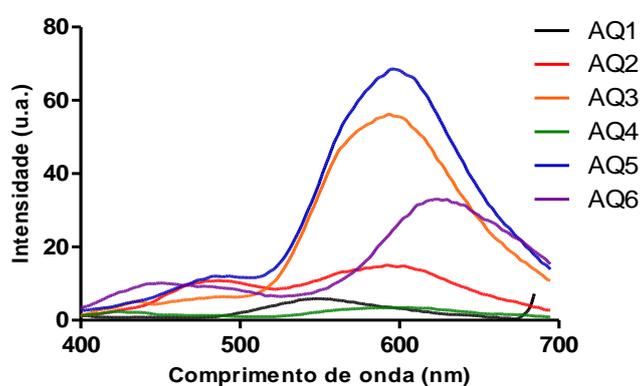


Figura 54. Determinação do CMC do SDS com AQ5 (5 μ M) por fluorescência em estado estacionário. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de CTAB (0, 1000, 2000, 4000, 8000, 1600, 3200, 6400, 100000, em μ M), utilizando-se de $\lambda_{exc}=375\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-650\text{nm}$, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700;



Como pode ser observado em Figura 51, Figura 53 e Figura 54 o AQ5 apresenta um novo máximo de banda próximo de 600nm, sendo que o SDS essa banda mais deslocada se apresentou a mais intensa entre os casos. Assim, com intuito de reforçar a escolha da sonda AQ5 e compreender o aparecimento dessa nova banda, avaliou-se a intensidade da mesma usando as outras aminoquinolinas sintetizadas em uma concentração fixa de detergente SDS de 10mM. Os resultados apresentados na Figura 55 confirmando mais uma vez que a AQ5 é a sonda mais adequada para este estudo.

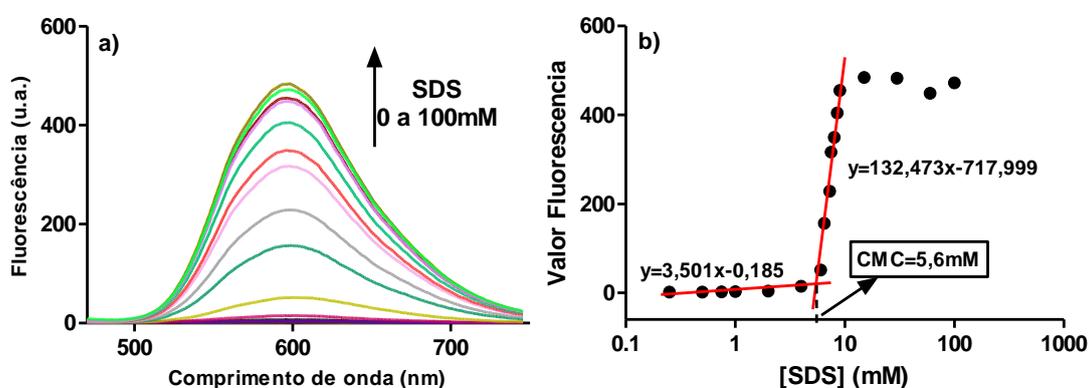
Figura 55. Fluorescências de diferentes aminoquinolinas (5 μ M) em SDS 10mM, em estado estacionário, utilizando-se de $\lambda_{exc}=375$ nm, $\lambda_{em}=400-650$ nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700.



A fim de obter melhor entendimento sobre essa nova banda de fluorescência foram realizados experimentos para obtenção de espectro de excitação do AQ5 em SDS 20mM, fixando a emissão em 597nm e varrendo a excitação entre 300-580nm (Figura B- 5 do Anexo B), e a partir de sua análise foi observado o aparecimento de 3 bandas onde o máximo de excitação se dava nos seguintes valores: $\lambda = 334, 371$ e 443nm. Vale ressaltar que esta banda em

443nm não existe para nenhuma das aminoquinolinas estudadas em solventes ou em micelas positivas ou neutras, ou seja, a presença de micelas de surfactante negativo promoveu o aparecimento de algum complexo com novas características fotofísicas. Na sequência foi fixado a excitação em 443nm e obtido o espectro de emissão entre 470-700nm. A Figura 56 mostra claramente a formação dessa nova banda de fluorescência e que sua formação é dependente da formação de micela de SDS, além de apresentar um aumento da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de SDS e assim tem como potencial utilização a obtenção do CMC do SDS a partir dos valores de fluorescência, como pode ser observado na Figura 56.

Figura 56. Determinação do CMC do SDS com AQ5 (5 μ M) por fluorescência em estado estacionário. a) Espectro de emissão de fluorescência obtidos com o aumento da concentração de SDS (0, 250, 500, 750, 1000, 2000, 4000, 6000, 6500, 7250, 7500, 8000, 8500, 9000, 15000, 30000, 60000, 100000, em μ M), utilizando-se de $\lambda_{exc}=445$ nm, $\lambda_{em}=470-700$ nm, com 7,5mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700; b) Curva do aumento da fluorescência máxima relativa ao aumento da concentração de SDS no meio para a determinação do CMC do surfactante negativo (dados de máximo de fluorescência retirados do gráfico a).



Os resultados das interações de AQ5 com surfactante aniônico são diferentes daqueles dos surfactantes catiônico e neutro. A Figura 57(a) mostra o espectro de fluorescência do AQ5 em diferentes micelas (TX-100, CTAB, SDBS e SDS) em comparação com outros solventes como diclorometano, acetonitrila (ACN) e dimetilsulfóxido (DMSO). Como pode ser observado, em SDS, além da banda com máximo em 480nm, uma nova banda aparece próximo de 596nm. Esse valor é cerca de 110nm maior (deslocado para o vermelho) comparado com as bandas de fluorescência observadas em TX-100 (486nm), CTAB (489nm), diclorometano (440nm), ACN (461nm), DMSO (485nm). Em um primeiro momento pode parecer que essa diferença pode ser devido a uma diferença na hidrofobicidade da micela, porém, ao observar os valores de constante dielétrica, essa nova banda observada não pode ser explicada pelas diferenças de propriedades físico-químicas. Na verdade, mesmo em solventes com grande diferença dielétrica como por exemplo o diclorometano ($\epsilon=8,9$) e DMSO ($\epsilon=47$), o deslocamento espectral é de 45nm. Para as micelas, as constantes dielétricas encontradas para os detergentes são: SDS ($\epsilon=38$), CTAB (30) e TX-100 (28) (Iwunze, 2005; Zacharlasse, Phuc, Van e Kozankiewicz, 1981). Assim, apenas a hidrofobicidade do meio onde AQ5 está inserido não explica esse grande deslocamento batocrômico de sua banda.

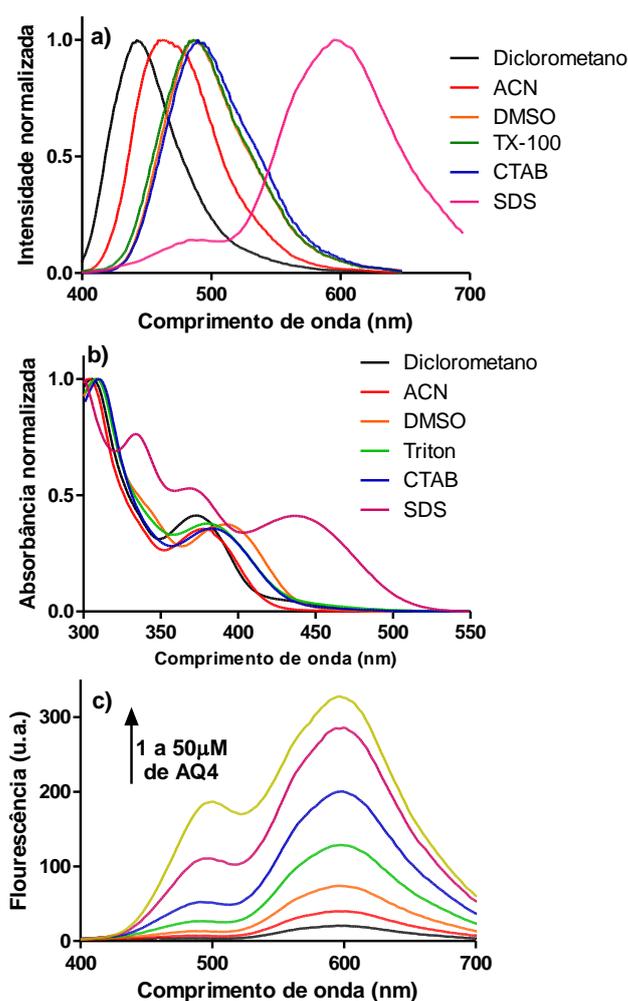
Além disso, esse grande deslocamento não é exclusivo para o AQ5, todas as aminoquinolinas sintetizadas apresentaram essa característica (como já observado e discutido na Figura 55). Além disso, é observado para outras micelas negativas como o SDBS e o S8S (sendo nesse caso a banda deslocada não é tão significativa como nos outros detergentes negativos). Esses resultados

sugerem uma interação iônica específica entre as micelas negativas e AQs, que resulta nessa banda deslocada batocrômica.

Como essa nova banda não está relacionada à hidrofobicidade do SDS, uma explicação possível pode ser a presença de um dímero de estado excitado (excímero) ou um complexo de transferência de carga excitada (exciplexo). No caso do excímero, nossos resultados são opostos aos esperados. Por exemplo, o fenômeno de emissão de excímero induzida por agregado (AIE) já foi discutido na literatura para sondas fluorescentes em ambientes micelares (Gao e Tang, 2017; Hussain *et al.*, 2018). Nesses casos, a incorporação dessas sondas nas micelas promove uma “diluição” e sua consequente desagregação. Nesses casos, a espectroscopia resulta no desaparecimento da banda de fluorescência de comprimento de onda maior quando a sonda está incorporada na micela. Aqui, o oposto é observado, ou seja, o aparecimento de uma nova banda de maior comprimento de onda ocorre. Em outra perspectiva relacionada à formação de excímeros em solução, bandas de comprimento de onda maiores aparecem em altas concentrações de fluoróforo, que aumenta a probabilidade de formação de dímeros e consequentemente excímeros (Iwunze, 2005; Zacharlasse, Phuc, Van e Kozankiewicz, 1981). Novamente, nossos resultados não apresentam essa característica uma vez que a banda de maior comprimento de onda é dependente da concentração, como pode ser observado na Figura 57 (c), a banda deslocada aparece em concentrações de 1 a 50 μM . Por fim a formação de um exciplexo também é descartada uma vez que uma nova banda é observada também no estado fundamental; a Figura 57 (b) mostra a absorção de AQ5 em SDS, TX-100 e CTAB em comparação com outros solventes e o que

é observado novamente é o aparecimento de uma nova banda com máximo próximo a 445nm, que não é observado em nenhum outro caso.

Figura 57. Gráficos de medidas espectroscópicas para o estudo da nova banda em detergentes negativos. a) Gráfico comparativo de fluorescência normalizada das bandas de detergentes com as bandas para solvente de AQ5 (em todos os casos, AQ5 5 μ M, λ_{exc} 375nm, λ_{em} =400-700nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700), b) Gráfico comparativo de UV-Vis para AQ5 (30 μ M) em detergentes (realizando varredura de λ =300 a 550nm), c) Gráfico de fluorescência mostrando o comportamento da banda de AQ5 aumentando sua concentração em SDS 20mm (concentrações utilizadas, 1; 2; 4; 8; 15; 30 e 50 μ M), utilizando-se de λ_{exc} =445nm, λ_{em} =470-700nm, com 7,5mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700



Em resumo, as aminoquinolinas, em particular AQ5, podem ser utilizadas para determinação de CMC de surfactantes. Os resultados apresentados na Tabela 20 mostram os valores obtidos para o AQ5, C-153 (usada como referência) e valores descritos na literatura utilizando diferentes metodologias.

Tabela 20. Tabela comparativa entre os resultados obtidos com AQ5 em relação a sonda de referência Coumarina-153 e com os resultados encontrados na literatura com outros métodos de obtenção dos resultados

	AQ5 (Fluorescência em estado estacionário)	AQ5 (Fluorescência resolvida no Tempo)	C-153 (Fluorescência em estado estacionário)	Literatura
TX-100	228 μ M*	236 μ M	475 μ M	200 μ M ¹ , 210 μ M ² , 224 μ M ³ , 190 μ M ³
CTAB	802 μ M*	1000 μ M	873 μ M	980 μ M ⁴ , 890 μ M ⁵ ,
SDBS	987 μ M*	---	878 μ M	1,2mM ⁴ , 1,2mM ⁶ , 1,25mM ⁵
S8S	66mM*	---	---	155mM ⁸ , 134mM ⁹
SDS	5,6mM**	---	5,8mM	8,1mM ² , 8,1mM ⁴ , 7,3mM ³ , 7,91 ⁷

¹Fluorescência sincronizada, ²Índice de refração, ³Deslocamento de Stokes. ⁴Condutância, ⁵Espalhamento de luz Rayleigh, ⁶Tensão superficial, ⁷Constante dielétrica, ⁸Viscosidade, ⁹Fluorescência (pireno). * λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650, ** λ_{exc} =445nm, λ_{em} =470-700nm

Assim sendo, é necessário maiores investigações sobre o efeito de detergentes negativos sobre as aminoquinolinas, porém o AQ5 se apresentou potencial como sonda para a determinação de CMC de detergentes.

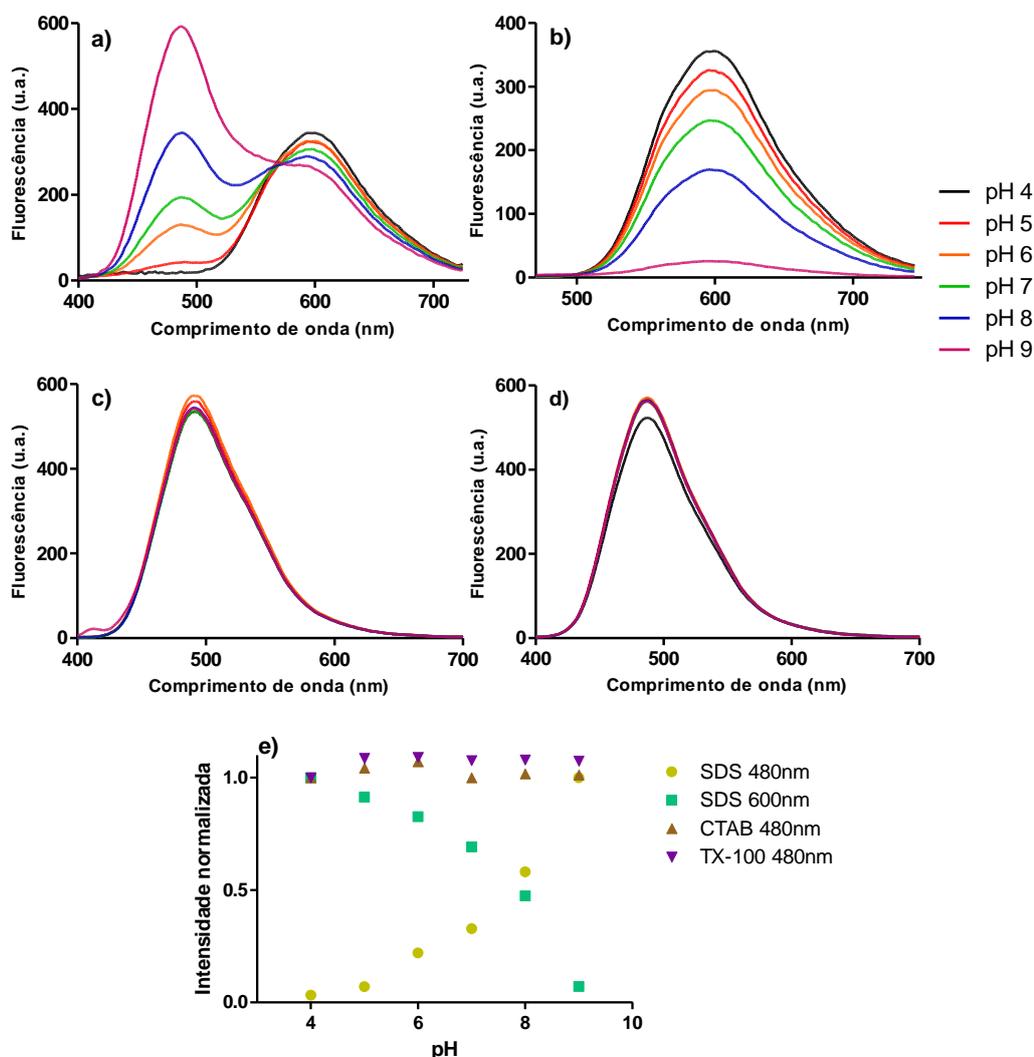
7.4.2. Estudo da interação da aminoquinolina com SDS

Após a observação do aparecimento da nova banda de forma muito intensa para o SDS, novos experimentos começaram a ser realizados a fim de se compreender melhor a interação entre a aminoquinolina (nesse caso para os estudos foi utilizada apenas AQ5) com SDS, uma vez que como já discutido anteriormente não se trata de um complexo formado em estado excitado e sim ainda no estado fundamental que acarreta o aparecimento da nova banda de absorbância e fluorescência. Uma forma de avaliação foi a alteração do pH do meio para os detergentes tanto dos de carga positiva e neutra (CTAB e TX-100, respectivamente) como para o de carga negativa para assim poder observar se haveria alguma modificação para o caso do SDS.

Antes da apresentação do resultado em gráficos, é interessante lembrar que o pKa das aminoquinolinas tem valores baixos, em torno de 4.0 a 6.0, pois apesar de não termos realizado a determinação experimentalmente, sabe-se que esses são os valores para as quinolinas e naftilaminas (Perrin, 1964; Schulman, 1971; Yasuda *et al.*, 2013), além dos valores para o grupo amina e piridina isoladamente serem próximos a esse valor (Figura B-6, do Anexo B). Assim, a molécula de AQ5 em meio neutro deve estar totalmente desprotonada, mas a probabilidade de mudança e protonação nesse caso é um fato importante nesse caso, uma vez que é possível observar a relação entre a banda com o

máximo em maiores comprimentos de onda de emissão e as micelas negativas, ou seja, é possível que a carga positiva de AQ5 esteja influenciando a formação do complexo. Os resultados obtidos estão dispostos de forma resumida na Figura 58.

Figura 58. Estudos fluorescência de AQ5 em micelas com alteração de pH. a) Espectro de fluorescência de AQ5 (5 μ M) em SDS (20mM) alterando o pH de 4 a 9 (λ_{exc} =375nm, λ_{exc} =400-750nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700), b) Espectro de fluorescência de AQ5 (5 μ M) em SDS (20mM) alterando o pH de 4 a 9 (λ_{exc} =445nm, λ_{exc} =470-750nm, com 7,5mm de abertura de slits, sem filtro de corte e fotomultiplicadora em 700), c) Espectro de fluorescência de AQ5 (5 μ M) em CTAB (6mM) alterando o pH de 4 a 9 (λ_{exc} =375nm, λ_{exc} =400-700nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700), d) Espectro de fluorescência de AQ5 (5 μ M) em Triton X-100 (4mM) alterando o pH de 4 a 9 (λ_{exc} =375nm, λ_{exc} =400-700nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700), d) Gráfico comparativo de fluorescência normalizada para os resultados obtidos



A Figura 58 (a) mostra que uma alteração no pH do meio quando AQ5 no meio de SDS é excitado em 375nm, com o aumento do pH é observado um aumento da banda com o máximo em 480nm e uma diminuição da banda com o máximo em 600nm de emissão. Quando olhamos a excitação em 445nm (Figura 58,b) o comportamento de diminuição da intensidade de banda com o aumento do pH do meio se mantém. Uma análise da Figura 58 (c e d) mostra que esse comportamento de aumento ou diminuição da banda em função da mudança de pH não acontece para CTAB ou TX-100. Os resultados comparativos normalizados encontram-se na Figura 58 (e) e é possível observar a grande diferença entre os fenômenos que ocorrem em cada caso, mostrando que o AQ5 provavelmente não interage com detergentes positivos ou neutros de tal forma que suas cargas seriam determinantes ou sensível ao pH do meio onde estão inseridos. Já para o SDS um efeito comparativamente grande ocorre com a alteração do pH do meio, muito provavelmente pelo fato do aumento o pH ocasionar uma desprotonação da molécula de AQ5, o que causa uma diminuição da intensidade de interação entre o AQ5 e SDS, o que enfraquece a formação do complexo que é formado por forças eletrostáticas entre a carga negativa do detergente e a carga positiva da aminoquinolina. A não formação do complexo faz com que a banda com maiores comprimentos de onda de emissão diminua sua intensidade, uma vez que essa banda é ocorrência da formação do complexo. Esses resultados corroboram novamente com observação da formação de um complexo entre AQ5 e SDS.

7.4.3. Estudos de supressão da fluorescência da aminoquinolina em meio micelar e determinação do N_{agg} de surfactantes

Os estudos para a determinação do número de agregação dos surfactantes foram iniciados com os estudos de supressão de fluorescência, uma vez que a partir dessa supressão efetiva que é possível o cálculo desse parâmetro das micelas. Assim, considerando que as aminoquinolinas são susceptíveis a terem sua fluorescência suprimida por PET (Jiang *et al.*, 2019) foram utilizados como supressores para o estudo o NNDA (que é uma molécula doadora de elétrons) e o NCB (molécula aceitadora de elétrons) (Lakowicz, 2006; McMurry, 2016) e os resultados podem ser observados em Figura 59 e Figura 60 abaixo (os gráficos representativos para o experimento realizado com DMF se encontra na Figura B-7 do Anexo B).

Figura 59. Gráficos de supressão de fluorescência de AQ4 em diferentes micelas por aumento da concentração de NNDA (0, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 μ M), a) TX-100 (4mM) (λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm), b) CTAB (6mM) (λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700), SDS (20mM) (λ_{exc} =445nm, λ_{em} =400-750nm, com 7,5mm de abertura de slits, sem filtro de corte e fotomultiplicadora em 700). d) Estudo das intensidades de fluorescência normalizada para comparação do decaimento em diferentes ambientes.

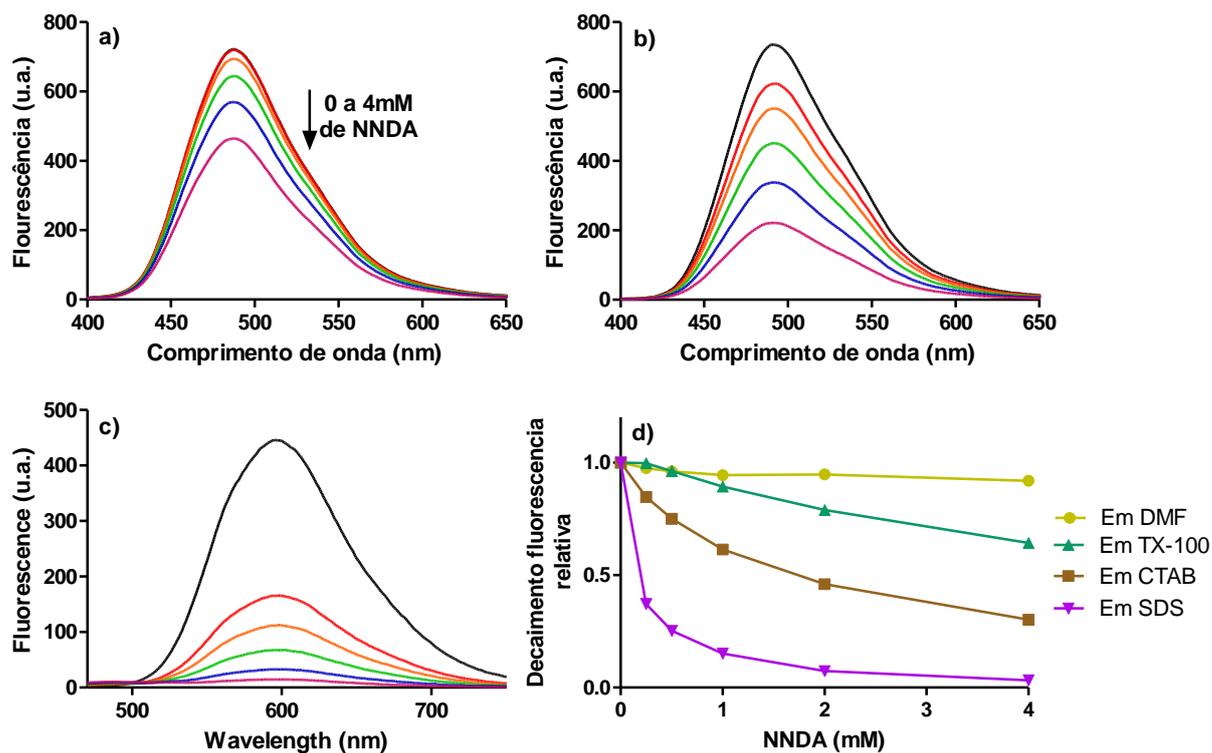
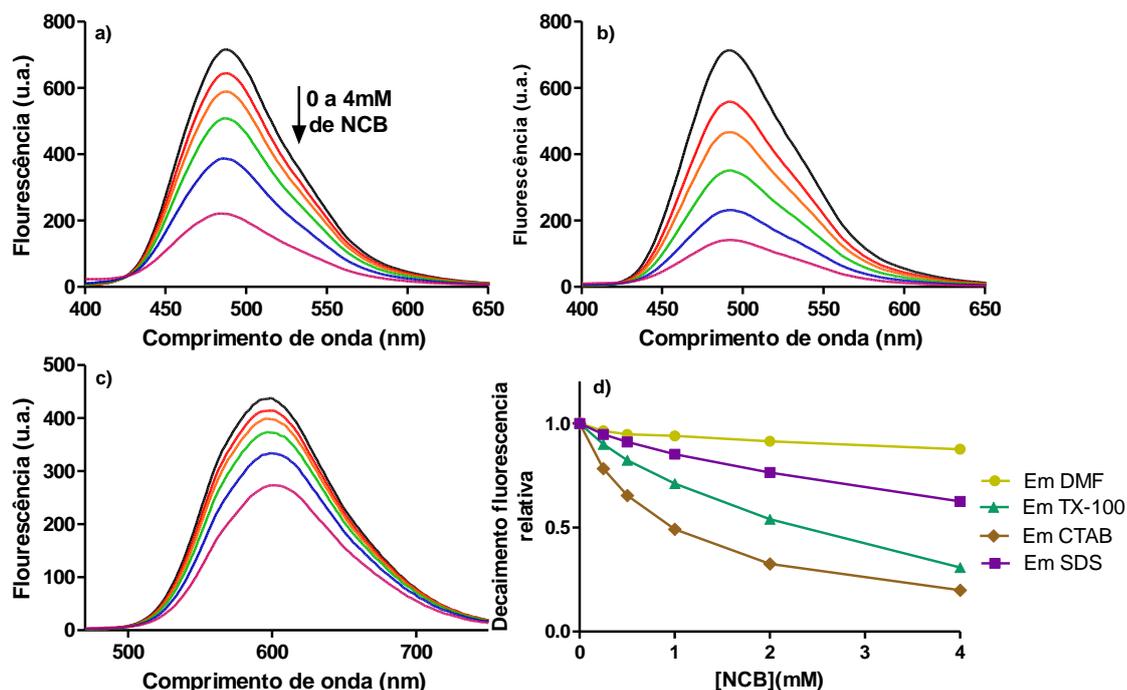


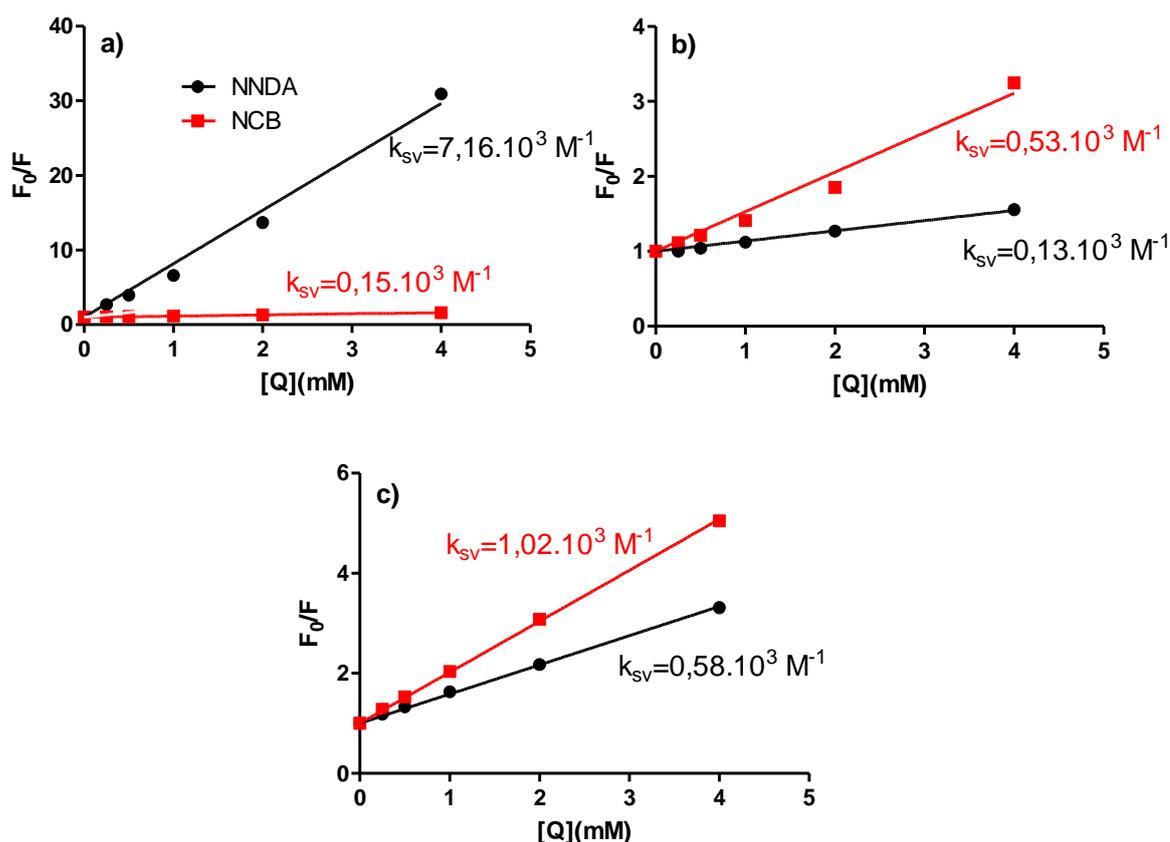
Figura 60. Gráficos de supressão de fluorescência de AQ4 em diferentes micelas por aumento da concentração de NCB (0, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 μ M), a) TX-100 (4mM) (λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm), b) CTAB (6mM) (λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700), SDS (20mM) (λ_{exc} =445nm, λ_{em} =400-750nm, com 7,5mm de abertura de slits, sem filtro de corte e fotomultiplicadora em 700). d) Estudo das intensidades de fluorescência normalizada para comparação do decaimento em diferentes ambientes.



Os resultados mostram que a supressão de fluorescência ocorre mais eficientemente para os meios micelares do que para o solvente (DMF), isso é devido as moléculas de supressores serem incorporadas às micelas, provocando uma concentração local maior e aumentando assim a eficiência da interação entre o doador e o aceitador da PET. Outro fenômeno interessante que pode ser observado é que parece haver uma inversão da eficiência de supressão ao compararmos a micela negativa (SDS) com as outras micelas (TX-100 e CTAB), assim NNDA apresentou uma supressão maior para o SDS e o NCB

apresentou melhores resultados nesse quesito para o CTAB e TX-100. Para um estudo mais detalhado, os valores de constante de Stern-Volmer (K_{sv}) (equação mostrada no item 6.3.1) foram calculados e comparados, como pode ser observado na Figura 61 abaixo.

Figura 61. Determinação da eficiência de supressão de fluorescência pelo método gráfico para cálculo do K_{sv} , a) para SDS (utilizando 20mM de detergente + AQ5 5 μ M) e supressores (NNDA e NCB) em concentração de 0 a 4mM, b) para TX-100 (utilizando 4mM de detergente + AQ5 5 μ M) e supressores (NNDA e NCB) em concentração de 0 a 4mM, c) para CTAB (utilizando 6mM de detergente + AQ5 5 μ M) e supressores (NNDA e NCB) em concentração de 0 a 4mM)



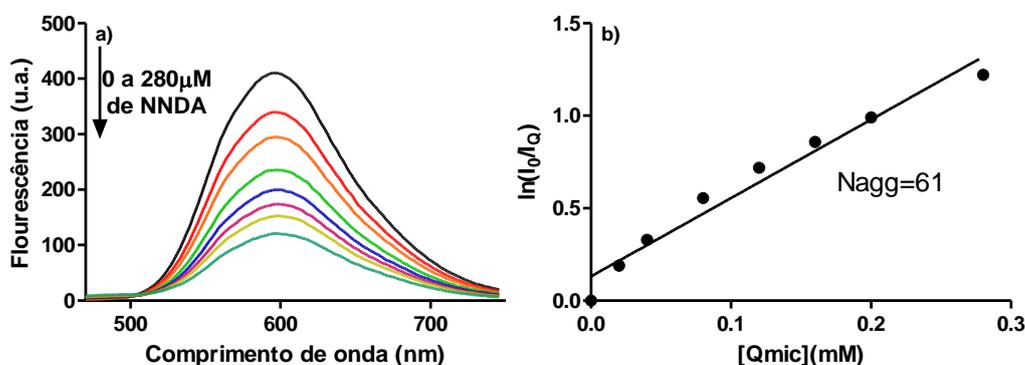
Analisando os valores obtidos para o gráfico de K_{sv} é possível observar que a supressão mais efetiva ocorreu no caso do SDS utilizando NNDA, que quando comparado à supressão com NCB no mesmo é cerca de 60 vezes maior. Além disso, a inversão observada nas normalizações se confirma nesses resultados. Considerando que o anel quinolínico é encontrado como sendo doadores de elétrons, os melhores supressores serão aqueles com características de elétrons receptores (no caso desse estudo a molécula de NCB), e esse resultado é encontrado para as aminoquinolinas no meio micelar de TX-100 e CTAB. Já para o SDS o resultado encontrado é o oposto do esperado e encontrado anteriormente e isso é devido provavelmente à formação do complexo de par iônico como já vem sendo demonstrado que houve nesse caso, e em outros casos de estudos na literatura (Hu Li, Yuanyuan Han, Haiyan Zhao, Hassan Jafri, 2021; Marcus, 1964; Sun, Bunker e Ma, 1994; Weller, 1968). Isso mostra mais uma vez que a interação entre as aminoquinolinas e detergentes negativos é diferente do que ocorre para os outros tipos de detergente.

Considerando os resultados de supressão é possível utilizar dessa estratégia para o cálculo do número de agregação (N_{agg}) das micelas como descrito nas Equações 28 e 29, do Item 7.3.4. Lembrando que esse parâmetro é o número de monômeros de surfactante por micela, e que estamos utilizando o modelo desenvolvido por Turro e Yekta (1978) e otimizado por Stam, Depaemelaere e Schryver (1998), é necessário supor alguns fatores como: tanto o corante (no caso as aminoquinolinas) como os supressores devem estar estáticos dentro da micela quando excitadas e durante todo o tempo de duração do estado excitado. A supressão deve ser efetiva e a emissão advinda apenas

do sistema micelar (Stam, Van, Depaemelaere e Schryver, De, 1998; Turro e Yekta, 1978).

Ao fazer uma análise dos valores de K_{sv} o que pode ser observado é que a supressão efetiva necessária para esse caso ocorre apenas para o sistema AQ5+SDS+NNDA. O gráfico construído para a determinação do N_{agg} do SDS está na Figura 62 abaixo, sendo que foram realizados com concentrações mais baixas de NNDA pois nas concentrações mais altas utilizadas até o momento o gráfico se apresentava fora da zona de linearidade necessária para o cálculo do parâmetro de N_{agg} .

Figura 62. Gráficos representativos para a determinação de N_{agg} , a) Gráfico da supressão de fluorescência de AQ5 ($5\mu\text{M}$) em SDS (20mM) ($\lambda_{exc}=445\text{nm}$, $\lambda_{em}=400-750\text{nm}$, com $7,5\text{mm}$ de abertura de slits, sem filtro de corte e fotomultiplicadora em 700), com adição de NNDA ($0, 20, 40, 80, 120, 160, 200$ e $280\mu\text{M}$), b) Método do gráfico para a determinação do N_{agg} de SDS por fluorescência estacionária.



Como pode ser observado o valor encontrado para o número de agregação do SDS com o método utilizando-se supressão de AQ5 como parâmetro de cálculo foi de $N_{agg}=61$ monomeros de SDS/micela. Esse valor está de acordo com o encontrado tanto para valores obtidos por outros métodos

experimentais como para métodos de cálculo, que varia de 55 a 65 monômeros de SDS/micela (Bhattacharjya e Balaram, 1997; Pisárčik, Devínsky e Pupák, 2015; Stam, Van, Depaemelaere e Schryver, De, 1998).

7.5. Conclusões dos estudos de AQ5 com micelas

Dentre as aminoquinolinas sintetizadas nesse trabalho a AQ5 foi a selecionada para o uso nos estudos das micelas. Essa sonda se mostrou eficiente para a determinação do CMC das micelas positivas e neutras, com valores próximos da literatura para a determinação por outros métodos. Quando em contato com detergentes negativos (principalmente o SDS) as aminoquinolinas apresentam uma nova banda de emissão de fluorescência com deslocamento batocrômico muito maior do que aqueles apresentados em qualquer outra situação desse estudo (solvatocromismo, estudo de proteínas nativas e modificadas), sendo que essa banda parece estar ligada à formação de complexo. Ao realizar os estudos de SDS com AQ5 foi possível determinar o CMC desse detergente a partir da variação de intensidade de fluorescência estacionária da nova banda encontrada.

Os estudos realizados para tentar entender melhor essa banda foi primeiramente a alteração do pH do meio, o que ocasionou uma diminuição da banda em maiores comprimentos de onda e aumento da banda em menores comprimentos de onda máximo conforme há o aumento do pH. Para os detergentes neutros e positivos não houve alteração da banda com a modificação do pH da solução. Outro estudo realizado foi com a adição de moléculas com potencial supressor de fluorescência e para os detergentes

positivo e neutro apresentou alteração menos significativa da fluorescência do que para a nova banda de SDS-AQ5 com a molécula elétron doador (NNDA), isso é provavelmente devido à formação do complexo de par iônico que apresenta característica oposta (elétron aceitador) que é mais sensível à supressão e efeitos de PET. Essa supressão mais significativa mostra que AQ5 pode ser uma boa opção para determinação da N_{agg} para detergentes negativos que apresentem essa banda deslocada com rendimentos quânticos maiores.

8. Conclusões finais do trabalho e perspectivas futuras

A aminoquinolinas polissubstituídas sintetizadas por reação multicomponente mostraram ganho de rendimento quântico de fluorescência em relação a molécula de referência comercial. Além disso, os estudos de solvatocromismo mostram que as moléculas sintetizadas apresentaram potencial utilização como sondas de meio devido ao deslocamento batocrômico quando há um aumento da polaridade do meio onde estão inseridas. Além disso, responderam de modo satisfatório aos diferentes modelos solvatocrômicos estudados, o que possibilitou a utilização do modelo de Kawski (utilizando a sonda AQ4) para estimar a constante dielétrica no interior da proteína BSA.

Outra potencial utilização para as aminoquinolinas sintetizadas seria como sonda de meio para proteínas, principalmente AQ4 mostrou uma interação efetiva com a proteína BSA. Além disso, o aumento de fluorescência fruto da associação da AQ4 com a BSA foi sensível à desnaturação da proteína, bem como a formação de agregados amiloides tanto de BSA como de lisozima (Lys), o que abre um campo de investigação para novas aplicações dessas moléculas.

Os estudos realizados para os detergentes mostraram resultados interessantes das aminoquinolinas sintetizadas ao interagirem com micelas e AQ5 pode se apresentar como uma sonda fluorescente para a determinação de CMC de surfactantes neutros e positivos. Além disso, para surfactantes negativos, detectou-se uma nova banda de fluorescência, a qual parece estar relacionada a formação de um complexo, que se forma exclusivamente em micelas negativas.

Assim, essas moléculas apresentaram uma gama de possíveis aplicações e os estudos aprofundados com as mesmas podem ainda ser interessantes para descoberta de novas potencialidades para as mesmas.

9. Referências

ADAMCIK, J.; MEZZENGA, R. Amyloid Polymorphism in the Protein Folding and Aggregation Energy Landscape. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 57, n. 28, p. 8370–8382, 2018.

ALLENMARK, S. Induced circular dichroism by chiral molecular interaction. **Chirality**, v. 15, n. 5, p. 409–422, 2003.

ALMARZA, J. *et al.* Molecular mechanism for the denaturation of proteins by urea. **Biochemistry**, v. 48, n. 32, p. 7608–7613, 2009.

ANDRADE, A. DE; SANTOS, G. C. DOS; SILVA-FILHO, L. C. DA. Synthesis of Quinoline Derivatives by Multicomponent Reaction Using Niobium Pentachloride as Lewis Acid. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 273–277, jan. 2015.

ANG, X.-Y. *et al.* Multiple Photoluminescent Processes from Pyrene Derivatives with Aggregation-and Mechano-Induced Excimer Emission. **Wiley Online Library**, v. 14, n. 16, p. 2903–2910, 2019.

ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. **Purification of laboratory chemicals**. Fourth ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1996.

ASSINK, H. A. *et al.* The Introduction of Bromocresol Purple for the Determination of Serum Albumin on SMAC and ACA, and the Standardization Procedure. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 22, n. 10, p. 685–692, 1984.

BARROS, A. E. B. *et al.* Denaturant effects on HbGp hemoglobin as monitored by 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid (ANS) probe. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 327–336, 2015.

BARTOLOMEU, A. DE A. *et al.* Multicomponent reactions mediated by NbCl₅ for the synthesis of phthalonitrile-quinoline dyads: Methodology, scope, mechanistic insights and applications in phthalocyanine synthesis. **Dyes and Pigments**, v. 151, n. December 2017, p. 391–402, 2018.

BAYLISS, N. S.; BRACKENRIDGE, C. J. The Perturbation of the Ultraviolet Spectrum of Nitromethane in Mixed Solvents, with a Note on Complex Formation.

Journal of the American Chemical Society, v. 77, n. 15, p. 3959–3963, 1955.

BELATIK, A. *et al.* Locating the binding sites of pb(II) ion with human and bovine serum albumins. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

BENNETT, G. M.; WILLIS, G. H. The structure of organic molecular compounds. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, n. 0, p. 256–268, 1 jan. 1929.

BHATTACHARJYA, S.; BALARAM, P. Effects of organic solvents on protein structures: Observation of a structured helical core in hen egg-white lysozyme in aqueous dimethylsulfoxide. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 29, n. 4, p. 492–507, 1997.

BIELSKA, M.; SOBCZYŃSKA, A.; PROCHASKA, K. Dye-surfactant interaction in aqueous solutions. **Dyes and Pigments**, v. 80, n. 2, p. 201–205, 2009.

BILOT, L.; KAWSKI, A. Der Einfluß des Lösungsmittels auf die Elektronenspektren lumineszierender Moleküle. **Zeitschrift für Naturforschung - Section A Journal of Physical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 10–15, 1963.

BLANCHARD-DESCE, M. *et al.* Intramolecular charge transfer in elongated donor-acceptor conjugated polyenes. **Chemical Physics Letters**, v. 243, n. 5–6, p. 526–532, 1995.

BRACKMANN, W. Organic charge-transfer complexes. **Rec. Trav. chim.**, v. 68, p. 147, 1949.

BRADBURN, D.; BITTINGER, T. **Micelles: Structural Biochemistry, Formation and Functions & Usage**. New York: Nova Science Publisher, 2014.

BRIEGLEB AND T. SCHACHOWSKOY, Z. Physicochemical Studies of Molecular Compounds. **Physik. Chem.**, v. B19, p. 255, 1932.

BROUWER, A. M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 2213–2228, 2011.

CANFIELD, R. E. The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme. **The Journal of biological chemistry**, v. 238, n. 8, p. 2698–2707, 1963.

CAO, K. J. *et al.* Solvation-Guided Design of Fluorescent Probes for Discrimination of Amyloids. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

CHIPMAN, D. M.; SHARON, N. Mechanism of Lysozyme Action. **American Association for the Advancement of Science**, v. 165, n. 3892, p. 454–465, 1969.

CLINT, J. H. **Surfactant Aggregation**. New York: Springer Science, 1992.

CONNOR, D. V. O.; PHILLIPS, D. **Time-Correlated Single Photon Counting**. 1st. ed. London: Academic Press, 1984.

CONSTANTINO, M. *et al.* Niobium (V) Chloride Mediated Preparation of β -Chloro- α,β -Unsaturated Ketones. **Letters in Organic Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 360–364, 2004.

DEMCHENKO, A. P. **Introduction to Fluorescence Sensing**. [s.l: s.n.].

DOBKOWSKI, J.; RETTIG, W.; WALUK, J. Intramolecular charge-transfer properties of a molecule with a large donor group: The case of 4'-(pyren-1-yl)benzonitrile. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 4, n. 18, p. 4334–4339, 2002.

DOBSON, C. M. **Principles of protein folding, misfolding and aggregation**Seminars in Cell and Developmental Biology. **Anais...**Elsevier Ltd, 2004

ERCELEN, S.; KLYMCHENKO, A. S.; DEMCHENKO, A. P. Novel two-color fluorescence probe with extreme specificity to bovine serum albumin. **FEBS Letters**, v. 538, n. 1–3, p. 25–28, 2003.

FARIA, D. L. A.; SANTOS, P. S. Complexos Moleculares: Alguns Aspectos Históricos. **Química Nova**, v. 16, n. 5, p. 449–453, 1993.

FASMAN, G. D. **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**. 1st. ed. New York: Springer Science, 1996.

FERREIRA, H. *et al.* Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos. **Química**, v. 99, p. 39–51, 2005.

FLEMMING, J.; ROSA, C. A. Análise da luz circularmente polarizada produzida por um ser vivo. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 37, n. 4, p. 4309–1, 2015.

FOSTER, R. **Electron Donor-Acceptor Complexes**. **J. Phys. Chem.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 27 mar. 2021.

FRANCIS, G. L. Albumin and mammalian cell culture: Implications for biotechnology applications. **Cytotechnology**, v. 62, n. 1, p. 1–16, 2010.

FUCHI, Y. *et al.* Selective synthesis of substituted amino-quinoline derivatives by C-H activation and fluorescence evaluation of their lipophilicity-responsive properties. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

GAO, M.; TANG, B. Z. Fluorescent Sensors Based on Aggregation-Induced Emission: Recent Advances and Perspectives. **ACS Sensors**, v. 2, n. 10, p. 1382–1399, 2017.

GAWROŃSKI, J.; GRAJEWSKI, J. The significance of induced circular dichroism. **Organic Letters**, v. 5, n. 18, p. 3301–3303, 2003.

GIUDICE, A. DEL *et al.* Structural response of human serum albumin to oxidation: Biological buffer to local formation of hypochlorite. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 40, p. 12261–12271, 2016.

GODOI CONTESSOTO, V. DE *et al.* Introdução ao problema de enovelamento de proteínas: uma abordagem utilizando modelos computacionais simplificados. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 40, n. 4, 2018.

GOLDSIPE, A.; BLANKSCHTEIN, D. Modeling counterion binding in ionic-nonionic and ionic-zwitterionic binary surfactant mixtures. **Langmuir**, v. 21, n. 22, p. 9850–9865, 2005.

GORDON, J. A.; WARREN, J. R. Denaturation of Globular Proteins: I. THE INTERACTION OF UREA AND THIOUREA WITH BOVINE PLASMA ALBUMIN. **The Journal of biological chemistry**, v. 243, n. 21, p. 5663–5669, 1968.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein

secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2007.

HAN, J. *et al.* A quinoline-based fluorescence “on-off-on” probe for relay identification of Cu²⁺ and Cd²⁺ ions. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 205, p. 597–602, 2018.

HILDEBRAND, J. H.; BENESI, H. A. Interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. **Nature**, v. 164, n. 4179, p. 963, 1949.

HOLMBERG, K. *et al.* **Surfactant and Polymers in aqueous solution**. 2nd. ed. West Sussex: John Willey and Sons Ltda, 2003.

HU LI, YUANYUAN HAN, HAIYAN ZHAO, HASSAN JAFRI, B. T. Dyes as Labels in Biosensing. **Dyes and Pigments**, v. 187, p. 137–144, 2021.

HUSSAIN, E. *et al.* Aggregation enhanced excimer emission (AEEE) of benzo[ghi]perylene and coronene: multimode probes for facile monitoring and direct visualization of micelle transition. **Analyst**, v. 143, n. 18, p. 4283–4289, 2018.

INGLE, J. D.; CROUCH, S. R. **Spectrochemical Analysis**. 1st. ed. New Jersey: Prentice-Hall inc, 1988.

IWUNZE, M. O. The determination of the effective dielectric constant of micelles and microemulsions. **Physics and Chemistry of Liquids**, v. 43, n. 2, p. 195–203, 2005.

JIANG, K. *et al.* A functionalized fluorochrome based on quinoline-benzimidazole conjugate: From facile design to highly sensitive and selective sensing for picric acid. **Dyes and Pigments**, v. 162, n. July 2018, p. 367–376, 2019.

JONES, G. *et al.* Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism. **Journal of Physical Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 294–300, 1985.

JOSHI, D. *et al.* **Detection of biological warfare agents using ultra violet-laser induced fluorescence LIDAR** **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** Elsevier B.V., , 2013.

KATRITZKY, A. R. *et al.* Quantitative Measures of Solvent Polarity. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 175–198, 2004.

KAWSKI, A. **Solvent-shift effect on electronic spectra and excited-state dipole moments**. [s.l: s.n.].

KAWSKI, A.; BOJARSKI, P. Comments on the determination of excited state dipole moment of molecules using the method of solvatochromism. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 82, n. 1, p. 527–528, 2011.

KAWSKI, A.; BOJARSKI, P.; KUKLIŃSKI, B. Estimation of ground- and excited-state dipole moments of Nile Red dye from solvatochromic effect on absorption and fluorescence spectra. **Chemical Physics Letters**, v. 463, n. 4–6, p. 410–412, 2008.

KHAN, M. Y.; AGARWAL, S. K.; HANGLOO, S. Urea-induced structural transformations in bovine serum albumin. **Journal of Biochemistry**, v. 102, n. 2, p. 313–317, 1987.

KHATTAB, M. *et al.* **Solvatochromism and linear solvation energy relationship of the kinase inhibitor SKF86002**. [s.l: s.n.]. v. 170

KOBAYASHI, S.; JORGENSEN, K. A. **Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis**. 1. ed. Weinheim: Wiley-CH, 2001. v. 1

KOUZNETSOV, V. V. **Recent synthetic developments in a powerful imino Diels-Alder reaction (Povarov reaction): application to the synthesis of N-polyheterocycles and related alkaloids** *Tetrahedron*, 4 abr. 2009.

KRAGH-HANSEN, U. Reversible ligand binding to human serum albumin. Theoretical and clinical aspects. **Danish Medical Bulletin**, v. 46, p. 57–84, 1990.

KRATOCHWIL, N. A. *et al.* Predicting plasma protein binding of drugs: A new approach. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 9, p. 1355–1374, 1 nov. 2002.

LAKOWICZ, J. **Principles of fluorescence spectroscopy**. [s.l: s.n.].

LAVKUSH BHAISARE, M. *et al.* Fluorophotometric determination of critical

micelle concentration (CMC) of ionic and non-ionic surfactants with carbon dots via Stokes shift. **Talanta**, v. 132, p. 572–578, 2015.

LEUNG, N. L. C. *et al.* Restriction of intramolecular motions: The general mechanism behind aggregation-induced emission. **Chemistry - A European Journal**, v. 20, n. 47, p. 15349–15353, 1 nov. 2014.

LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 90. ed. [s.l: s.n.].

LIN, H. *et al.* Interactions between bromophenol blue and cetyltrimethylammonium bromide in aqueous solutions and microemulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 38, n. 10, p. 1410–1414, 3 out. 2017.

LIN, Y. *et al.* The interaction of serum albumin with ginsenoside Rh2 resulted in the downregulation of ginsenoside Rh2 cytotoxicity. **Journal of Ginseng Research**, v. 41, n. 3, p. 330–338, 1 jul. 2017.

LIPPERT, E. Spektroskopische Bestimmung des Dipolmomentes aromatischer Verbindungen im ersten angeregten Singulettzustand. **Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, v. 61, n. 8, p. 962–975, 1957.

LOVING, G. S.; SAINLOS, M.; IMPERIALI, B. **Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores** *Trends in Biotechnology*, fev. 2010.

MAHLER, H. C. *et al.* **Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis** *Journal of Pharmaceutical Sciences* John Wiley and Sons Inc., , 2009.

MANDAL, J. *et al.* An aminoquinoline based biocompatible fluorescent and colourimetric pH sensor designed for cancer cell discrimination. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 19818–19826, 2018.

MARCUS, R. A. Chemical and electrochemical electron-transfer theory. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, v. 15, n. 1, p. 154–196, 1964.

MARINI, A. *et al.* What is solvatochromism? **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 51, p. 17128–17135, 2010.

MATAGA, N.; KAIFU, Y.; KOIZUMI, M. Solvent Effects upon Fluorescence Spectra and the Dipolemoments of Excited Molecules. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 29, n. 4, p. 465–470, abr. 1956.

MCMURRY, J. **Organic Chemistry**. 9th. ed. Boston: [s.n.].

MCRAE, E. G. Theory of solvent effects on molecular electronic spectra. Frequency shifts. **Journal of Physical Chemistry**, v. 61, n. 5, p. 562–572, 1957.

MISRA, R.; BHATTACHARYYA, S. P. **Intramolecular Charge Transfer: Theory and Applications**. 1st. ed. Weinheim: Wiley-CH, 2018.

MORAES, C. S. *et al.* **Série em Biologia Celular e Molecular: métodos experimentais no estudo de proteínas**. [s.l: s.n.]. v. 53

MOREIRA, M. B. *et al.* Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 227–232, 1 fev. 2015.

MULLIKEN, R. S.; PERSON, W. B. Molecular Compounds and Their Spectra. XXL Some General Considerations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 13, p. 3409–3413, 1969.

MUZAMMIL, S.; KUMAR, Y.; TAYYAB, S. Anion-induced stabilization of human serum albumin prevents the formation of intermediate during urea denaturation. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 40, n. 1, p. 29–38, 2000.

N HANAFY, N. A.; EL-KEMARY, M.; LEPORATTI, S. Micelles Structure Development as a Strategy to Improve Smart Cancer Therapy. 2018.

NEDELTCHEV, A. K.; HAN, H.; BHOWMIK, P. K. Photoactive amorphous molecular materials based on quinoline amines and their synthesis by Friedländer condensation reaction. **Tetrahedron**, v. 66, n. 48, p. 9319–9326, 2010.

NILSSON, M. R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. **Methods**, v. 34, n. 1, p. 151–160, set. 2004.

OH, K.; KNABE, W. E. Lewis acid-promoted electron transfer deoxygenation of

epoxides, sulfoxides, and amine N-oxides: the role of low-valent niobium complexes from NbCl₅ and Zn. **Tetrahedron**, v. 65, n. 15, p. 2966–2974, 2009.

ONSAGER, L. Electric Moments of Molecules in Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 58, n. 8, p. 1486–1493, 1936.

PARKER, A. J. Solvation of Ions. Part II. Dipolar aprotic solvents as media for nucleophilic substitution reactions at a saturated carbon atom. n. 255, p. 1328–1337, 1961.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução a Espectroscopia**. [s.l: s.n.].

PÉREZ-RODRÍGUEZ, M. *et al.* A comparative study of the determination of the critical micelle concentration by conductivity and dielectric constant measurements. **Langmuir**, v. 14, n. 16, p. 4422–4426, 1998.

PERICHERLA, K.; KUMAR, A.; JHA, A. Povarov-reductive amination cascade to access 6-aminoquinolines and anthrazolines. **Organic Letters**, v. 15, n. 16, p. 4078–4081, 2013.

PERKAMPUS, H.-H. **UV-VIS Spectroscopy and Its Applications**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1992.

PERRIN, D. D. The effect of temperature on pK values of organic bases. **Australian Journal of Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 484–488, 1964.

PISÁRČIK, M.; DEVÍNSKY, F.; PUPÁK, M. Determination of micelle aggregation numbers of alkyltrimethylammonium bromide and sodium dodecyl sulfate surfactants using time-resolved fluorescence quenching. **Open Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 922–931, 2015.

PRAZERES, T. J. V. *et al.* Determination of the critical micelle concentration of surfactants and amphiphilic block copolymers using coumarin 153. **Inorganica Chimica Acta**, v. 381, n. 1, p. 181–187, 2012.

PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 27 dez. 2019.

QIN, A. *et al.* Aggregation-Enhanced Emissions of Intramolecular Excimers in

Disubstituted Polyacetylenes. **J Phys Chem B**, v. 112, p. 9281–9288, 2008.

QU, P. *et al.* Investigations of effects of environmental factors in unfolding/refolding pathway of proteins on 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid (ANS) fluorescence. **Journal of Molecular Structure**, v. 936, n. 1–3, p. 187–193, 2009.

RAWEL, H. M.; MEIDTNER, K.; KROLL, J. Binding of selected phenolic compounds to proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4228–4235, 2005.

REICHARDT, C. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. **Chemical Reviews**, v. 94, n. 8, p. 2319–2358, 1994.

REICHARDT, C. **Solvent Effects in Organic Chemistry**. 3rd. ed. Weinheim: Wiley-CVH, 2003.

RENNY, J. S. *et al.* Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 46, p. 11998–12013, 2013.

RHYS WILLIAMS, A. **An Introduction to Fluorescence Spectroscopy**. 1st. ed. [s.l.] Perkin Elmer, 2000.

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R.; MELLO, L. C. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de química. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 518–521, 2009.

ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. **Surfactants and Interfacial Phenomena**. 4th. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2012.

ROTILIO, G. Interaction of metal ions with proteins: an overview. **Inorganica Chimica Acta**, v. 40, p. X49, jan. 1980.

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2007. v.

ROY, S. Fluorescence Quenching Methods to Study Protein-Nucleic Acid Interactions. **Methods in Enzymology**, v. 379, n. 1997, p. 175–187, 2004.

RYABUKHIN, D. S.; VASILYEV, A. V. Synthesis of (iso)quinoline, (iso)coumarin and (iso)chromene derivatives from acetylene compounds. **Russian Chemical Reviews**, v. 85, n. 6, p. 637–665, 2016.

SANTOS, G. C. DOS *et al.* Facile Synthesis and Photophysical Characterization of New Quinoline Dyes. **Journal of Fluorescence**, v. 27, n. 1, p. 271–280, 2017.

SCHUKIN, E. D.; PERTSOV, A. V.; AMÉLINA, E. A. **Química coloidal**. Moscou: Editorial Mir Moscou, 1988.

SCHULMAN, S. G. Dissociation Constants of Some Isomeric Aminoquinolines: Determination of the Site of Protonation from Shifts in Electronic Absorption Spectra. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 3, p. 371–374, 1971.

SCHULMAN, S. G. **Fluorescence and phosphorescence spectroscopy: Physicochemical principles and practice**. 1st. ed. Oxford: Pergamon Press, 1979.

SCRIMIN, P.; TECILLA, P. **Model membranes: Developments in functional micelles and vesicles** *Current Opinion in Chemical Biology* Current Biology Ltd, , 1 dez. 1999.

SERNA, P. *et al.* Selective hydrogenation of nitrocyclohexane to cyclohexanone oxime with H₂ on decorated Pt nanoparticles. **Journal of Catalysis**, v. 263, n. 2, p. 328–334, 2009.

SHAH, D. O. **Micelles, Microemulsions, and Monolayers: science and technology**. 1frs. ed. New York: CRC Press, 1998.

SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e superfícies**. 1st. ed. São Paulo: [s.n.].

SHI, Y.; LUO, H. Q.; LI, N. B. Determination of the critical premicelle concentration, first critical micelle concentration and second critical micelle concentration of surfactants by resonance Rayleigh scattering method without any probe. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular**

Spectroscopy, v. 78, n. 5, p. 1403–1407, 2011.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, n. 1, p. 21, 2011.

SIDARAI, A. H. *et al.* Study of Photophysical Properties on Newly Synthesized Coumarin Derivatives. **Journal of Fluorescence**, v. 27, n. 6, p. 2223–2229, 2017.

SILVA, B. H. S. T. DA; MARTINS, L. M.; SILVA-FILHO, L. C. DA. Niobium pentachloride catalyzed multicomponent Povarov reaction. **Synlett**, v. 23, n. 13, p. 1973–1977, 2012.

SINGH, O.; KAUR, R.; MAHAJAN, R. K. Flavonoid-surfactant interactions: A detailed physicochemical study. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 170, p. 77–88, 2017.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. Boston: [s.n.].

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. **Methods in Enzymology**, v. 383, n. 1, p. 318–351, 2004.

STAM, J. VAN; DEPAEMELAERE, S.; SCHRYVER, F. C. DE. Micellar aggregation numbers - A fluorescence study. **Journal of Chemical Education**, v. 75, n. 1, p. 93–98, 1998.

SUN, Y. P.; BUNKER, C. E.; MA, B. Quantitative Studies of Ground and Excited State Charge Transfer Complexes of Fullerenes with N, N-Dimethylaniline and N, N-Diethylaniline. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 21, p. 9692–9699, 1994.

SURYAWANSHI, V. D. *et al.* Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 1, p. 56–63, 2016.

TABOADA, P. *et al.* Amyloid fibril formation and other aggregate species formed by human serum albumin association. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110,

n. 42, p. 20733–20736, 2006.

TAN, Y. *et al.* A fluorescent pH chemosensor for strongly acidic conditions based on the intramolecular charge transfer (ICT) effect. **RSC Advances**, v. 3, n. 15, p. 4872–4875, 2013.

TANAKA, N.; NISHIZAWA, H.; KUNUGI, S. Structure of pressure-induced denatured state of human serum albumin: A comparison with the intermediate in urea-induced denaturation. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1338, n. 1, p. 13–20, 1997.

TANGOD, V. B. *et al.* Studies of the photophysics of highly fluorescent Red Mega 480 laser dye in solutions: Steady state spectroscopy. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 148, p. 105–113, 2015.

TECHERT, S. *et al.* Photophysical characteristics of directly linked pyrene-dimethylaniline derivatives. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 104, n. 24, p. 5700–5710, 2000.

TEHRANI-BAGHA, A. R.; SINGH, R. G.; HOLMBERG, K. Solubilization of two organic dyes by anionic, cationic and nonionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 417, p. 133–139, 2013.

THIPPERUDRAPPA, J. *et al.* Effect of solvents, solvent mixture and silver nanoparticles on photophysical properties of a ketocyanine dye. **Luminescence**, v. 32, n. 1, p. 51–61, 2017.

TIWARI, K. *et al.* Experimental and computational approaches on dipole moment of 5-aminoisoquinoline. **Journal of Molecular Liquids**, v. 200, n. PB, p. 460–464, 2014.

TONG, D. *et al.* Aggregation-enhanced excimer emission (AEEE) based on pyrenylchalcone and 2-to-4 molecular decoder by biothiols and polyanions in aqueous media. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 195, p. 80–84, maio 2014.

TUMMINO, P. J.; GAFNI, A. Determination of the aggregation number of

detergent micelles using steady-state fluorescence quenching. **Biophysical Journal**, v. 64, n. 5, p. 1580–1587, 1993.

TURRO, N. J.; YEKTA, A. Luminescent Probes for Detergent Solutions. A Simple Procedure for Determination of the Mean Aggregation Number of Micelles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 100, n. 18, p. 5951–5952, 1978.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. [s.l.: s.n.].

VASU, A. K.; KANVAH, S. Red-emitting cationic fluorophore as a probe for anionic surfactants. **Dyes and Pigments**, v. 142, p. 230–236, 2017.

WEISS, J. J. Electron transfer in the formation of organic molecular complexes. **Philosophical Magazine**, v. 8, n. 91, p. 1169–1177, 1963.

WELLER, A. Electron-transfer and complex formation in the excited state. **Pure and Applied Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 115–124, 1968.

WITKOWSKA, D.; ROWIŃSKA-ŻYREK, M. Biophysical approaches for the study of metal-protein interactions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 199, 1 out. 2019.

WOODWARD, R. B.; HOFFMANN, R. The Conservation of Orbital Symmetry. **Angewandte Chemie (International Edition)**, v. 8, n. 1, p. 781–932, 1969.

YAMASAKI, K. *et al.* Albumin-drug interaction and its clinical implication. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 12, p. 5435–5443, 2013.

YASUDA, M. *et al.* Simultaneous determination of nicotine and cotinine in serum using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection and postcolumn UV-photoirradiation system. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 934, p. 41–45, 2013.

ZACHARLASSE, K. A.; PHUC, N. VAN; KOZANKIEWICZ, B. Investigation of micelles, microemulsions, and phospholipid bilayers with the pyridinium N-phenolbetaine ET(30), a polarity probe for aqueous interfaces. **Journal of Physical Chemistry**, v. 85, n. 18, p. 2676–2683, 1981.

ZANA, R. **Dynamics of Surfactant Self-Assemblies**. [s.l: s.n.].

ZDZIENNICKA, A. *et al.* Critical micelle concentration of some surfactants and thermodynamic parameters of their micellization. **Fluid Phase Equilibria**, v. 322–323, p. 126–134, 2012.

ZHANG, Y.; LI, P.; WANG, L. Iron-catalyzed tandem reactions of aldehydes, terminal alkynes, and primary amines as a strategy for the synthesis of quinoline derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 153–157, jan. 2011.

ZSILA, F.; HAZAI, E.; SAWYER, L. Binding of the pepper alkaloid piperine to bovine β -lactoglobulin: Circular dichroism spectroscopy and molecular modeling study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 10179–10185, 28 dez. 2005.

Anexo A – Caracterização dos compostos sintetizados

Figura A- 1. Espectro de RMN ^1H para o composto NQ-I (6-nitro-2,4-difenilquinolina) em CDCl_3

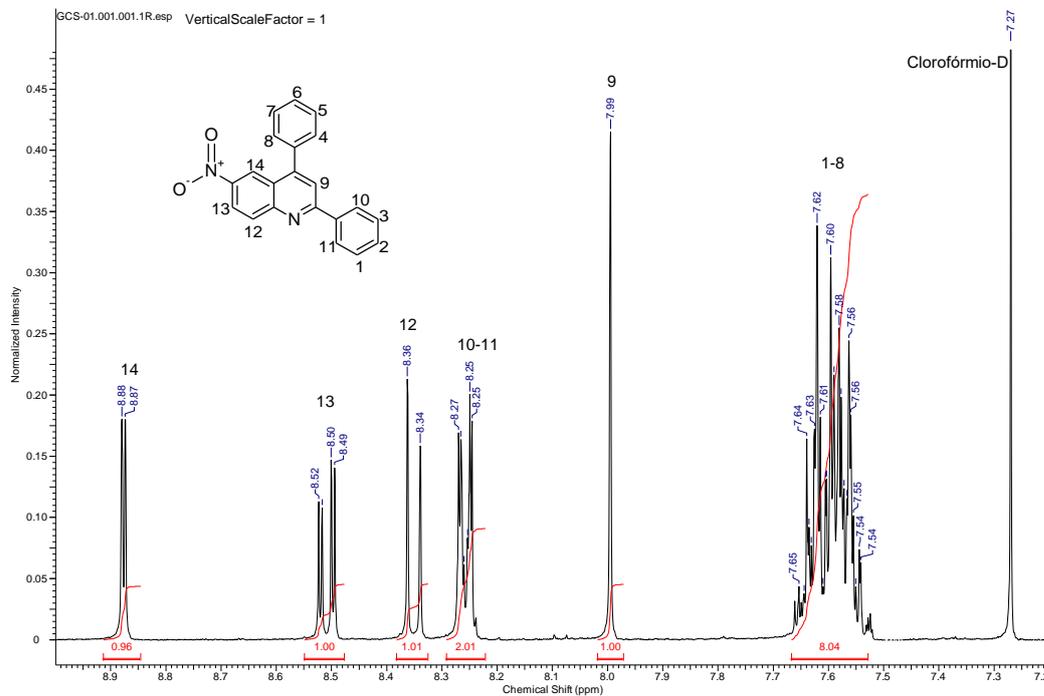


Figura A- 2. Espectro de RMN ^{13}C para o composto NQ-I (6-nitro-2,4-difenilquinolina) em CDCl_3

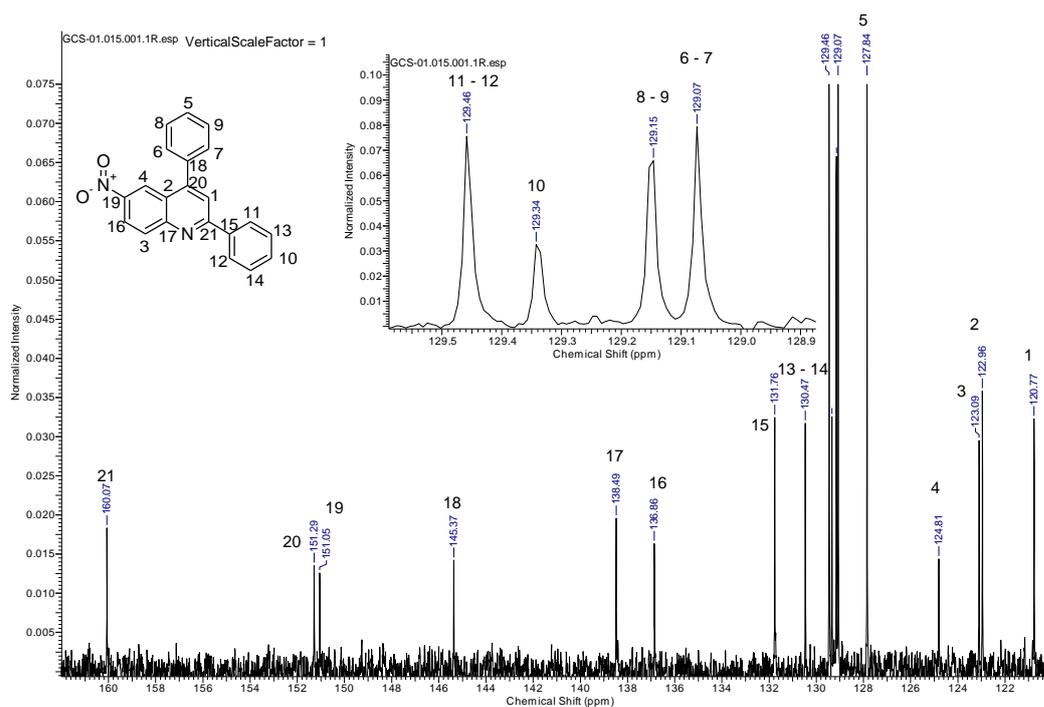


Figura A- 7. Espectro de RMN ^1H para o composto NQ-IV (2-(4-metiltio(fenil)-(6-nitro-4-fenilquinolina) em CDCl_3

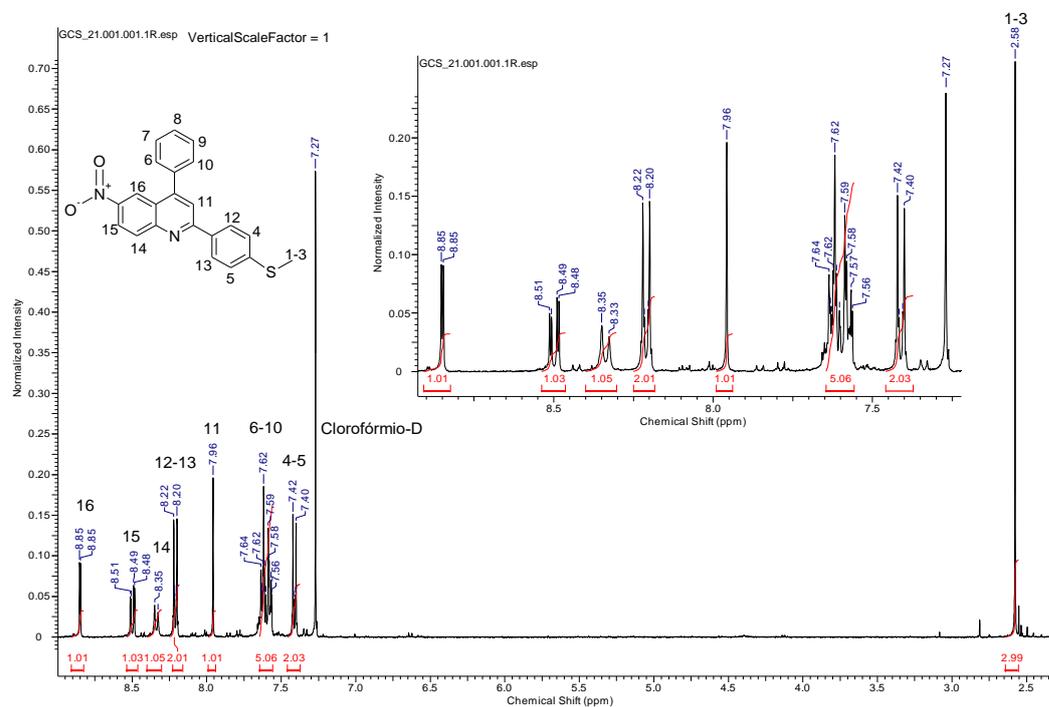


Figura A- 8. Espectro de RMN ^{13}C para o composto NQ-IV (2-(4-metiltio(fenil)-(6-nitro-4-fenilquinolina) em CDCl_3

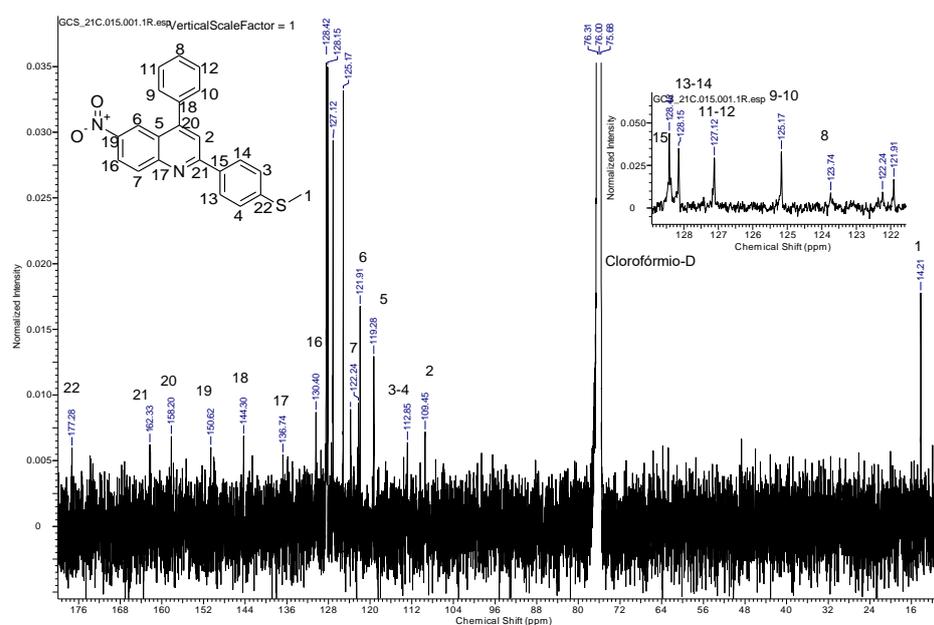


Figura A- 9. Espectro de IV para os compostos: a) NQ-II, b) NQ-III, c) NQ-IV.

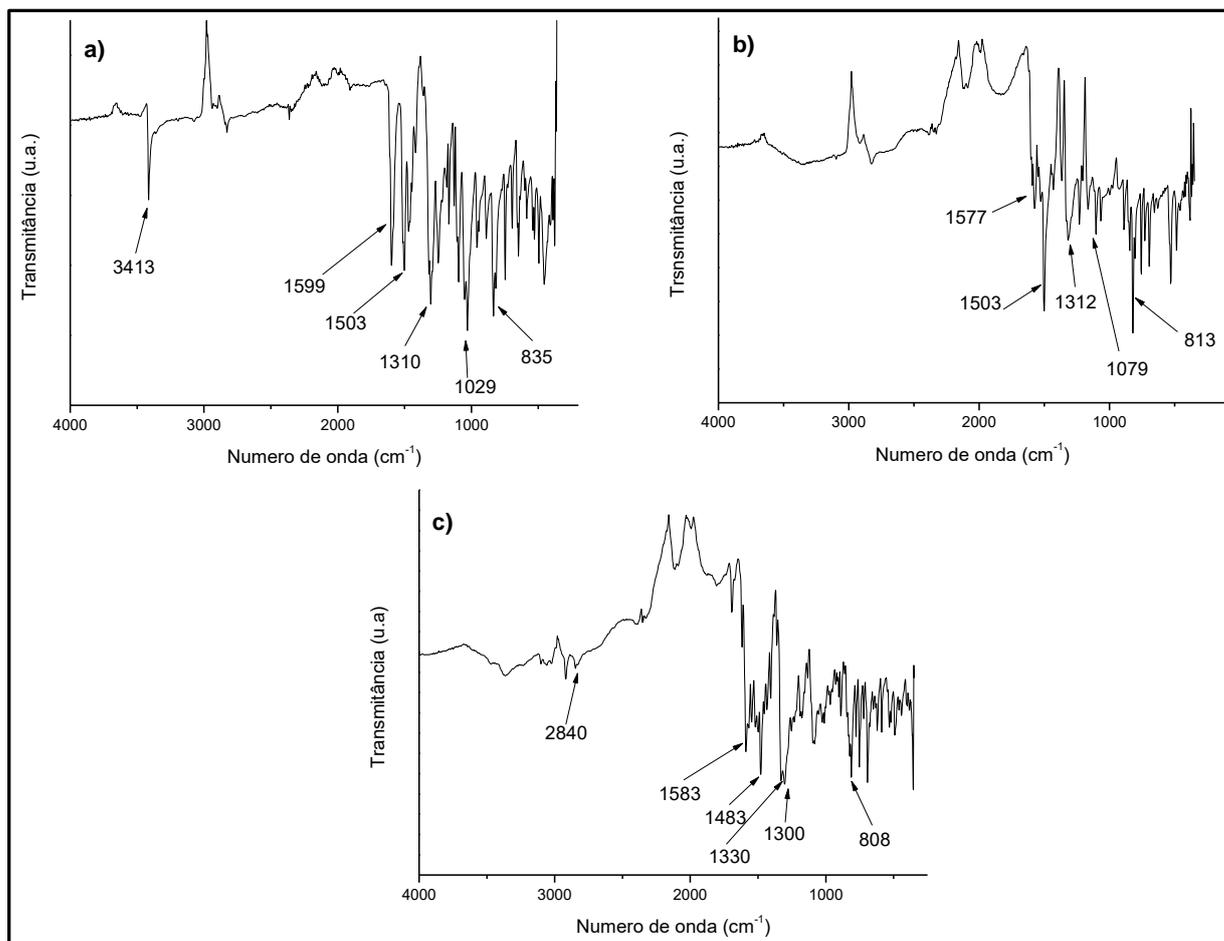


Figura A- 10. Espectro de massas para o composto NQ-I

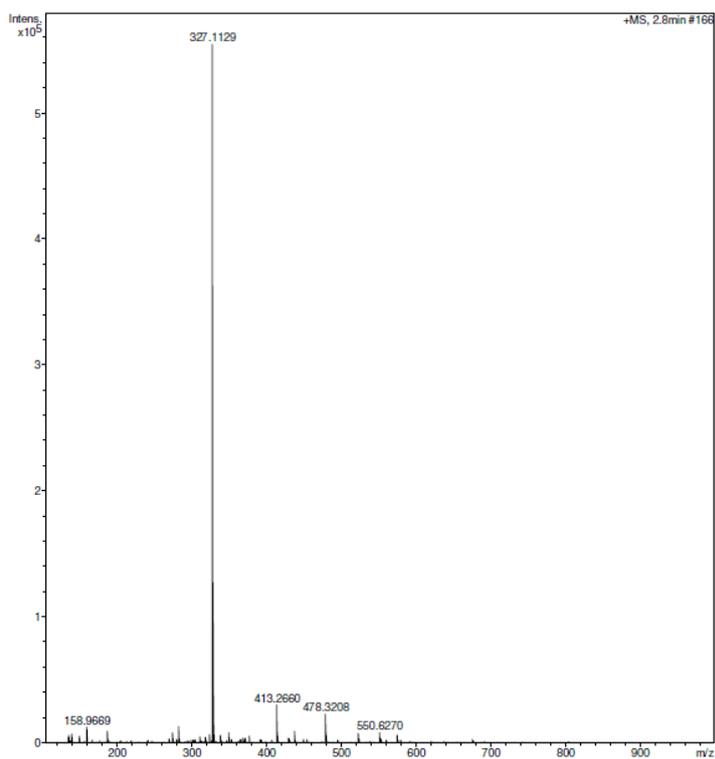


Figura A- 11. Espectro de massas para o composto NQ-II

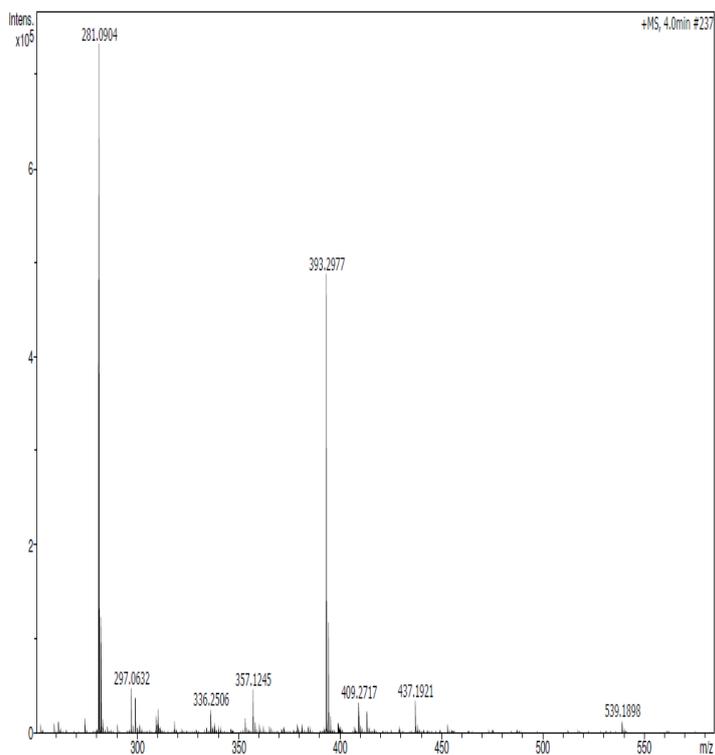


Figura A- 12. Espectro de massas para o composto NQ-III

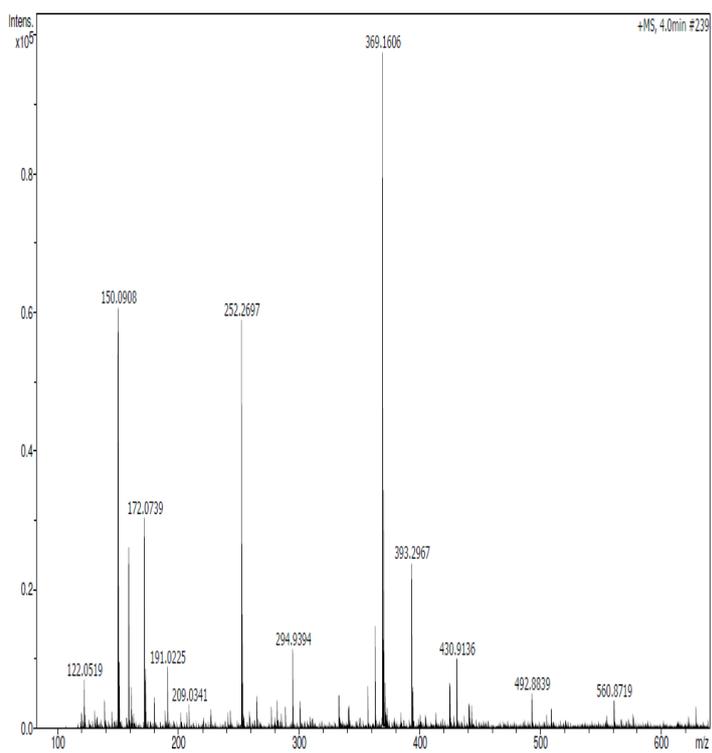


Figura A- 13. Espectro de massas para o composto NQ-IV

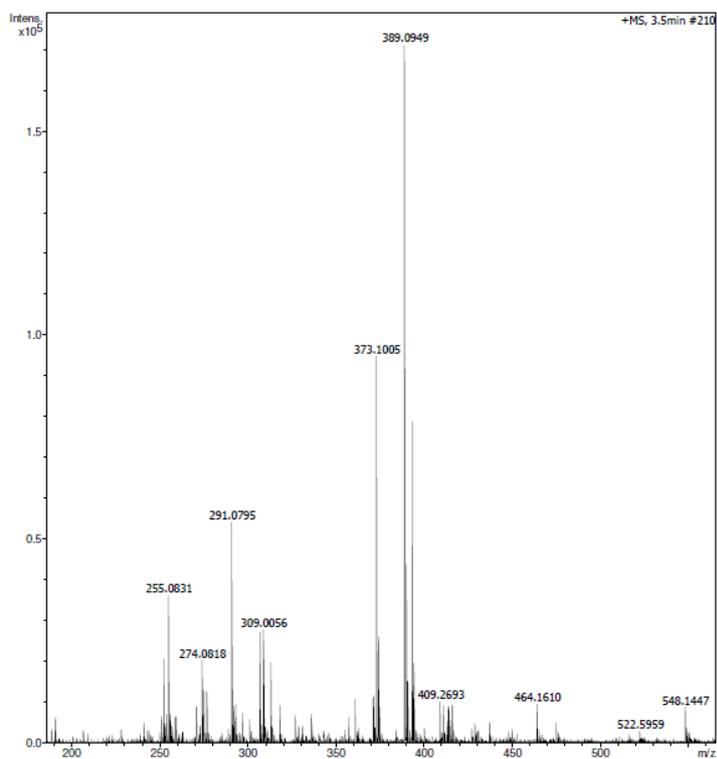


Figura A- 14. Espectro de RMN ^1H para o composto AQ-I (2,4-difenilquinolin-6-amino) em CDCl_3

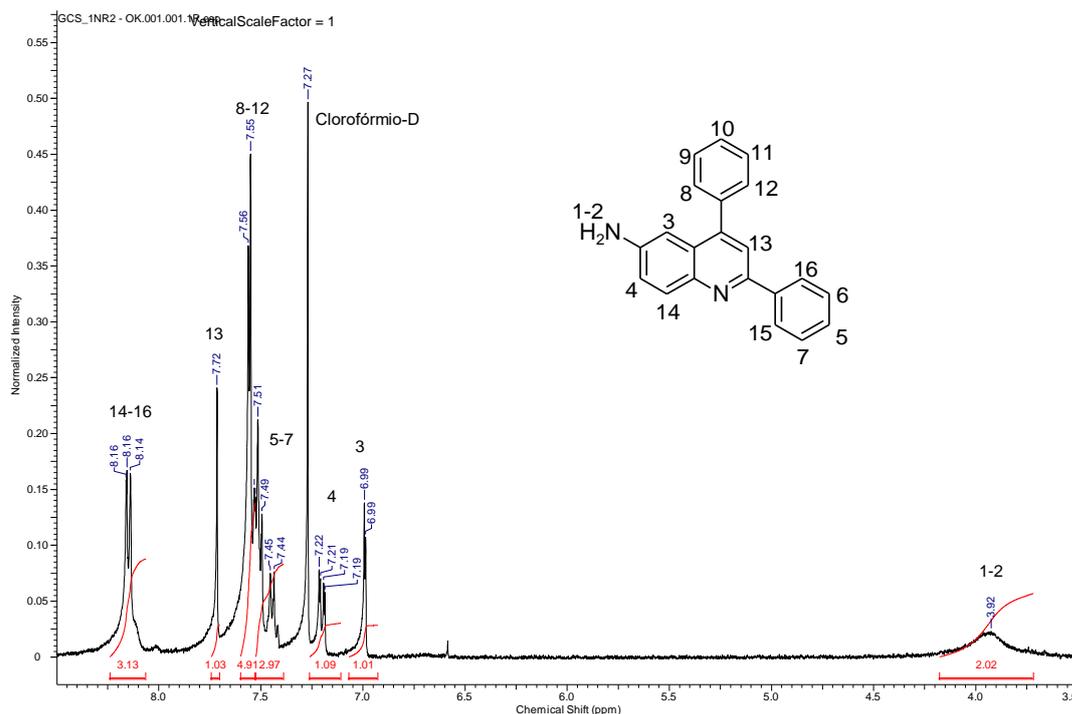


Figura A- 15. Espectro de RMN ^{13}C para o composto AQ-I (2,4-difenilquinolin-6-amino) em CDCl_3

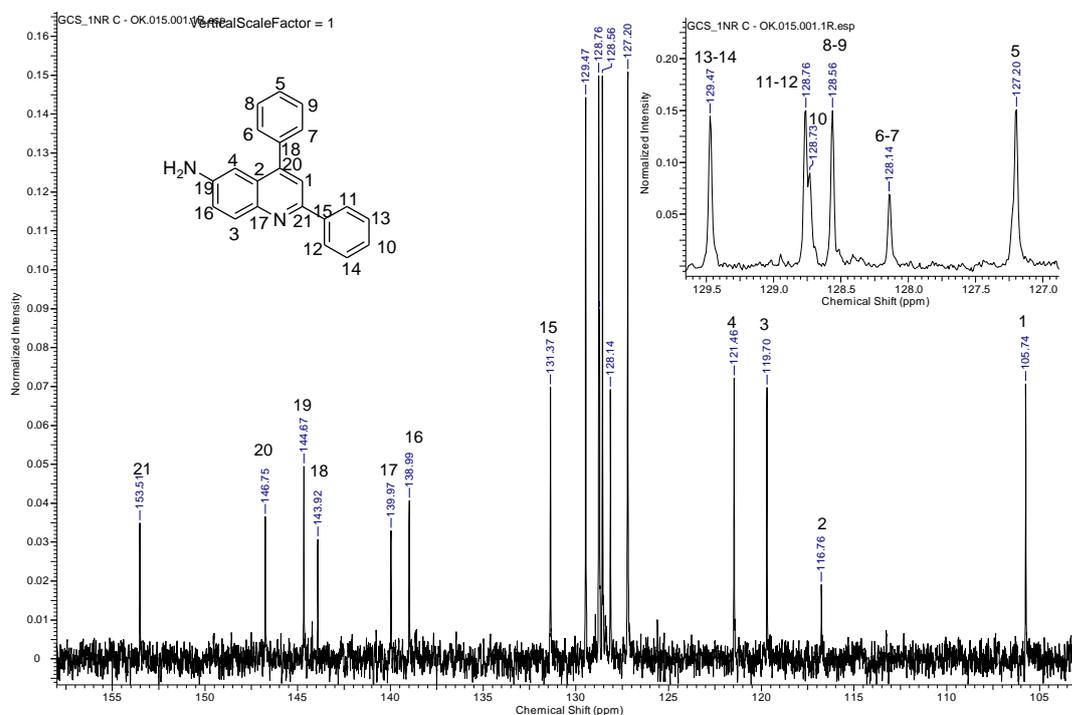


Figura A- 16. Espectro de RMN ^1H para o composto AQ-II (2-(4-metóxfenil-4-fenilquinolin-6-amino) em CDCl_3

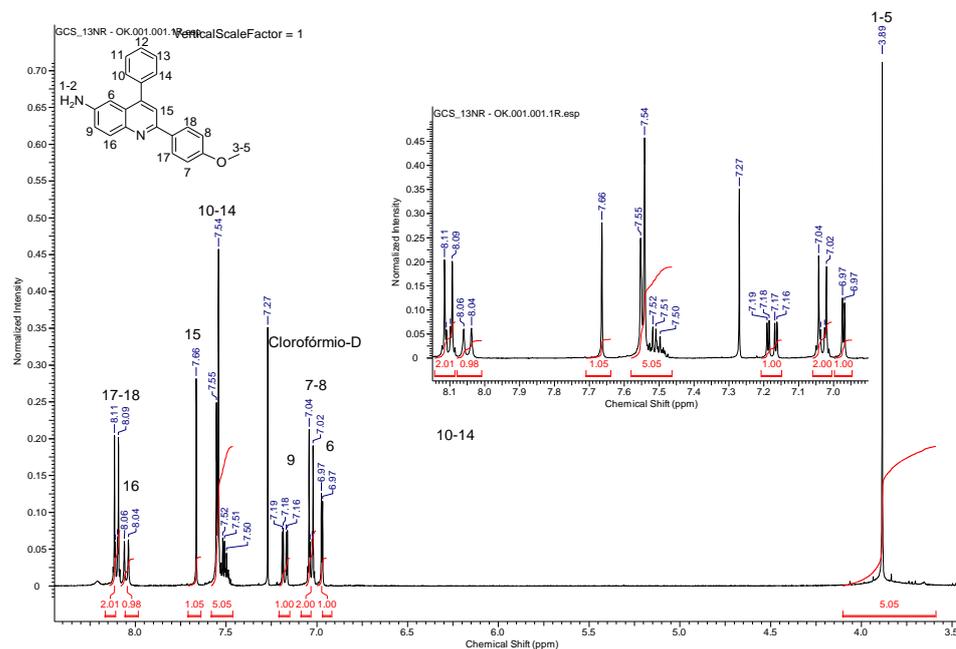


Figura A- 17. Espectro de RMN ^{13}C para o composto AQ-II (2-(4-metóxfenil-4-fenilquinolin-6-amino) em CDCl_3

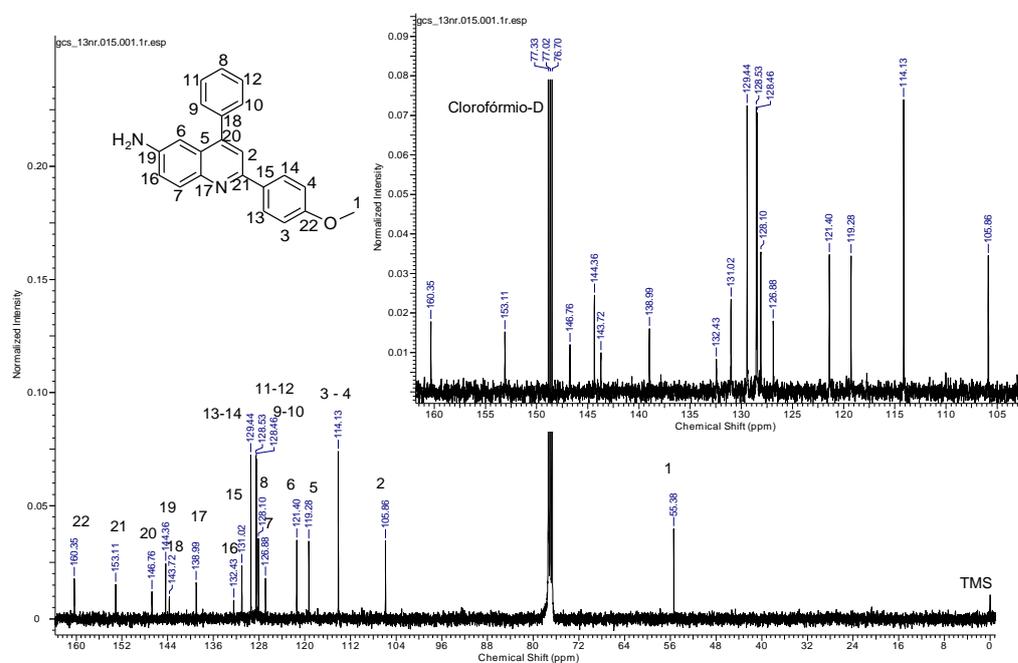


Figura A- 18. Espectro de RMN ^1H para o composto AQ-III (2-(4-dimetilamino)fenil-4-fenilquinolin-6-amino) em CDCl_3

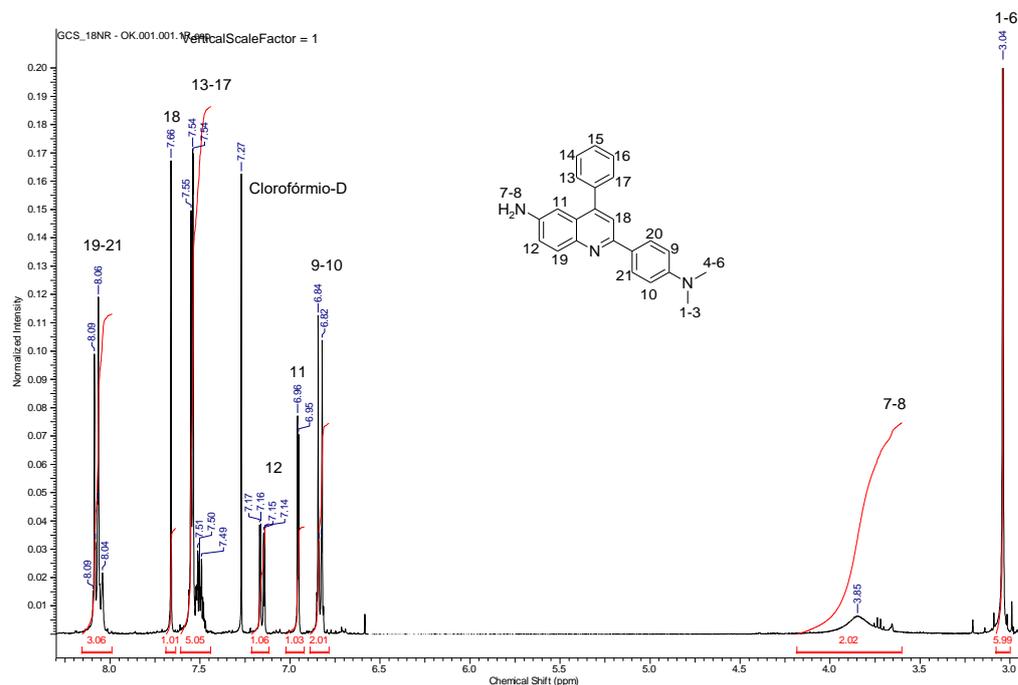


Figura A- 19. Espectro de RMN ^{13}C para o composto AQ-III (2-(4-dimetilamino)fenil-4-fenilquinolin-6-amino) em CDCl_3

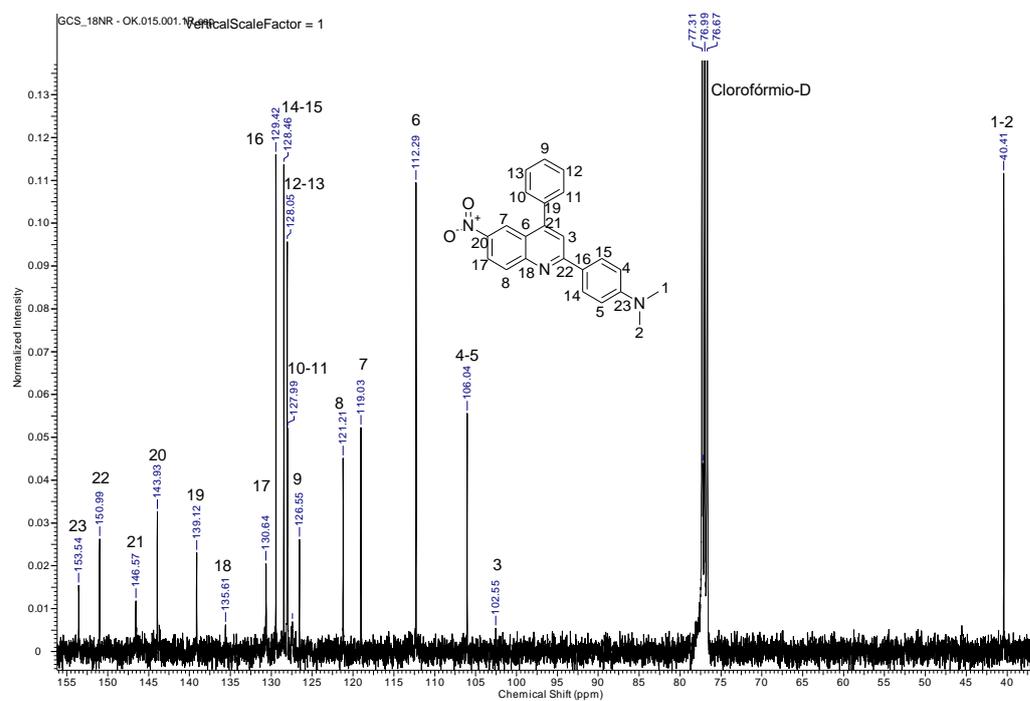


Figura A- 20. Espectro de RMN ^1H para o composto AQ-IV (2-(4-(metiltio)fenil)-4-fenilquinolin-6-amino) em CDCl_3

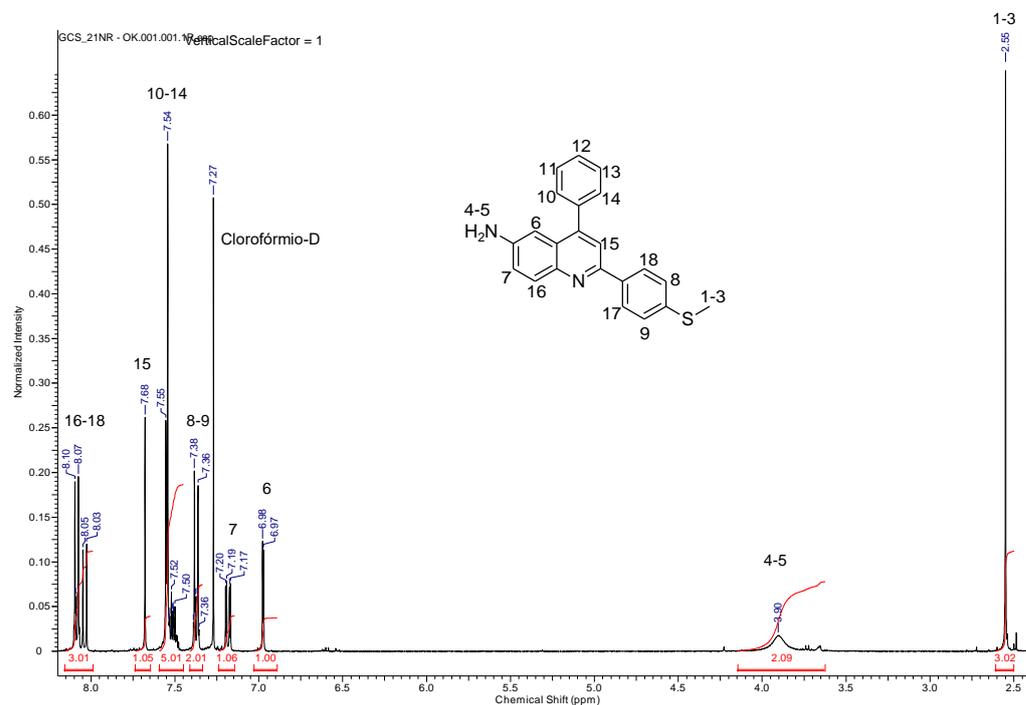


Figura A- 21. Espectro de RMN ^{13}C para o composto AQ-IV (2-(4-(metiltio)fenil)-4-fenilquinolin-6-amino) em CDCl_3

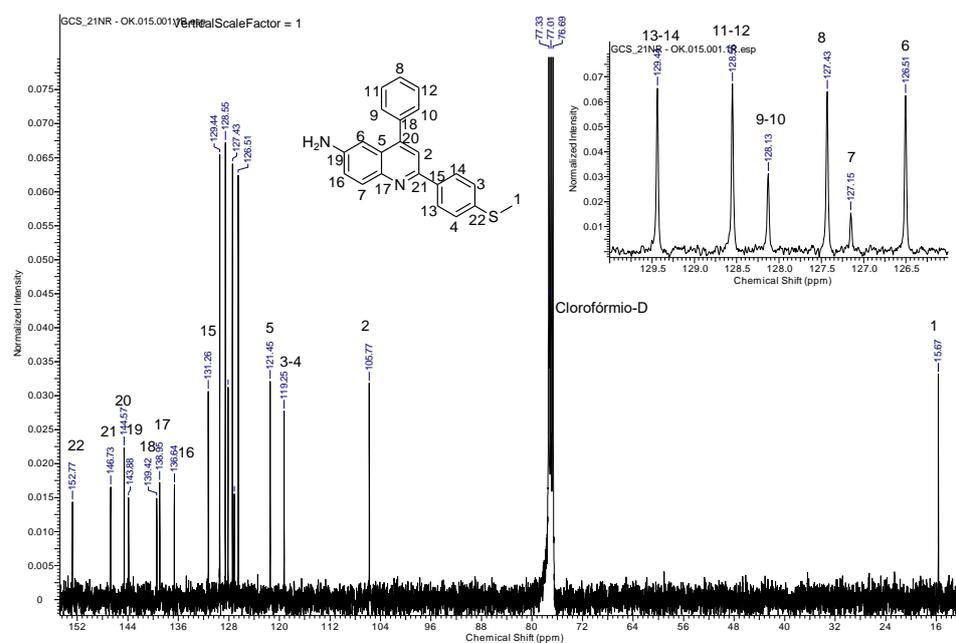


Figura A- 22. Espectro de IV para os compostos: a) AQ-I, b) AQ-II, c) AQ-III e d) AQ-IV).

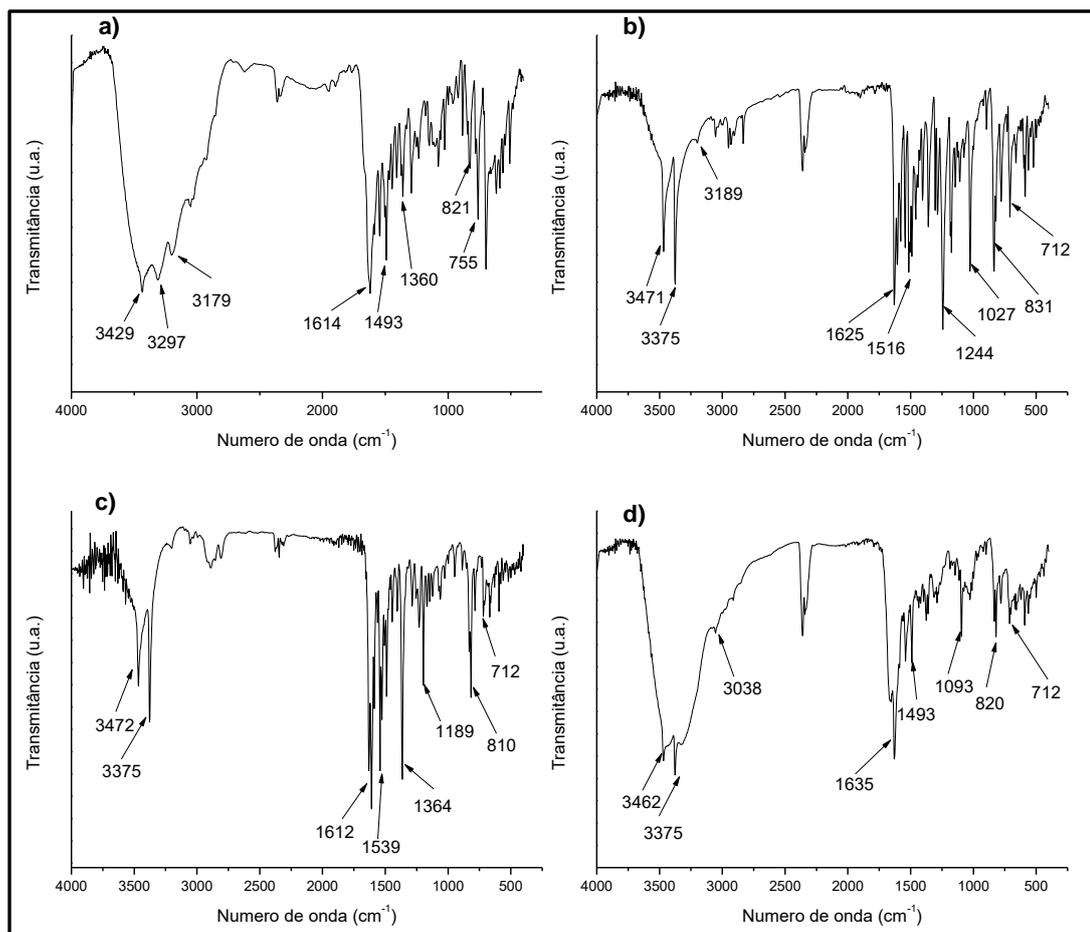


Figura A- 23. Espectro de massas para o composto AQ-I

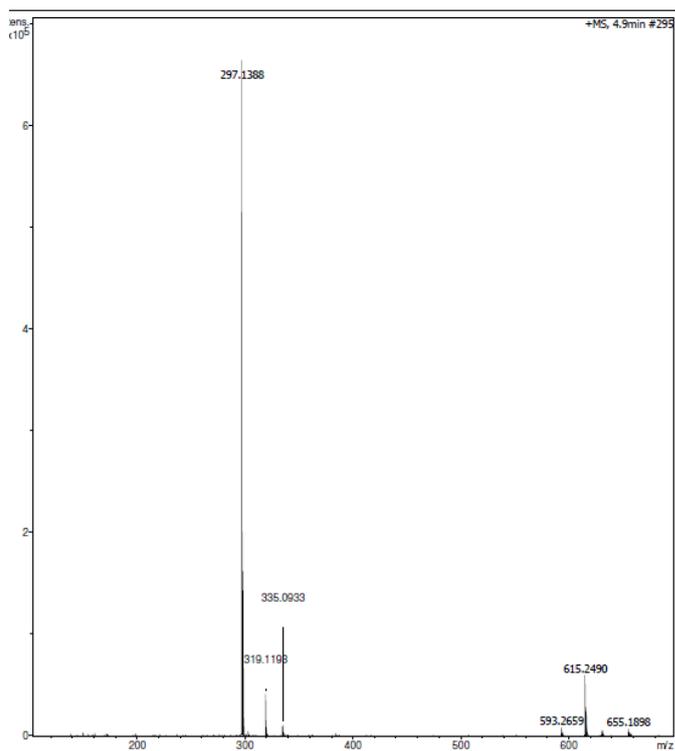


Figura A- 24. Espectro de massas para o composto AQ-II

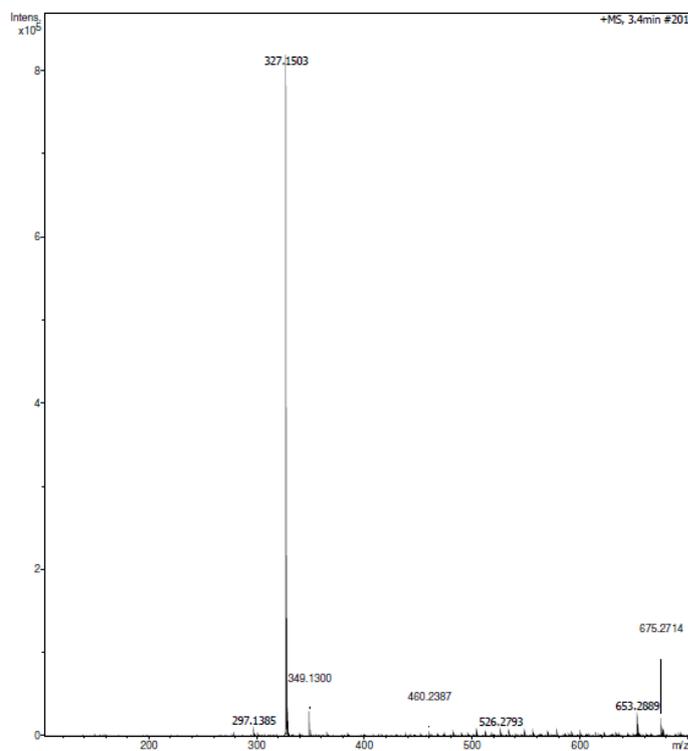


Figura A- 25. Espectro de massas para o composto AQ-III

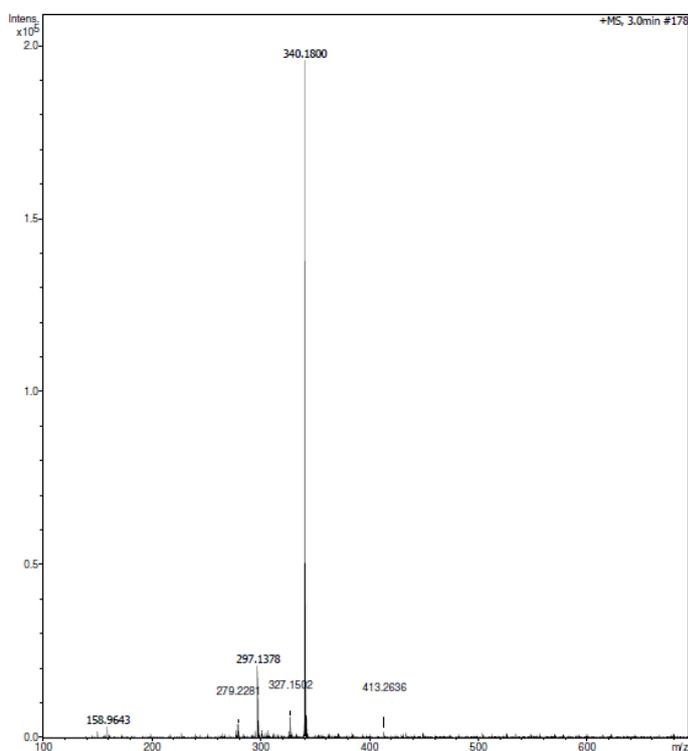
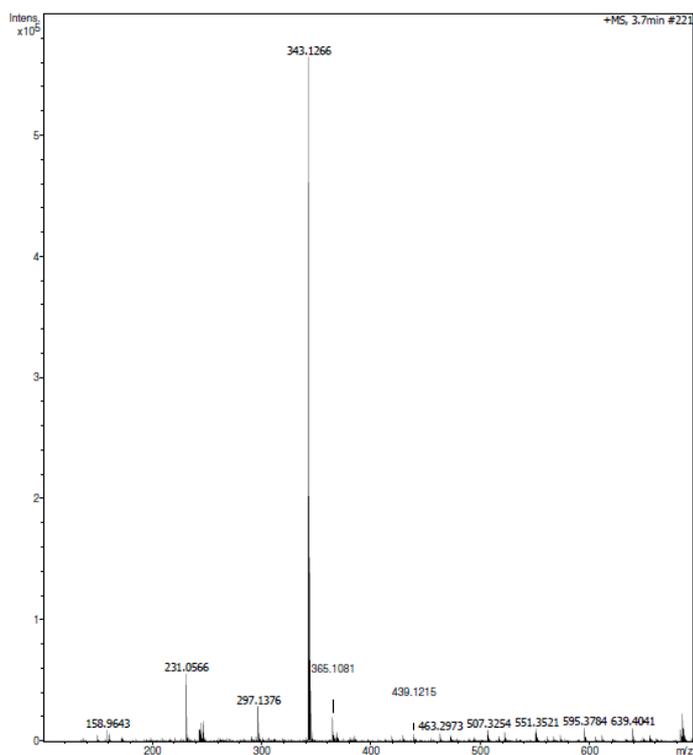


Figura A- 26. Espectro de massas para o composto AQ-IV



Anexo B – Imagens diversas extras para auxílio dos estudos dos compostos sintetizados

Figura B- 1. Gráfico representativo para Coumarina-102, a 2,5 μ M, em acetonitrila, utilizado como padrão para o cálculo de rendimento quântico relativo das aminoquinolinas (λ_{exc} =375nm e λ_{em} =390-650nm)

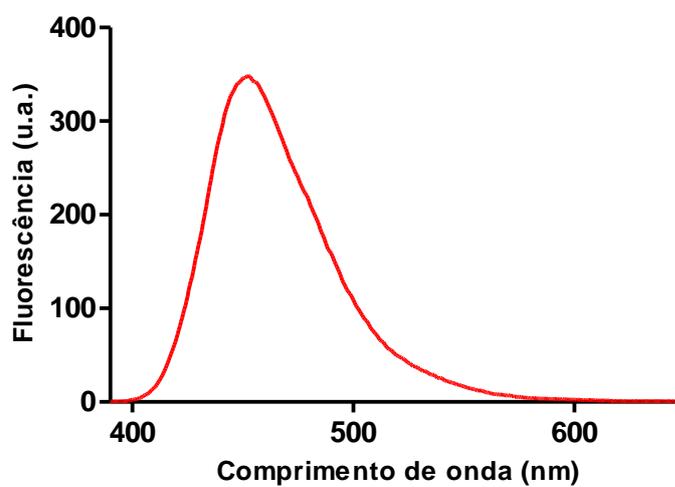


Figura B- 2. Gráficos representativos de UV-Vis para os compostos que foram estudados em termos de absorvidade molar em 16 diferentes solventes para a) AQ1, b) AQ2, c) AQ3, d) AQ4, e) AQ5, f) AQ6

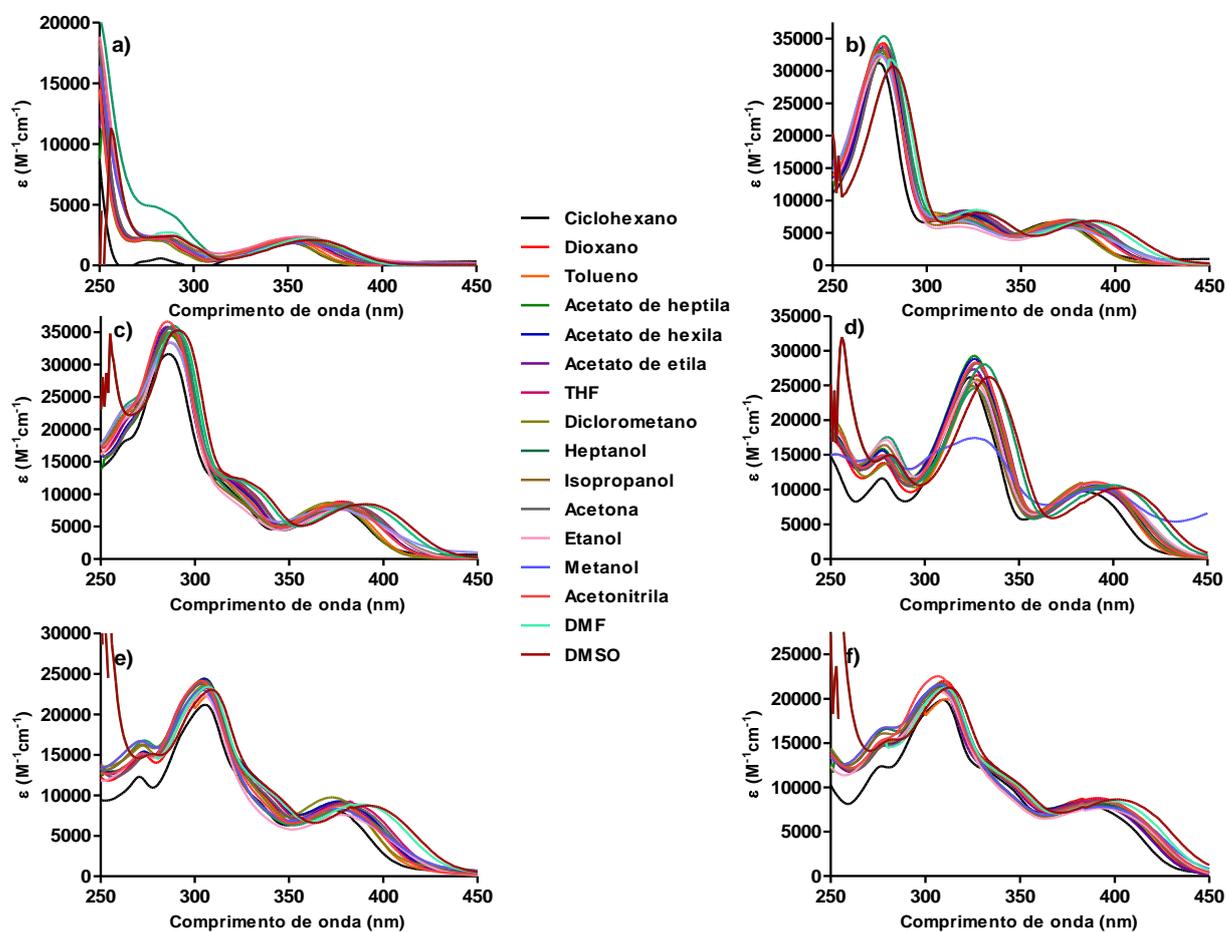


Figura B- 3. Gráfico representativo para AQ4 5 μ M em BSA 40 μ M, em tampão fosfato 50mM a pH=7,0, com valores normalizados. Para a absorbância foi realizada a medida em $\lambda=350-500$ e para a fluorescência foi utilizado os parâmetros $\lambda_{exc}=375$ nm e $\lambda_{em}=390-650$ nm

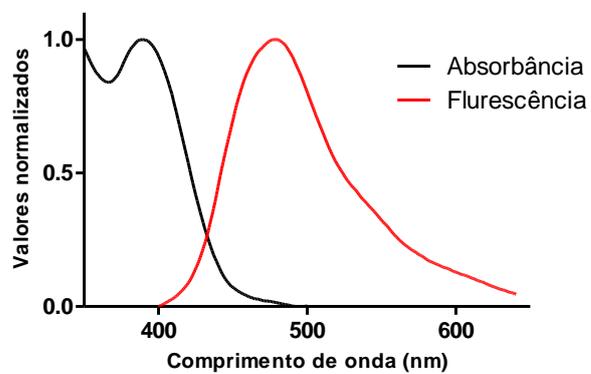


Figura B- 4. Curva do aumento de fluorescência máxima para determinação do CMC de detergentes por fluorescência estacionária utilizando-se da sonda Coumarina-153, com $\lambda_{exc}=410nm$, $\lambda_{em}=450-700nm$, a) para Triton X-100 (detergente neutro), b) para CTAB (detergente positivo), c) para SDBS (detergente negativo) e d) SDS (detergente negativo).

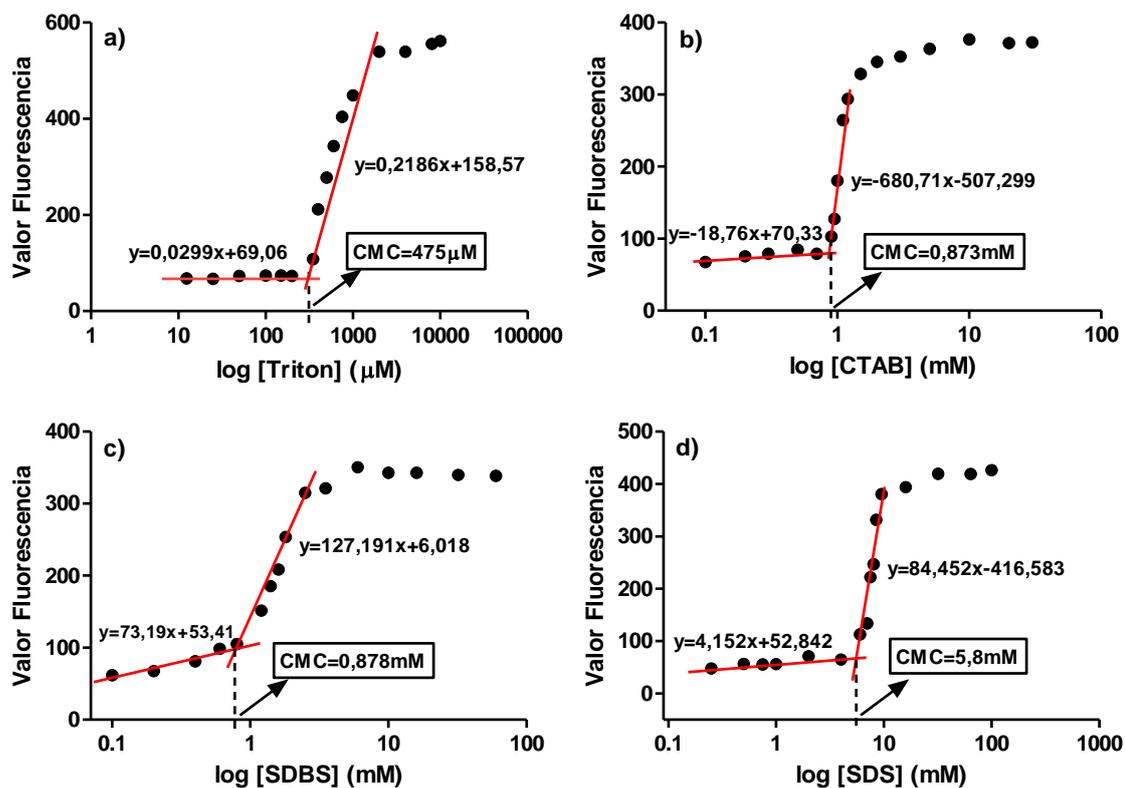


Figura B- 5. Espectro de excitação de AQ5 (5 μ M) em SDS (10mM), utilizando-se como parâmetro $\lambda_{em}=597$ nm, $\lambda_{exc}=300-580$ nm e espectro de emissão de fluorescência realizado a partir do máximo de excitação ($\lambda_{exc}=445$ nm) e obtenção de uma nova banda ($\lambda_{em}=460-750$ nm)

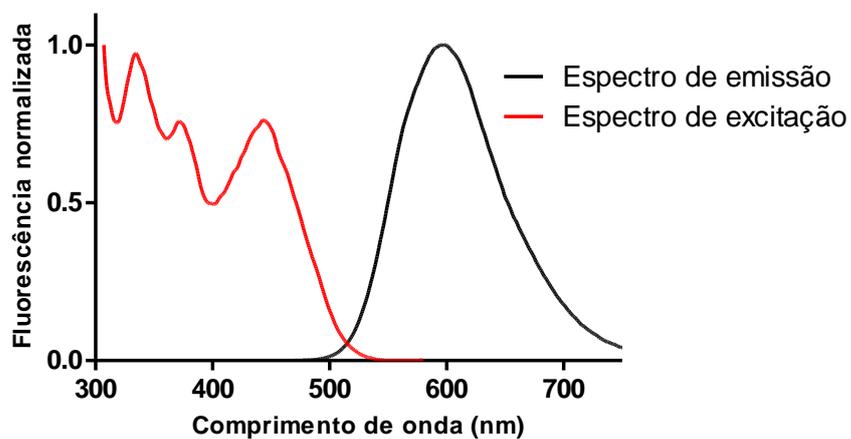


Figura B- 6. Molécula de aminoquinolina e seus prováveis valores aproximados de pKa

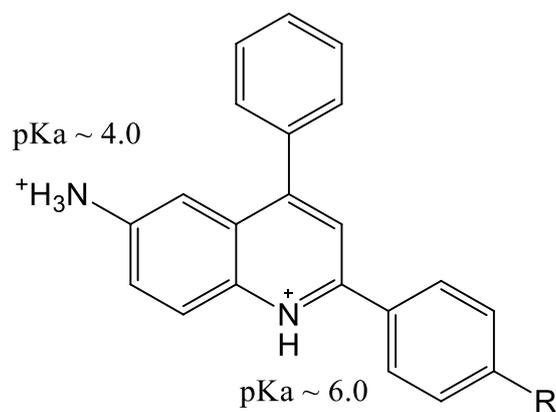


Figura B- 7. Gráficos de alteração de intensidade de fluorescência de AQ4 em DMF por aumento da concentração de NNDA (0, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 μ M). Utilizando como parâmetros: λ_{exc} =375nm, λ_{em} =400-650nm, com 10mm de abertura de slits, filtro de corte de 92% e fotomultiplicadora em 700

