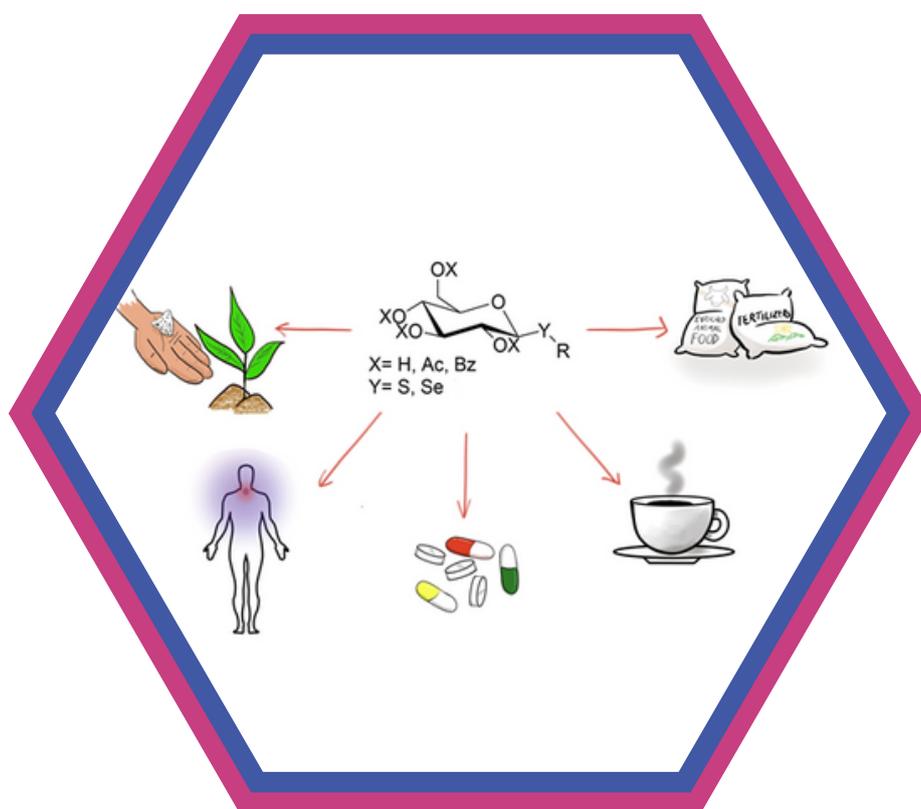


2º ANAIS

9º Workshop do Mestrado Profissional

Instituto de Química
Universidade de São Paulo



Carbohydrates are the most abundant macromolecules on Earth and have a broad spectrum of applications in organic synthesis. Sugar analogues that contain structural modifications in their molecule are of great interest in science and have been gaining attention in a wide area of biological and pharmacological studies. Modifications involving chalcogen atoms are particularly interesting because they combine the absorption of glycosides in the human body with desired properties. Modifications made in position C-1 are highlighted due to the high reactivity of this position and the stability of the anomeric chalcogen-carbon bond.

Beatriz F. dos Santos*, Samuel L. Silva, Alcindo A. Dos Santos

Organização
e Apoio:



Workshop do Programa de Mestrado Profissional Tecnologia em Química e Bioquímica da USP – AMPT (9. : 2021 : São Paulo)

Anais : vol. 2

© 2021 Alcindo A. Dos Santos, Alexander Henning Ulrich, Paulo Roberto H. Moreno
Editora Edgard Blücher Ltda.

Blucher

Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4º andar
04531-934 – São Paulo – SP – Brasil
Tel 55 11 3078-5366
contato@blucher.com.br
www.blucher.com.br

Segundo Novo Acordo Ortográfico, conforme 5. ed.
do Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa,
Academia Brasileira de Letras, março de 2009.

É proibida a reprodução total ou parcial por quaisquer
meios, sem autorização escrita da Editora.

Todos os direitos reservados pela Editora
Edgard Blücher Ltda.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Angélica Ilacqua CRB-8/7057

Workshop do Programa de Mestrado Profissional
Tecnologia em Química e Bioquímica da USP –
AMPT (9. : 2021 : São Paulo) [livro eletrônico]

Anais : vol. 2 / organizado por Alcindo Aparecido
dos Santos, Alexander Henning Ulrich, Paulo
Roberto H. Moreno. – São Paulo : Blucher, 2021.

Bibliografia
ISBN 978-65-5550-140-7 (e-book)

1. Química 2. Bioquímica I. Santos, Alcindo
Aparecido dos II. Ulrich, Alexander Henning III.
Moreno, Paulo Roberto H.

21-5618

CDD 540

Índices para catálogo sistemático:
1. Química

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Reitor: Prof. Dr. Vahan Agopyan

Vice-Reitor: Prof. Dr. Antonio Carlos Hernandez

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Júnior

INSTITUTO DE QUÍMICA

Diretor: Prof. Dr. Paolo Di Mascio

Vice-Diretor: Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira

Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão

Vice-Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho

Presidente da Comissão Coordenadora do Mestrado Profissional: Prof. Dr. Alcindo A. dos Santos

Vice-Presidente da Comissão Coordenadora do Mestrado Profissional: Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich

COMISSÃO EXECUTIVA

Prof. Dr. Alcindo A. Dos Santos (IQ-USP)

Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich (IQ-USP)

Prof. Dr. Amâncio Jorge Silva Nunes (IRI-USP)

Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri (IQ-USP)

Prof. Dr. Jorge César Masini (IQ-USP)

Prof. Dr. Koiti Araki (IQ-USP)

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno (IQ-USP)

EQUIPE DE PRODUÇÃO E APOIO

Beatriz dos Santos Cugnasca (Doutoranda, IQ-USP)

Gabriela Gomes Coelho Ferreira (Pós-Doutoranda, DCP-USP)

Maria Gambera (Graduanda, IRI-USP)

CAPA

Fillipe Ferreira Marques Santos

REVISÃO CIENTÍFICA

Profa. Dra. Bettina Malnic (IQ-USP); Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani (IQ-USP);

Profa. Dra. Daisy de Brito Rezende (IQ-USP); Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri (IQ-USP); Prof. Dr. Jorge César Masini (IQ-USP); Prof. Dr. Koiti Araki (IQ-USP);

Profa. Dra. Liliana Marzorati (IQ-USP); Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno (IQ-USP); Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini (IQ-USP)

EMPRESAS PARCEIRAS

Agilent Technologies Brasil Ltda
Aqualis Indústria E Comércio Ltda
Biolab Sanus Farmaceutica Ltda
CH5 Comércio e Serviços Em Análise Instrumental Ltda
Clariant S/A
Clínica Médica Spazio S/c
Diversey Brasil Indústria Química Ltda
Dow Brasil Sudeste Industrial Ltda
Eurofarma Laboratórios S/A
Farma Service Bioextract Ltda
IFF Essências e Fragrâncias Ltda
Intercientífica Ltda
Lorene Importação e Exportação Ltda
Nova Analítica Importação e Exportação Ltda
Petrobras S/A
Produquímica Indústria E Comércio S/A
Reichold
Siegwerk Brasil Indústria De Tintas Ltda
Spice Indústria Química Ltda
3M do Brasil Ltda
United States Farmacopéia Brasil Ltda
Volkswagen Do Brasil Ind. De Veículos Automotores Ltda
Waters Technologies Do Brasil Ltda

Prefácio

O Programa de Mestrado Profissional do IQ-USP “Tecnologia em Química e Bioquímica” volta-se à formação de profissionais atuantes no mercado de trabalho, que querem aprimorar sua qualificação em uma pós-graduação de excelência oferecida pela USP, com o rigor e nível de dedicação semelhantes aos dos programas acadêmicos desta Universidade, adequados aos objetivos de um mestrado profissional. A satisfação de todos os envolvidos – docentes, alunos e empresas – pode ser percebida pelo alto índice de retorno que temos por parte das empresas parceiras, cujos profissionais formaram-se em nosso Programa. Os ganhos com a relação estabelecida entre as partes são de dimensões superiores ao objetivo principal do Programa, que é o de qualificar profissionais em nível de mestrado stricto sensu. Esses profissionais-alunos acabam sendo vetores de comunicação e estreitamento da relação entre a Universidade e o setor privado, com uma qualificação alinhada com às necessidades tecnológicas da iniciativa privada. Ao mesmo tempo, os conhecimentos e tecnologias das pesquisas de ponta, desenvolvidas pelos orientadores dos Programas do IQ, podem encontrar aplicações práticas, oferecendo soluções tecnológicas genuinamente nacionais.

Em sua 1ª edição publicada em 2020, no formato *open access*, em parceria com a Editora Blücher, por ocasião do 8º workshop do Mestrado Profissional, foram publicados 14 trabalhos, entre Mini-Review (1), Resenhas (2), Notas Técnicas (2) e Resumos Expandidos (9). Devido às características próprias do Programa e do propósito desta publicação, recebemos contribuições variadas, em uma linguagem rigorosa, porém acessível a profissionais da química e de áreas correlatas, tanto do ambiente acadêmico, quanto do setor privado. O formato logrou êxito, como indicado pelo número de acessos aos trabalhos publicados na 1ª edição, com mais de 400.000 *downloads*.

Na sua 2ª edição, os “Anais do Programa de Mestrado Profissional Tecnologia em Química e Bioquímica da USP – AMPT” traz contribuições que incluem trabalhos de revisão e resultados de pesquisa de estudantes de nossos Programas de Pós-graduação, em várias temáticas da química, que se interessaram por este canal de divulgação técnico-científico, em vista de sua grande abrangência, rigor e nível de qualidade. Todos os trabalhos recebidos passaram por rigoroso processo de avaliação dos seus méritos científico por pares.

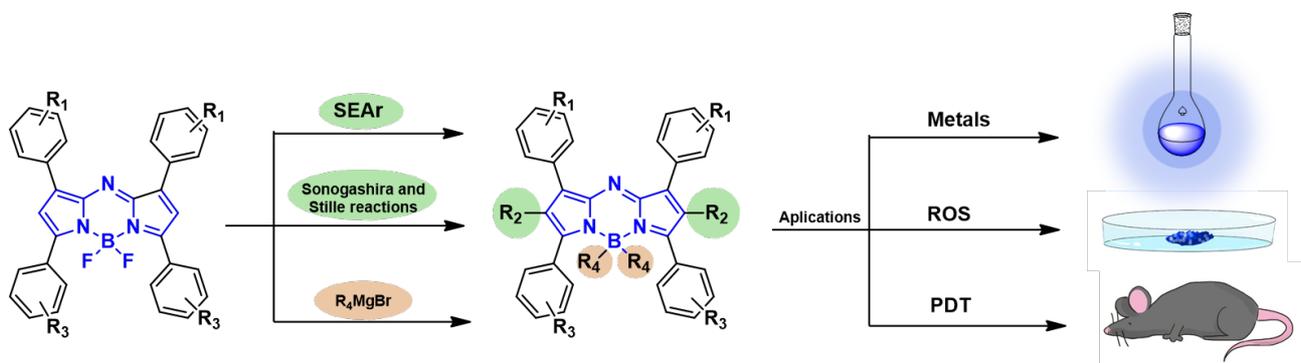
Apesar das mudanças impostas pela pandemia ao longo do ano de 2021, como fazemos desde a implementação do MPT, teremos, entre as atividades do Programa de Mestrado Profissional do IQ, o seu tradicional Workshop, no qual serão apresentados os resultados dos projetos de pesquisa de nossos alunos, realizados em parceria com as empresas em que atuam profissionalmente.

Desta maneira, gostaríamos de agradecer a todos os autores que contribuíram para esta obra e confiaram nela como meio de divulgação para seus achados científicos nas áreas de química orgânica, inorgânica, materiais e analítica, como também nas áreas de biotecnologia e saúde. Esperamos que esta publicação obtenha tanto sucesso quanto a da 1ª edição, trazendo conteúdos que despertem o interesse de profissionais da química e de áreas afins, contribuindo para a aproximação à temas que são alvo de investigação na Academia e de aplicação no Setor privado!

Prof. Dr. Alcindo A. Dos Santos – Coordenador

Prof. Dr. Henning Ulrich – Vice-Coordenador

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno – Membro da Comissão Coordenadora do Programa
Organizadores



FLUOROFÓROS Aza-BODIPY: ESTRATÉGIAS DE SÍNTESE E APLICAÇÕES

Pedro G. Spinello ^a, Alcindo A. Dos Santos ^{a,*}

^aDepartamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo,
05508-000 São Paulo – SP, Brasil.

*e-mail: pedroguillem@usp.br

Abstract

Aza-BODIPY FLUOROPHORES: SYNTHETIC ESTRATEGIES AND APLICACIONES

Since their discovery in 1968, the BODIPYs (4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene) dyes have been attracting attention due to their wide applicability. However, these compounds have some undesirable characteristics, one being their absorption and emission below 600 nm. To remedy this disadvantage, many researchers started to develop analogues, leading to the synthesis of a new class of fluorophores, the *aza*-BODIPY's. This review will address the synthesis, structural modifications and applications of these interesting compounds.

Keywords: *aza*-BODIPY; fluorescence; bioimaging; phototherapy; fluorescence probe.

Resumo

FLUOROFOROS *Aza*-BODIPY: ESTRATÉGIAS DE SÍNTESE E APLICAÇÕES

Desde sua descoberta em 1968, os corantes BODIPYs (4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene) têm chamado a atenção devido à sua ampla aplicabilidade. No entanto, esses compostos apresentam absorção e emissão abaixo de 600 nm. Para contornar esta pequena desvantagem, estudos recentes estão voltados para o desenvolvimento de análogos, levando à síntese de uma nova classe de fluoróforos, os *aza*-BODIPY'. Esta revisão abordará a síntese, modificações estruturais e aplicações desses compostos.

Palavras-chave: *aza*-BODIPY; fluorescência; bioimagem; fototerapia; sonda de fluorescência.

Fluoróforos

Compostos orgânicos fluorescentes são substâncias que têm a capacidade de emitir luz ao absorver radiação eletromagnética¹. Tais espécies se constituem em ferramentas poderosas, que estão à disposição de pesquisadores que investigam eventos e processos químicos, físicos e biológicos². Nos últimos anos, tem havido grandes esforços no design e síntese de fluoróforos com estruturas moleculares inéditas e propriedades fotofísicas-chave para as mais diversas aplicações³.

Alguns cromóforos têm sido utilizados como sensores moleculares³, como marcadores fluorescentes⁴, como diodos orgânicos emissores de luz (OLEDs)⁵ e como sensibilizantes de células fotovoltaicas⁶. Além disso, o interesse nestes materiais vem se intensificando, devido aos seus relevantes usos em sistemas biológicos e aplicações para imageamento em medicina⁷.

Apesar do extenso acervo de fluoróforos que vêm sendo utilizados e estudados, a família dos BODIPY's (*boron dipirromethene*) tem chamado atenção devido ao acesso sintético, facilidade de funcionalização, alta estabilidade química, versatilidade e boas propriedades fotofísicas⁸⁻¹⁰.

Histórico

O núcleo BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno), apresentado na figura 1 (A), foi sintetizado pela primeira vez por Treibs e Kreuzer em 1968¹¹. Desde então, tem sido vastamente explorado e aplicado em diversas áreas do conhecimento, porém apresentam algumas características fotofísicas que limitam suas aplicações⁸. Este fato estimulou investigações de sistemas similares, que não apresentassem tais limitações.

Uma das principais limitações dos BODIPY's é a faixa de absorção e emissão, que está no ultravioleta-visível (UV-Vis), comprimento de onda em que ocorre a absorção e/ou espalhamento de luz em biomateriais e consequente limitação de uso. Para muitas aplicações mais sofisticadas, especialmente em biomedicina e bioquímica, é necessário que o fluoróforo, absorva no infravermelho próximo (IVP)¹² e com isso, grandes avanços foram e vem sendo atingidos com derivados *aza*-BODIPY (figura 1B, Os BODIPY's são caracterizados por sais internos e por efeitos práticos, as cargas não serão apresentadas nas próximas estruturas).

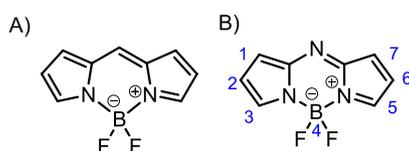


Figura 1. Núcleos fundamentais de um BODIPY e de um *aza*-BODIPY.

O primeiro registro de reação envolvendo um *aza*-dipirrometeno (**1**) foi descrito em 1943 por Rogers¹³, porém esta classe recebeu pouca atenção e somente em 1993 Boyer demonstrou que sua complexação com o trifluoreto de boro¹⁴. O complexo di-fluorborado **2**

apresentou características fluorescentes interessantes e destacadamente relevantes, em comparação com seu precursor; contudo a rota sintética empregada por Rogers apresentava condições drásticas e baixo rendimento, o que motivou a realização de novos estudos.

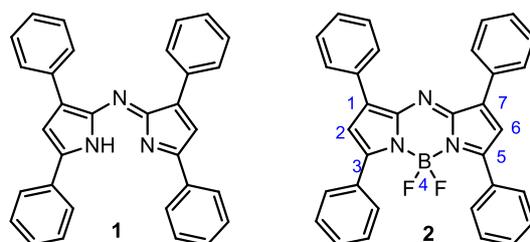


Figura 2. Representação estrutural dos primeiros aza-dipirrometeno e aza-BODIPY reportados em literatura.

DESIGN ESTRUTURAL

Principais rotas sintéticas

Devido a necessidade de rotas sintéticas em condições amenas, com maiores rendimentos e operacionalmente mais fáceis para a síntese do núcleo aza-BODIPY, diversos estudos metodológicos foram realizados e entre eles, os três principais foram os de O'Shea, Carreira e Lukyanets, como apresentado na figura 3.

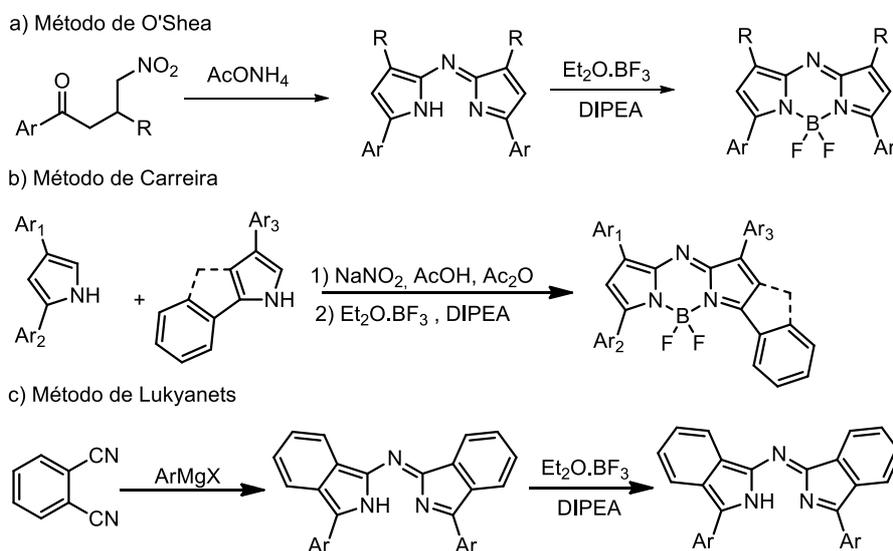


Figura 3. Principais rotas sintéticas para a construção do núcleo aza-BODIPY

Em um primeiro momento, O'Shea investigou a síntese dos produtos simétricos e assimétricos¹⁵, partindo da ciclização dos adutos obtidos da adição 1,4- do nitrometano à chalconas, seguido de boro-complexação. As condições reacionais deste método são amenas e os rendimentos globais variam de 25 a 60%.

O método descrito por Carreira permite explorar a extensão da conjugação de compostos *aza*-BODIPY e se fundamenta na ciclização direta de pirróis substituídos, seguida da complexação¹⁶. Por este procedimento se pode preparar compostos simétricos e assimétricos, em rendimentos tipicamente maiores que os da metodologia comentada anteriormente, ficando na faixa de 40 a 90%.

Em estudos mais recentes, Lukyanets demonstrou uma metodologia que permitiu preparar compostos simétricos ao submeter a ftalonitrila à reação com halogeneto de arilmagnésio¹⁷. Esta condição reacional apresenta rendimentos aproximadamente de 20%, inferiores aos exemplos reportados anteriormente.

Estas são as três principais e mais abrangentes rotas sintéticas de *aza*-BODIPY's; nos núcleos já sintetizados, várias modificações estruturais podem ser realizadas à fim de modular as características e propriedades desejáveis nos compostos-alvo¹⁸. Dentre estas características as mais realizadas são modificações para melhorar características fotofísicas^{16,19,20} e aumentar hidrofiliicidade/biocompatibilidade²¹⁻²⁴.

Modificações estruturais

Estruturalmente, os *aza*-BODIPY's são versáteis e admitem funcionalizações/modificações estratégicas, a partir de núcleos fundamentais mais gerais, permitindo síntese de famílias de compostos. Intrinsecamente, a presença de anéis aromáticos nas posições 1, 3, 5 e 7 lhes conferem maior estabilidade e por consequência, em compostos que contenham anéis nestas posições, pós-funcionalizações das posições 2, 4 e 6 estão entre as modificações mais comumente reportadas em literatura.

O primeiro relato da substituição do núcleo *aza*-BODIPY foi de halogenação, onde foi realizada reação de bromação²⁵ nas posições 2 e 6 do *aza*-dipirrometeno (**1**) utilizando Br₂. Para a formação deste produto as condições reacionais empregadas foram amenas, levando ao núcleo dihalogenado (**3**) em rendimentos elevados (Figura 4). Em seguida, observou-se que com substituintes ativantes, também é possível realizar a halogenação com o núcleo já complexado utilizando de *N*-iodosuccinimida (NIS) ou de *N*-bromosuccinimida (NBS)^{26,27}.

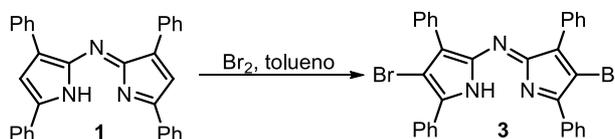


Figura 4. Estratégia de halogenação do composto **1**

Em seguida, Jiao em 2009²⁸ foi pioneiro na monosubstituição de um grupamento aldeído no núcleo, tornando o núcleo um bloco de construção estratégico. A reação de formilação ocorreu via reação de Vilsmeier-Haack, produzindo o correspondente *aza*-BODIPY monosubstituído (**4**) em alto rendimento (Figura 5). O produto diformilado não foi observado devido ao fato da primeira inserção da carbonila, que implicou em desativação, prevenindo o segundo ataque nucleofílico.

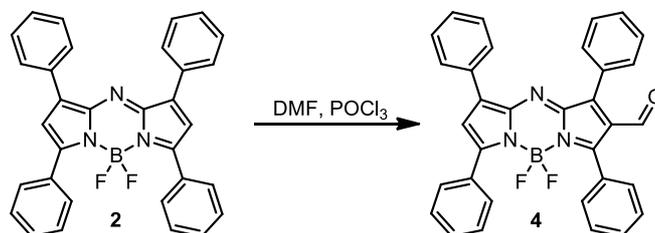


Figura 5. Condição de formulação do núcleo *aza*-BODIPY

O composto monoformilado que tem um grupamento muito eletrofílico, é submetido a reações de Wittig utilizando uma ilida de fósforo estabilizada, dando origem aos correspondentes produtos α,β -insaturados em rendimentos da ordem de 50 a 90%^{29,30}. Além disso, também é possível a reação do aldeído com grupos nucleofílicos, para formação de compostos para aplicações variadas^{31,32}.

Os núcleos halogenados também podem ser utilizados como blocos de construção para reações posteriores, principalmente para reações de acoplamento catalisadas por paládio. Esta reação foi reportada pela primeira vez com núcleos *aza*-BODIPY, em 2011 por Moritz e colaboradores, em que utilizaram o acoplamento de Stille como estratégia de acoplamento de um composto dibromado com um tiofeno silanizado que levou ao 2,6-tiofeno *aza*-BODIPY em bom rendimento (figura 6)³³.

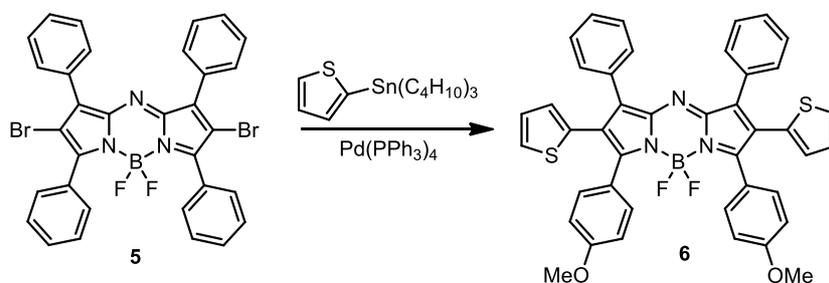


Figura 6. Reação de acoplamento de Stille para formação do 2,6-tiofeno *aza*-BODIPY

Em um estudo recente um acoplamento de Sonogashira, foi reportado por Pascal e co-autores, como estratégia de preparação de BODIPY's di-alquínicos (**8**), em rendimentos elevados. Estes compostos foram investigados para a aplicação como limitadores de potência óptica (Figura 7)³⁴.

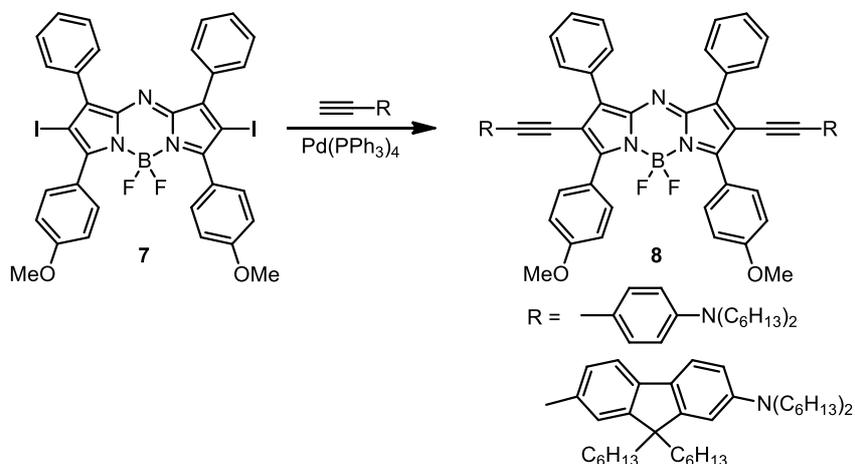


Figura 7. Exemplo de reação de acoplamento de aza-iodo-BODIPY's com alquinos terminais, catalisada por paládio

Como já comentado, além das posições 2 e 6 serem passíveis de funcionalizações, também é possível realizar modificações na posição 4. A funcionalização do átomo de boro é uma estratégia amplamente investigada nos corantes de núcleo BODIPY³⁵, porém menos comuns em derivados *aza*-BODIPY. A substituição dos átomos de flúor foi reportada por O'Shea³⁶, onde realizou a reação do *aza*-BODIPY com metóxido de sódio, dando origem ao composto 9 (Figura 8).

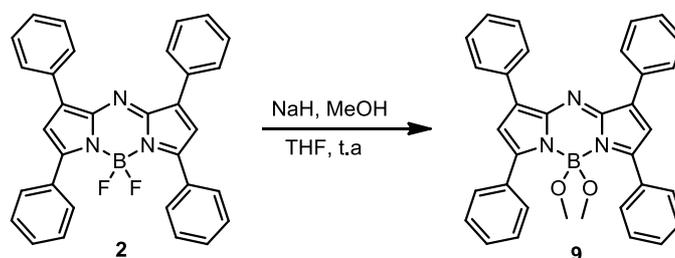


Figura 8. Primeira reação de substituição dos átomos de flúor de um aza-BODIPY

O ataque nucleofílico de reagentes de Grignard são as principais estratégias empregadas atualmente para a substituição dos átomos de flúor da posição 4, como representado na figura 9³⁵. Recentemente foram reportadas^{22,37-39} sínteses de *aza*-BODIPY's com este padrão de substituições, sendo que alguns dos produtos gerados tiveram sua hidrofiliicidade aumentada, permitindo aplicações em sistemas biológicos *in-vitro* e *in-vivo*.

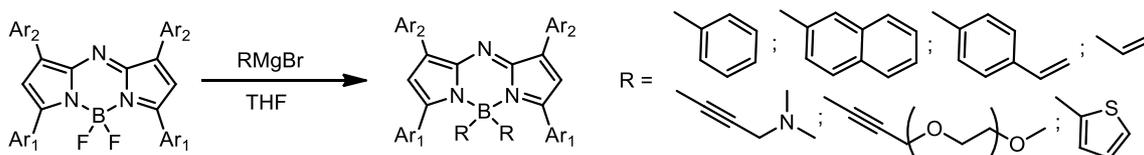


Figura 9. Principal estratégia para substituição dos átomos de flúor

APLICAÇÕES

Sondas fluorescentes

A maioria dos eventos estudados nas ciências química, biológica e física ocorrem em escalas muito menores dos que grande parte de outros eventos cotidianos com os quais a maioria das pessoas está acostumada a presenciar. Algumas informações sobre esses eventos podem ser convenientemente transmitidas por meio de sinais de luz, que são emitidos por dispositivos moleculares modelados, idealmente para a detecção de certo analito. Entre estes dispositivos estão as sondas fluorescentes³.

Este recurso analítico tem ganhado cada vez mais aplicações e versatilidade devido à alta sensibilidade, baixo tempo de resposta, alta resolução e seletividade, com baixa ou mínima invasividade⁴⁰. Os BODIPY's e *aza*-BODIPY's encontram grandes e amplas aplicações como sensores fluorescentes devido a suas excelentes propriedades fotofísicas, sendo possível a modulação destas propriedades em função do perfil estrutural requerido para a aplicação pretendida.

Deteção de espécies reativas de oxigênio

O oxigênio tem uma estrutura molecular única e além de muito abundante em organismos vivos, cumprindo papéis vitais, é precursor ou componente de entidades químicas responsáveis por estresse oxidativo, que também cumpre papéis benéficos e deletérios. Ao aceitar elétrons, em processos do metabolismo aeróbio, da origem às espécies reativas de oxigênio (ERO's), mediadoras dos processos de estresse oxidativo⁴¹. Cabem a estas espécies várias funções vitais, entre as quais a sinalização celular, indução de necrose, supressão ou indução de expressão de genes entre outras⁴². Contudo, o desequilíbrio na produção das ERO's e das defesas antioxidantes que protegem as células pode implicar em danos, causando assim inúmeras doenças ou desordens como câncer, asma e problemas neurodegenerativos como Alzheimer e Parkinson⁴¹⁻⁴⁴. Devido as patologias associadas as ERO's, sua detecção, quantificação e especificação são de fundamental importância para a compreensão, diagnóstico e controle/tratamento dos eventos aos quais estão relacionadas. As sondas fluorescentes estão entre as principais ferramentas analíticas rotineiramente desenvolvidas, customizadas e sintetizadas para a medição das ERO's.

Uma das primeiras divulgações científicas de *aza*-BODIPY para detecção de ERO's foi realizada por Jiang e colaboradores em 2016⁴⁵. Neste trabalho, os autores mostraram que a função "ácido borônico" nos grupamentos arilas, (composto **10**) das posições 3 e 7, reagem de maneira seletiva com H₂O₂ (Figura 10), convertendo o ácido borônico nos respectivos fenóis (composto **11**). Simultaneamente a esta transformação, ocorre a diminuição de emissão fluorescência em 681 nm e aumento em 724 nm evidenciando a presença de peróxido de hidrogênio no meio. Também foram realizados estudos *in vitro* a fim de detectar estas espécies utilizando-se de células hela.

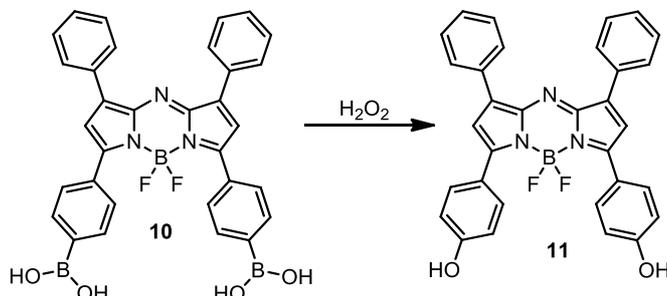


Figura 10. Reação seletiva da sonda na detecção de H_2O_2

Outros derivados *aza*-BODIPY funcionalizados com grupamentos derivados do ácido borônico⁴⁶ e derivados de hidrazonas⁴⁷ foram utilizados para detecção de ERO's. Neste ano (2021), Gao e co-autores⁴⁸ reportaram a síntese e aplicação de um sensor seletivo para íons hipoclorito (ClO^-), representado pelo composto **12**. O evento de oxidação promovido por íons hipoclorito foi detectado pela oxidação seletiva dos átomos de telúrio, que atuaram como “chaves liga/desliga” do dispositivo fluorescente, formando o produto **13**. Neste estudo, o fenômeno de fluorescência foi mediado pelos átomos de telúrio graças ao processo de transferência eletrônica fotoinduzida (PET), trazido pelo efeito do átomo pesado do telúrio⁴⁹. Neste trabalho, foram realizados estudos *in vitro* com células RAW264.7 em que íons hipoclorito cumprem papel fisiológico relevante (Figura 11).

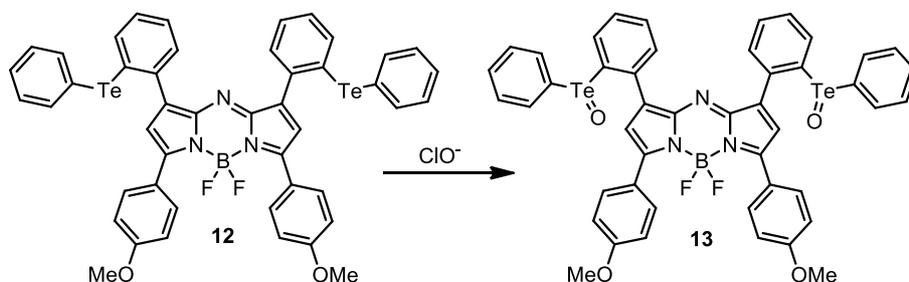


Figura 11. Reação de oxidação dos átomos de telúrio do *aza*-BODIPY promovida seletivamente por íons hipoclorito, acompanhado de aumento de fluorescência

Detecção de metais

Outra aplicação para as quais os sensores fluorescentes tem ganhado grande aplicação é a de detecção de íons metálicos, em diferentes matrizes, incluindo o de amostras ambientais e biológicas. O mercúrio está entre os elementos de maior toxicidade para organismos superiores, em todos os seus estados de oxidação⁵⁰.

Akkaya e colaboradores reportaram a detecção de metais promovida por *aza*-BODIPY's, substituídos nas posições 1 e 7 por grupamentos 2-piridínicos, que desempenharam papel quelante de íons metálicos⁵¹. A sonda apresentou boa seletividade para íons Hg^{2+} , evidenciado pelo deslocamento de emissão de fluorescência, de 682 para 719 nm (Figura

12). Sondas contendo grupamentos 2-piridinil⁵² e 2-tiofeno⁵³ também foram investigadas para tais aplicações.

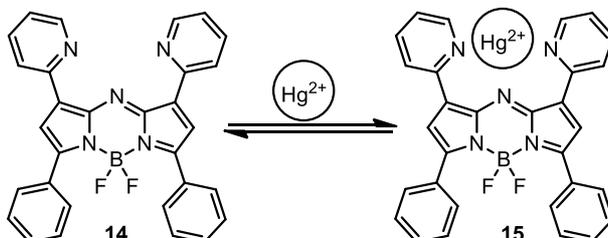


Figura 12. Representação da estrutura formada da interação do composto 14 com íons Hg^{2+}

O Cobre é um elemento-traço, presente em organismos biológicos com participação em processos celulares importantes^{54,55}. Contudo em altas concentrações pode ser tóxico e o aumento de sua utilização em vários segmentos, em especial agricultura, provoca contaminação ambiental que pode acarretar em doenças neurodegenerativas⁵⁶ e por este motivo, métodos robustos de sua detecção são importantes.

Em estudos recentes, Sekar e co-autores reportaram a síntese de um *aza*-BODIPY substituído com uma porção 3-etóxi-*N,N*-dietilanilina nos anéis aromáticos superiores (**16**)⁵⁷, capaz de detectar quantitativa- e seletivamente, íons cobre (Figura 13). O composto **16** apresentou emissão apenas residual em 749 nm e na presença de Cu^{2+} passou a ter forte fluorescência em 700 nm.

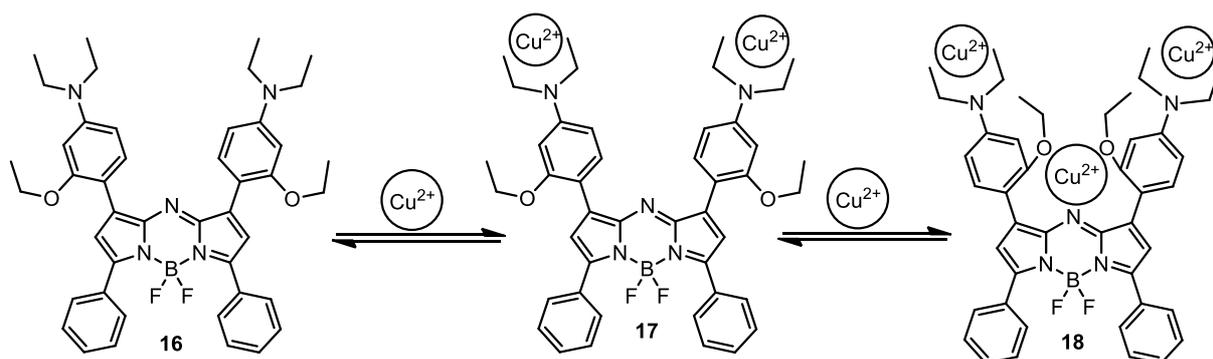


Figura 13. Esquema de reação entre o *aza*-BODIPY **16** e íons Cu^{2+}

Terapia fotodinâmica

Terapia fotodinâmica (PDT) consiste na habilidade de um composto ou sistema, de no estado excitado, reagir com oxigênio para formar oxigênio singlete (1O_2). A espécie resultante pode reagir com as moléculas presentes na célula causando estresse oxidativo, ocasionando, conseqüentemente, morte celular^{21,58}. Derivados *aza*-BODIPY's, além de

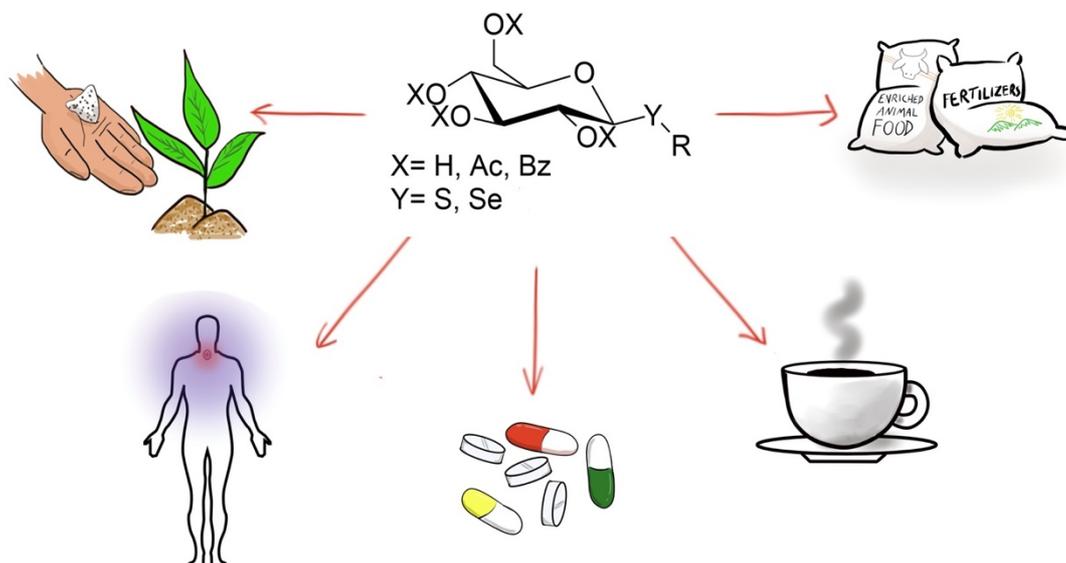
relevância e importância, que se referem ao campo da medicina ainda são muito recentes, contudo, promissoras e com uma janela de oportunidades não só instigantes do ponto de vista científico, como também decisivas do ponto de vista do impacto social e de saúde pública que podem trazer.

REFERÊNCIAS

1. Jameson, D. M. *Jameson, David M-Introduction to Fluorescence-CRC Press (2014); 2014.*
2. Bismillah, A. N.; Aprahamian, I. ;*Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 5631.
3. Demchenko, A. P. *Introduction to Fluorescence Sensing; 2015.*
4. Sameiro, M.; Gonçalves, T. ;*Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190.
5. Chou, P. T.; Chi, Y. ;*Chem. - A Eur. J.* **2007**, *13*, 380.
6. Mishra, A.; Fischer, M. K. R.; Büuerle, P. ;*Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 2474.
7. Grimm, J. B.; Tkachuk, A. N.; Xie, L.; Choi, H.; Mohar, B.; Falco, N.; Schaefer, K.; Patel, R.; Zheng, Q.; Liu, Z.; Lippincott-Schwartz, J.; Brown, T. A.; Lavis, L. D. ;*Nat. Methods* **2020**, *17*, 815.
8. Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932.
9. Kowada, T.; Maeda, H.; Kikuchi, K. ;*Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4953.
10. Ulrich, G.; Ziesel, R.; Harriman, A. ;*Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184.
11. Treibs, A.; Kreuzer, F. -H ;*Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208.
12. Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. ;*Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620.
13. Rogers, M. A. T. ;*J. Chem. Soc.* **1943**, 590.
14. Sathyamoorthi, G.; Soong, M.; Ross, T. W.; Boyer, J. H. **1993**, *4*, 603.
15. Killoran, J.; Allen, L.; Gallagher, J. F.; Gallagher, W. M.; O’Shea, D. F. ;*Chem. Commun.* **2002**, *317*, 1862.
16. Zhao, W.; Carreira, E. M. ;*Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12*, 7254.
17. Donyagina, V. F.; Shimizu, S.; Kobayashi, N.; Lukyanets, E. A. ;*Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6152.
18. Shamova, L. I.; Zatsikha, Y. V.; Nemykin, V. N. Synthesis pathways for the preparation of the BODIPY analogues: aza-BODIPYs, BOPHYs and some other pyrrole-based acyclic chromophores. *Dalt. Trans.* **2021**, *50*, 1569–1593.
19. Wang, Y.; Zhang, D.; Xiong, K.; Shang, R.; Jiang, X. D. ;*Chinese Chem. Lett.* **2021**.
20. Daly, H. C.; Sampedro, G.; Bon, C.; Wu, D.; Ismail, G.; Cahill, R. A.; O’Shea, D. F. ;*Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *135*, 392.
21. Kalot, G.; Godard, A.; Busser, B.; Pliquett, J.; Broekgaarden, M.; Motto-Ros, V.; Wegner, K. D.; Resch-Genger, U.; Köster, U.; Denat, F.; Coll, J. L.; Bodio, E.; Goze, C.; Sancey, L. ;*Cells* **2020**, *9*, 2.
22. Kalot, G.; Godard, A.; Busser, B.; Pliquett, J.; Broekgaarden, M.; Motto-Ros, V.;

- Wegner, K. D.; Resch-Genger, U.; Köster, U.; Denat, F.; Coll, J. L.; Bodio, E.; Goze, C.; Sancey, L. ;*Cells* **2020**, *9*.
23. Kamkaew, A.; Burgess, K. ;*Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10664.
24. Wu, D.; Cheung, S.; Daly, R.; Burke, H.; Scanlan, E. M.; O'Shea, D. F. ;*European J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 6841.
25. Gorman, A.; Killoran, J.; O'Shea, C.; Kenna, T.; Gallagher, W. M.; O'Shea, D. F. ;*J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10619.
26. Yu, Z.; Zhou, J.; Ji, X.; Lin, G.; Xu, S.; Dong, X.; Zhao, W. ;*J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 9950.
27. Karatay, A.; Miser, M. C.; Cui, X.; Küçüköz, B.; Yilmaz, H.; Sevinç, G.; Akhüseyin, E.; Wu, X.; Hayvali, M.; Yaglioglu, H. G.; Zhao, J.; Elmali, A. ;*Dye. Pigment.* **2015**, *122*, 286.
28. Jiao, L.; Yu, C.; Li, J.; Wang, Z.; Wu, M.; Hao, E. ;*J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7525.
29. Koch, A.; Kumar, S.; Ravikanth, M. ;*Tetrahedron* **2017**, *73*, 1459.
30. Wang, J.; Wu, Y.; Sheng, W.; Yu, C.; Wei, Y.; Hao, E.; Jiao, L. ;*ACS Omega* **2017**, *2*, 2568.
31. Kumar, S.; Gobeze, H. B.; Chatterjee, T.; Ravikanth, M. 1.
32. Gao, Y.; Pan, Y.; Chi, Y.; He, Y.; Chen, H.; Nemykin, V. N. ;*Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *206*, 190.
33. Gresser, R.; Hartmann, H.; Wrackmeyer, M.; Leo, K.; Riede, M. ;*Tetrahedron* **2011**, *67*, 7148.
34. Pascal, S.; Bellier, Q.; David, S.; Bouit, P. A.; Chi, S. H.; Makarov, N. S.; Le Guennic, B.; Chibani, S.; Berginc, G.; Feneyrou, P.; Jacquemin, D.; Perry, J. W.; Maury, O.; Andraud, C. ;*J. Phys. Chem. C* **2019**.
35. Bodio, E.; Goze, C. ;*Dye. Pigment.* **2019**, *160*, 700.
36. Palma, A.; Tasiar, M.; Frimannsson, D. O.; Vu, T. T.; Méallet-Renault, R.; O'Shea, D. F. ;*Org. Lett.* **2009**, *11*, 3638.
37. Florès, O.; Pliquett, J.; Abad Galan, L.; Lescure, R.; Denat, F.; Maury, O.; Pallier, A.; Bellaye, P. S.; Collin, B.; Mème, S.; Bonnet, C. S.; Bodio, E.; Goze, C. ;*Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 1306.
38. Pliquett, J.; Dubois, A.; Racœur, C.; Mabrouk, N.; Amor, S.; Lescure, R.; Bettaïeb, A.; Collin, B.; Bernhard, C.; Denat, F.; Bellaye, P. S.; Paul, C.; Bodio, E.; Goze, C. ;*Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 1061.
39. Diaz-Rodriguez, R. M.; Burke, L.; Robertson, K. N.; Thompson, A. ;*Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 2139.
40. De Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. ;*Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515.
41. Auten, R. L.; Davis, J. M. ;*Pediatr. Res.* **2009**, *66*, 121.
42. Hancock, J. T.; Desikan, R.; Neill, S. J. ;*Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 345.
43. Deshmukh, P. P.; Navalkar, A.; Maji, S. K.; Manjare, S. T. ;*Sensors Actuators, B Chem.* **2019**, *281*, 8.

44. Malankar, G. S.; Sakunthala, A.; Navalkar, A.; Maji, S. K.; Raju, S.; Manjare, S. T. ;*Anal. Chim. Acta* **2021**, *1150*, 338205.
45. Xu, J.; Zhai, J.; Xu, Y.; Zhu, J.; Qin, Y.; Jiang, D. ;*Analyst* **2016**, *141*, 2380.
46. Mao, W.; Zhu, M.; Yan, C.; Ma, Y.; Guo, Z.; Zhu, W. ;*ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 45.
47. Gao, Y.; Pan, Y.; He, Y.; Chen, H.; Nemykin, V. N. ;*Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, *269*, 151.
48. Shi, W. J.; Feng, L. X.; Wang, X.; Huang, Y.; Wei, Y. F.; Huang, Y. Y.; Ma, H. J.; Wang, W.; Xiang, M.; Gao, L. ;*Talanta* **2021**, *233*, 122581.
49. Daly, B.; Ling, J.; De Silva, A. P. ;*Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4203.
50. Nolan, E. M.; Lippard, S. J. ;*Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3443.
51. Coskun, A.; Yilmaz, M. D.; Akkaya, E. U. ;*Org. Lett.* **2007**, *9*, 607.
52. Jiang, X. D.; Zhao, J.; Li, Q.; Sun, C. L.; Guan, J.; Sun, G. T.; Xiao, L. J. ;*Dye. Pigment.* **2016**, *125*, 136.
53. Liu, S.; Shi, Z.; Xu, W.; Yang, H.; Xi, N.; Liu, X.; Zhao, Q.; Huang, W. ;*Dye. Pigment.* **2014**, *103*, 145.
54. Shi, Z.; Han, X.; Hu, W.; Bai, H.; Peng, B.; Ji, L.; Fan, Q.; Li, L.; Huang, W. Bioapplications of small molecule Aza-BODIPY: From rational structural design to: From vivo investigations. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 7533–7567.
55. Ciesiński, K. L.; Hyman, L. M.; Derisavifard, S.; Franz, K. J. ;*Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 6808.
56. Saleem, M.; Rafiq, M.; Hanif, M.; Shaheen, M. A.; Seo, S. Y. *A Brief Review on Fluorescent Copper Sensor Based on Conjugated Organic Dyes*; Springer US, 2018; Vol. 28.
57. Gawale, Y.; Mangalath, S.; Adarsh, N.; Joseph, J.; Ramaiah, D.; Sekar, N. ;*Dye. Pigment.* **2019**, *171*, 107684.
58. Bodio, E.; Denat, F.; Goze, C. In *Porphyrim Science By Women (In 3 Volumes)*; World Scientific Publishing Co., 2020; pp. 116–140.
59. Hoover, G. C.; Seferos, D. S. ;*Chem. Sci.* **2019**, *10*, 9182.
60. Lee, D. R.; Lee, K. H.; Shao, W.; Kim, C. L.; Kim, J.; Lee, J. Y. ;*Chem. Mater.* **2020**, *32*, 2583.
61. Ortiz, M. J.; Agarrabeitia, A. R.; Duran-Sampedro, G.; Bañuelos Prieto, J.; Lopez, T. A.; Massad, W. A.; Montejano, H. A.; García, N. A.; Lopez Arbeloa, I. ;*Tetrahedron* **2012**, *68*, 1153.
62. Miao, X.; Hu, W.; He, T.; Tao, H.; Wang, Q.; Chen, R.; Jin, L.; Zhao, H.; Lu, X.; Fan, Q.; Huang, W. ;*Chem. Sci.* **2019**, *10*, 3096.



Structural diversity and potential applications of chalcogen sugars.

CALCOGENO-AÇÚCARES: PERSPECTIVAS, SÍNTESES E APLICAÇÕES

Beatriz F. dos Santos^{1*}, Samuel L. Silva¹, Alcindo A. Dos Santos¹

¹- Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

*e-mail: beatrizfuzinato@usp.br

Resumo: Os carboidratos estão entre as macromoléculas mais abundantes da Terra e têm um amplo espectro de aplicação em síntese orgânica. Análogos de açúcar que contêm modificações estruturais em suas moléculas são de grande interesse científico e vêm ganhando ampla atenção em estudos biológicos e farmacológicos. Modificações envolvendo átomos de calcogênios são particularmente interessantes porque combinam a absorção de glicosídeos no corpo humano com as propriedades desejadas. As modificações químicas feitas na posição C-1 de açúcares são destacadamente importantes devido à alta reatividade desta posição e à estabilidade da ligação anomérica calcogeno-carbono.

Palavras-chave: açúcares, carboidratos, calcogênios

Chalcogen-sugar's: perspectives, synthesis and applications

Abstract: Carbohydrates are the most abundant macromolecules on Earth and have a broad spectrum of application in organic synthesis. Sugar analogues that contain structural modifications in their molecule are of great interest in science and have been gaining attention in a wide area of biological and pharmacological studies. Modifications involving chalcogen atoms are particularly interesting because they combine the absorption of glycosides in the human body with desired properties. Modifications made in position C-1 are highlighted due to the high reactivity of this position and the stability of the anomeric chalcogen-carbon bond.

Keywords: sugars, carbohydrates, chalcogens

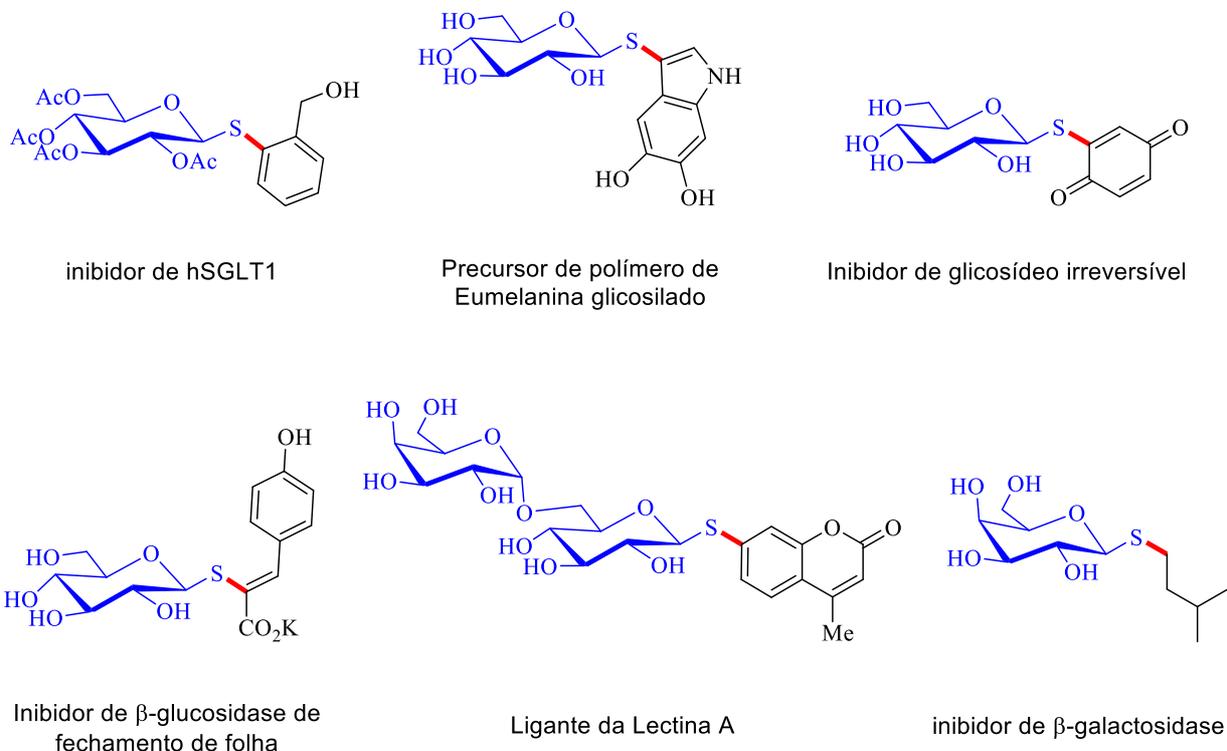
Introdução

A substituição de um grupo hidroxila, de um monossacarídeo por um átomo com propriedades distintas, como o enxofre, selênio, ou telúrio, altera a basicidade, polaridade e solubilidade dos açúcares, além das suas capacidades de estabelecerem ligações de hidrogênio. Após a inserção deste átomo de calcogênio também é possível realizar reações subsequentes para adição de outras porções para conferirem, reunidas, propriedades desejadas. Porém, a substituição de apenas um grupo hidroxila não é uma tarefa trivial, sendo necessários inúmeros passos que envolvem, ou não, a proteção de grupos, seletivamente.^{1,2}

Dentre todas as hidroxilas presentes em moléculas de sacarídeos, a hidroxila ligada ao átomo de carbono cetral é particularmente interessante. Este átomo de carbono é anomérico, sendo que quando o açúcar se encontra na sua forma aberta este carbono é carbonílico, e quando está na forma fechada, este carbono se torna um centro quiral, o hidrogênio a ele ligado apresenta pK_a menor que dos outros e, por consequência maior reatividade. Além disso, as ligações chamadas glicosídicas em geral são feitas, principalmente nesta posição.

Os derivados 1-tioglicosídicos têm sido considerados compostos miméticos de *O*-glicosídeos biologicamente importantes³ e, além disso, os *S*-glicosídeos são mais estáveis a degradações química e enzimática em comparação aos análogos de oxigenados.^{4,5} Além disso, a porção tioaçúcar é encontrada em vários medicamentos, produtos naturais e agentes biologicamente ativos, incluindo o inibidor de hSGLT1 (pertencente à classe de inibidores do diabetes do tipo 1), ligante da proteína lectina A, bem como inibidores das enzimas galactosidase e glicosidase (figura 1).^{6,7,8,9}

Figura 1. Moléculas bioativas contendo o núcleo tioaçúcar.



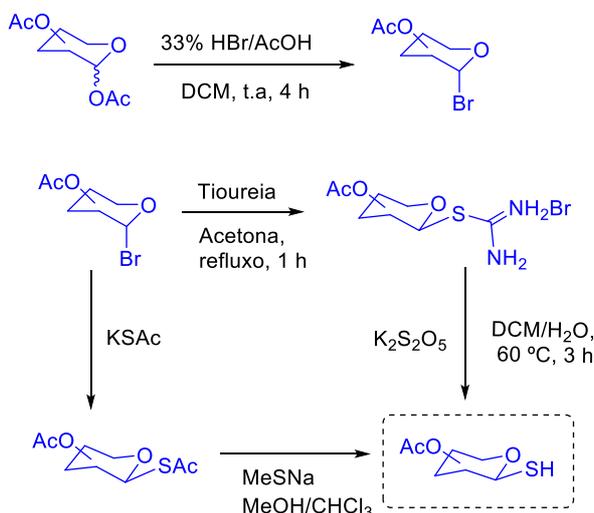
Ainda no tocante aos calcogênios, compostos de selênio já foram identificados como metabolitos de bactérias e micro-organismos,¹⁰ e desde a primeira síntese reportada de um sacarídeo contendo selênio em 1945, diversos avanços foram feitos. Em 1997 o primeiro selenoaçúcar, de fonte natural, foi identificado na planta *Astragalus racemosus*¹¹ e pesquisas recentes identificaram 3 glicosídeos contendo selênio na urina humana.¹² Do ponto de vista sintético, diversos compostos de selênio são de interesse reacional, pois podem apresentar caráter nucleofílico ou eletrofílico¹³ e servem como precursores de outras moléculas derivadas de carboidratos, tais como 2-deoxiglicosídeos e orto-ésteres, glicais funcionalizados, C-glicosídeos, ou mesmo em glicosilações controladas de proteínas. Além disso sabendo do papel do selênio no organismo, pode-se inferir que a síntese destas moléculas é de grande interesse para a produção de suplementos à base de selênio com papel coadjuvante na prevenção de diversas doenças.¹²

Tendo em vista a importância sintética e biológica dos açúcares substituídos na posição anomérica, esta mini revisão visa destacar alguns conceitos e trazer breves relatos da literatura para a síntese e a funcionalização de 1-calcogenoaçúcares de estruturas diversas.

Síntese de 1-calcogenoaçúcares

Síntese de 1-tioaçúcares

Diversas metodologias já foram reportadas na literatura, visando a síntese de 1-tioaçúcares. No geral, os métodos para a síntese de 1-tioaçúcares envolvem o tratamento do glicosil halogenado (*building block* estratégico) com uma espécie de enxofre nucleofílica (tioureia, dissulfeto de carbono ou tioacetato de potássio) em acetona, dando origem ao sal de tiourônio.^{14,15,16,17} Em seguida, o grupo de enxofre livre (SH) é gerado através de uma hidrólise do sal de tiourônio (esquema 1). Outras metodologias para a obtenção de 1-tioaçúcares incluem o uso de ácidos de Lewis¹⁸ e a redução de Birch do derivado tiobenzil anomérico.¹⁹

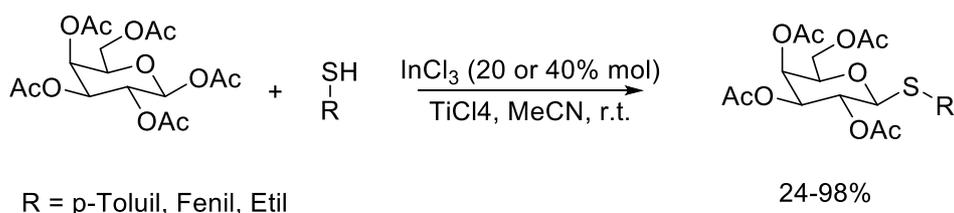


Esquema 1. Estratégias sintéticas gerais de 1-tioaçúcares.

Síntese de Tioglicosídeos Catalisada por Ácidos de Lewis

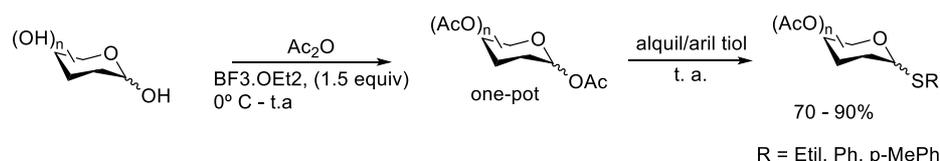
Como os tioglicosídeos são intermediários versáteis e valiosos na síntese orgânica,²⁰ pesquisadores têm se esforçado na síntese e avaliações biológicas desses glicomiméticos.²¹ No entanto, poucos métodos para a síntese de tiossacarídeos foram relatados na literatura até o presente momento. Normalmente, os derivados de tioglicosídeos são mais comumente preparados pela reação do tiofenol com o glicosil per-*O*-acetilado na presença de um ácido de Lewis^{22,23,24} ou pela substituição do átomo de halogênio no carbono anomérico do açúcar por um ânion tiolato.^{25,26} Deste modo, Abbineni e coautores, em 2003²³ relataram um método simples e eficiente para a síntese de tioglicosídeos catalisada por cloreto de índio (III). As reações conduzidas pelos autores foram

realizadas usando várias glicopiranoses per-*O*-acetiladas como substratos, além de diversos tiois (3 equiv), MeCN como solvente (2 mL), InCl₃ (20 ou 40 mol%) e TiCl₄ como co-ativador (esquema 2).



Esquema 2. Síntese de tioglicosídeos, catalisada por InCl₃ e TiCl₄.

Em 2005, Misra e colaboradores realizaram a síntese *one-pot* de tioglicosídeos per-*O*-acetilados a partir de açúcares desprotegidos, utilizando BF₃.OEt₂ como catalisador (esquema 3). Os autores reportaram a utilização de quantidade estequiométrica de Ac₂O, excesso de BF₃.OEt₂ (1,5 equiv) como catalisador, além de diversos açúcares desprotegidos e variados alquil- e aril-tióis. O progresso da reação foi monitorado por cromatografia em camada delgada. Os produtos foram obtidos em rendimentos de 70 a 90%.²⁴



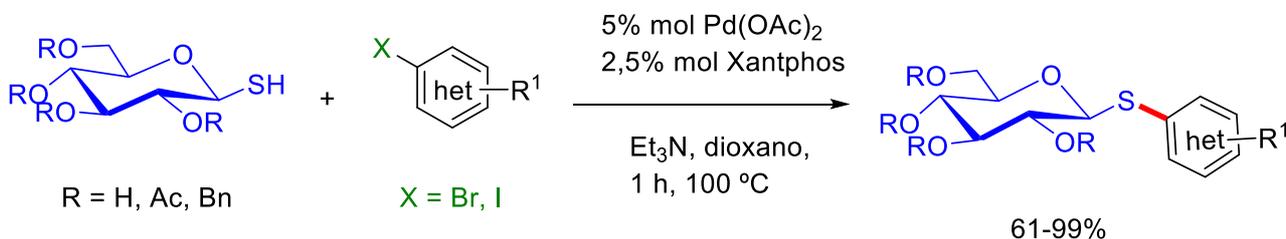
Esquema 3. Síntese de tioglicosídeos catalisada por BF₃.OEt₂

Síntese de Derivados do 1-Tioaçúcar Catalisada por Paládio

Apesar de serem relativamente simples, as metodologias utilizando ácidos de Lewis são restritas ao escopo do substrato com tiofenóis e sofrem com o uso de reagentes ácidos agressivos.³ Assim, o desenvolvimento de protocolos eficientes e seletivos para acessar os derivados de tioaçúcar ainda é desejável. Algumas metodologias já foram descritas na literatura para a

preparação de derivados de tioaçúcar por meio de reações de acoplamento cruzado C-S, porém essas abordagens são bem menos comuns.²⁷

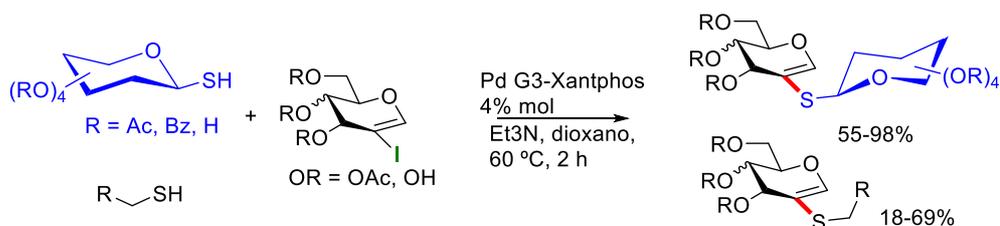
Alami e colaboradores³, em 2013 publicaram um trabalho de acoplamento cruzado C-S para a síntese de derivados tioglicosídeos utilizando (hetero) haletos de arila, diversos tioaçúcares e Pd(OAc)₂/Xantphos como catalisador (esquema 4). Além disso, os autores também fizeram o uso de Et₃N como base e dioxano como solvente. Os produtos foram obtidos após 1 hora de reação a 100 °C, com rendimentos variando de 61 a 99%.



R₁ = 4-OMe, 4-NH₂, 3-OTBS-4-OMe, 3-OH, 2-OMe, 2-Me, 4-NO₂,
4-CHO, 4-CO₂Et, 4-COMe, 3-Br, 4-CF₃

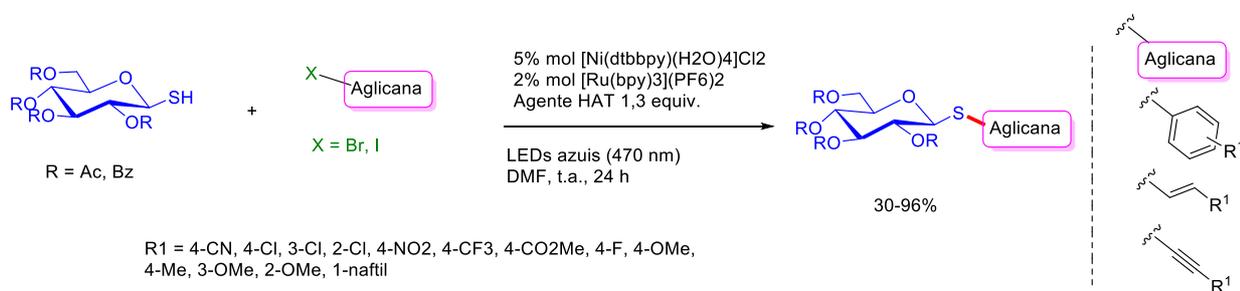
Esquema 4. Síntese de derivados tioglicosídeos utilizando (hetero) haletos de arila

Em 2017, Messaoudi e colaboradores²¹ relataram a síntese de tioglicosídeos derivados do 2-iodoglicol utilizando como catalisador o Pd G3-Xantphos. Os autores realizaram uma triagem de solvente, temperatura e tempo reacional, e ao final estabeleceram as melhores condições, sendo estas de: 4% mol de catalisador, Et₃N como base e dioxano como solvente, em um tempo reacional de 2 horas à 60 °C. Os autores obtiveram 17 compostos com rendimentos variando de 18 a 98% (esquema 5).



Esquema 5. Síntese de tioglicosídeos derivados do 2-iodoglicol.

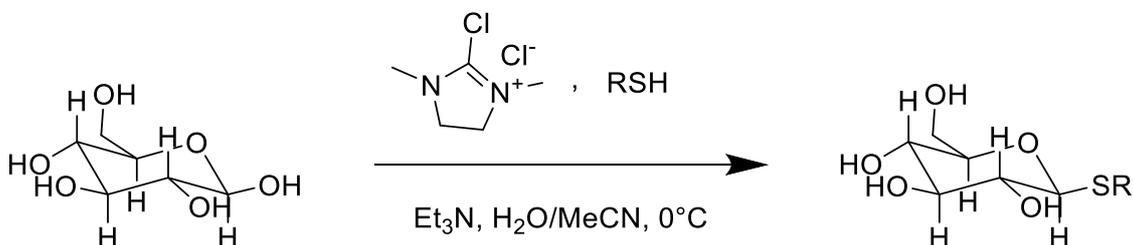
Recentemente (em 2019), Messaoudi e colaboradores²⁸ propuseram novamente a funcionalização de 1-tioaçúcares, porém desta vez, utilizando uma metodologia de catálise dual fotoredox, empregando um catalisador de níquel (II) e rutênio bipyridina como fotocatalisador (esquema 6). Os autores fizeram o uso de diversos tioaçúcares mono e dissacarídeos, além de diferentes aglicanas, por irradiação com LEDs azuis, DMF como solvente em um tempo reacional de 24 horas à temperatura ambiente. Um aspecto importante desta metodologia foi a utilização de um agente HAT (Hydrogen Atom Transfer) e a ausência de base. Os autores obtiveram 32 compostos em rendimentos de 30 à 96%.



Esquema 6. Funcionalização de 1-tioaçúcares fotocatalisada por níquel

Síntese de tioglicosídeos utilizando cloreto de 2-cloro-1,3-dimetilimidazol

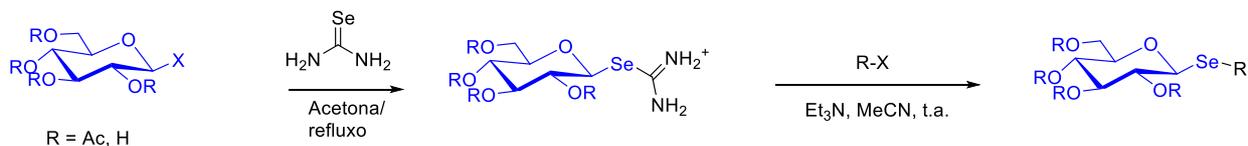
Shoda e colaboradores relataram uma nova abordagem utilizando o cloreto de 2-cloro-1,3-dimetilimidazol (DMC) como catalisador de reações centradas no carbono anomérico de carboidratos sem proteção, sendo este reagente utilizado, entre outras aplicações, para síntese de 1-tioaçúcares. Desde então, sínteses de carboidratos sem o uso de grupos protetores têm sido reportadas na literatura, utilizando o DMC como agente ativante do carbono anomérico.^{1,2} Este processo apresenta a vantagem de não requerer etapas de proteção/desproteção, que inerentemente são mais práticos, rápidos e atrativos do ponto de vista econômico/ambiental. No esquema 7, está apresentado de maneira genérica, a aplicação do DMC para a preparação de diferentes tioaçúcares.²⁹



Esquema 7. Síntese de tioaçúcares por catalise com DMC sem proteção dos grupos hidroxila.

Síntese de 1-selenoaçúcares

A estabilidade de compostos contendo selênio na posição 1 dos carboidratos substituídos ainda é um impedimento para aplicações preparativas desses compostos. Dentre as metodologias desenvolvidas, as mais utilizadas estão centradas no uso de selenoureia para adição de selênio e posterior alquilação, conforme esquema 8.^{12,30}



Esquema 8. Síntese de selenoaçúcares utilizando selenoureia como nucleófilos de selênio.

Conclusões

A presente mini revisão destacou brevemente algumas das possibilidades de síntese de carboidratos contendo átomos de calcogênios, bem como metodologias para a obtenção de 1-calcogenoaçúcares funcionalizados. Esta classe de moléculas é de grande interesse biológico e sintético, além disso, apresenta uma grande versatilidade de métodos de preparação de derivados glicosídeos, não se limitando somente às reações mostradas aqui. Apesar de haver um número razoável de exemplos de metodologias fundamentadas na funcionalização do carbono anomérico com resíduos de enxofre, existe um número muito menor de metodologias robustas e reprodutíveis envolvendo compostos de selênio e ainda mais raros são os exemplos com o homólogo, telúrio. Não apenas pela escassez de exemplos com estes outros derivados de calcogênios, mas especialmente pela peculiar atividade que estes podem conferir aos compostos de que fazem parte estrutural, este é

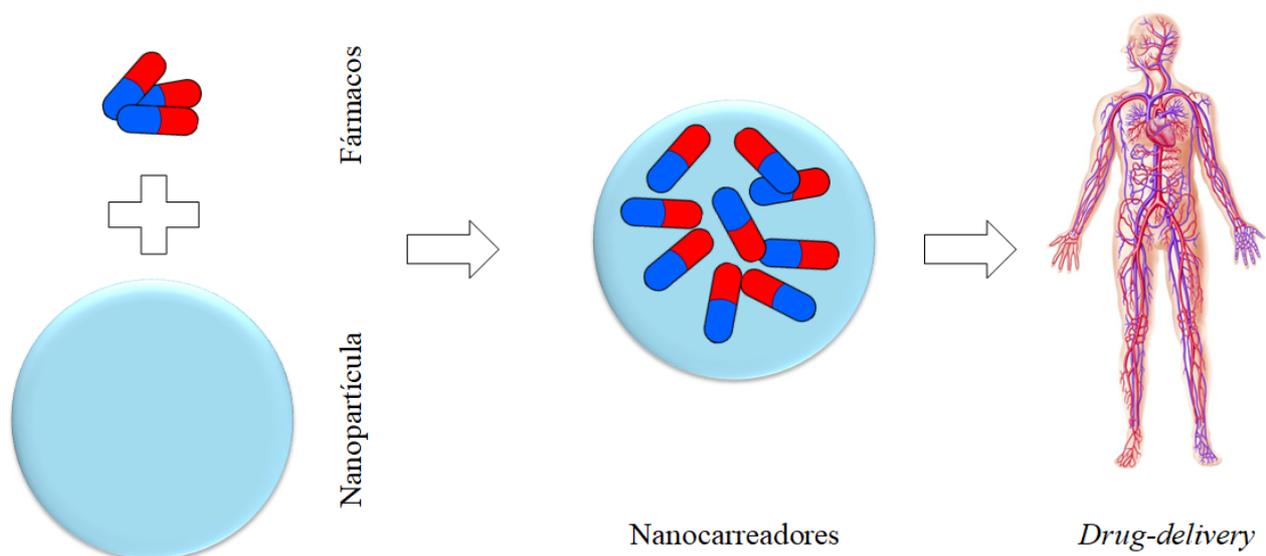
um ramo da química preparativa de açúcares que representa uma janela de oportunidades, unindo, a importância dos glicosídeos com o perfil redox único dos organocalcogenetos.

Agradecimentos

FAPESP, Capes, USP.

Referências

1. Meguro, Y.; Noguchi, M.; Li, G.; Shoda, S. I.; *Org. Lett.* **2018**, *20*, 76.
2. Fairbanks, A. J.; *Carbohydr. Res.* **2021**, 499.
3. Brachet, E.; Brion, J.-D.; Messaoudi, S.; Alami, M.; *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355, 477.
4. Rye, C. S.; Withers, S. G.; *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 699.
5. Metaferia, B. B.; Fetterolf, B. J.; Shazad-ul-Hussan, S.; Moravec, M.; Smith, J. A.; Ray, S.; Gutierrez-Lugo, M.-T.; Bewley, C. A.; *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6326.
6. Castaneda, F.; Burse, A.; Boland, W.; Kinne, R. K-H.; *Int. J. Med. Sci.* **2007**, *4*, 131.
7. Rodrigue, J.; Ganne, G.; Blanchard, B.; Saucier, C.; Giguère, D.; Shiao, T. C.; Varrot, A.; Imberty, A.; Roy, R.; *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6906.
8. Elgemeie, G. H.; Farag, A. B.; Amin, K. M.; El-Badry, O. M.; Hassan, G. S.; *Med. Chem.* **2014**, *4*, 814.
9. Kato, E.; Nagano, H.; Yamamura, S.; Ueda, M.; *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5909.
10. Heider, J.; Böck, A.; *Adv. Microb. Physiol.* **1993**, *35*, 71.
11. Witczak, Z. J.; Czernecki, S.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1998**, *53*, 143.
12. Ashok, A.; Zita, T.; Kövér, K. E.; Szilágyi, L.; *Carbohydr. Res.* **2012**, *360*, 8.
13. Braga, A. L.; Lütke, D. S.; Vargas, F.; Braga, R. C.; *Synlett* **2006**, 1453.
14. Lee, Y. C.; Stowell, C. P.; Krantz, M. J.; *Biochemistry* **1976**, *15*, 3956.
15. Lee, Y. C.; Stowell, C. P.; *Methods Enzymol.* **1982**, *83*, 278.
16. MacDougall, J. M.; Zhang, X. D.; Polgar, W. E.; Khroyan, T. V.; Toll, L.; Cashman, J. R.; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5809.
17. Johnston, B. D.; Pinto, B. M.; *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4607.
18. Ibatulin, F. M.; Shabalin, K. A.; JKnis, J. V.; Shavva, A. G.; *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 7961.
19. Holick, S. A.; Anderson, L.; *Carbohydr. Res.*, **1974**, *34*, 208.
20. Codée, J. D. C.; Litjens, R. E. J. N.; J. van den Bos, L.; Overkleeft, H. S.; A. van der Marel, G.; *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 769.
21. AL-Shuaeeb, R. A. A.; Montoir, D.; Alami, M.; Messaoudi, S. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 6720.
22. Nicolaou, K. C.; Randall, J. L.; Furst, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5556.
23. Das, S. K.; Roy, J.; Reddy, K. A.; Abbineni, C. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2237.
24. Agnihotri, G.; Tiwari, P.; Misra, A. K.; *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1393.
25. Blanc-Muesser, M.; Defaye, J.; Driguez, H.; *Carbohydr. Res.* **1978**, *67*, 305.
26. Apparau, M.; Blanc-Muesser, M.; Defaye, J.; Driguez, H.; *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 314.
27. Ibrahim, N.; Alami, M.; Messaoudi, S.; *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7*, 2026.
28. Zhu, M.; Dagousset, G.; Alami, M.; Magnier, E.; Messaoudi, S. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 5132.
29. Li, G.; Dao, Y.; Mo, J.; Dong, S.; Shoda, S.; Ye, X. **2021**, 2316.
30. Tiwari, P.; Misra, A. K.; *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2345.



SISTEMAS DE ENTREGA DE FÁRMACOS: FUNDAMENTOS E AVANÇOS

Jéssica T. dos Santos*, Beatriz F. dos Santos, Marcel L. de Almeida, Koiti Araki*

Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

*e-mail: jessica.teixeira@usp.br, koiaraki@iq.usp.br

SISTEMAS DE ENTREGA DE FÁRMACOS: FUNDAMENTOS E AVANÇOS

Resumo: Os sistemas de entrega de fármacos, ou nanocarreadores, são materiais biocompatíveis que, em conjunto com os compostos bioativos adequados, atuam como um sistema de entrega de drogas. Esses materiais têm sido amplamente estudados nos últimos anos, principalmente devido a biodegradabilidade, não toxicidade e facilidade de ajustar suas características para uma determinada finalidade. Assim, neste artigo de revisão é dada uma visão geral dos fundamentos da nanotecnologia com foco nos diferentes tipos de nanocarreadores, apresentando algumas definições e conceitos, bem como as características que possibilitam seu uso na entrega de fármacos para as células-alvo. Além disso, os desafios e as perspectivas futuras para os sistemas de entrega de medicamentos também são discutidos.

Palavras-Chave: nanotecnologia, nanocarreadores, nanopartículas, nanocápsulas, lipossomas.

DRUG DELIVERY SYSTEMS: CONCEPTS AND ADVANCES

Abstract: Drug delivery systems, or nanocarriers, are biocompatible materials that loaded with suitable bioactive compounds act as drug delivery systems. These materials have been widely studied in recent years, mainly due to characteristics such as biodegradability, non-toxicity and ease to adjust key features aiming a particular purpose. Thus, an overview on the fundamentals of nanotechnology focusing on the main types of nanocarriers is provided in this review article, presenting some definitions and concepts, and the characteristics that enable their use in the delivery of drugs to target cells as well. In addition, the challenges and future perspectives for drug delivery systems are also discussed.

Keywords: nanotechnology, nanocarriers, nanoparticles, nanocapsules, liposomes.

INTRODUÇÃO

O prefixo grego “nano” significa simplesmente “anão” e representa um bilionésimo do metro (10^{-9} m), dimensões muito pequenas, completamente fora do alcance de nossa visão, ou de microscópios ópticos, mas que estão sendo ativamente exploradas utilizando-se microscópios que utilizam feixes de elétrons (ao invés de luz visível) para gerar as imagens. Assim, nanomateriais são definidos como materiais que apresentam pelo menos uma de suas dimensões na escala de cerca de 1 a 100 nm, que podem ser produzidos subdividindo-se materiais convencionais (estratégia *top-down*), ou construindo-se a partir de átomos ou moléculas (estratégia *bottom-up*).¹ Considerando-se um cubo de 1 cm de lado, percebe-se claramente que se cortarmos o mesmo gerando folhas de 1 nm de espessura obteremos 10.000.000 (dez milhões) de folhas com mais ou menos a área de duas de suas faces. Se estes forem cortadas novamente na espessura de 1 nm, cada folha gerará dez milhões de bastões de 1 cm² e 1 cm de comprimento (Figura 1). Finalmente, se repetirmos o procedimento com esses bastões cada um deles irá produzir dez milhões de nanocubos de 1 nm³ cada um. Note, que neste processo a área superficial está sendo aumentada enormemente à medida que subdividimos o cubo gerando nanomateriais, ou seja, nanofolhas, nanobastões e nanocubos.² Outro aspecto muito importante que deve ser lembrado é que no processo de corte do material, estamos quebrando ligações e gastando energia. Logo, estamos gerando superfícies de alta energia e altamente reativas que tendem a se juntar novamente, ou seja, de agregar gerando partículas maiores. Note que as nanopartículas como as que descrevemos não são entidades estáveis e precisam ser funcionalizadas, ou seja, moléculas devem ser ligadas a superfície não somente diminuindo a energia de superfície, mas atribuindo-lhes novas propriedades de interação.^{3,4}

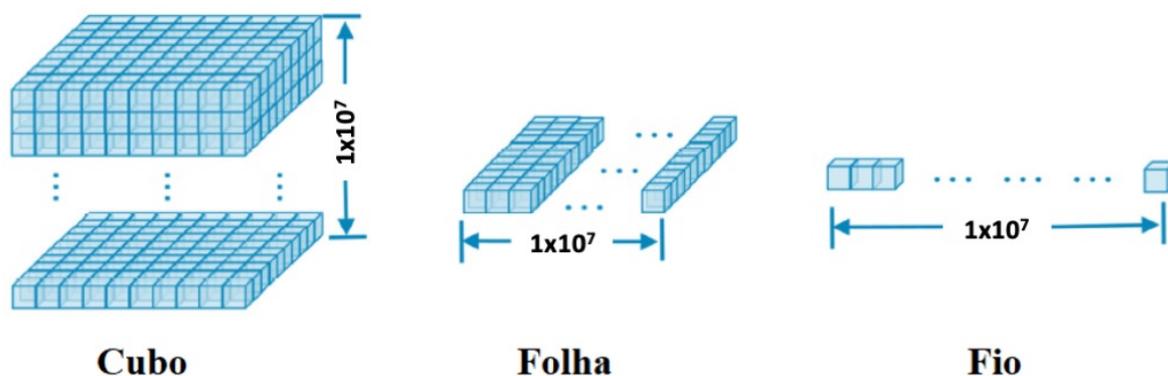


Figura 1. Esquemas ilustrando o aumento da área superficial a medida que um cubo de 1 cm de lado é cortado em 1×10^7 folhas de 1 nm de espessura e estas em 1×10^{14} bastões de 1 nm^2 de base, que finalmente podem ser cortados para gerar 1×10^{21} cubos de 1 nm^3 .

A nanotecnologia é considerada uma das últimas, se não a última fronteira do conhecimento, e visa o desenvolvimento de novos materiais e aplicações a partir da manipulação, montagem, controle de materiais com pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica (Figura 2). O desenvolvimento de processos de fabricação suficientemente simples, economicamente competitivos e ambientalmente amigáveis de nanomateriais possibilitará sua aplicação na resolução de problemas relevantes da sociedade e agregação de valor nos mais diversos segmentos, como de energia, saúde e meio ambiente, de maneira sustentável, além de estudos inovadores nas áreas de química, física, engenharia, e biologia, dentre outras. Mas, para isso é fundamental o domínio do processo de preparação, incluindo o domínio da química de superfície/funcionalização, para que possamos controlar as propriedades das nanopartículas, por exemplo, ajustando-as para o desenvolvimento de aplicações na área biomédica.^{5,6}

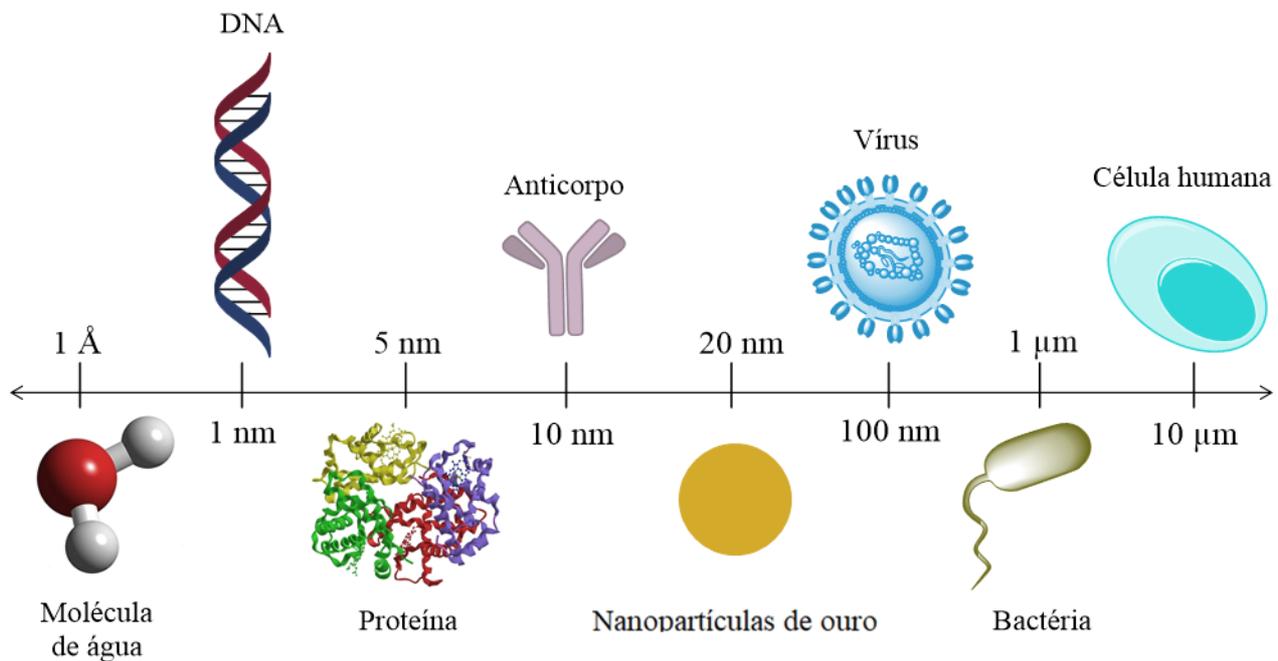


Figura 2. Tamanho de algumas estruturas relevantes na nanoescala.

Neste trabalho de revisão serão apresentadas algumas definições e conceitos fundamentais relacionados aos nanocarreadores, em especial suas características, métodos de preparação e design estrutural que possibilitam seu uso na entrega de fármacos para células-alvo, visando o tratamento de doenças como o câncer. Também serão apresentadas as características principais que os nanocarreadores, ou sistemas de liberação de fármacos, precisam apresentar para que possam ser efetivos, bem como os principais desafios e como estão sendo superados. Em outras palavras, serão apresentadas as principais estratégias que vêm sendo desenvolvidas e reportadas na literatura de modo a gerar sistemas eficientes de entrega de fármacos.

Nanocarreadores: Definições e fundamentos

Diferentes necessidades clínicas e enfermidades que acometem os seres humanos exigem diferentes tipos de sistemas de entrega de medicamentos. Nanomateriais têm sido amplamente estudados para desenvolver sistemas de entrega de fármacos inteligentes que

atuem de maneira seletiva, liberando o fármaco nos locais desejados.⁵ Diversos estudos reportados nos últimos anos mostram que a nanotecnologia pode contribuir para o tratamento de doenças. E, de fato, já existem diversas formulações cosméticas e farmacêuticas com nanotecnologia embarcada disponíveis para uso clínico.^{4,7}

a) Tipos de nanocarreadores

Os nanocarreadores podem ser classificados em três tipos principais, os baseados em a) nanopartículas metálicas e b) de óxidos metálicos, e c) nanopartículas geradas por automontagem de surfactantes e polímeros. Dentre eles o segundo pode ser subdividido em dois grupos: nanomateriais onde b1) as moléculas bioativas encontram-se ligadas a superfície, e b2) inseridas nos poros ou intercaladas nas regiões interlamelares. Por outro lado, as nanopartículas preparadas com surfactantes e polímeros podem ser classificadas, dependendo do tipo de estrutura básica formada, em c1) micelas e micro/nanoemulsões, c2) nanoesferas, nanopartículas lipídicas e nanocápsulas, e c3) lipossomas (Figura 3).^{8,9}

As nanopartículas metálicas podem ser sintetizadas por rotas fotoquímicas, eletroquímicas, crescimento dirigido por modelo e processos de síntese verdes, que se destacam devido às suas propriedades favoráveis ao meio ambiente (Rout2018). Depois de obtidas, as nanopartículas metálicas podem ligar fármacos por adsorção, e por esta razão processos de adsorção e de dessorção são importantes para o mecanismo de drug delivery nesses nanossistemas. Neste sentido, é importante considerar a relação entre superfície/volume e as propriedades físico-químicas da superfície das nanopartículas metálicas, já que esses são os fatores que determinam sua capacidade de adsorção.^{2,6} Dentre as nanopartículas metálicas que têm sido utilizadas como nanocarreadores, as de ouro se destacam, e podem ser preparadas tanto a partir dos seus sais e compostos (abordagens *bottom-up*) bem como por processos de cominuição de ouro metálico (abordagem *top-down*). Seu sucesso se deve principalmente a estabilidade química do núcleo de ouro bem como da facilidade de ligação de diferentes biomoléculas tais como enzimas, carboidratos,

peptídeos e proteínas na superfície das nanopartículas, possibilitando o transporte efetivo das mesmas para as células-alvo.⁹

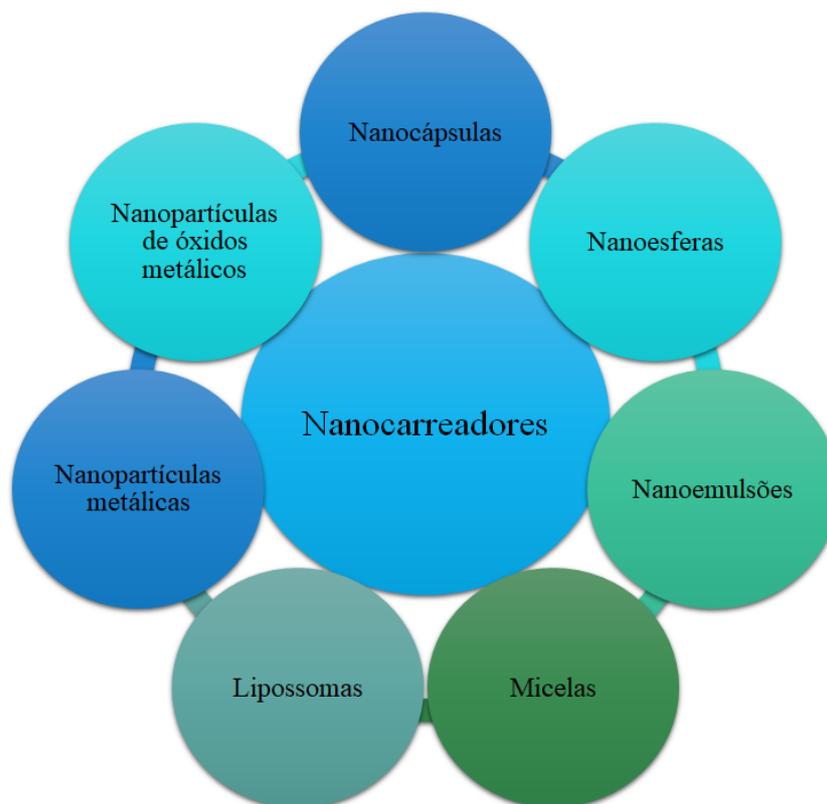


Figura 3: Esquema mostrando os diferentes tipos de nanomateriais que podem ser utilizados como nanocarreadores de fármacos.

Os mecanismos de adsorção e dessorção também são importantes para as nanopartículas de óxidos metálicos, já que elas também podem carregar fármacos em sua superfície por adsorção. Entre as nanopartículas de óxidos metálicos, as de óxido de ferro superparamagnéticas recobertas por polímeros merecem destaque devido ao seu pequeno tamanho (que permite maior internalização celular), propriedades magnéticas e biocompatibilidade. Tais propriedades possibilitam sua utilização em diversas aplicações farmacêuticas e/ou biomédicas. Essas nanopartículas podem, por exemplo, ser utilizadas

como agentes de contraste para obtenção de imagens por ressonância magnética, na administração de fármacos de maneira direcional, tratamento por hipertermia, detecção precoce de inflamação, além de diagnóstico de doenças infecciosas como tuberculose, câncer, diabetes e aterosclerose.^{6,9,10} Um artigo de revisão da literatura publicado por Kawassaki et. al. (2021) aborda com detalhes as propriedades e as perspectivas atuais sobre nanopartículas de titânio e de óxido de ferro inteligentes para diagnóstico e tratamento de doenças.³

As micelas são estruturas auto-montadas de moléculas anfífilas (surfactantes moleculares e poliméricos) cujo processo de formação em fase aquosa são dirigidas principalmente por interações de van der Waals entre as cadeias de hidrocarbonetos, gerando domínios hidrofóbicos separados do meio hidrofílico.² Nas micelas formadas em meio aquoso, a cauda apolar (hidrofóbica) está sempre voltada para o centro e cabeça polar (hidrofílica) fica em contato com o solvente polar. Além disso, em um solvente apolar é possível obter a micela inversa onde as cadeias apolares estão voltadas para fora. As características da solução, como temperatura, força iônica e pH, e a natureza da molécula anfífila determinam o tamanho e a forma das micelas produzidas quando a concentração de surfactante estiver acima da concentração micelar crítica, a concentração mínima necessária para a formação dessas estruturas.^{9,11}

Por outro lado, as nanopartículas poliméricas podem ser classificadas como nanoesferas ou nanocápsulas dependendo das características da sua estrutura interna, sendo que as nanocápsulas possuem um núcleo sólido/líquido e as nanoesferas possuem uma estrutura regular que é composta por uma matrix polimérica sólida.¹²

Existem 3 métodos principais para obtenção de nanoesferas e nanocápsulas poliméricas: o método de deposição interfacial, o método “template” e o método camada sobre camada. Sendo que não existem inovações significativas nos últimos anos com relação à novas rotas de obtenção de nanocápsulas poliméricas. Todavia os métodos já conhecidos têm sido muito explorados para a preparação de nanomateriais utilizando-se diferentes materiais com

intuito de satisfazer as diferentes características que os sistemas de entrega de drogas devem apresentar de acordo com o tipo de fármaco e a via de administração.^{12,13} Além disso, diversos tipos de polímeros naturais e sintéticos, que idealmente devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, estão sendo utilizados no preparo de nanopartículas poliméricas. As principais vantagens desse nanocarreador comparado aos demais é sua versatilidade, já que eles podem utilizar diferentes tipos de polímero, dependendo do fármaco que se deseja encapsular, sua estabilidade em diferentes meios e a velocidade de liberação do fármaco em função do tempo.¹⁴ Uma descrição detalhada dos métodos de preparação de nanocápsulas poliméricas e os avanços conseguidos na última década é apresentada no artigo de revisão publicado por Deng e colaboradores.¹²

Por sua vez, os lipossomas são estruturas geralmente formadas por bicamadas fosfolipídicas, ou seja, moléculas anfifílicas que possuem um grupo fosfato hidrofílico e duas caudas de ácido graxo hidrofóbicas. Quando essas moléculas são colocadas em uma solução aquosa elas se auto-organizam formando uma bicamada lipídica de modo a minimizar a interação com a água (as caudas hidrofóbicas de duas monocamadas se juntam). O processo de formação é dirigido por força de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. Lipossomas possuem estrutura semelhante à da membrana celular, sendo por esta razão mais estáveis que micelas formadas por surfactantes com uma única cauda hidrofóbica.^{2,11,15}

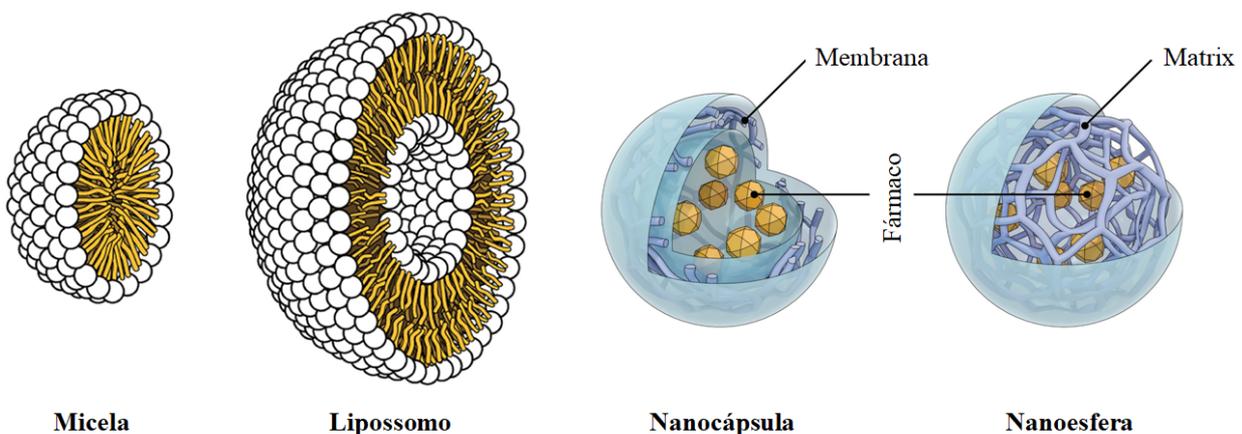


Figura 3. Representação esquemática da estrutura de micelas, lipossomas, nanocápsulas e nanosferas.^{16,17}

b) Vetorização Molecular

O controle da química de superfície dos nanomateriais é fundamental ao projetar nanobiomateriais funcionais inteligentes para aplicações médicas e biomédicas, já que a superfície desses materiais atua como a interface com o ambiente circundante, desempenhando um papel fundamental nas interações e determinando o destino biológico dos nanomateriais.³ Por esta razão os nanocarreadores podem ser funcionalizados para aumentar sua biocompatibilidade e incorporação de moléculas vetorizantes com capacidade de direcionar o nanocarreador para que seu conteúdo seja entregue e concentrado nos alvos biológicos desejados.^{9,18} A vetorização e a liberação das moléculas bioativas em sítios específicos (alvos) é um dos processos mais fundamentais para o tratamento de doenças pois maximizam a efetividade e minimizam os efeitos colaterais, assim viabilizando a terapia molecular personalizada. Além disso é importante salientar que as pequenas dimensões dos nanocarreadores são fundamentais para que eles possam alcançar os alvos desejados e realizar a entrega do princípio ativo de maneira precisa e homogênea, promovendo a funcionalidade e o desempenho terapêutico intensificado dos nanomateriais, enquanto se controla outras propriedades complementares relevantes.^{8,18} Alguns dos compostos que podem ser empregados para este objetivo são aptâmeros, peptídeos, anticorpos e antígenos.³

c) Vias de administração

Dentre as vias de administração, provavelmente, a administração intravenosa é a que oferece os maiores desafios, pois a formulação concentrada entra em contato com o sangue onde vai interagir com as diversas espécies/partículas nela presentes. Logo, podem sofrer modificações em suas propriedades, ou levar a formação de aglomerados capazes de induzir

trombose. Assim, apesar de parecer uma tarefa relativamente simples, vários são os obstáculos a serem superados. De fato os nanocarreadores devem a) nanopartículas/nanocápsulas devem ser compatíveis com os fluidos corpóreos de modo a evitar aglomeração e mudanças importantes de propriedades em função do efeito corona, b) ser invisível ao sistema imune responsável pela proteção do nosso organismo, que quando ativado leva a eliminação de corpos estranhos por processos de fagocitose, endocitose e pinocitose, c) ter tempo suficiente de circulação evitando a eliminação pelos sistemas de excreção, principalmente a renal, d) ser vetorizados para as células/tecidos tumorais, e) ser incorporados pelas células/tecidos tumorais, e f) liberar os fármacos no meio intracelular e provocar a morte celular por apoptose ou necrose.^{3,15,18}

Nanocarreadores: Desenvolvimentos Recentes

Muitos trabalhos focados na preparação de nanocarreadores mais eficientes e biocompatíveis vêm sendo publicados nos últimos anos, explorando diversas estratégias para melhorar/adequar as propriedades dos nanocarreadores. Por exemplo, em um trabalho desenvolvido por Romano *et. al.* (2020) foram obtidas uma série de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs) conjugadas com ibuprofeno (ibu) e fosfato de glicerol (glicerol) ou ibu e glicose-1-fosfato (Figura 3) com o objetivo de avaliar a atividade anti-inflamatória desses nanomateriais,¹⁹ constatada nos conjugados SPION-glicerol fosfato/ibu pela inibição da liberação de óxido nítrico (NO) induzida por lipopolissacarídeos em macrófagos, mesmo em baixas concentrações.

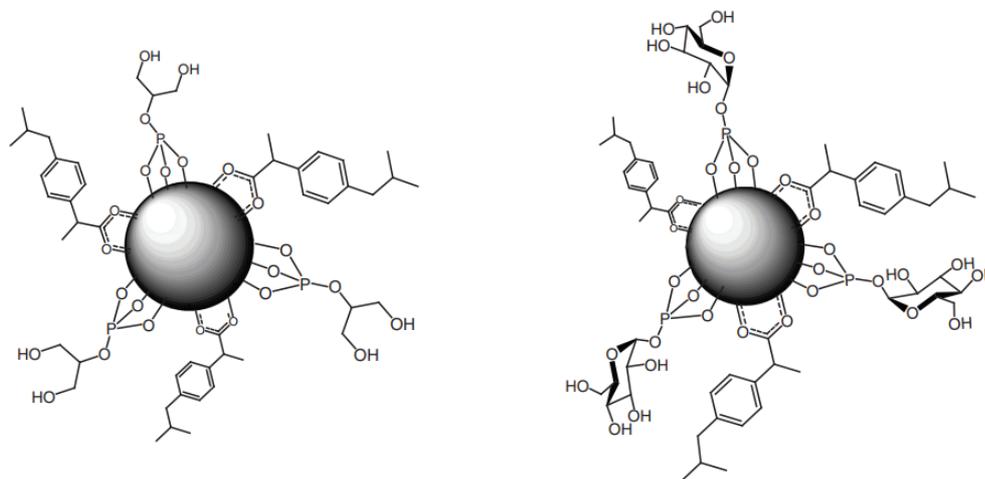


Figura 3: Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas conjugadas com ibuprofeno e glicerol fosfato (esquerda) e ibuprofeno e glicose-1-fosfato (direita).¹⁹

Além disso, há diversas formulações baseadas em nanocarreadores que foram aprovados pelas agências reguladoras de medicamentos, como a Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos e a European Medicines Agency (EMA) (Tabela 1), demonstrando o grande potencial de aplicação dos mesmos para o desenvolvimento de diversas aplicações e produtos, especialmente voltados para a área biomédica.^{3,6}

Tabela 1. Exemplos de nanocarreadores comerciais, sua eficácia terapêutica e aprovação por agência reguladora.⁶

Nome (tipo)	Eficácia terapêutica e diagnóstica	Aprovação	Referências
Feraheme (AMAG)/Rienso (Takeda)/ Ferumoxytol (ferro poliglucose sorbitol Carboximetiléter colóide)	Deficiência de ferro em pacientes com doença crônica (doença renal)	FDA (2009)	20
Injectafter/Ferinject (Vifor)	Anemia ferropriva	FDA (2013)	21

(ferro carboximaltose colóide)

Diprivan (propofol lipossomal) Indução e manutenção de sedação ou anestesia FDA (1989) 21

AmBisome (Gilead Sciences) (anfotericina B lipossomal) Meningite criptocócica em pacientes infectados com HIV Infecções por Aspergillus, Candida e/ou espécies de Cryptococcus (secundária) e parasita da leishmaniose visceral em pacientes imunocomprometidos FDA (1997) 22

Visudyne (Bausch e Lomb) (verteporfina lipossomal) Tratamento de neovascularização coróide subfoveal de degeneração macular relacionada à idade, histoplasiose patológica ou ocular FDA (2000) e EMA (2000) 23

Além disso diversos esforços vêm sendo realizados no desenvolvimento de novas formulações com o objetivo de nanoencapsular ativos para que eles possam ser entregues de maneira mais efetiva ao local desejado e, também, para que seja necessária uma menor dose do fármaco para se alcançar o efeito desejado, assim diminuindo possíveis efeitos colaterais. Por exemplo, Matteis et. al. (2018), realizaram o nanoencapsulamento da bedaquilina o primeiro medicamento eficaz contra a tuberculose desenvolvido nos últimos 40 anos. Porém, os efeitos colaterais da bedaquilina são tão perigosos que, no momento, este medicamento só é prescrito quando não existem outras opções de tratamento disponíveis. Por esta razão, novos métodos baseados em nanotecnologia podem ser particularmente relevantes para aumentar a concentração do fármaco somente no local da infecção, de modo a reduzir as doses necessárias e, conseqüentemente, os efeitos colaterais graves ampliando sua aplicação clínica. O medicamento foi encapsulado em dois tipos de nanocarreadores,

nanopartículas lipídicas e nanocápsulas à base de quitosana, que apresentaram alta eficiência de encapsulação do fármaco. A eficácia das nanoformulações, bem como a excelente compatibilidade de ambos com células animais, foi demonstrada *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*.²⁴

Há também estudos interessantes, como o desenvolvido por Sandri et. al. (2019), que demonstrou que nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs) de poli-(ϵ -caprolactona), além de funcionarem como transportadores de drogas eficientes e livres exibem efeitos terapêuticos, tem a capacidade de inibir o crescimento tumoral e a atividade de neutrófilos. Os LNCs penetram rapidamente nos leucócitos sem apresentar citotoxicidade, inibindo a proliferação de linfócitos induzida por mitógenos, a liberação de citocinas e a migração de leucócitos sob estimulação inflamatória, que foram associadas à inibição da via da MAP quinase e ao influxo de cálcio intracelular. Ou seja, os resultados indicaram que os LNCs podem agir como agentes reguladores negativos em células do sistema imunológico, sugerindo que as próprias nanopartículas vazias, ou carregadas com fármacos, podem interromper os processos inflamatórios.⁷

CONCLUSÕES

Nanocarreadores e nanossistemas de entrega de fármacos cada vez mais sofisticados vem sendo desenvolvidos de modo a atender as necessidades geradas pelo grande número de doenças que acometem os organismos vivos, em especial os seres humanos. Todavia, para que possam ser utilizados clinicamente devem apresentar propriedades tais como biocompatibilidade, tempo prolongado de circulação e capacidade de vetorização para alvos específicos, além de capacidade de entregar seu conteúdo gerando os efeitos desejados, serem fáceis de preparar, manipular e economicamente competitivos no mercado. Para isso, nanomateriais estão sendo desenvolvidos com diversos tipos de materiais tais como metais, óxidos metálicos, polímeros/biopolímeros e surfactantes de modo a melhorar a eficiência de moléculas bioativas, tornando-as dispersáveis em água e biocompatíveis, aumentando a

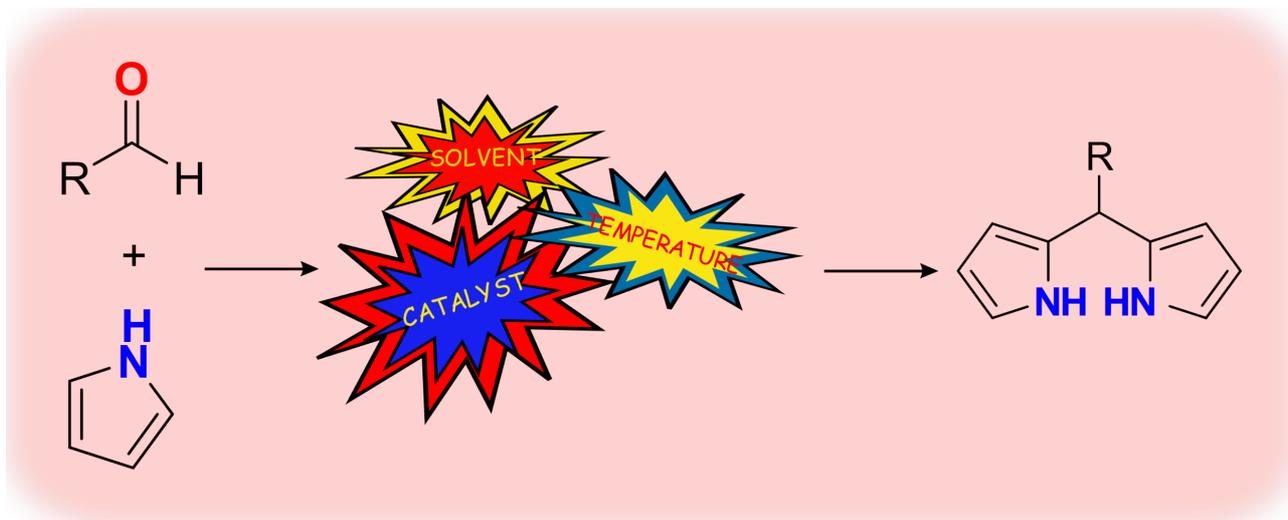
estabilidade e a biodistribuição, bem como diminuindo a dose e os efeitos colaterais. Para isso é preciso gerar “nanopartículas fantasmas”, nanomateriais inteligentes que não sejam reconhecidas pelo sistema imune e sejam mais lentamente filtradas pelo sistema de excreção, para que possam ser direcionadas para os alvos, onde irão promover a ação desejada. O potencial de aplicação de sistemas de entrega controlada e direcionada de fármacos é enorme, mas suas propriedades devem ser validadas não somente através de ensaios *in vitro* mas também por ensaios *in vivo*, a fim de verificar a toxicidade, eficácia e segurança dos potenciais agentes terapêuticos em modelos mais complexos e similares aos de aplicação real.

REFERÊNCIAS

- 1 S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani and F. Rizzolio, *Molecules*, 2019, **25**, 112.
- 2 N. Wang, X. Cheng, N. Li, H. Wang and H. Chen, *Adv. Healthc. Mater.*, 2019, **8**, 1801002.
- 3 R. K. Kawassaki, M. Romano, N. Dietrich and K. Araki, *Front. Nanotechnol.*, 2021, **3**, 735434.
- 4 D. K. Deda and K. Araki, *J. Braz. Chem. Soc.*, DOI:10.5935/0103-5053.20150316.
- 5 Z. Shi, Y. Zhou, T. Fan, Y. Lin, H. Zhang and L. Mei, *Smart Mater. Med.*, 2020, **1**, 32–47.
- 6 G. K. Rout, H.-S. Shin, S. Gouda, S. Sahoo, G. Das, L. F. Fraceto and J. K. Patra, *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.*, 2018, **46**, 1053–1062.
- 7 S. Sandri, C. B. Hebeda, R. A. Loiola, S. Calgaroto, M. K. Uchiyama, K. Araki, L. A. Frank, K. Paese, S. S. Guterres, A. R. Pohlmann and S. H. P. Farsky, *Nanomed.*, 2019, **14**, 1429–1442.
- 8 S. Su and P. M. Kang, *Pharmaceutics*, 2020, **12**, 837.
- 9 M. Chamundeeswari, J. Jeslin and M. L. Verma, *Environ. Chem. Lett.*, 2019, **17**, 849–865.
- 10 M. K. Uchiyama, C. B. Hebeda, S. Sandri, M. de Paula-Silva, M. Romano, R. M. Cardoso, S. H. Toma, K. Araki and S. H. Farsky, *Nanomed.*, 2021, **16**, 741–758.
- 11 R. Ahmad, S. Srivastava, S. Ghosh and S. K. Khare, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2021, **197**, 111389.
- 12 S. Deng, M. R. Gigliobianco, R. Censi and P. Di Martino, *Nanomaterials*, 2020, **10**, 847.
- 13 A. Rehman, Q. Tong, S. M. Jafari, E. Assadpour, Q. Shehzad, R. M. Aadil, M. W. Iqbal, M. M. A. Rashed, B. S. Mushtaq and W. Ashraf, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2020, **275**, 102048.
- 14 D. K. Mishra, R. Shandilya and P. K. Mishra, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, 2018, **14**, 2023–2050.
- 15 M. Elmowafy, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2021, **203**, 111748.
- 16 D. Bitounis, R. Fanciullino, A. Iliadis and J. Ciccolini, *ISRN Pharm.*, 2012, **2012**, 1–11.
- 17 G. Suffredini, J. E. East and L. M. Levy, *Am. J. Neuroradiol.*, 2014, **35**, 1246–1253.
- 18 A. Shah, S. Aftab, J. Nisar, M. N. Ashiq and F. J. Iftikhar, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2021, **62**, 102426.

- 19 M. Romano, M. K. Uchiyama, R. M. Cardoso, S. H. Toma, M. S. Baptista and K. Araki, *Nanomed.*, 2020, **15**, 2475–2492.
- 20 M. Auerbach and J. W. Adamson, *Am. J. Hematol.*, 2016, **91**, 31–38.
- 21 M. G. Braz, L. G. Braz, C. M. M. Freire, L. M. C. Lucio, J. R. C. Braz, G. Tang, D. M. F. Salvadori and K.-J. Yeum, *Medicine (Baltimore)*, 2015, **94**, e1266.
- 22 A. C. Anselmo and S. Mitragotri, *Bioeng. Transl. Med.*, 2016, **1**, 10–29.
- 23 Y. Min, J. M. Caster, M. J. Eblan and A. Z. Wang, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 11147–11190.
- 24 L. De Matteis, D. Jary, A. Lucía, S. García-Embid, I. Serrano-Sevilla, D. Pérez, J. A. Ainsa, F. P. Navarro and J. M. de la Fuente, *Chem. Eng. J.*, 2018, **340**, 181–191.

Graphical Abstract



A variety of conditions can lead the condensation of aldehydes and pyrrole to dipyrromethanes. Some of these approaches are discussed in this article.

ALGUMAS ESTRATÉGIAS DE PREPARAÇÃO DE DIPIRROMETANOS, UM PRECURSOR-CHAVE NA SÍNTESE DE BODIPY'S

João Luiz Petrarca de Albuquerque¹, Alcindo A. Dos Santos^{1*}

¹Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo

alcindo@iq.usp.br

Resumo: Dipirrometanos (DPM's) são estruturas químicas importantes pois são precursores de diversos compostos amplamente utilizados atualmente. Entre alguns exemplos estão as porfirinas e os BODIPYs. Estratégias de preparação destes compostos vem atraindo pesquisadores desde a década de 1970, principalmente por conta das suas propriedades e também pelo desafio sintético que representam. Para melhorar questões de eficiência e rendimento, muitas metodologias se utilizam de excessos de reagentes, altas temperaturas ou catalisadores menos convencionais. Porém, ainda assim os métodos existentes apresentam muitos pontos negativos passíveis de serem melhorados. Recentemente, com o desenvolvimento dos BODIPYs, volta a ganhar força a busca por novas estratégias de síntese dos DPM's, por parte da comunidade científica, e estratégias mais modernas têm surgido. Apesar disso, o tema se estende por décadas com desafios sintéticos importantes a serem superados.

Palavras-chave: dipirrometanos; BODIPY; síntese.

SOME STRATEGIES FOR THE PREPARATION OF DIPIRROMETHANES, A KEY INTERMEDIATE FOR THE SYNTHESIS OF BODIPYS

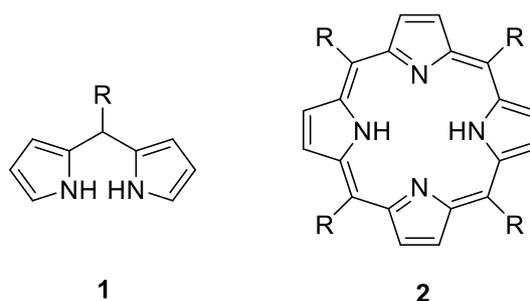
Abstract: Dipyrromethanes (DPM's) are important chemical structures as they are precursors of several compounds widely used today. Among some examples are porphyrins and BODIPYs. Strategies for preparing these compounds have been the object of attention of researchers since the 1970s, mainly because of their properties and also because of the synthetic challenge they represent. To improve efficiency and yield issues, many methodologies use excess reagents, high temperatures or less conventional catalysts. However, even so, the existing methods have many negative points that could be improved. Recently, with the development of BODIPYs, the search for new DPM's synthesis strategies have gained strength again, by the synthetic community, and more modern strategies have emerged. Despite this, the theme extends for decades with important synthetic challenges to be overcome.

Keywords: dipyrromethane; BODIPY; synthesis.

Introdução

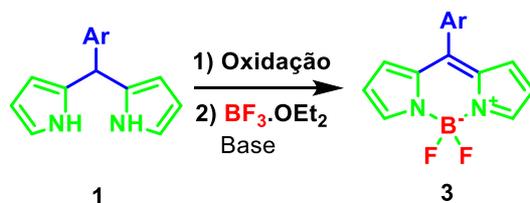
Algumas classes de compostos têm papel de destaque no desenvolvimento de certos ramos da química. Muitas têm uso em diversas áreas, sendo essenciais para o desenvolvimento de produtos, reagentes de análise, materiais (incluindo de tecnologia) e bens de consumo (de vários segmentos). Certamente, os DPM's (**1**, figura 1) fazem parte dessa limitada classe de compostos, estrategicamente empregados como intermediários-chave de produtos que apresentam aplicação em diversas áreas científicas e tecnológicas. Talvez a aplicação mais conhecida seja como precursores das porfirinas (**2**, figura 1). Estes macrocíclicos são classicamente produzidos por reação entre DPM's e aldeídos e correspondem a complexos metálicos presentes na natureza e de origem sintética, com aplicações em catálise e muitas outras.¹

Figura 1. Estruturas básicas de a) dipirrometanos meso substituídos e b) porfirinas



Recentemente os BODIPYs (**3**) vêm ganhando destaque, principalmente devido às suas propriedades fluorescentes e aplicações, decorrentes disso. Essas propriedades são bastante desejadas para aplicações destes compostos como sensores fluorescentes, moléculas capazes de detectarem analitos de interesse, como por exemplo cátions metálicos ou espécies oxidantes². Os BODIPYs têm como precursores sintéticos diretos, os DPM's (Esquema 1), e, portanto, estratégias eficientes para a preparação de DPMs, com maiores rendimentos, utilizando menores quantidades de reagentes e solventes e com catalisadores reaproveitáveis ou de baixo custo são altamente desejáveis nos dias de hoje.

Esquema 1. Formação de um núcleo básico de BODIPY (**3**) tendo como precursor o DPM (**1**).



Os DPM's são compostos por duas unidades pirrólicas unidas por uma ponte, constituída por um grupo metino. Sua estrutura nitrogenada permite que estas moléculas atuem como quelantes

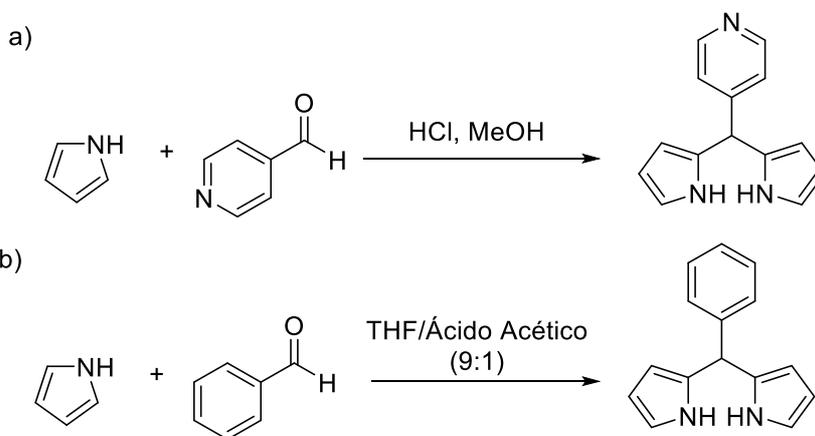
de metais de transição e também outros átomos, como o boro, o que permite a formação do BODIPY. A porção pirrólica, rica em elétrons, pode servir como nucleófilo em outras reações, permitindo a rápida funcionalização deste núcleo.

Movidos pelos desafios sintéticos e pela necessidade de preparação desse material para os seus diversos usos, pesquisadores do mundo todo ao longo de mais de 50 anos vêm se dedicando ao estudo de estratégias sintéticas destes núcleos. Esta resenha traz um histórico desse desenvolvimento, iniciando pelas rotas clássicas e suas limitações, passando por tentativas de desenvolver rotas mais verdes, como por exemplo, em meio aquoso e finalizando pela apresentação de estratégias modernas e até mesmo inusitadas.

Histórico da síntese de dipirrometanos

O desenvolvimento das estratégias sintéticas de dipirrometanos foi inicialmente movido pela química de porfirinas e a partir da década de 1970, algumas rotas começaram a ser relatadas em literatura. Nagarkatti, em 1974 relatou a síntese de DPM's meso-substituídos com piridinas, promovendo a condensação de pirrol e aldeídos com HCl gasoso em metanol (Esquema 2, a)³. Já em 1994, Vigmond utilizou uma mistura THF/ácido acético para obter o produto de interesse (Esquema 2, b)⁴.

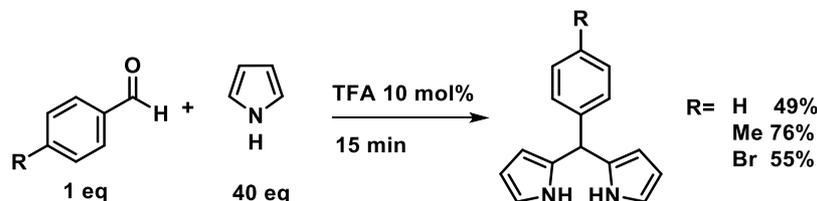
Esquema 2. Estratégias de síntese de DPM's, segundo a) Nagarkatti e b) Vigmond



Síntese clássica de dipirrometanos

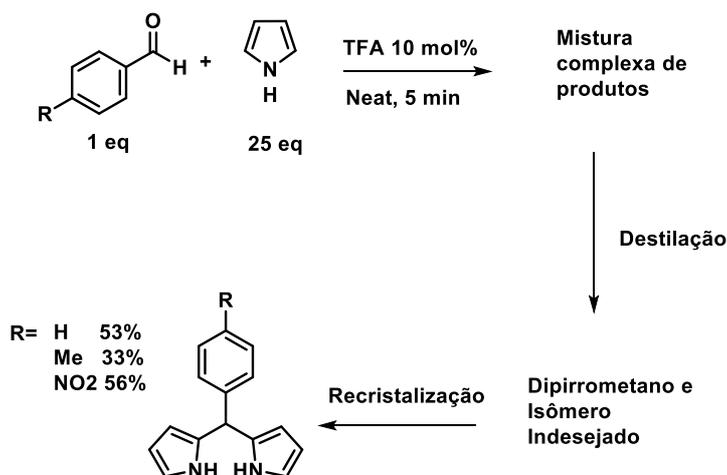
Em 1994, um trabalho publicado por Lindsay alterou o panorama da síntese de DPM⁵. Os autores relataram a condensação de aldeídos e pirróis utilizando ácido trifluoroacético como catalisador, em meio em que o próprio pirrol atuava como solvente da reação (Esquema 3). Desta forma, os autores conseguiram bom desempenho, utilizando 40 equivalentes de pirrol. A purificação descrita faz uso de destilação ou de coluna cromatográfica de sílica, sendo que os autores observaram que a recristalização direta não foi possível.

Esquema 3. Síntese de BODIPY, relatado por Lindsay, empregando ácido trifluoroacético



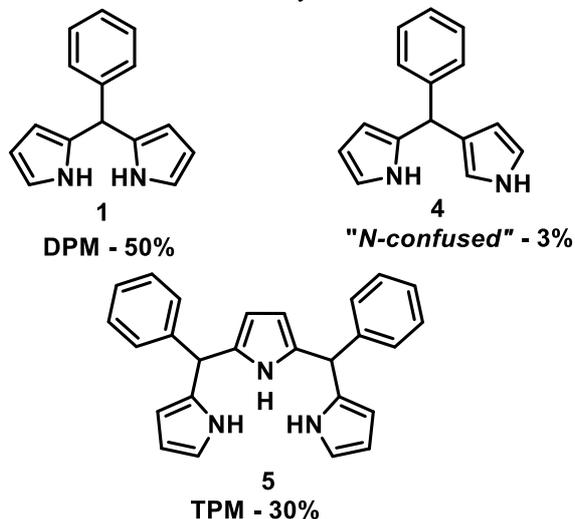
Em 1999, o mesmo pesquisador publicou outro trabalho, trazendo novas contribuições para o tema⁶. Amparados por análises quantitativas por cromatografia gasosa, os autores verificaram que o excesso de pirrol poderia ser diminuído para 25 equivalentes sem diminuir significativamente o rendimento do produto principal (Esquema 4). Isso significou uma grande contribuição para o tópico, pela diminuição expressiva de um dos reagentes, tornando o processo mais sustentável e menos dispendioso.

Esquema 4. Síntese relatada por Lindsay e método de purificação



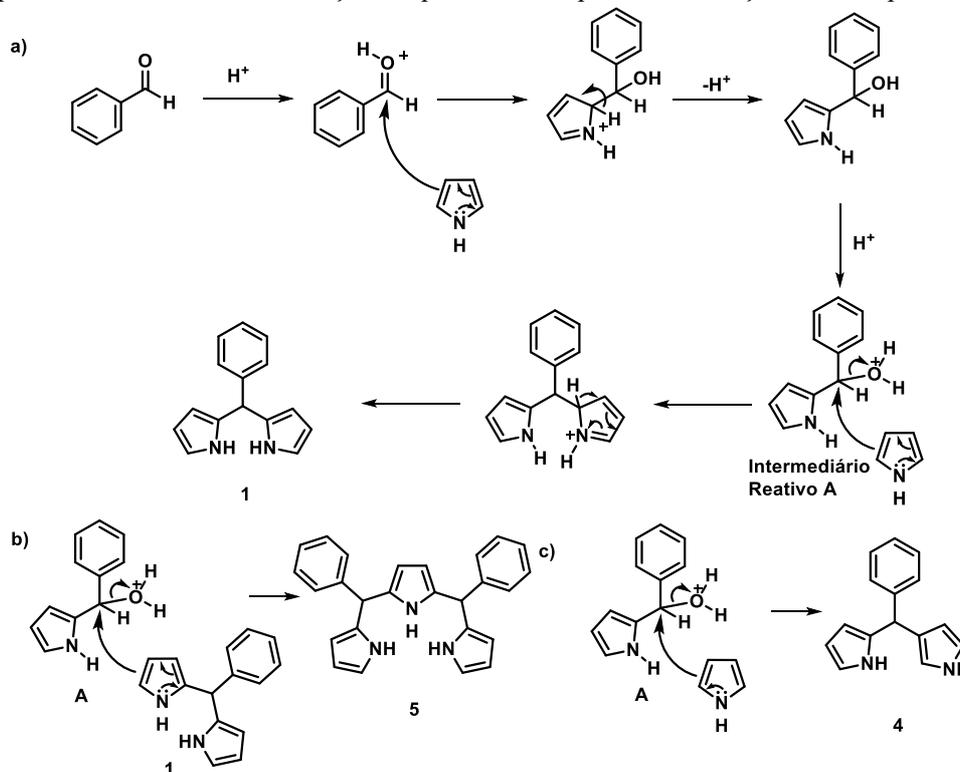
Provavelmente, a maior contribuição deste estudo foi o entendimento das as razões dos produtos e subprodutos principais formados. Lindsay observou que o principal subproduto formado corresponde à tripirranos (5), seguido dos DPM “N-confused” (4, Figura 2). Além disso, foram observados também outros oligômeros (maiores). A explicação do surgimento destes subprodutos está amparada na reatividade de pirróis.

Figura 2. Produtos caracterizados Lindsay, em seus trabalhos de síntese de DPM



A formação do DPM se dá por uma condensação, conforme apresentado no esquema 5. A ativação da carbonila pelo catalisador ácido gera o intermediário **A** que atua como eletrófilo na reação de substituição eletrofílica com o pirrol. Após a eliminação de água, o intermediário formado atua como eletrófilo para uma outra reação de substituição eletrofílica com outro pirrol. O produto desta reação é o PDP desejado. Porém, a reação não termina neste estágio. Os dipirrometanos são, essencialmente, pirróis substituídos e apresentam reatividade muito similar aos dos seus precursores. Assim, uma segunda condensação pode ocorrer da reação do DPM formado com o intermediário **A**, gerando o tripirrano (**5**), identificado por Lindsay como principal subproduto da reação. Pequenos oligômeros podem continuar sendo formados de reações subseqüentes das unidades pirrólicas com o intermediário **A**, gerando uma mistura complexa de oligômeros.

Esquema 5. Mecanismos de formação dos produtos e subprodutos da reação estudada por Lindsay



A posição mais nucleofílica de pirróis é a 2 (vicinal ao átomo de nitrogênio). Isso pode ser explicado pela formação de um intermediário mais estável quando o ataque ocorre por esta posição, visto que nessa estrutura a deslocalização de elétrons é mais expandida. Além disso, todos os átomos apresentam octeto completo, contribuindo para a maior estabilização. Porém, o ataque pela posição 3 não é proibido. Na verdade, ocorre, porém com menor frequência. Isso explica a formação do subproduto denominado “*N-confused*” (**4**), conforme mostrado no esquema 5, c.

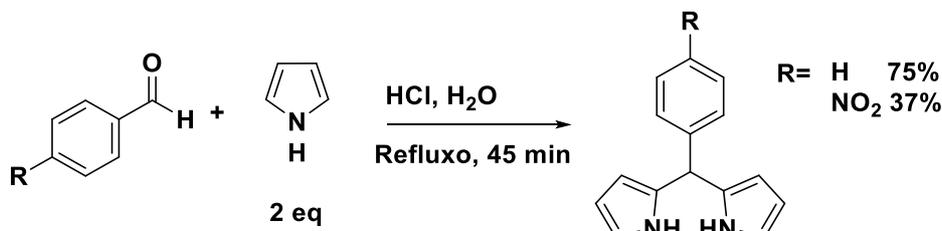
Além de quantificar os subprodutos formados na condensação de pirróis com aldeídos, o trabalho de Lindsay propôs, também, uma metodologia de purificação do DPM. Em trabalhos anteriores, destilação do pirrol excedente era efetuada, seguida da destilação do DPM e então, uma recristalização. Contudo, com esta estratégia, DPMs substituídos com grupo grandes não podiam ser destilados, devido aos seus altos pontos de ebulição. Além disso, os autores perceberam que os DPM's não são muito estáveis em solventes orgânicos e, por consequência, durante o processo de purificação em coluna cromatográfica, limitando bastante os processos de purificação desses compostos.

Essa publicação foi de grande importância para a comunidade sintética de porfirinas e afins, pois apresentou um método robusto de preparação de DPM. Ainda persiste a busca por melhoramentos dos métodos de preparação de DPM pois apesar dos avanços trazidos por Lindsay a utilização de grande excesso de pirrol ainda representa uma limitação que impõe necessidades de etapas de purificação bastante dispendiosas e trabalhosas. Na virada do século, um trabalho

inaugurou uma nova metodologia para síntese de DPM, contornando a necessidade de excessos de reagentes e mostrando ser possível promover esta reação em meio aquoso.

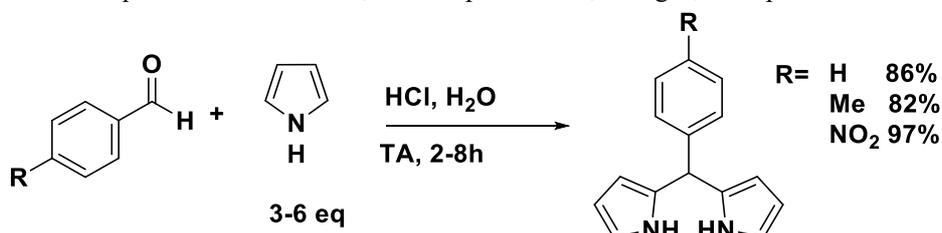
Nos anos 2000, Gonsalves e colaboradores relataram a preparação de DPMs em água⁷. Os autores partiram da hipótese de que, para suprimir as reações subsequentes de DPM e a formação de tripirranos, uma abordagem possível seria a proteção do DPM, impedindo que a reação se processasse. Sendo esses últimos insolúveis em água, após sua formação, saíam de solução, por precipitação, não participando mais de reações subsequentes que pudessem dar origem aos subprodutos indesejáveis. Desta forma, utilizando HCl como catalisador e promovendo a reação em refluxo, os autores foram capazes de obter diversos DPM's em bons rendimentos, sem a necessidade de utilizar excesso de pirrol. Apesar disso, não é uma metodologia muito adotada e existem relatos de pesquisadores que não foram capazes de reproduzir a condição relatada (Esquema 6).

Esquema 6. Síntese de DPM em água, relatada por Gonsalves



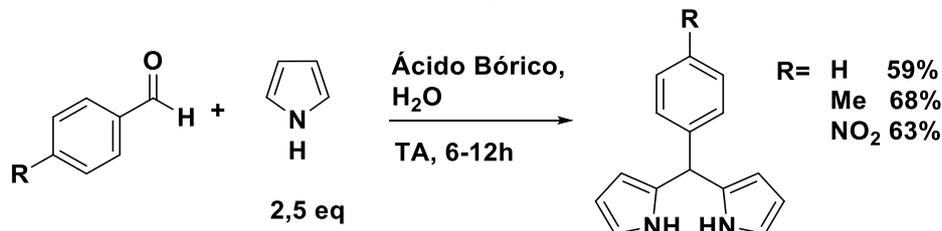
Alguns anos depois, Dehaen relatou uma variação, tendo como diferencial principal a utilização de HCl em água à temperatura ambiente em tempos reacionais mais longos.⁸ Neste trabalho, o produto sólido é simplesmente filtrado do meio reacional após o término da reação. Apesar da aparente robustez do método, os autores não descreveram claramente a pureza com que os produtos puderam ser obtidos por este procedimento, alegando apenas “uma pureza considerável”. De qualquer modo, este parece ser o método de maior recorrência e descrição em literatura.

Esquema 7. Síntese DPM, descrita por Dehaen, em água, à temperatura ambiente



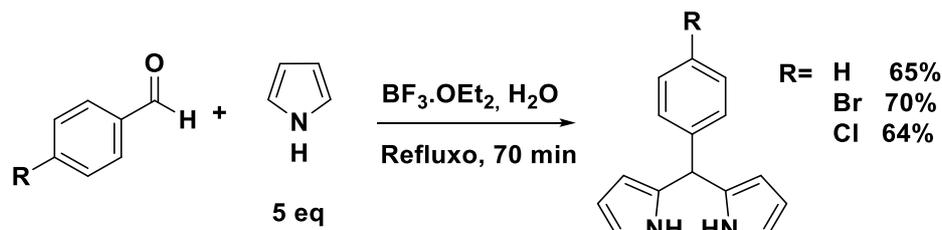
Na década seguinte, um outro protocolo, também em água, foi relatado por Chauan e colaboradores. Os autores relataram a utilização de ácido bórico como catalisador da reação de aldeídos e pirrol, à temperatura ambiente⁹. Neste caso, as purificações foram realizadas por coluna cromatográfica, implicando em baixos rendimentos impostos pela instabilidade em solvente orgânico, exigido para o procedimento cromatográfico de purificação (Esquema 8).

Esquema 8. Metodologia de síntese de DPM, empregando ácido bórico, em água, publicada por Chauan



Em 2019, Mortazavi-Manesh relatou a utilização de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ em água, sob refluxo (Esquema 9)¹⁰. Os autores relataram que foi possível recrystalizar o produto após uma etapa de extração com diclorometano. Os rendimentos obtidos, segundo os autores, foram bons, se comparados com os dos métodos clássicos (em solventes orgânicos), porém menores do que os obtidos por Dehaen.

Esquema 9. Metodologia de preparação de DPM, empregando $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, em água, publicada por Mortazavi-Manesh.



Considerações finais

Espero que com este trabalho tenhamos conseguido mostrar que os DPM's pertencem à uma importante classe de compostos, com uma história longa e cheia de avanços bastante significativos. Essa história mostra também que a busca de diferentes métodos para sua síntese ainda não acabou e é um tópico relevante para pesquisas até os dias atuais. Métodos modernos que permitam a obtenção desses núcleos em maiores rendimentos, sem a necessidade do uso de grandes excessos de reagentes e com meios reacionais recicláveis ainda são desejáveis na busca por metodologias mais sustentáveis. As estratégias de reação em meio aquoso apresentadas representam um grande avanço na síntese dos DPM. O fato de não utilizarem solventes orgânicos é bastante desejável pelo ponto de vista de química verde. Os rendimentos relatados são bastante atraentes e os procedimentos de purificação são substancialmente mais simples. Certamente, outras metodologias para a obtenção dos produtos de interesse utilizando água ainda são bem-vindas e contribuirão para a comunidade sintética. Complementarmente, cabe-nos dizer que outras abordagens de preparação de DPM's são conhecidas. Contudo, são conceitualmente diferentes e não foi nosso propósito relatá-las aqui, por não ser nossa intenção esgotar o assunto, neste trabalho

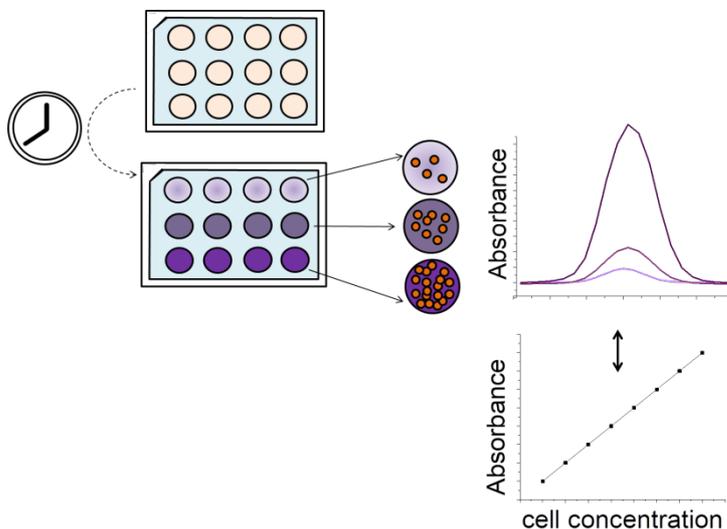
Agradecimentos

Os autores agradecem à Capes, CNPq e FAPESP pelo fomento à pesquisa.

Referências

1. Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L.; *J. Org. Chem.* **1967**, *32* (2), 476–476.
2. Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W.; *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (3), 1130–1172.
3. Nagarkatti, J. P.; Ashley, K. R.; *Synthesis.* **1974**, *1974* (03), 186–187.
4. Vigmond, S. J.; Chang, M. C.; Kallury, K. M. R.; Thompson, M.; *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35* (16), 2455–2458.
5. Lee, C. H.; S. Lindsey, J.; *Tetrahedron* **1994**, *50* (39), 11427–11440.
6. Littler, B. J.; Miller, M. A.; Hung, C. H.; Wagner, R. W.; O’Shea, D. F.; Boyle, P. D.; Lindsey, J. S.; *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (4), 1391–1396.
7. Sobral, A. J. F. N.; Rebanda, N. G. C. L.; da Silva, M.; Lampreia, S. H.; Ramos Silva, M.; Beja, A. M.; Paixão, J.; Rocha Gonsalves, A. M. D. A.; *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (20), 3971–3973.
8. Dehaen, W.; Rohand, T.; Dolusic, E.; Ngo, T.; Maes, W.; *Arkivoc* **2007**, *1* (10), 307–324.
9. Singhal, A.; Singh, S.; Chauhan, S. M. S.; *Arkivoc* **2017**, *2016* (6), 144–151.
10. Bagherzadeh, M.; Jonaghani, M. A.; Amini, M.; Mortazavi-Manesh, A. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2019**, *23* (06), 671–678.

Graphical Abstract



Cell viability assay based on colorimetric methods indicates the number of healthy cells through biochemical markers as indicators of metabolically active cells

ENSAIOS COLORIMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

Emilli C. G. Frachini^a, Alex C. Alavarse^a, Jean Bezerra^b, Henning Ulrich^{b*}, Denise F. S. Petri^{a*}

^a Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo-SP, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo-SP, Brazil

*e-mail: dfsp@iq.usp.br, *henning@iq.usp.br

COLORIMETRIC ASSAYS FOR ASSESSMENT IN VITRO CELL VIABILITY/ CYTOTOXICITY

Colorimetric assays have been often applied to determine cell viability or cytotoxicity due to fastness, reliability, and low cost. Most common assays include tetrazolium salts, lactate dehydrogenase (LDH), sulforhodamine B (SRB), crystal violet (CV), and neutral red uptake (NRU). Overall, choosing a suitable method is needed to obtain reliable results. Sometimes, different assays should be combined to achieve meaningful data. This review describes an overview of colorimetric assays and the corresponding protocols, advantages, and limitations related to cell culture on monolayer, and 3D systems.

Keywords: cell viability; colorimetric assays; cell culture; biomaterials

INTRODUÇÃO

Os ensaios de viabilidade celular são métodos utilizados para estimar a quantidade de células viáveis a partir de diversos indicadores de funções celulares, como produção de ATP, integridade da membrana plasmática, aderência celular, oxirredução de coenzimas, e atividade de captação de nucleotídeos.¹ Geralmente, esses ensaios são realizados para avaliar as células metabolicamente ativas em resposta a estímulos extracelulares,² fármacos para tratamento terapêutico,³ agentes químicos,⁴ ou a fim de otimizar as condições da cultura celular.⁵ Os ensaios de viabilidade celular podem ser classificados de acordo com o procedimento de quantificação celular: métodos colorimétricos, fluorimétricos, luminométricos, e por exclusão de corante.⁶ Os ensaios colorimétricos permitem, a partir da medida de absorbância por espectrofotometria, avaliar a quantidade de células viáveis em relação ao controle, que são as células cultivadas em placa de cultura celular convencional sem tratamento ou estímulo extracelular. A **Figura 1** mostra as estruturas químicas e os espectros de absorção na região ultravioleta/visível (UV-vis) de reagentes frequentemente utilizados em ensaios colorimétricos.

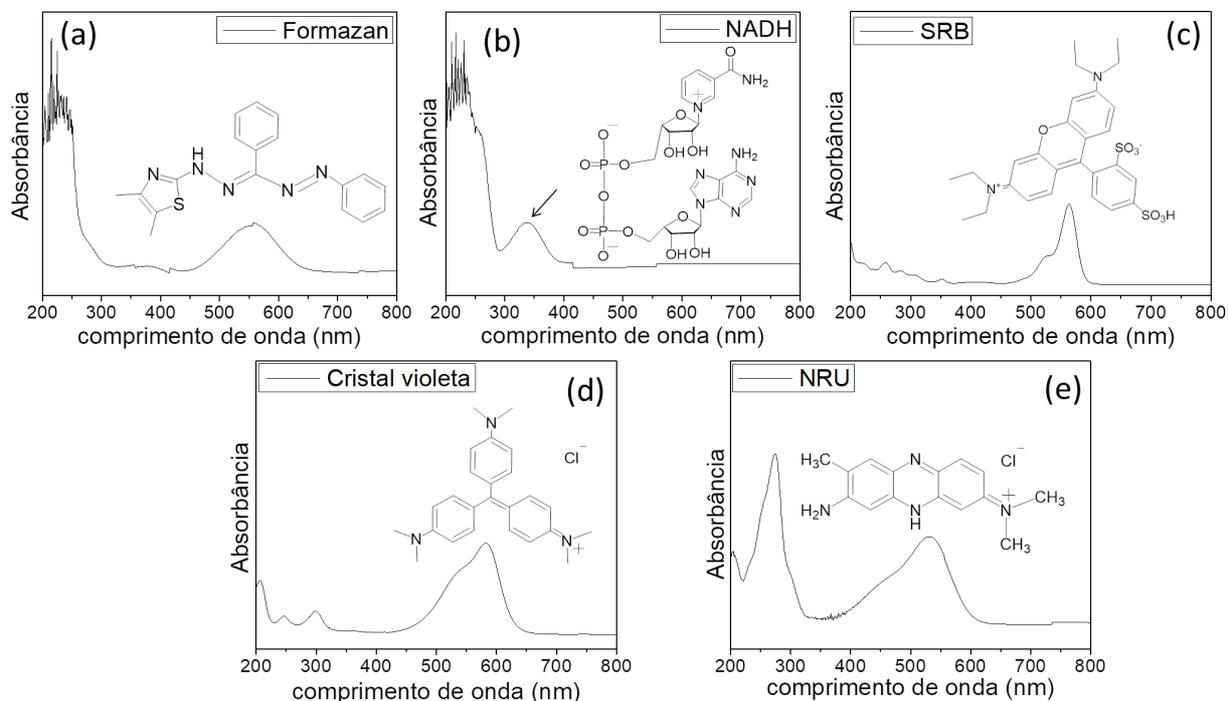


Figura 1. Estrutura química, espectros de absorção na região UV-vis (espectrofotômetro Beckman-Coulter DU650) e comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{max}) dos compostos utilizados em ensaios colorimétricos para avaliar a viabilidade celular. (a) formazan, $\lambda_{max} = 570 \text{ nm}$, (b) NADH, $\lambda_{max} = 340 \text{ nm}$, (c) sulforodamina B (SRB), $\lambda_{max} = 565 \text{ nm}$, (d) cristal violeta, $\lambda_{max} = 570 \text{ nm}$, (e) vermelho neutro, $\lambda_{max} = 540 \text{ nm}$

Métodos colorimétricos são amplamente utilizados devido à rápida aplicação, fácil automação e baixo custo.⁷ No entanto, alguns fatores podem influenciar no sinal de absorbância^{6,7} (ver na seção “Avaliação e comparação entre métodos colorimétricos”), levando a falhas na avaliação do crescimento celular, principalmente quando as células são cultivadas em sistemas 3D.⁸ Portanto, ao escolher o método ideal, vários parâmetros devem ser considerados para que os resultados gerados sejam reprodutíveis e confiáveis.

MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Sais de tetrazólio

Uma variedade de sais de tetrazólio pode ser utilizada na detecção de células metabolicamente ativas com a finalidade de avaliar a viabilidade celular ou a citotoxicidade de uma dada substância ou material. Esses compostos podem ser classificados em sais catiônicos, sais aniônicos, e os sais de tetrazólio solúveis em água.^{9,10} Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) é o sal de tetrazólio mais utilizado para determinar viabilidade celular em diferentes linhagens de células. Este ensaio foi desenvolvido por Mosmann,¹¹ e é considerado um método simples, rápido e reprodutível. No entanto, o MTT é tóxico para as células, e alguns fatores influenciam no sinal de absorvância (ver seção “Avaliação e comparação entre métodos colorimétricos”).^{9,12} Este ensaio é baseado na redução do sal de tetrazólio em formazan pela oxidação de coenzimas mitocondriais (NADH e/ou FADH₂) (**Figura 2**). No entanto, ainda há especulações sobre esse mecanismo, pois algumas pesquisas mostram que o MTT pode formar depósitos em outras organelas ou em gotículas de lipídeos.^{13,14}

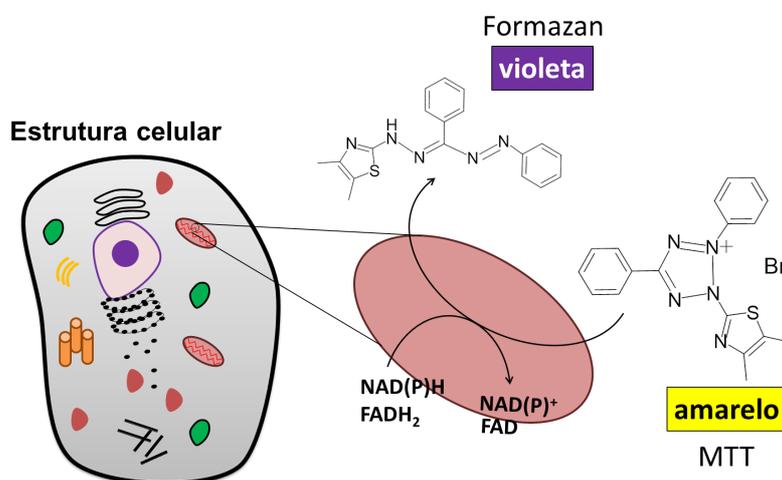


Figura 2. Reação de redução do MTT a formazan em uma célula eucariótica por enzimas mitocondriais. Nessa reação, as coenzimas NADH e FADH₂ são utilizadas como doadores de elétrons para a redução do MTT.

No ensaio de MTT, o sal de tetrazólio amarelo é solubilizado em água destilada ou tampão fosfato-salino pH 7,4 (PBS), na concentração de 5,0 mg/mL. Em seguida, pode ser filtrado em membrana

de 0,22 µM, armazenado a -20 °C e protegido da luz.⁷ Essa solução é adicionada à cultura celular na concentração final de 0,2-0,5 mg/mL, e incubada a 37 °C por 1-4 h.^{5,7,9} Nessa etapa, ocorrem as reações de redução do MTT a formazan e de oxidação de NADH a NAD⁺. Quanto maior o número de células metabolicamente ativas, maior a oxidação de NADH a NAD⁺ e, portanto, maior a formação de formazan. Posteriormente, o meio contendo MTT é removido e DMSO é adicionado para solubilizar os cristais, já que o formazan é um sal violeta insolúvel em água. A absorbância da solução é medida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm (**Figura 1a**).¹⁵ O número de células viáveis é considerado diretamente proporcional à atividade metabólica das células e, conseqüentemente, à intensidade de absorbância medida. A porcentagem de células viáveis em relação ao controle pode ser calculada a partir dos valores de absorbância referente às células expostas ao tratamento (Am) e as células controle (Act), sem tratamento, após subtração da absorbância do meio de cultivo livre de células (branco-Ab), como indicado na Eq. (1):

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \left[\frac{Am - Ab}{Act - Ab} \right] \times 100 \quad (1)$$

Lactato desidrogenase (LDH)

A citotoxicidade de um composto também pode ser avaliada pela quantificação de células mortas a partir da atividade enzimática do LDH. Esta enzima, presente no citoplasma de células eucarióticas, é liberada para o meio de cultivo quando a integridade da membrana plasmática celular é comprometida. A função catalítica da LDH é fundamental para as reações reversíveis do piruvato/lactato e NADH/NAD⁺, como exemplificado na reação da **Figura 3**.^{16,17}

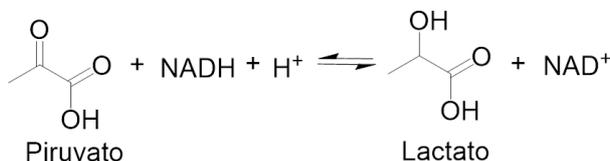


Figura 3. Reação reversível entre piruvato/lactato e NADH/NAD⁺ catalisada pela enzima LDH.¹⁶

O reagente de trabalho desse ensaio é comercializado na forma de duas soluções: reagente 1 (R1) que contém NADH, e o reagente (R2) que contém uma solução tampão, pH 7,5, suplementado com piruvato de sódio e azida sódica. A solução de trabalho é preparada previamente a partir da mistura do R1 com R2 na proporção de 4:1 (v/v). Após a morte celular as células se destacam da placa de

cultura. Em seguida, a solução de trabalho é misturada apenas no meio de cultura contendo células mortas. Nesse momento, o piruvato sofre uma reação de redução e convertido à lactato, enquanto NADH é oxidado a NAD⁺. Dessa maneira, é possível estimar a atividade de LDH a partir da medida de absorvância em 340 nm, absorvância máxima do NADH (**Figura 1b**).¹⁸ A taxa de conversão de NADH para NAD⁺ é diretamente proporcional à atividade de LDH no meio de cultura e, conseqüentemente, à morte celular. Na presença da enzima LDH a formação de NAD⁺ é acentuada em até 14 vezes, dessa forma, variações no tempo de incubação podem acarretar em grande variabilidade e aumentar o erro experimental entre as amostras.¹⁹ Isso indica que o equilíbrio NADH/NAD⁺ é alcançado rapidamente, e não é recomendável a leitura de sua absorvância. Como alternativa para uma análise assertiva, o processo NADH→NAD⁺ pode ser explorado adicionando a atividade da enzima diaforase.²⁰ A enzima diaforase transfere H/H⁺ a partir do NADH/H⁺ para um sal de tetrazólio presente na solução a ser reduzido a formazan.⁶ Nesses casos, a solução do ensaio é composta por NAD⁺, ácido láctico e um sal de tetrazólio, como por exemplo, o iodonitrotetrazólio (INT).¹⁷ O meio de cultura que contém o LDH liberado na morte celular é transferido para outra placa e a solução do ensaio é misturada com o meio de cultivo. A placa é incubada por 15-30 min em 37 °C e protegida da luz. Em seguida, uma solução contendo dimetilformamida/SDS é adicionada. A absorvância pode ser medida em aproximadamente 490 nm após 1 h.²¹ Uma vez que a reação é reversível, o excesso de lactato e NAD⁺ no meio de cultura gera piruvato e NADH (ver **Figura 3**).²² Dessa maneira, o NADH sofre oxidação para NAD⁺, e reduz o INT a formazan (**Figura 4**), que por sua vez tem absorvância máxima em 490 nm. O aumento da absorvância indica maior quantidade de LDH liberada para o meio de cultura, logo é diretamente proporcional a morte celular.¹⁷

É importante obter um parâmetro da atividade máxima da LDH, ou seja, obter um controle positivo (Act_p), no qual todas as células estejam mortas, e também um controle negativo (Act_n). No controle negativo a solução de ensaio é adicionada ao meio de cultura livre de células vivas ou mortas.²² Nesse caso, a citotoxicidade pode ser calculada a partir da Eq.(2):

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = \left[\frac{Am - Act_n}{Act_p - Act_n} \right] \times 100 \quad (2)$$

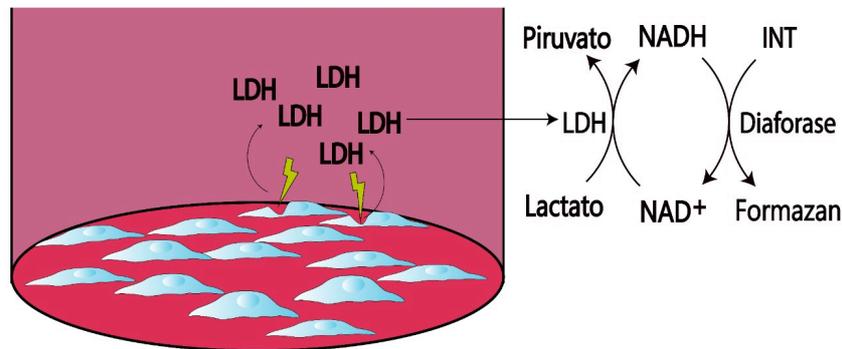


Figura 4. Mecanismo para avaliação da citotoxicidade utilizando o ensaio de LDH. A enzima LDH converte lactato em piruvato, além de reduzir a coenzima NAD⁺. O NADH sofre oxidação formando NAD⁺, enquanto o INT é reduzido a formazan

Kits comerciais já contêm a solução de NADH, lactato e diaforase combinados com diferentes sais tetrazólio como CyQUANT™ (ThermoFisher) que usa o INT e o LDH-Cytox™ (BioLegend) que contém o sal de tetrazólio solúvel em água (WST-1), sendo quantificados por espectrofotometria em $\lambda = 490 \text{ nm}$ e 438 nm , respectivamente. Além disso, marcadores bioluminescentes como no caso do kit LDH-Glo™ (Promega) podem ser analisados por meio de espectrofluorímetro (Ex/Em = $535/587 \text{ nm}$) que gera luz por meio da oxidação da luciferina à oxiluciferina na presença de oxigênio, ATP e luciferase.

Sulforodamina B (SRB)

A SRB é um corante solúvel em água de cor avermelhada (excitação/emissão máxima a $565/586 \text{ nm}$) e pode ser utilizado para estimar a citotoxicidade de substâncias em ensaios com células aderentes. A SRB é uma molécula composta por três anéis (xanteno) ligados a dois grupos dietilaminas e um anel di-hidroxosulfônico. Possui uma alta afinidade por interação eletrostática com aminoácidos catiônicos (histidina, arginina e lisina) sob condições ácidas moderadas. Desde a década de 1990, estudos têm sido reportados adotando como protocolo de viabilidade celular a quantificação da SRB em contato com aminoácidos residuais de células aderentes saudáveis²³⁻²⁵ e cancerosas.²⁶⁻²⁸ Para que isso ocorra, após o tempo de incubação, as células devem ser fixadas e os aminoácidos catiônicos devem estar com carga superficial positiva. Esta forte interação permite que todo o excesso de SRB seja descartado, remanescendo somente uma quantidade proporcional à

quantidade de proteínas ligantes, que é proporcional ao número de células viáveis. A **Figura 5** exemplifica essa interação da SRB e amino ácidos residuais a um pH moderadamente ácido.

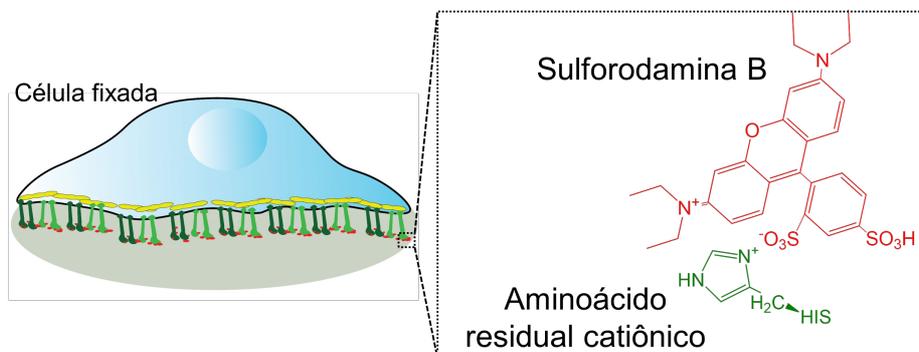


Figura 5. Viabilidade celular avaliada indiretamente pela interação de aminoácidos residuais (derivadas de integrinas) e SRB. Em condições ácidas, a interação eletrostática entre o grupo protonado imidazol da histidina e aniônico sulfônico da SRB garante sua retenção

De uma forma geral, o ensaio pela SRB é relativamente rápido e pode ser feito com poucas etapas. Após o tempo de incubação, retira-se o meio de cultivo dos poços e substitui-se por solução de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (wt/v). Assim, ocorre a precipitação das proteínas celulares a partir da interação eletrostática entre os íons tricloroacetato e as amins primárias protonadas. Após 1 h de reação, as células se mantêm fixadas e a solução de SRB é adicionada. O corante SRB adicionado nas células é previamente solubilizado em ácido acético; neste meio, SRB está negativamente carregada, pois o pKa da SRB é 2,1.²⁹ Após 0,5 h de reação, os poços são lavados novamente com solução de ácido acético 1 % (v/v) (cerca de 6x) para que todo o excesso da SRB seja retirado. Em seguida, adiciona-se uma solução tris(hidroximetil)aminometano (tris), em pH 10,5 para que o todo o corante SRB ligado aos aminoácidos das células seja liberado na solução. Embora a absorvância máxima da SRB seja em 565 nm (**Figura 1c**), o ensaio é realizado em comprimento de onda de 510 nm, porque a melhor linearidade de absorvância em função de concentração está entre 490-530 nm.^{26,30} O número de células saudáveis é diretamente proporcional à quantidade de SRB extraída, e a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle pode ser calculada a partir da Eq.(1). Vale ressaltar que, a absorvância da SRB não é afetada pela variação de pH do meio.³¹

Cristal violeta (CV)

O cristal violeta (CV), ou violeta genciana, é um corante com propriedade antibacteriana, antifúngica e antitumoral.³² Além disso, o CV tem um papel muito importante na pesquisa biomédica, já que é utilizado para coloração de Gram,³³ e quantificação de células aderentes por meio da marcação de DNA.³⁴ O CV é capaz de interagir com superfícies negativas das proteínas em meio de cultura,^{35,36} uma vez que o CV ($pK_{a1}= 5,3$ e $pK_{a2}=8,64$)³⁷ está positivamente carregado quando dissolvido em água/metanol (pH da solução de CV em água/metanol é 3,15). O ensaio de CV para avaliar a citotoxicidade de fármacos foi reportado pela primeira vez por Saotome e colaboradores.³⁸ Primeiramente, as células plaqueadas são tratadas com agente químico de interesse. Após o tempo de incubação, o meio de cultura é removido, e as células mortas destacadas da placa de cultura são removidas ao realizar etapas de lavagem. Então, o CV solubilizado em água/metanol é adicionado em concentração de aproximadamente 0,5 % para interagir com as proteínas e DNA das células saudáveis remanescentes. As células são mantidas em contato com o CV em temperatura ambiente por aproximadamente 20 min. Em seguida, a solução de CV é removida, e os poços são lavados com água Milli-Q. O corante que ficou ligado ao DNA das células é solubilizado por uma solução de metanol; a absorbância da solução pode ser medida em um espectrofotômetro em aproximadamente 570 nm (**Figura 1d**).⁷ Finalmente, a viabilidade celular pode ser avaliada pela Eq.(1), a partir das medidas referentes às células que foram tratadas (A_m) e as sem tratamento ($-Act$). O aumento no valor da absorbância dos poços onde houve tratamento com algum agente químico ou estímulo extracelular indica maior número de células viáveis em relação ao controle. A coloração de células com CV é considerada um ensaio rápido, simples e reprodutível para avaliar a citotoxicidade celular *in vitro*. No entanto, deve-se ter cautela, pois as etapas de lavagem podem remover algumas células viáveis.

Absorção de vermelho neutro (neutral red uptake-NRU)

O vermelho neutro (3-amino-7-dimethylamino-2-methyl-phenazine hydrochloride) é um corante catiônico fraco capaz de penetrar nas membranas de células saudáveis por difusão passiva não iônica e se acumular nos lisossomos. Ao passar pela membrana do lisossomo, o corante fica carregado positivamente já que o pK_a do vermelho neutro ($pK_a = 6,8$) é maior que o pH do lisossomo (pH 4,8), e fica preso dentro dessa organela.⁶ Esse ensaio foi desenvolvido por

Borenfreund e Puerner,³⁹ e desde então tem sido aplicado em diversas áreas da pesquisa biomédica.^{40,41} No ensaio de NRU, as células plaqueadas e tratadas são incubadas com o vermelho neutro na concentração de aproximadamente 25-40 µg/mL, por 2-4 h. Em seguida, o corante é removido, e as células são lavadas cuidadosamente com PBS. O corante que ficou concentrado no lisossomo é solubilizado com uma solução de descoloração (50 % de etanol, 49 % de água, e 1 % de ácido acético glacial) em agitação constante protegido da luz. Após 1 h, as soluções são conduzidas a um espectrofotômetro ou leitor de placas para medida da absorbância máxima do vermelho neutro em 540 nm (**Figura 1e**).^{7,42} A viabilidade celular é diretamente proporcional à quantidade de vermelho neutro extraído das células, portanto proporcional à medida de absorbância. O cálculo pode ser realizado a partir da Eq.(1). Embora o NRU seja menos utilizado que outros ensaios colorimétricos discutidos aqui, como o MTT, esse ensaio é mais econômico,⁴³ apresenta menos limitações relacionadas à agentes químicos, como compostos de cobre,⁴⁴ e pode ser utilizado em ensaios sob condições ácidas.⁴⁵ No entanto, existem algumas limitações quanto ao uso de substâncias voláteis, instáveis e com baixa solubilidade.⁴³

AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Encontrar o método ideal que atenda às suas necessidades às vezes pode ser uma tarefa desafiadora. Fatores como a linhagem celular, densidade celular, ponto final da reação, a dosagem dos reagentes, limitações das substâncias químicas, sensibilidade de detecção do método, e a facilidade de manipulação devem ser avaliados.^{6,46} Apesar do ensaio de MTT ser popularmente utilizado, algumas vezes não é recomendado. Śliwka e colaboradores observaram que o ensaio de CV é mais confiável que o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade na linhagem celular HT-29 expostas a dois agentes anticancerígenos.⁴⁷ O ensaio de citotoxicidade de nanopartículas (NP) também deve ser cuidadosamente escolhido já que algumas NP apresentam atividade óptica. A presença de NP de negro de fumo reduziu significativamente o sinal de absorbância dos ensaios de MTT e CV na avaliação de citotoxicidade em HaCaT.⁴⁸ Compostos naturais como kaempferol, resveratrol, e alguns antioxidantes também podem interferir na medida de absorbância do ensaio de MTT.⁴⁹ Por outro lado, Fotakis e Timbrell⁵⁰ reportaram que o ensaio de MTT e NRU parecem ter mais sensibilidade do que o ensaio de LDH na avaliação da citotoxicidade de HTC e HepG2 expostas à

CdCl₂. Já Bacanlı e colaboradores⁵¹ relatam que não há diferença entre os resultados obtidos na viabilidade de células V79, HeLa e BT-474 por meio dos métodos NRU e MTT. Vajrabhaya e Korsuwannawong⁵² indicaram que os ensaios SRB e MTT geraram dados similares para avaliar a citotoxicidade da planta *Clinacanthus nutans* em linhagem L929. Além da cultura celular em monocamada, o crescimento celular também pode ser realizado em scaffolds tridimensionais (3D). Biomateriais provenientes de polissacarídeos e proteínas são amplamente utilizados no campo da medicina regenerativa a fim de mimetizar a organização *in vivo*.⁵³ Ensaios de MTT e LDH foram efetivos para medir a viabilidade em células hepáticas HepG2 encapsuladas em matrizes de alginato⁵⁴ e células-tronco mesenquimais humanas (hADSCs) em hidrogel de quitosana.⁵⁵ Debnath e colaboradores⁵⁵ reportaram que a atividade metabólica de células-tronco mesenquimais cultivadas em hidrogel aumentou mais que 100 % após 4 dias de cultivo. Ensaios de CV, NRU, e SRB também foram utilizados para avaliar a viabilidade celular de células-tronco mesenquimais da medula óssea de rato (BMSC)⁵⁶, fibroblastos de camundongo L929⁵⁷, e fibroblastos dérmicos humanos NHDF⁵⁸, respectivamente, cultivadas em hidrogéis. A **Tabela 1** apresenta biomateriais utilizados como suportes para proliferação celular e como carreador de fármacos, e o tipo de ensaio colorimétrico utilizado. No entanto, a complexidade dos suportes pode apresentar um desafio adicional no design experimental. Há um risco ao aplicar tais métodos colorimétricos, pois os ensaios em sistemas 2D podem não funcionar igualmente para ensaios em 3D.⁵⁹ Fatores como a densidade celular, volume do meio, tempo de exposição ao tratamento, dosagem dos reagentes devem ser otimizados e padronizados na presença do sistema 3D.⁶⁰

Tabela 1. Métodos colorimétricos (MC) utilizados para avaliar a viabilidade celular e citotoxicidade em hidrogéis sintetizados para aplicações biomédicas.

Biomaterial	Linhagem celular	MC	Aplicação	Ref.
Quitosana (Quit)	células-tronco hADSCs	MTT/LDH	Regeneração tecidual	55
Quit/AuNPs	Células epidérmicas (CCD 1106 KERTr)	XTT/MTT	Antibacteriana; Entrega de fármacos	61
Quit/Gelatina/vidro bioativo	células-tronco BMSC	CV	Regeneração tecidual	56
Colágeno/Quit	Fibroblastos MEF/HSF	XTT/CV	Suporte celular	62

Quit/alginato	Fibroblastos L929	NRU	Proliferação celular	40
N-trimetil Quit/ carboximetil xantana	Células de pulmão (Wi38)	NRU	Liberação de fármaco; antibacteriana	41
Carboximetilamido/PVA/Ag	Fibroblastos NHDF	SRB	Antibacterianos	58

CONCLUSÃO

Os ensaios colorimétricos são amplamente aplicados em diferentes áreas da pesquisa biomédica. No entanto, é um desafio escolher o método ideal que atenda as necessidades de cada design experimental. Apesar das vantagens como agilidade, baixo custo e facilidade de aplicação, apenas o uso de ensaios colorimétricos não é suficiente para determinar o crescimento celular, pois erros potenciais podem ocorrer, principalmente em culturas 3D.⁸ A viabilidade celular em sistemas 3D deve ser avaliada em combinação de diversos protocolos como atividade metabólica, integridade da membrana celular, e técnicas fluorescentes a fim de obter resultados confiáveis.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio financeiro do CNPq (306848/2017, 421014/2018-0 e 306392/2017-8), FAPESP (2018/13492- 2, 2020/01907-3, 2018/08426-0 e 2018/07366-4) e CAPES (Código 001).

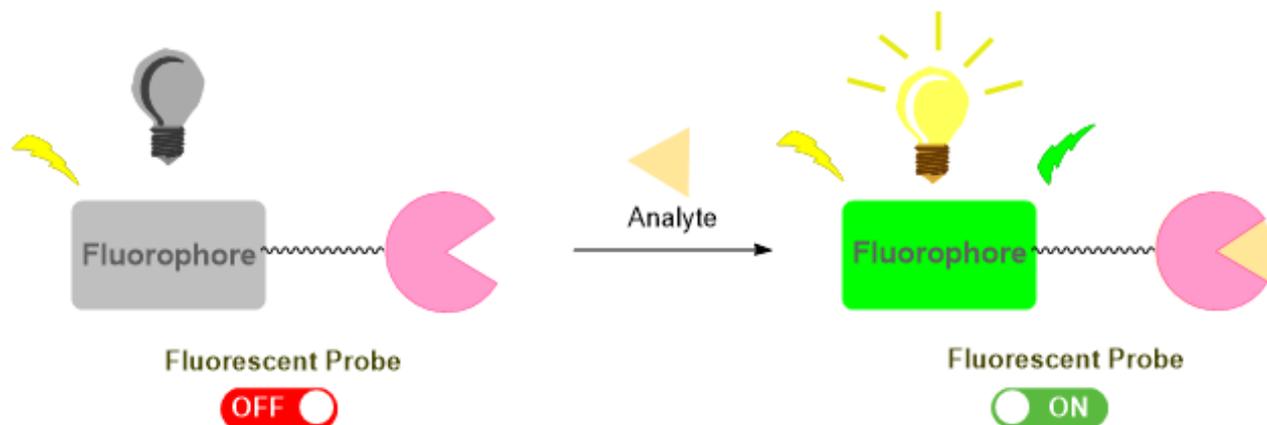
REFERÊNCIAS

1. Thangaraj, P.; In *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products*; Rainsford, K. D., Ed.; 2016; Vol. 71, p. 188.
2. Sola-Leyva, A.; Jabalera, Y.; Chico-Lozano, M. A.; Carrasco-Jiménez, M. P.; Iglesias, G. R.; Jimenez-Lopez, C.; *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 7667.
3. Gomathi, A. C.; Xavier Rajarathinam, S. R.; Mohammed Sadiq, A.; Rajeshkumar, S.; *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *55*, 101376.
4. Omaiye, E. E.; McWhirter, K. J.; Luo, W.; Pankow, J. F.; Talbot, P.; *Chem. Res. Toxicol.* **2019**, *32*, 1058.
5. Nga, N. T. H.; Ngoc, T. T. B.; Trinh, N. T. M.; Thuoc, T. L.; Thao, D. T. P.; *Anal. Biochem.* **2020**, *610*, 113937.
6. Aslantürk, Ö. S.; In *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*; Larramendy, M. L.; Soloneski, S., Eds.; 2018; Vol. 2, pp. 64–80.
7. Kamiloglu, S.; Sari, G.; Ozdal, T.; Capanoglu, E.; *Food Front.* **2020**, *1*, 332.

8. Dominijanni, A. J.; Devarasetty, M.; Forsythe, S. D.; Votanopoulos, K. I.; Soker, S.; *Tissue Eng. Part C Methods* **2021**, *27*, 401.
9. Glicksman, M.; Li, Z.; Markossian, S.; Riss, T.; Sittampalam, G. S.; O. Joseph Trask, J.; Wang, Y.; In *Assay Guidance Manual*; Caaveiro, J. M. M.; Kahl, S. D.; Kirshner, S.; Minor, L.; Lemmon, V.; Napper, A.; Peltier, J. M.; Nelsen, H.; Gal-Edd, N., Eds.; 2004; pp. 315–883.
10. Stoddart, M. J.; In *Mammalian cell viability: methods and protocols, Methods in Molecular Biology*; Stoddart, M. J., Ed.; 2011; Vol. 740, pp. 1–6.
11. Mosmann, T.; *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
12. Moradi, M.; *Helix* **2018**, *8*, 3274.
13. Bernas, T.; Dobrucki, J.; *Cytom. J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **2002**, *47*, 236.
14. Stockert, J. C.; Blázquez-Castro, A.; Cañete, M.; Horobin, R. W.; Villanueva, Á.; *Acta Histochem.* **2012**, *114*, 785.
15. Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D.; *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, *2018*, 469.
16. Jähn, K.; Stoddart, M. J.; In *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*; Stoddart, M. J., Ed.; 2011; pp. 141–148.
17. Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D.; *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, *2018*, 465.
18. Labtest Diagnóstica S. A.; LDH Liquiform. Instruções de Uso **2013**, 1–6.
19. Burgner, J. W.; Ray, W. J.; *Biochemistry* **1984**, *23*, 3636.
20. Decker, T.; Lohmann-Matthes, M. L.; *J. Immunol. Methods* **1988**, *115*, 61.
21. Roche Diagnostics; Cytotoxicity Detection Kit (LDH). *sigma-aldrich* **2016**, *11*, 1–20.
22. Riss, T.; Niles, A.; Moravec, R.; Karassina, N.; Vidugiriene, J.; In *Assay Guidance Manual*; Caaveiro, J. M. M.; Kahl, S. D.; Kirshner, S.; Minor, L.; Lemmon, V.; Napper, A.; Peltier, J. M.; Nelsen, H.; Gal-Edd, N., Eds.; 2004; pp. 343–357.
23. Papazisis, K. T.; Geromichalos, G. D.; Dimitriadis, K. A.; Kortsaris, A. H.; *J. Immunol. Methods* **1997**, *208*, 151.
24. Sagias, F. G.; Mitry, R. R.; Hughes, R. D.; Lehec, S. C.; Patel, A. G.; Rela, M.; Mieli-Vergani, G.; Heaton, N. D.; Dhawan, A.; *Cell Transplant.* **2010**, *19*, 1487.
25. Elashry, M. I.; Baulig, N.; Heimann, M.; Bernhardt, C.; Wenisch, S.; Arnhold, S.; *Res. Vet. Sci.* **2018**, *117*, 45.

26. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R.; *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107.
27. Banasiak, D.; Barnetson, A. R.; Odell, R. A.; Mameghan, H.; Russell, P. J.; *Radiat. Oncol. Investig. Clin. Basic Res.* **1999**, *7*, 77.
28. Lin, W.; Xu, Y.; Huang, C. C.; Ma, Y.; Shannon, K. B.; Chen, D. R.; Huang, Y. W.; *J. Nanoparticle Res.* **2009**, *11*, 25.
29. Ghimire, G.; Espinoza, R.; Xu, H.; Nagasaka, S.; Kameta, N.; Masuda, M.; Higgins, D. A.; Ito, T.; *Langmuir* **2019**, *35*, 7783.
30. Vichai, V.; Kirtikara, K.; *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112.
31. Hornig, S.; Biskup, C.; Gräfe, A.; Wotschadlo, J.; Liebert, T.; Mohr, G. J.; Heinze, T.; *Soft Matter* **2008**, *4*, 1169.
32. Maley, A. M.; Arbiser, J. L.; *Exp. Dermatol.* **2013**, *22*, 775.
33. Coico, R.; *Curr. Protoc. Microbiol.* **2005**, *1*, 3.
34. Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M.; *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *2016*, 343.
35. Bonnekoh, B.; Wevers, A.; Jugert, F.; Merk, H.; Mahrle, G.; *Arch. Dermatol. Res.* **1989**, *281*, 487.
36. Santhanalakshmi, J.; Balaji, S.; *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2001**, *186*, 173.
37. Abdi, M.; Balagabri, M.; Karimi, H.; Hossini, H.; Rastegar, S. O.; *Appl. Water Sci.* **2020**, *10*, 1.
38. Saotome, K.; Morita, H.; Umeda, M.; *Toxicol. Vitro.* **1989**, *3*, 317.
39. Borenfreund, E.; Puerner, J. A.; *J. Tissue Cult. Methods* **1985**, *9*, 7.
40. Baysal, K.; Aroguz, A. Z.; Adiguzel, Z.; Baysal, B. M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *59*, 342.
41. Hanna, D. H.; Saad, G. R.; *Bioorg. Chem.* **2019**, *84*, 115.
42. Ates, G.; Vanhaecke, T.; Rogiers, V.; Rodrigues, R. M.; In *Cell Viability Assays: methods and protocols. Methods in Molecular Biolog*; Gilbert, D. F.; Friedrich, O., Eds.; Humana Press, 2017; Vol. 1601, pp. 19–26.
43. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J. L.; *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125.
44. Gomez Perez, M.; Fourcade, L.; Mateescu, M. A.; Paquin, J.; *Anal. Biochem.* **2017**, *535*, 43.
45. Gomez-Gutierrez, J. G.; Bhutiani, N.; McNally, M. W.; Chuong, P.; Yin, W.; Jones, M. A.;

- Zeiderman, M. R.; Grizzle, W. E.; McNally, L. R.; *Biotech. Histochem.* **2021**, *96*, 302.
46. Riss, T.; O'Brien, M.; Moravec, R.; *Cell Notes* **2003**, *6*, 6.
47. Śliwka, L.; Wiktorska, K.; Suchocki, P.; Milczarek, M.; Mielczarek, S.; Lubelska, K.; Cierpiął, T.; Łyzwa, P.; Kiełbasiński, P.; Jaromin, A.; Flis, A.; Chilmonczyk, Z.; *PLoS One* **2016**, *11*, 1.
48. Almutary, A.; Sanderson, B. J. S.; *Int. J. Toxicol.* **2016**, *35*, 454.
49. Bruggisser, R.; Von Daeniken, K.; Jundt, G.; Schaffner, W.; Tullberg-Reinert, H.; *Planta Med.* **2002**, *68*, 445.
50. Fotakis, G.; Timbrell, J. A.; *Toxicol. Lett.* **2006**, *160*, 171.
51. Bacanlı, M.; Anlar, H. G.; Başaran, A. A.; Başaran, N.; *Turkish J. Pharm. Sci.* **2017**, *14*, 95.
52. Vajrabhaya, L. ongthong; Korsuwannawong, S.; *J. Anal. Sci. Technol.* **2018**, *9*, 1.
53. Loh, Q. L.; Choong, C.; *Tissue Eng. - Part B Rev.* **2013**, *19*, 485.
54. Khattak, S. F.; Spataro, M.; Roberts, L.; Roberts, S. C.; *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1361.
55. Debnath, T.; Ghosh, S.; Potlapuvu, U. S.; Kona, L.; Kamaraju, S. R.; Sarkar, S.; Gaddam, S.; Chelluri, L. K.; *PLoS One* **2015**, *10*, 1.
56. Moreira, C. D. F.; Carvalho, S. M.; Florentino, R. M.; França, A.; Okano, B. S.; Rezende, C. M. F.; Mansur, H. S.; Pereira, M. M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *132*, 811.
57. Aroguz, A. Z.; Baysal, K.; Adiguzel, Z.; Baysal, B. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *173*, 433.
58. Ounkaew, A.; Kasemsiri, P.; Jetsrisuparb, K.; Uyama, H.; Hsu, Y. I.; Boonmars, T.; Artchayasawat, A.; Knijnenburg, J. T. N.; Chindaprasirt, P.; *Carbohydr. Polym.* **2020**, *248*, 116767.
59. Ruoff, M.; Kieber, V.; Rebholz, S.; Linnemann, C.; Rinderknecht, H.; Häussling, V.; Häcker, M.; Damink, L. H. H. O.; Ehnert, S.; Nussler, A. K.; *Methods Protoc.* **2020**, *3*, 1.
60. Zoetemelk, M.; Rausch, M.; Colin, D. J.; Dormond, O.; Nowak-Sliwinska, P.; *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1.
61. Tyliszczak, B.; Drabczyk, A.; Kudłacik-Kramarczyk, S.; Bialik-Wąs, K.; Sobczak-Kupiec, A.; *J. Polym. Res.* **2017**, *24*, 1.
62. Fiejdasz, S.; Horak, W.; Lewandowska-Łańcucka, J.; Szuwarzyński, M.; Salwiński, J.; Nowakowska, M.; *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *524*, 102.



FLUORESCÊNCIA: PRINCÍPIOS E ALGUMAS APLICAÇÕES

Beatriz S. Cugnasca^{a*}, Alcindo A. Dos Santos^a

^aInstituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), 05508-000, São Paulo – SP, Brasil.

beatriz.cugnasca@usp.br

Resumo: A fluorescência vem sendo bastante estudada nos últimos tempos tendo grande relevância em muitas áreas com aplicações em diversos segmentos, tais como diagnósticos clínicos, detecção de analitos, biotecnologia, imageamento celular e molecular, química forense, teranóstica, entre outras. Devido à versatilidade e facilidade de modificação estrutural, elevada sensibilidade e rápido tempo de resposta, os sensores fluorescentes acabam sendo muito utilizados como biomarcadores, podendo auxiliar no diagnóstico de doenças. Nesta resenha iremos abordar os fundamentos básicos da fluorescência, bem como seu uso como sensores fluorescentes, buscando apresentar alguns exemplos de aplicações e a sua importância na detecção de analitos em sistemas biológicos.

Palavras-chave: fluorescência, sensores fluorescentes, fotoluminescência, sistemas biológicos.

FLUORESCENCE: PRINCIPLES AND SOME APPLICATIONS

Abstract: Fluorescence has been widely studied in recent times, having great relevance in several areas such as clinical diagnosis, analyte detection, biotechnology, cell and molecular imaging, forensic chemistry, theranostics, among others. Due to their versatility and easy of structural modification, high sensitivity, and fast response time, fluorescent sensors have been widely used as biomarkers and can help in the diagnosis of diseases. In this mini-review we will present the basics of fluorescence, as well as its use for fluorescent sensing, seeking to present some examples of applications and their importance in the detection of analytes in biological systems.

Keywords: fluorescence; fluorescent sensors; photoluminescence, biological systems.

Introdução

Luminescência é o fenômeno de emissão de radiação por determinadas substâncias, a partir de um estado eletrônico excitado.¹ Este pode ser atingido através de diferentes modos de excitação (estímulos), que são utilizados como critérios de classificação da luminescência. Ela pode ser dividida em: bioluminescência (estímulo por reações bioquímicas), quimiluminescência (estímulo por reações químicas), eletroluminescência (estímulo elétrico), termoluminescência (estímulo

térmico) e fotoluminescência (estímulo por absorção de luz, no qual se inserem os conceitos de fluorescência e fosforescência), entre outros tipos.^{1,2}

A fluorescência, de modo geral, é o fenômeno de emissão de luz por determinadas substâncias quando expostas à radiação eletromagnética.³ Este fenômeno está diretamente envolvido na resposta dos sensores fluorescentes. Nos últimos anos a fluorescência vem sendo amplamente explorada em diversas áreas como para detecção de analitos (espécies oxidantes, íons metálicos, aminoácidos, entre outros),⁴⁻⁶ biotecnologia, diagnósticos clínicos, imageamento celular, sequenciamento de DNA, biomarcação de proteínas, citometria de fluxo, química forense, teranóstica, análises genéticas, entre outras aplicações.⁷

Breve histórico sobre fluorescência

Em 1565, o botânico Nicolas Monardes descreveu pela primeira vez a emissão de fluorescência, relatando o surgimento de uma coloração azul intensa emanada de uma infusão aquosa de uma árvore mexicana (*Eysenhardtia polystachya*), utilizada na época para o tratamento de doenças renais,¹ ficando conhecida como *Lignum nephriticum* (madeira de rim).^{2,8-10} As propriedades observadas foram, posteriormente, estudadas por outros cientistas, estando entre eles Newton, Kircher, Grimaldi e Boyle.⁸ Em 1845, John Herschel estava realizando estudos utilizando soluções de sulfato de quinina e observou o fenômeno de emissão de luz por parte da solução, denominando na época como um processo de refrangibilidade da luz.^{1,7,11,12} Em 1852, Sir George Stokes, um matemático e físico irlandês, deu continuidade aos estudos de emissão de luz utilizando soluções de sulfato de quinino e estabeleceu uma relação entre a absorção de luz com o fenômeno de emissão observado, cunhando, pela primeira vez, a palavra “fluorescência”.^{1,2,7,12}

Uma outra contribuição bastante importante na área foi realizada pelo físico polonês Alexander Jablonski, em 1933, ao propor a criação de um diagrama, conhecido atualmente como Diagrama de Jablonski, que permite explicar, por meio de níveis energéticos, os processos envolvidos na absorção e emissão de luz.^{1,2,7,13,14}

Diagrama de Jablonski

Estruturalmente, o Diagrama de Jablonski é constituído por estado eletrônico singlete não excitado (S_0), estados eletrônicos singlete excitado (S_1 e S_2) e estado eletrônico tripleto excitado (T_1) (Figura 1). Em cada um desses estados eletrônicos existem níveis vibracionais, sendo esses subníveis classificados pelos números quânticos: 0, 1, 2,...⁷ Quando um fluoróforo é exposto à uma radiação eletromagnética, o mesmo pode absorver luz passando do estado eletrônico S_0 para um dos estados eletrônicos excitados S_1 ou S_2 . Esse processo de absorção de luz ocorre muito rapidamente, sendo da ordem de 10^{-15} segundos. Quando no estado eletrônico excitado, pode ocorrer a relaxação vibracional, um processo de transição não radiativa, sendo uma transição de um nível vibracional de maior energia para outro de menor energia dentro de um mesmo estado eletrônico excitado. Um outro processo de transição não radiativa é o da conversão interna (CI). Este ocorre quando se tem uma transferência de um estado eletrônico excitado singlete para outro estado eletrônico excitado de mesma multiplicidade de spin. Quando no menor nível vibracional do estado eletrônico excitado S_1 , pode ocorrer retorno para um dos níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental S_0 , por meio de uma transição radiativa, sendo esse processo denominado fluorescência. Este fenômeno está diretamente envolvido nas respostas dos sensores fluorescentes, que serão abordados aqui. Vale

ressaltar que os processos não radiativos (conversão interna e relaxação vibracional) ocorrem em um tempo da ordem de 10^{-12} segundos, sendo este menor que o da fluorescência (10^{-8} segundos).⁷ Dessa forma, eles tendem a acontecer anteriormente à emissão, de modo que ela se processe a partir do menor nível vibracional do estado eletrônico excitado S_1 , e não dependa do comprimento de onda de excitação na grande maioria das vezes (regra de Kasha)^{7, 15}

Em alguns casos, pode ocorrer o processo denominado de Cruzamento Intersistemas (CIS), no qual se tem transição não radiativa do estado eletrônico excitado singleto (S_1) para algum nível vibracional isoenergético do estado eletrônico excitado tripleto (T_1) envolvendo mudança de spin. A partir do estado T_1 pode ocorrer emissão sendo esse processo denominado fosforescência (10^{-3} - 10^0 segundos), apresentando, no geral, maiores valores de comprimento de onda quando comparado com a emissão de fluorescência. Apesar de ser uma transição proibida, ela pode ocorrer devido ao acoplamento spin-órbita, sendo favorecido em compostos contendo átomos pesado, como bromo ou iodo. Temperaturas baixas e solventes com maior viscosidade tendem a favorecer a ocorrência da fosforescência.⁷

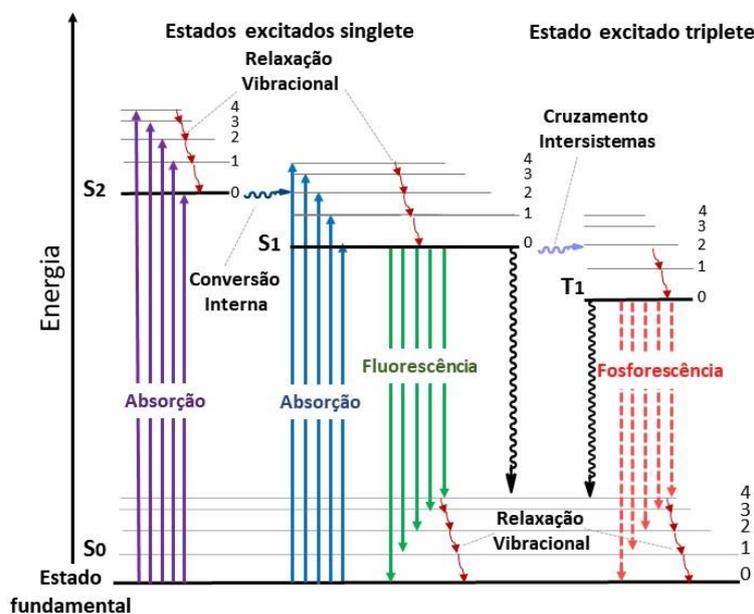


Figura 1. Representação esquemática do Diagrama de Jablonski

Nos últimos anos se observou um crescimento na procura, desenvolvimento e no uso de técnicas baseadas na fluorescência como ferramenta analítica em diversas áreas do conhecimento,^{2,7} como biotecnologia, biologia molecular, análises clínicas e toxicológicas, entre outras. Dentre as principais técnicas laboratoriais encontram-se microscopia confocal¹⁶ e microscopia de fluorescência,¹⁷ imunofluorescência,¹⁸ citometria de fluxo,¹⁹ imunoenaios por fluorescência,^{20,21} PCR em tempo real²² (uso de sensores fluorescentes no PCR tradicional), entre outras áreas.

Fundamentos básicos da fluorescência

Os estudos fotofísicos de compostos fluorescentes geralmente se iniciam por meio da obtenção de espectros de absorção, excitação e emissão de fluorescência, a partir dos quais

parâmetros espectrais como valores de comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{em}), coeficiente de absorvidade molar (ϵ) e intensidade de emissão de fluorescência são obtidos, além de ser possível avaliar a pureza dos compostos em estudo. A lei de Beer-Lambert (Equação 1)¹ pode ser utilizada para descrever o processo de absorção uma vez que correlaciona a quantidade de luz que é absorvida pela amostra com a sua concentração, caminho óptico e a absorvidade molar:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{Equação 1})$$

onde c (mol.L^{-1}) é a concentração da amostra, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e b é o comprimento do caminho óptico (cm).

Após a absorção de luz, perdas de energia podem ocorrer através de processos não radiativos, como relaxação vibracional e conversão interna. Dessa forma é esperado que o espectro de emissão de fluorescência seja observado em comprimentos de onda maiores do que o comprimento de onda de excitação. Assim, a diferença entre os comprimentos de onda λ_{abs} e λ_{em} é denominada de Deslocamento de Stokes,^{1,7} podendo ser representada pelo símbolo: $\Delta\lambda$ (Figura 2).

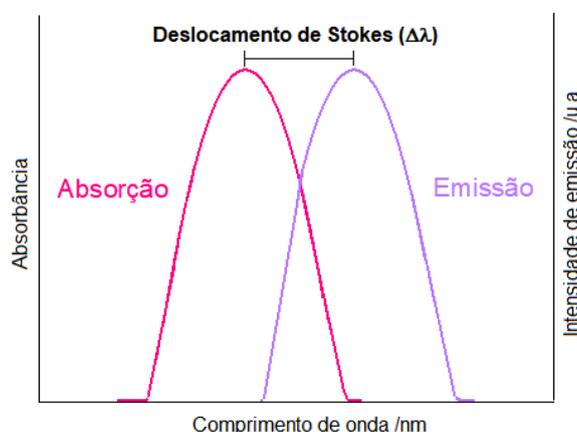


Figura 2: Desenho representativo de espectros de absorção e emissão destacando o Deslocamento de Stokes

Como já mencionado, sabe-se que existe uma competição entre o processo de transição por meios radiativos e não radiativos. Nesse contexto, o conceito de Rendimento Quântico de Fluorescência (Φ) é utilizado, sendo definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons totais absorvidos. Um outro conceito bastante utilizado é o de tempo de vida de fluorescência (τ), sendo correspondente ao tempo de vida em que o composto fluorescente permanece no estado excitado antes de retornar para o estado fundamental.^{1,2,7}

Sensores fluorescentes

A emissão de fluorescência pode ser modulada por meio de alterações químicas na estrutura de determinado composto fluorescente ou por meio de variações de parâmetros do meio em que ocorre o fenômeno, como por exemplo temperatura, pH, viscosidade e polaridade do solvente.²³⁻²⁵ Entre os diversos métodos de detecção de analitos, os sensores fluorescentes vêm sendo bastante

utilizados como biomarcadores devido à facilidade de modificação estrutural, elevada sensibilidade e rápido tempo de resposta.²⁶ Eles podem auxiliar na descoberta de novos medicamentos, na obtenção de imagem celular, no diagnóstico de doenças, além de permitir o monitoramento em tempo real de diversos analitos.²⁷ Dessa forma o interesse no desenvolvimento de novos sensores fluorescentes tem se intensificado nos últimos anos.

Estruturalmente, os sensores fluorescentes são compostos constituídos por uma unidade receptora, responsável pela interação com o analito e uma porção fluorofórica, responsável pela emissão da fluorescência. Quando na presença de um analito, este pode interagir com a porção receptora do sensor de modo que uma resposta devido à essa interação seja obtida na forma de fluorescência. Essas respostas, por sua vez, podem ser quantificadas por meio da obtenção de espectros de emissão e rendimento quântico de fluorescência.²⁸ Após estudos fotofísicos, testes *in vitro* e *in vivo* podem ser realizados, buscando-se aplicações em sistemas biológicos.

Aplicações em sistemas biológicos

Os sensores fluorescentes vêm sendo amplamente utilizados atualmente na detecção de diversos analitos, como íons metálicos, espécies reativas de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs),⁴ alguns aminoácidos, além de poderem auxiliar no diagnóstico de doenças ou até mesmo para finalidades terapêuticas.^{29,30}

A detecção de cátions metálicos em sistemas biológicos é de bastante relevância uma vez que os mesmos, quando em excesso ou falta no organismo podem estar associados à processos patológicos, já que esses íons participam de diversos processos bioquímicos de regulação e sinalização. Além disso, o monitoramento desses cátions nas células, órgãos e tecidos auxiliam no diagnóstico e no estudo de doenças.³¹ Um exemplo de grande importância é a detecção de íons Cu^{2+} em células. O cobre é um elemento que está relacionado a certos processos fisiológicos, atuando como cofator de enzimas essenciais do metabolismo. Um desequilíbrio na concentração de cobre nas células pode ocasionar doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, além de poder levar a distúrbios gastrointestinais e danos no fígado e rim.³²⁻³⁵ Sendo assim, o desenvolvimento de sensores fluorescentes para a detecção de Cu^{2+} é bastante importante. Em 2018, um sensor fluorescente ratiométrico constituído de uma Rodamina 6G e de 2-formilanilina, conectadas por uma hidrazina, foi sintetizado (Figura 3).³⁵ Ele apresentou elevada seletividade para íons Cu^{2+} frente a outros 15 cátions, sendo os estudos conduzidos por meio da obtenção de espectros de absorção e emissão de fluorescência. Quando na ausência de íons Cu^{2+} , o composto apresenta emissão em 450 nm, sendo correspondente à porção constituída pela formilanilina. No entanto, conforme se adiciona íons Cu^{2+} na solução, a intensidade de emissão de fluorescência em 450 nm sofre um decréscimo enquanto que um novo pico de emissão surge no comprimento de onda de 546 nm, devido à abertura do anel espirocíclico da rodamina 6G quando na presença do cátion, com um rendimento quântico de 0,33. O sensor apresentou limite de detecção de $4,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ e estudos em células foram realizados, mostrando que o mesmo pode ser utilizado de forma eficiente como um biomarcador para íons cobre (II). Os autores mostraram que o processo é reversível, pela adição de EDTA à solução, que complexa, seletivamente os íons Cu^{2+} , regenerando a estrutura molecular original (**1**), emissiva, em apenas um comprimento de onda (450 nm).

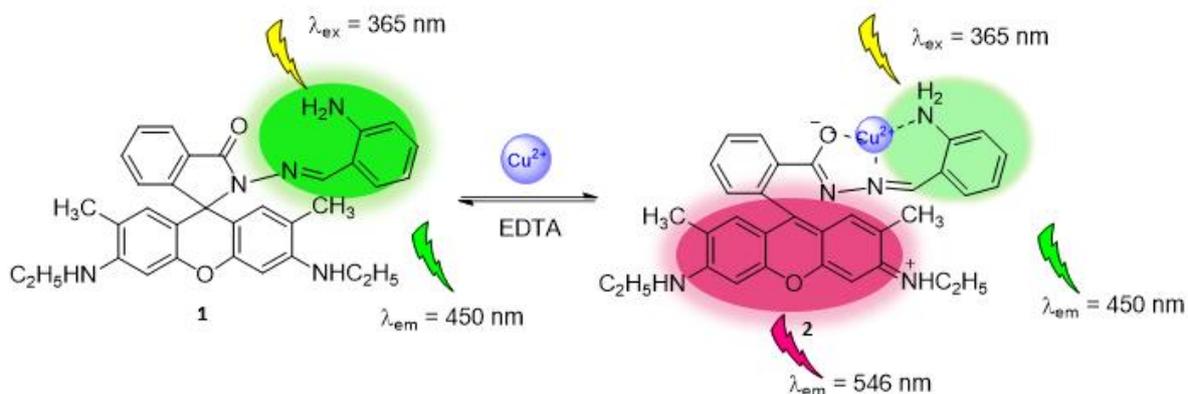


Figura 3: Sensor fluorescente à base de Rodamina utilizado para detecção ratiométrica de íons Cu^{2+} (Adaptada de Sikdar, A., et. al., 2018)³⁵

Além de íons metálicos, muitos sensores fluorescentes vêm sendo desenvolvidos com o intuito de detectar de espécies reativas de oxigênio (EROs). A mitocôndria tem um importante papel na produção dessas espécies. Elas estão associadas às funções fisiológicas de sinalização celular, síntese de biomoléculas e ao sistema de defesa do organismo. No entanto, quando em condições de estresse oxidativo, elevadas concentrações de EROs no organismo podem levar a danos celulares, podendo estar associado às doenças ou desordens como diabetes, câncer, neurodegeneração, entre outras.^{36,37} Dessa forma, a detecção dessas espécies em sistemas biológicos é bastante importante.

Em 2019, um teluro-BODIPY (**3**), que foi empregado como sensor fluorescente de EROs foi sintetizado (Figura 4). O composto apresentou capacidade de detecção rápida e seletiva para hipoclorito.³⁸ Estudos de emissão de fluorescência foram conduzidos e observou-se que o BODIPY, quando na presença do analito apresentava fluorescência verde intensa, que pode ser explicada pela oxidação do telúrio ao correspondente teluróxido. Foi obtida uma correlação linear entre a intensidade de emissão de fluorescência e a concentração de hipoclorito ($0 - 8 \mu\text{mol.L}^{-1}$) apresentando um limite de detecção de $0,12 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Além disso, estudos em células foram realizados com auxílio da microscopia confocal de fluorescência, permitindo a aplicação do sensor, na detecção deste EROs, em sistemas biológicos.

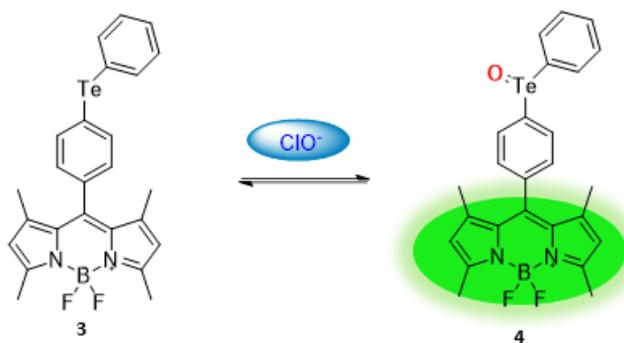


Figura 4: Sensor fluorescente a base de teluro-BODIPY utilizado para detecção de hipoclorito (Adaptada de Shi, W., et. al., 2019)³⁸

Uma outra abordagem é a do uso de sensores fluorescentes na detecção e quantificação de tióis endógenos, como a glutatona. Um grupo de pesquisadores chineses desenvolveu um sensor à base de cumarina capaz de detectar glutatona (GSH) especificamente, por fluorescência (Figura 5).³⁹ Devido à presença de um átomo pesado como o Br, o sensor **5** não apresenta fluorescência. No entanto, quando na presença de tióis como a glutatona, o bromo acaba sendo substituído, dando lugar ao composto **6**, fluorescente. No caso de biotióis, como cisteína ou homocisteína, a extremidade livre contendo um grupo NH₂ é capaz de reagir com a carbonila, resultando nos compostos **7** ou **8**, que apresentam fluorescência apenas moderada. Dessa forma, o sensor **5** apresentou uma boa seletividade para glutatona frente a outros possíveis interferentes biológicos, estando entre eles outros compostos contendo também grupos SH, como cisteína e a homocisteína. Estudos com células também foram realizados permitindo a detecção de glutatona em sistemas biológicos.

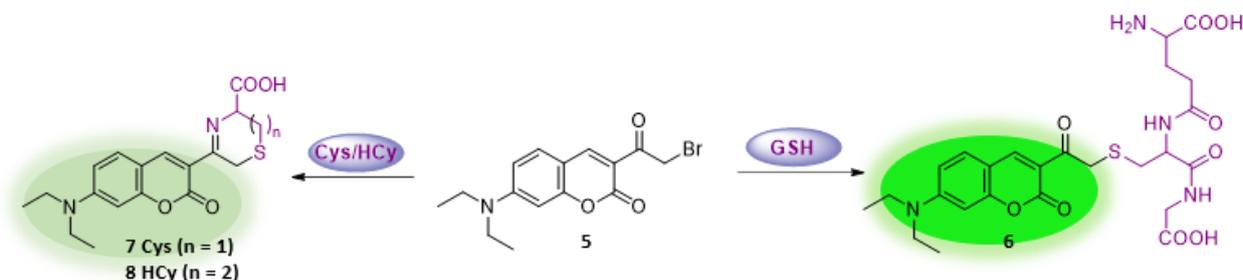


Figura 5: Sensor fluorescente a base de cumarina utilizado para detecção de glutatona. (Adaptada de He, L., et. al., 2015)³⁹

Considerações finais

A fluorescência é um fenômeno de emissão de luz que vem sendo amplamente explorado nos últimos anos estando presente em diversas técnicas laboratoriais como PCR em tempo real, microscopia confocal e microscopia de fluorescência, imunoenaios, citometria de fluxo, entre outros. É uma ferramenta analítica poderosa e de utilização ampla para diversas aplicações. Por se tratar de um fenômeno que pode ser modulado, em função da estrutura de compostos que apresentam tais fatores, a síntese de novos sensores fluorescentes é um ramo da química de intensa investigação e grande interesse, abrindo horizontes na construção de dispositivos seletivos para a detecção de analitos variados e compreensão de fenômenos biológicos complexos.

Como pretendíamos demonstrar, os sensores fluorescentes encontram utilização em vários setores, permitindo, desde a simples detecção de um analito ambiental, como um cátion metálico, à eventos biológicos altamente complexos e difíceis de serem mensurados por outras técnicas. Pela fluorescência tem sido possível realizar, em tempo real, o imageamento de eventos biológicos *in vivo*, de elevada complexidade, abrindo aos olhos de cientistas, fenômenos antes apenas conjecturados e outros até então desconhecidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (2019/07634-1 e 2018/24434-3) e ao CNPq (141855/2019-3) pelo suporte financeiro. Agradecem também ao Instituto de Química da USP pela infraestrutura e suporte para o desenvolvimento das pesquisas realizadas no LabSSeTe.

Referências

1. Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, New Jersey: **2012**.
2. Rezende, L. C. D.; *Síntese, caracterização e aplicações de fluoróforos derivados do BODIPY*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, **2016**.
3. McNaught, A. D.; Wilkinson, A. *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, (the “Gold Book”)*, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford: **1997**. Online version: **2019**, created by Chalk, S. J. ISBN:0-9678550-9-8.
4. Wu, L.; Sedgwick, A. C.; Sun, X.; Bull, S. D.; He, X.; James, T. D. *Acc. Chem. Res.* **2019**, 52(9), 2582-2597.
5. Chowdhury, S.; Rooj, B.; Dutta, A.; Mandal, U. *Journal of Fluorescence*, **2018**, 28, 999-1021.
6. Zhou, Y.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 52-67.
7. Lakowicz, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. Springer: New York. **2006**.
8. Acuna, A. U.; Amat-guerri, F.; *Early history of solution fluorescence: The Lignum nephriticum of Nicolás Monardes*. In: *Fluorescence of Supermolecules, Polymers, and Nanosystems*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2008**. p. 3-20.
9. Partington, J.R. *Annals of Science* **1955**, 11, 1–26
10. Burns, D. T.; Dalgarno, B. G.; Gargan, P. E.; Grimshaw, J. *Phytochemistry*, **1984**, 23(1), 167.
11. Herschel, J. F. W. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1845**, 135, 143-145.
12. Stokes, G. G. *Philos Trns R. Soc. London*, **1852**, 142, 463-562.
13. Jablonski, A. *Nature*, **1933**, 131, n. 839, p. 21.
14. Jablonski, A. *Z. Phys.*, **1935**, 94, 38-46.
15. Kasha, M. *Discussions of the Faraday Society*, **1950**, 9, 14-19.
16. Singh, A.; Gopinathan, K. P. *Current Science*, **1998**, 74 (10), 841-851.
17. Masters, B. R. *The Development of Fluorescence Microscopy*. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Chichester, **2010**.
18. Coons, A. H.; Kaplan, M. H. *The Journal of Experimental Medicine*, **1950**, 91(1), 1-13
19. Herzenberg, L. A. et. al. *Clinical Chemistry*, **2002**, 48(10), 1819-1827.
20. Soini, E.; Hemmila, I. *Clinical Chemistry*, **1979**, 25(3), 353-361.
21. Hemmila, I. *Clinical Chemistry*, **1985**, 31(3), 359-370.
22. Heid, C. A. et. al. *Genome Research*, **1996**, 6(10), 986-994.
23. Kim, J. S.; Quang, D. T.; *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3780-3799
24. Li, X.; Gao, X.; Shi, W.; Ma, H.; *Chem. Rev.* **2014**, 114, 590-659.
25. Han, J.; Burgess, K. *Chem Rev.* **2010**, 110, 2709-2728.
26. Han, H.; Jr, H. T.; Zang, Yi; Sedgwick, A. C.; Li, Jia; Sessler, J. L.; He, X.; James, T. D. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50, 9391-9429.

27. Gao, L.; Wang, W.; Wang, X.; Yang, F.; Xie, L.; Shen, J.; Brimble, M. A.; Xiao, Q.; Yao, S. Q. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50 (2), 1219-1250.
28. Escudero, D. *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49, 1816.
29. Xing, J.; Gong, Q.; Akakuru, O. U.; Liu, C.; Zou, R.; Wu, A. *Nanoscale*, **2020**, 12, 24311-24330.
30. Yan, C.; Zhang, Y.; Guo, Z. *Coordination Chemistry Reviews* **2021**, 427, 213556.
31. Zheng, X.; Cheng, W.; Ji, C.; Zhang, J.; Yin, M. *Reviews in Analytical Chemistry* **2020**, 39 (1), 231
32. Kuo, Y.; Zhou, M.; Cosco, B.; Gitschier, D. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 6836–6841.
33. Strausak, D.; Mercer, J. F.; Dieter, H. H.; Stremmel, W.; Multhaup, G.; *Brain Res. Bull.* **2001**, 55, 175–185;
34. Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 1995–2044.
35. Sikdar, A.; Roy, S.; Mahto, R. B.; Mukhopadhyay, S. S.; Haldar, K.; Panja, S. S. *Chemistry Select* **2018**, 3(46), 13103-13109.
36. Ray, P. D.; Huang, B.; Tsuji, Y. *Cell. Signal.* **2012**, 24 (5), 981.
37. Lou, Z.; Li, P.; Han, K. *Acta Physico-Chimica Sinica* **2017**, 33(8), 1573.
38. Shi, W.; Huang, Y.; Liu, W.; Xu, D.; Chen, S.; Liu, F.; Hu, J.; Zheng, L.; Chen, K. *Dyes and Pigments* **2019**, 170, 107566.
39. He, L.; Xu, Q.; Liu, Y.; Wei, H.; Tang, Y.; Lin, W.; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7 (23), 12809.

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS PARA APLICAÇÃO FOLIAR DE MICRONUTRIENTES EM PLANTAS

Keila C. Marques da Silva^{1*}, Ana M. da Costa Ferreira^{1*}

1 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP
keila.silva@icl-group.com.br

Resumo: Plantas necessitam de diferentes nutrientes para seu crescimento adequado, incluindo compostos de nitrogênio, fósforo e vários íons metálicos. Diferentes aminoácidos podem ser diretamente absorvidos e constituem a principal forma de transporte de compostos baseados em nitrogênio em plantas. Visando desenvolver produtos adequados para a captação de metais essenciais para um eficiente crescimento de plantas, foram preparados *in situ* compostos de cobre(II), manganês(II), zinco(II), cobalto(II) e níquel(II) com os complexantes ácido aspártico ou ácido glutâmico, que em seguida foram secos em *spray dryer* para obtenção dos respectivos complexos na forma sólida. Esses materiais foram então caracterizados através de solubilidade, pH, densidade, pH de decomposição, compatibilidade com agrotóxicos e compostos afins e corrosão, além de análises CNH e espectroscopia FTIR, obtendo-se resultados bastante satisfatórios para sua adequada aplicação foliar em cultura de soja.

Palavras-chave: metais de transição, ácido aspártico, ácido glutâmico, estabilidade térmica, aplicação foliar.

Development of products for foliar application of nutrients in plants

Abstract:

Different nutrients are crucial for the appropriate growth of plants, comprising nitrogen, phosphorus, and diverse metal ions. Aminoacids can be directly absorbed and represent the main mode of nitrogen transport in plants. In this work, complexes of the metal ions copper(II), manganese(II), zinc(II), cobalt(II) and nickel(II) were prepared *in situ* by coordination of aspartic acid or glutamic acid to each metal ion. The final coordination compounds were then dried in a spray dryer to obtain the corresponding compounds in solid form. Their characterizations through solubility, pH, density, decomposition pH, compatibility with pesticides and similar compounds, and corrosion were carried out. Additional CNH analyses and FTIR spectroscopy, provided satisfactory results for each of the determinations. The developed compounds have high stability under thermal stress when subjected to accelerated aging. Results indicated that they are suitable for foliar applications in soybean culture.

Keywords: transition metal complexes, aspartic acid, glutamic acid, thermal stability, foliar application.

Introdução

A deficiência em nutrientes pode ser um fator importante na queda de produtividade de uma cultura. Assim, fornecer um suprimento adequado de todos os nutrientes cruciais para a planta no seu período de crescimento constitui a meta principal deste trabalho. A chamada micronutrição foliar consiste em aspergir micronutrientes diretamente nas folhas da planta.¹ Constitui um método eficiente para fornecer os nutrientes necessários que apresentam problemas na sua fixação no solo.

Íons metálicos como ferro, zinco, manganês e cobre são micronutrientes essenciais para o bom crescimento de plantas, sendo inseridos no sítio ativo de proteínas envolvidas em seu metabolismo e desenvolvimento, onde desempenham papel estrutural e/ou catalítico. Por outro lado, nitrogênio é um macroelemento imprescindível para a planta, garantindo seu crescimento e desenvolvimento. Sua absorção principal ocorre pela captação de ânions nitrato ou cátions amônio pelas raízes, enquanto compostos orgânicos de N como aminoácidos são assimilados tanto nas raízes como nas folhas.² Aminoácidos são transportados e alocados adequadamente nas plantas através de proteínas transportadoras.³ Mais recentemente, fertilizantes têm sido propostos baseados em aminoquelatos, capazes de coordenar íons metálicos, formando compostos muito estáveis termodinamicamente e de serem transportados a sítios onde são necessários.⁴ Muitos dos estudos focalizam separadamente o transporte do N inorgânico do orgânico, mas há evidências de que a combinação deles pode trazer

progressos significativos à produtividade da colheita.⁵ A necessidade de se fornecer íons de metais de transição, como cobre, manganês ou zinco, às plantas decorre de sua nutrição e do papel fundamental que cada um dos macros e micronutrientes tem no metabolismo foliar, seja como substrato (composto orgânico) ou em sistemas enzimáticos.^{3,6}

O objetivo desse trabalho é desenvolver complexos de aminoácidos com os metais cobre, manganês, zinco, cobalto e níquel para aplicação foliar e elucidar os prováveis mecanismos de absorção pela planta.

Experimental

Síntese dos compostos de coordenação

Os correspondentes complexos com os aminoácidos *L*- ácido aspártico e *L*-ácido glutâmico dos íons metálicos já citados foram obtidos em solução aquosa, a partir de misturas estequiométricas (M:L 1:2) com controle de temperatura e pH, conforme descrito anteriormente.⁷ As espécies obtidas são neutras [ML₂].

Avaliação de compatibilidade físico-química com agrotóxicos, corrosão, pH de decomposição, determinação de pH, densidade e solubilidade

A avaliação de compatibilidade físico-química com agrotóxicos foi realizada conforme ABNT NBR 13875.⁸ Já determinações de corrosão, pH de decomposição, pH, densidade e solubilidade foram realizadas conforme manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos e metodologia desenvolvida e de domínio da empresa, nos laboratórios da ICL Ind. SA.^{9,10}

Determinação de CHN, MIP-OES e FTIR

As análises elementares de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) foram obtidas utilizando Analisador Elementar de CHN da Central Analítica do Instituto de Química da USP. Os teores de metais nos compostos secos foram determinados via MIP-OES conforme metodologia utilizada nos laboratórios ICL Ind. AS. Já espectros vibracionais na região do Infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR Spectrum Two–Perkin Elmer, utilizando janela espectral de 400–4000 cm⁻¹.

Aplicação foliar

A aplicação foliar foi realizada conforme metodologia desenvolvida na fazenda experimental da ICL, com Cu, Mn, Zn e Mg (sendo Cu e Mg via solo e Mn e Zn via hidroponia) pois não são obtidas respostas para aplicações foliares de Co e Ni, pois as quantidades de Co e Ni presentes no solo já são suficientes parcial ou totalmente para suprir as quantidades exigidas pela cultura.^{11, 12} Após aplicação foi determinado o índice de SPAD (Soil Plant Analysis Development – Análise de desenvolvimento de planta de solo)¹³ ao longo dos dias e análise de teor de metal contido antes e após aplicação foliar.

Resultados e Discussão

Durante o processo de síntese dos complexos, observou-se ao final das reações aspecto límpido e isento de insolúveis nas soluções, demonstrando que todo o metal na forma de carbonato/óxido, que possui baixa solubilidade, foi convertido ao complexo esperado, na forma neutra [ML₂].

A avaliação de compatibilidade físico-química com agrotóxicos foi realizada conforme descrito na parte experimental. Os resultados satisfatórios para todos os complexos podem ser vistos na Tabela 1, bem como a solubilidade determinada após secagem dos compostos via spray dryer.

Compostos	Compatibilidade	Corrosão	pH de quebra meio ácido	pH de quebra meio básico	pH	Densidade	Solubilidade
[Cu(Asp) ₂]	Compatível	Não há	0,2	11,3	7,5	0,850 g/cm ³	1200 g/L
[Mn(Asp) ₂]	Compatível	Não há	0,2	12,0	8,0	0,750 g/cm ³	800 g/L
[Zn(Asp) ₂]	Compatível	Não há	0,2	11,8	7,5	0,940 g/cm ³	600 g/L
[Ni(Asp) ₂]	Compatível	Não há	0,2	12,0	7,5	0,850 g/cm ³	900 g/L
[Co(Asp) ₂]	Compatível	Não há	0,2	11,4	8,0	0,850 g/cm ³	1000 g/L
[Cu(Glu) ₂]	Compatível	Não há	0,2	11,9	7,5	0,950 g/cm ³	1150 g/L
[Mn(Glu) ₂]	Compatível	Não há	0,3	12,2	8,0	0,740 g/cm ³	820 g/L
[Zn(Glu) ₂]	Compatível	Não há	0,2	11,86	7,5	0,950 g/cm ³	680 g/L
[Ni(Glu) ₂]	Compatível	Não há	0,1	11,60	7,5	0,850 g/cm ³	1000 g/L
[Co(Glu) ₂]	Compatível	Não há	0,2	11,1	8,0	0,810 g/cm ³	1100 g/L

Tabela 1 – Resultados de compatibilidade físico-química, corrosão, pH de decomposição e solubilidade obtidos. Metais na forma divalente; ASP = ânion aspartato⁻; GLU = ânion glutamato⁻.

Ao caracterizar CHN nos compostos, obteve-se variação abaixo de $\pm 5\%$ do esperado, que, combinada com determinações dos teores dos metais via MIP-OES e espectros de FTIR onde fica evidenciado que a ausência das bandas que são atribuídas aos grupos NH_3^+ e COO^- no espectro do complexo é indicativo da coordenação dos grupos amina e carboxílico ao metal. Outro indicativo da complexação do metal com esses grupos é o surgimento de bandas atribuídas aos grupos NH_2 e carboxila ($\text{C}=\text{O}$), pois estes inexistem no aminoácido livre devido sua forma zwitteriônica. A presença de banda referente às vibrações da $\text{C}=\text{O}$ é devido à reconstrução da dupla. Assim sugere-se que os aminoácidos Asp e Glu estejam coordenados bidentalmente aos íons metálicos pelo átomo de nitrogênio do grupo amina e o átomo de oxigênio do grupo carboxílico, ou seja, na forma de composto quelato neutro, $[\text{ML}_2]$.¹⁴

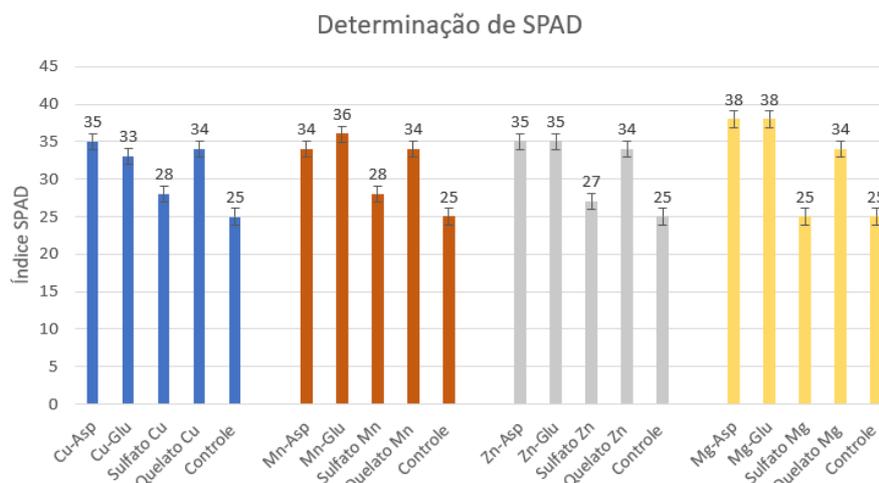


Gráfico 1 – Determinação de SPAD em plantas nutridas com os sais e complexos de Cu, Mn, Zn e Mg, $[\text{ML}_2]$, comparados a sais sulfato. Etilenodiaminatetraacetato (edta) foi usado como quelante padrão. Controle = sem aplicação.

A determinação de SPAD foi realizada ao longo de dez dias, com monitoramento periódico. Os resultados, apresentados no Gráfico 1 e Figura 1, mostram que as plantas nutridas com os compostos desenvolvidos a base de ácido aspártico e ácido glutâmico com os metais apresentam maior desenvolvimento do que o controle e outras fontes convencionais (como os sais de sulfato).

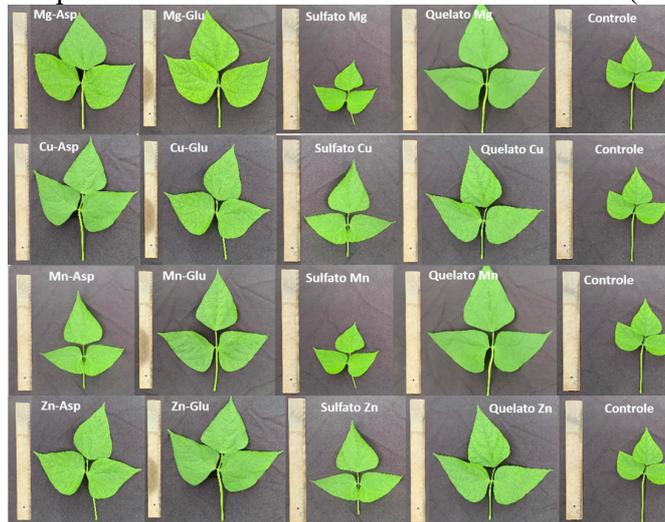


Figura 1 – Determinação de SPAD ao longo do tempo – desenvolvimento no tamanho das folhas com aplicação dos complexos de cada metal com aminoácidos, $[ML_2]$, em comparação com respectivos sais sulfato ou usando edta como quelante padrão. Controle = sem aplicação.

Após 10 dias das aplicações foliares, foi realizada a segmentação e caracterização das folhas para obter os resultados de teor dos metais nas folhas velhas (folhas que receberam aplicação) e folhas novas (folhas que cresceram após e não receberam aplicação). Em todas as aplicações, os resultados encontrados foram superiores ao controle e fonte convencional sulfatada, dados apresentados no Gráfico 2. Com os teores dos metais nas folhas novas superiores ao controle (não recebeu nenhum tipo de nutrição dos metais) pode-se inferir que os compostos translocaram, como era de previsto considerando o mecanismo de absorção de N em plantas.

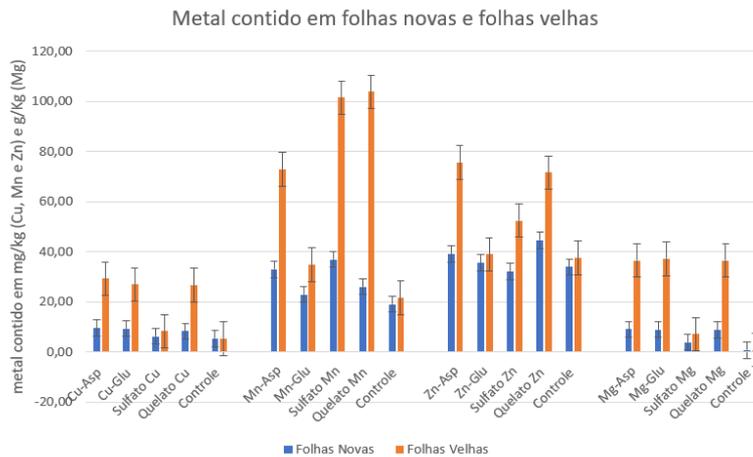


Gráfico 2 – Determinação de teor contido em folhas novas e folhas velhas, após 10 dias de aplicação foliar, utilizando sais sulfato, complexos $[ML_2]$ com os aminoácidos ou quelante padrão edta.

Conclusões

Os compostos de coordenação utilizados, na forma de aspartato ou glutamato, apresentaram boa estabilidade química, compatibilidade com defensivos agrícolas e boa resposta às caracterizações diversas. Sua aplicação foliar mostrou resultados promissores, num monitoramento pelo período de 10 dias, quanto à produtividade e reconhecimento dos ligantes pela planta, provavelmente por se tratar de compostos endógenos, isto é, ligantes orgânicos que estão presentes nas suas vias metabólicas. Todos os íons mostraram-se suficientes para suprir a necessidade nutricional e a translocação observada nos testes de folhas velhas para folhas novas demonstra que a aplicação foi bastante eficiente.

Agradecimentos

Agradecemos à empresa ICL América do Sul e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2013/07937-8, CEPID Redoxoma) pelo apoio ao Laboratório de Bioinorgânica, Catálise e Farmacologia (IQ/USP).

Referências:

1. Z. Zahed et al., *Foliar Micro-nutrition of Vegetable Crops, a Critical Review*, Curr. J. App. Sci. Technol. **2021**, 40, 1-12
2. T. Näsholm, K. Kielland, U. Ganeteg, *Uptake of organic nitrogen by plants*. New Phytol. **2009**, 182, 31–48.
3. Yang, G. et al., *Amino Acid Transporters in Plant Cells: A Brief Review*, Plants, **2020**, 9, 967; doi:10.3390/plants9080967
4. M.K. Souri, *Aminochelate fertilizers: the new approach to the old problem, a review*. Open Agriculture, **2016**, 1, 118-123.
5. M. Tegeder, C. Masclaux-Daubresse *Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use*, New Phytologist **2018**, 217, 35–53. doi: 10.1111/nph.14876,
6. Lucena, J. J. *El empleo de complejantes y quelatos en la fertilización de micronutrientes*. Revista Ceres **2009**, 20, 527
7. K.C.M. Silva, A. M. C. Ferreira, *Desenvolvimento de compostos de coordenação para aplicação foliar*, 2º Anais do Programa de Mestrado Profissional do IQ da USP, Ed. Blucher, **2020**, p. 88-92.
8. ABNT NBR 13875, Agrotóxicos e afins – Avaliação de compatibilidade físico-química. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **2014**.
9. Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes corretivos - *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*, Brasil **2014**
10. V. F. D. E. A. Souza, *Embrapa Informação Tecnológica*. Brasília, DF, **2011**.
11. G.J. Sfredo, *Indicação da aplicação de doses de micronutrientes no solo, para a cultura de soja*. Tecnologias de produção de soja região central do Brasil - Londrina, 226p.
12. F.H.Oliveira, R.F. Novais, V.H. Alvarez, R.B. Cantarutti, *Desenvolvimento de um sistema para recomendação de adubação para a cultura da bananeira*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, **2005**, 29 (1), 131-142.
13. P.T. Gil et al.; *Horticultura Brasileira* **2002**, 20, 611-615.

14. J. M. Murphy, B. A. Powell, J. L. Brumaghim, *Stability constants of bio-relevant, redox-active metals with amino acids: The challenges of weakly binding ligands*. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, 412, 213253.

DESENVOLVIMENTO DE APTÂMEROS COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO PARA CÂNCER DE PULMÃO

Juliana Baranova¹, Yuli S. Torres¹, Isis C. Nascimento¹, Vanessa de Sá^{1,2*}, Henning Ulrich^{1*}

1- Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo-SP, Brasil

2- Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do AC Camargo Câncer Center.

e-mail: henning@iq.usp.br; vankaren@gmail.com

Resumo: O câncer de pulmão continua sendo um dos tumores mais agressivos, com um prognóstico geralmente ruim, apesar dos avanços nas terapias personalizadas. A heterogeneidade dos tumores de pulmão sugere que estes podem ser originados a partir de células multipotentes. Diversos estudos já demonstraram que as células-tronco cancerosas estão envolvidas na iniciação e metástases do tumor. A falta de marcadores específicos para fenotipagem de células-tronco tumorais, dificultam a detecção destas células em amostras clínicas. A fim de obter-se uma ferramenta de diagnóstico mais acurado, estamos trabalhando no desenvolvimento de aptâmeros de DNA com ligação específica a células tumorais de pulmão.

Palavras-chaves: Câncer de pulmão, células-tronco cancerosas, aptâmeros.

Development of aptamers as a diagnostic instrument for lung cancer

Abstract: Lung cancer is one of the most aggressive tumors, with a generally poor prognosis. The cellular heterogeneity of tumor, resilience of cancer stem cells, and the lack of specific markers to detect and differentiate between various tumoral cell phenotypes in clinical materials hinders timely diagnosis. Novel diagnostic tools need to be developed that will specifically detect tumor cells and accelerate clinical characterization of the tumor. DNA aptamers have been developed and are being characterized for the selective interaction with lung cancer cells and detection of tumor cells in patients' samples.

Keywords: Aptamers, cytometry, lung cancer cells, cancer diagnostics.

Introdução:

O câncer de pulmão (CP) é a causa mais comum de morte por câncer no mundo, uma vez que a detecção da doença ocorre principalmente em estágios avançados e está comumente associado ao tabagismo. Considerada uma patologia genética, o CP encontra-se fortemente relacionado a alterações moleculares que influem em sua patogênese, como as mutações de genes responsáveis pelo crescimento, pela proliferação e pela sobrevivência celular^{4,2}. A heterogeneidade dos tumores de pulmão sugere que estes podem ser originados a partir de células multipotentes. Diversos estudos sugerem que as células-tronco cancerosas (CSC, do inglês cancer stem cells) podem ser a causa do crescimento de tumores e da resistência às terapias convencionais¹. A falta de marcadores específicos para CSC dificulta a utilização da detecção destas células na determinação do prognóstico da doença na prática clínica. O grande desafio no campo da biologia do câncer é a descoberta de biomarcadores para tipos específicos de câncer e o desenvolvimento de sondas capazes de identificar estes alvos. Desta forma, o objetivo deste projeto foi o desenvolvimento de aptâmeros de DNA capazes de identificar a assinatura molecular de células tumorais de pulmão. Aptâmeros são oligonucleotídeos selecionados capazes de reconhecer com grande especificidade epítomos proteicos, de maneira semelhante aos já conhecidos anticorpos monoclonais. Os aptâmeros possuem um potencial promissor em aplicações diagnósticas e terapêuticas, devido ao seu caráter não proteico, como resistência à degradação por ação enzimática, alta flexibilidade e especificidade,

baixo peso molecular, baixa imunogenicidade e facilidade de produção/manipulação, competindo com anticorpos monoclonais^{3,5}. O método de seleção de aptâmeros, SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), utiliza-se de bibliotecas combinatórias de sequências aleatórias de oligonucleotídeos (RNA ou DNA) capazes de enriquecer, por ciclos reiterativos de SELEX, ligantes com alta afinidade e especificidade para inúmeros alvos de seleção *in vitro*, incluindo antígenos expressos na superfície de células e membranas de células inteiras.

Parte experimental:

Processo de seleção *in vitro* de Aptâmeros:

Para a seleção dos aptâmeros e ensaios de seletividade de ligação, uma linhagem de câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC), histotipo adenocarcinoma (A549), foi utilizada. A seleção dos aptâmeros (SELEX) foi realizada em cinco ciclos. Observou-se um aumento de taxas de ligação no primeiro ciclo, quando 10 μ M de aptâmeros de fita simples foram incubados com 10^6 células. Nos ciclos subsequentes, foram utilizados 1 μ M de aptâmeros, os quais foram incubados em tampão de seleção com as células por 10 minutos. Em cada ciclo, foram utilizadas concentrações menores de células (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2). Após o período de incubação realizou-se as lavagens com tampão de seleção. Para aumentar a seletividade dos aptâmeros, foi adicionado t-RNA de levedura para o bloqueio de sítios de ligação não específica. Após 5 ciclos de SELEX, a biblioteca de aptâmeros foi sequenciada por sequenciamento de nova geração (NGS-Illumina). As sequências obtidas foram submetidas à análise de bioinformática. Com base de conservação de sequências na região anteriormente aleatória e de predição de estruturas, foram selecionados 8 aptâmeros.

Análise da taxa de ligação dos aptâmeros às células tumorais de linhagem de carcinoma pulmonar

A avaliação por citometria de fluxo foi realizada em células tumorais de câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC), dos histotipos adenocarcinoma: A549 (CCL185) e carcinoma de células escamosas: H1299 (CRL5803), para determinar as ligações dos aptâmeros selecionados. A concentração utilizada de cada aptâmero foi de 25 nM diluídos em 400 μ l tampão de ligação (pH 7,4). As células nativas (2×10^5 células) foram incubadas por 45 minutos com os aptâmeros selecionados à temperatura ambiente. Após incubação, as células foram centrifugadas a 200 X g por 5 minutos e lavadas 2 vezes em tampão de ligação. As células incubadas sem aptâmeros foram utilizadas como controle negativo (CN). A leitura foi realizada a 517 nm (pico de emissão de fluorescência de carboxi-fluoresceína [FAM] com o citometro de fluxo *Attune* (Applied Biosystems)). As análises foram realizadas em triplicatas para cada linhagem celular e os resultados foram relatados como % de células marcadas.

Ensaio de imunofluorescência para avaliação de ligação dos aptâmeros selecionados

Os ensaios de imunofluorescência com marcação por aptâmeros, foram realizados com a linhagem H1299 (CRL5803). As células em suspensão, foram aplicadas (esfregaço) em uma lâmina de vidro até a secagem completa, em temperatura ambiente. Em seguida, os aptâmeros previamente ligados com FAM (517 nm), foram diluídos em tampão de ligação (0,1 mM/100ul, pH 7,4), aplicados diretamente nas lâminas e incubados por 40 minutos. Para o controle negativo (CN), as células foram incubadas com o tampão de ligação, sem os aptâmeros. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS e permeabilizadas por 5 minutos na presença de PBS contendo

0,1% Triton-X100. Posteriormente, DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) foi aplicado por 10 minutos para a coloração de núcleo celular. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS. As lâminas foram montadas com meio de montagem (*Fluoromount*), e, posteriormente, observadas no microscópio confocal invertido TissueFAXS (TissueGnostics).

Resultados e Discussões:

A Figura 1 demonstram estruturas típicas dos aptâmeros selecionados. Estas estruturas 2D dos aptâmeros foram modeladas usando uma ferramenta online UNAFold do Integrated DNA Technologies. Confirmamos a ligação destes aptâmeros para as células tumorais. Nestes ensaios, os aptâmeros foram submetidos a análise por citometria de fluxo para validação da capacidade de ligação às células tumorais *in vitro*.

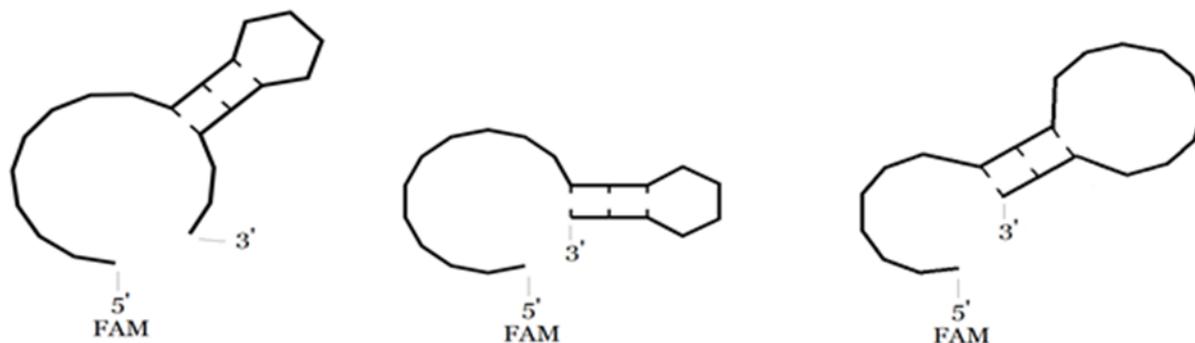


Figura 1: Ilustração de estruturas secundárias dos aptâmeros selecionados. As seguintes condições foram estabelecidas para modelagens das estruturas: 25 °C; 143 nM Na²⁺; 1,26 mM Mg²⁺. As estruturas 2D dos aptâmeros foram modeladas usando uma ferramenta online UNAFold do Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/UNAFold>).

Na Figura 2 mostram os resultados por citometria de fluxo, onde a células da linhagem A549 marcadas com o denominado aptâmeros 3, mostram a capacidade deste aptâmero em reconhecer uma sub-população de células tronco na linhagem A549 em torno de 5% do total das células. E célula da linhagem H1299 marcada com o denominado aptâmero 7, mostram a capacidade deste aptâmero em reconhecer uma sub-população de células tronco na linhagem H1299 em torno de 8% do total das células.

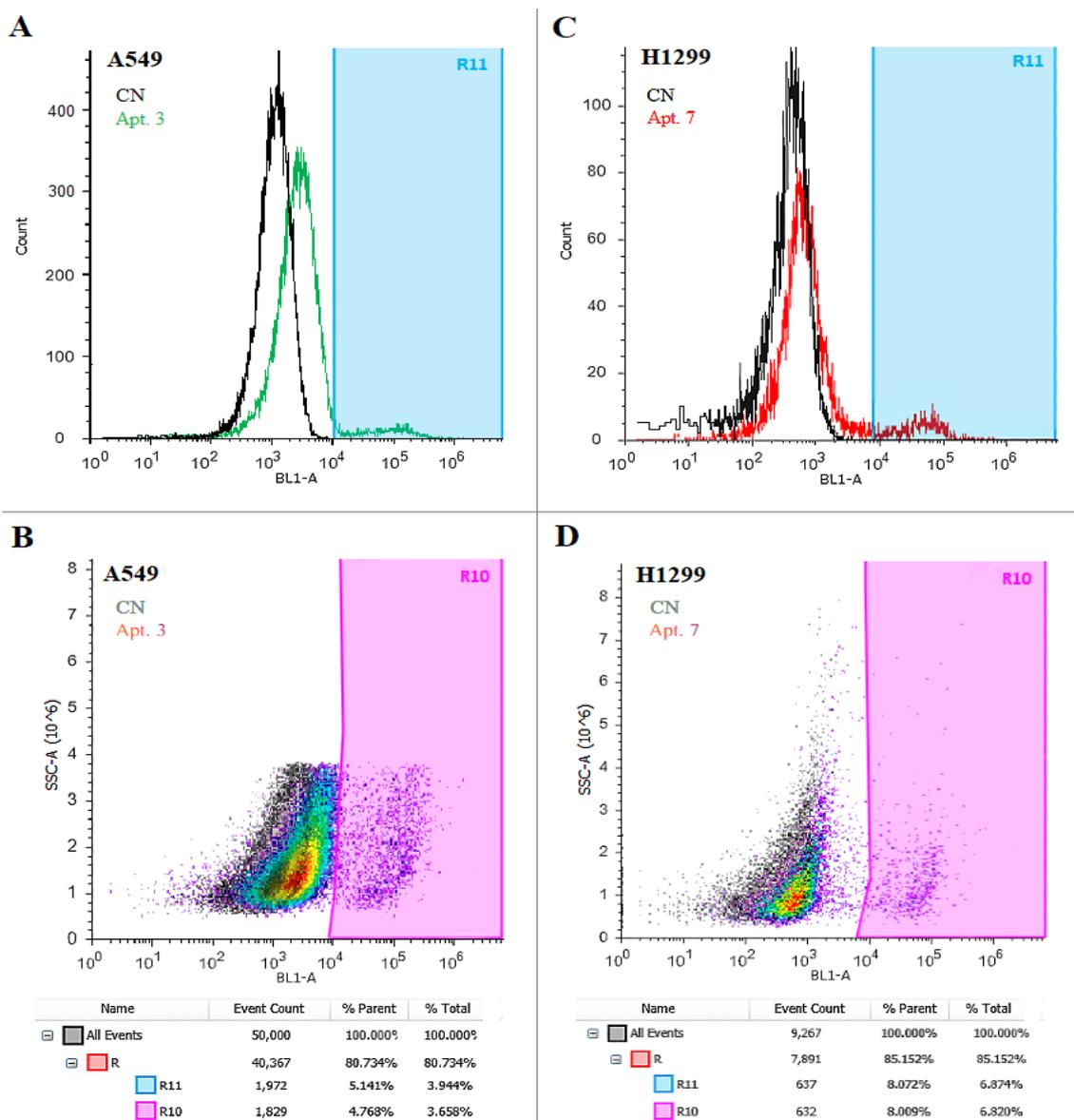


Figura 2: Avaliação por citometria de fluxo das linhagens A549 e H1299 marcadas com aptâmeros. Na figura A e B, os density plots mostram a presença de uma população secundária, bem definida, que é marcada com o denominado aptâmero 3, sugerindo uma capacidade deste aptâmero em reconhecer uma subpopulação de células tronco na linhagem A549 em torno de 5% do total das células. Na figura C e D, os density plots mostram a presença de uma população secundária que é marcada por o denominado aptâmero 7, demonstrando a capacidade deste aptâmero em reconhecer uma subpopulação de células tronco na linhagem H1299, com marcação em torno de 8% do total da população.

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados com a linhagem H1299, marcadas com o denominado aptâmero 7. Na Figura 3 mostram a imunomarcação do citoplasma das células H1299 com o aptâmero selecionado. Os resultados demonstram a capacidade do aptâmero em reconhecer as células da linhagem H1299.

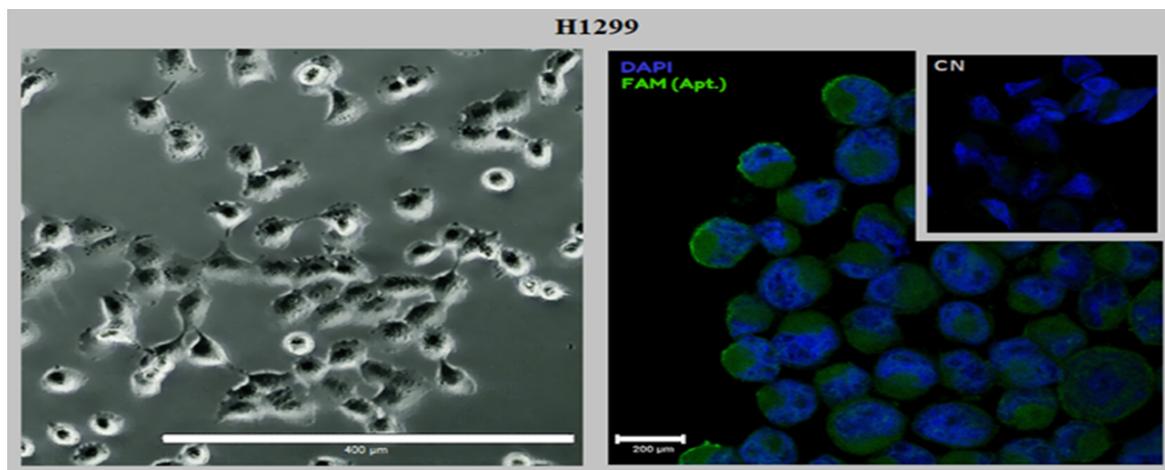


Figura 3. Marcação de células H1299 pelo aptâmero 7 em ensaios de imunofluorescência. A figura A, mostra a morfologia do carcinoma de células escamosas da linhagem H1299, por microscopia de campo claro. A figura B, mostra a imunomarcagem citoplasmática do aptâmero 7 (verde). Figura C: controle negativo, sem marcação para aptâmero e positivo para DAPI (núcleo).

Conclusão:

Durante a etapa do SELEX, foram selecionados 8 aptâmeros com estrutura mais estável e maior a força de especificidade de ligação nas células tumorais de pulmão. Desta maneira, os aptâmeros selecionados foram avaliados por ensaios de citometria de fluxo e imunofluorescência, onde dois tipos histotipos de NSCLC (adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas, A549 e H1299, respectivamente) foram utilizados com a finalidade de validar a capacidade de ligação de cada aptâmero.

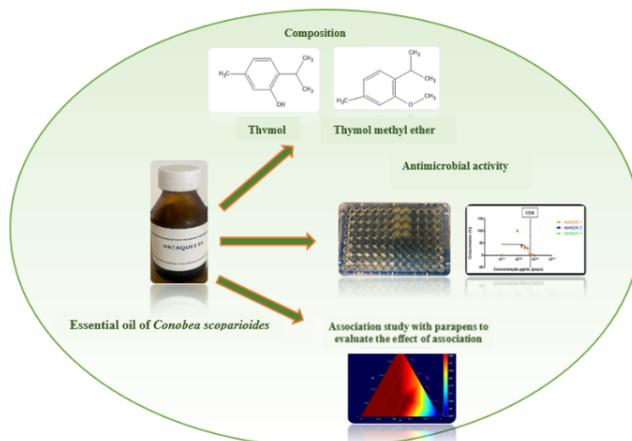
Nos ensaios de citometria de fluxo, a porcentagem de células positivas para cada um dos aptâmeros apresentaram uma capacidade de ligação delimitada. Os resultados de imunofluorescência reforçam os resultados da citometria de fluxo, evidenciando a ligação dos aptâmeros nas células tumorais. Estamos trabalhando com outros fenótipos de NSCLC e melhorando o método experimental, com a finalidade de aumentar a eficiência de detecção das células tumorais, através dos aptâmeros, bem como validá-los em amostras clínicas de pacientes com câncer de pulmão.

Agradecimentos:

Agradecemos ao apoio financeiro do CNPq (306392/2017-8), FAPESP (2018/07366-4) e CAPES (Código 001).

Bibliografias:

- 1- Ayob AZ, Ramasamy TS. *J Biomed Sci.* **2018**, 25: 20.
- 2- Christiansen JJ, Rajasekaran AK. *Cancer Research.* **2006**, 66 (17): 8319-8326.
- 3- Nery AA, Wrenger C. & Ulrich H. *Journal of Separation Science.* **2009**, 32:1523–1530.
- 4- Sá VK, et al. *Human Pathology.* **2012**, 43 (5): 675-683.
- 5- Šmuc T, et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **2013**, 81–82:210–217.



Antimicrobial activity of *Cono-bea scoparioides* essential oil, and its association with synthetic preservatives.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DO ÓLEO ESSENCIAL DE CONOBEA SCOPARIOIDES E SUA ASSOCIAÇÃO COM CONSERVANTES SINTÉTICOS PARA UTILIZAÇÃO EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

Cristina M. T. S. Miguel¹, Cristina H. Serra¹, Marcus T. Scotti², Paulo R. H. Moreno^{1,3*}

1-Programa de Pós Graduação de Farmácia e Medicamentos – Universidade de São Paulo.

2. Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, UFPB, Campus I

3 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

prmoreno@iq.usp.br

Resumo: O presente trabalho visa avaliar a composição química do óleo essencial de *Cono-bea scoparioides* Cham. & Schltdl., o seu potencial antimicrobiano e o efeito de sua associação com parabenos em bases cosméticas. Seus compostos majoritários são: éter metílico do timol (39,2%), timol (33,8 %) e α -felandreno (15,9%). A atividade antimicrobiana do óleo essencial e do timol foi acessada através da concentração inibitória mínima (CIM), cujos resultados em $\mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial e o timol foram respectivamente: *S. aureus* 650,7 e 284,9, *E. coli* 721,5 e 271,2, *P. aeruginosa* 1748,0 e > 2.000 , *B. cepacia* 833,0 e 1.077,7, *C. albicans* 521,43 e 172,61 e *A. brasiliensis* 300,0 e 400. O efeito sinérgico da associação foi realizado através de um delineamento experimental centroide simplex para uma mistura de metilparabeno e propilparabeno e óleo essencial frente aos mesmos micro-organismos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana. As concentrações obtidas em $\mu\text{g/mL}$ foram: 1120 para o metilparabeno, 350 para o propilparabeno e 675 para o óleo essencial. O óleo essencial de *C. scoparioides* apresentou um potencial antimicrobiano importante tanto sozinho como em associação com conservantes sintéticos. Estes resultados sugerem que esse óleo pode ser usado para compor um sistema conservante para formulações cosméticas contendo uma menor quantidade de sintéticos.

Palavras-chave: Conservantes. Óleos Essenciais. *Cono-bea scoparioides*. Atividade Antimicrobiana. Sinergia.

Chemical composition, antimicrobial activity of *Cono-bea scoparioides* essential oil and its association with synthetic preservatives for use in cosmetic formulations

Abstract: The present work aims to evaluate the chemical composition of the essential oil of *Cono-bea scoparioides* Cham. & Schltdl., its antimicrobial potential, and the effect of its association with parabens in cosmetic bases. The major oil compounds were thymol methyl ether (39.2%), thymol (33.8%) and α -phellandrene (15.9%). The antimicrobial activity of essential oil and thymol was accessed through the minimum inhibitory concentration (MIC), whose results in $\mu\text{g/mL}$ for essential oil and thymol were respectively: *S. aureus* 650,7 and 284,9, *E. coli* 721,5 and 271,2, *P. aeruginosa* 1748,0 and $>2,000$, *B. cepacia* 833,0 and 1.077,7, *C. albicans* 521,4 and 172,6, and *A. brasiliensis* 300,0 and 400,0. The synergistic effect of the association was carried out through a centroid simplex experimental design for a mixture of methylparaben, propylparaben, and essential oil against the same microorganisms previously used. The ideal concentrations obtained in $\mu\text{g/mL}$ were: 1120 for methylparaben, 350 for propylparaben and 675 for essential oil. The essential oil of *C. scoparioides* showed an important antimicrobial potential both alone and in association with synthetic

preservatives. These results suggest that this oil can be used to compose a preservative system for cosmetic formulations containing lower amounts of synthetic compounds.

Keywords: Preservatives. Essential Oils. *Conobea scoparioides*. Antimicrobial activity. Synergism

Introdução

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento na demanda do mercado cosmético mundial por produtos naturais. O consumidor atual, tem se tornado cada vez mais criterioso, optando por produtos cada vez mais próximos da sua origem^{1,3}. Produtos cosméticos com componentes naturais apresentam grandes atrativos, por serem ecologicamente corretos, potencialmente mais saudáveis e voltados à responsabilidade social². Diante desse quadro, a indústria cosmética, está em busca de produtos que contenham substâncias naturais em suas formulações com propriedades fitocosméticas e/ou ação conservante, em substituição aos compostos sintéticos³.

Os conservantes apresentam dupla função numa formulação, a primeira de proteção do produto e a segunda de proteção ao consumidor. Porém de forma geral, são os componentes da formulação cosmética que podem causar alergia e dermatite de contato. Sendo assim, vem se tornando crescente a preocupação em relação à toxicidade de conservantes sintéticos, o que demonstra o interesse pela busca de produtos naturais para minimizar os efeitos tóxicos causados pelos sintéticos.

Os óleos essenciais em formulações cosméticas, além de sua função como fragrância, têm demonstrado ação inibitória no crescimento de vários patógenos tanto Gram-positivos quanto negativos⁴. Diante desse cenário vários estudos têm demonstrado a importância na utilização dos óleos essenciais no combate aos micro-organismos patogênicos devido a sua ação antibacteriana, antifúngica e antiviral como uma alternativa viável na preservação de produtos tanto na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética⁵.

Dentre os óleos essenciais podemos citar o óleo de *Conobea scoparioides* Cham. & Schltl, popularmente conhecida como pataqueira. Esta é uma espécie nativa do Brasil, mas não endêmica. Entre suas características mais marcantes, destacam-se os constituintes timol, éter metílico do timol e α -felandreno, presentes em seu óleo essencial, os quais possuem odores agradáveis⁶ e são de interesse para o mercado brasileiro de perfumes e cosméticos⁷. Uma outra característica importante são as propriedades antimicrobianas destes componentes.

Assim, a proposta deste estudo é avaliar o potencial antimicrobiano e o efeito sinérgico do óleo essencial de *C. scoparioides* com metil- e propilparabeno, um grupo de conservantes sintéticos.

Experimental

O óleo essencial de *Conobea scoparioides* Cham. & Schltl, utilizado foi uma amostra comercial obtida da International Flavors & Fragrances (IFF) (Santana do Parnaíba, São Paulo), a qual é utilizada na indústria de cosmética.

Determinação dos perfis cromatográficos por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

A identificação dos compostos foi realizada conforme o método anteriormente descrito⁸, através da comparação dos espectros de massas e índices de retenção calculados (determinados em relação aos tempos de retenção de uma série de *n*-alcanos) com os espectros de massa encontrados na literatura e na biblioteca instalada no equipamento (Adams, NIST/Willey).

Determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e seus compostos majoritários.

Neste trabalho foram utilizadas 6 cepas, 4 bacterianas e 2 fúngicas: *E. coli* (ATCC 8739), *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *B. cepacia* (ATCC 25416) *C. albicans* (ATCC 10231) e *A. brasiliensis* (ATCC 16404). O ensaio da atividade antimicrobiana, foi baseado através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e para este foi utilizado o método de microdiluição com técnicas assépticas, empregando microplacas de cultura de células de fundo chato estéreis, adaptando-se os volumes de inóculo, amostra e meio de cultura para 200 μL ^{9,10,11}, já estabelecido no grupo¹², cuja leitura foi realizada através do leitor de microplacas (LGC Biotecnologia®). Para *A. brasiliensis* o ensaio foi realizado através do método de microdiluição, porém a leitura da verificação da inibição foi feita visualmente, considerando presença ou ausência de crescimento.

Delineamento experimental para avaliar o efeito da associação do óleo essencial com parabenos.

Para este experimento foi utilizado o planejamento experimental em rede simplex centroide com pontos adicionais de uma mistura de três componentes, composto por dez ensaios diferentes para determinação dos valores de todos os seus coeficientes representados na Tabela 1¹³. Para a realização do estudo das associações foi utilizado o método de microdiluição com técnicas assépticas, empregando microplacas de cultura de células de fundo chato estéreis, adaptando-se os volumes de inóculo, amostra e meio de cultura para 200 μL ^{9,10,11}. Os resultados foram apresentados na forma de gráficos de superfície resposta e contorno. As variáveis selecionadas neste estudo foram as CIM's do metilparabeno e do propilparabeno pré-determinados¹⁴ juntamente com a do óleo essencial.

Tabela 1. Composições obtidas através do delineamento experimental de misturas

Composições	Metilparabeno	Propilparabeno	Óleo Essencial
Proporções dos componentes nas composições (%)			
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33	33	33
8	50	25	25
9	25	50	25
10	25	25	50

Resultados e Discussão

Após a análise de GC/MS, os principais componentes do óleo foram identificados como metil timol (39,2%) e timol (33,8%), a composição completa pode ser vista na Tabela 2.

Tabela 2. Composição química do óleo essencial das folhas de *Conocarpus scoparioides*.

Composto	TR ^a	IA ^b	%	Composto	TR ^a	IA ^b	%
3-octanona	11,913	993	1,9	timol metil éter	23,638	1242	39,2
alfa-felandreno	12,774	1012	15,9	timol	26,752	1311	33,8
p-cimeno	13,635	1030	4,5	alfa-trans-bergamoteno	34,523	1493	1,3
3-isopropenil-5,5-dimetil-ciclopenteno	14,689	1052	0,5	octacosano	69,036	2673	1,3
N.I.5: 93(100%), 91(54%), 77(38%), 136(36%), 79 (36%)	15,034	1060	0,9	Identificados	99,1		
linalol	17,218	1106	0,7	Não Identificados	0,9		

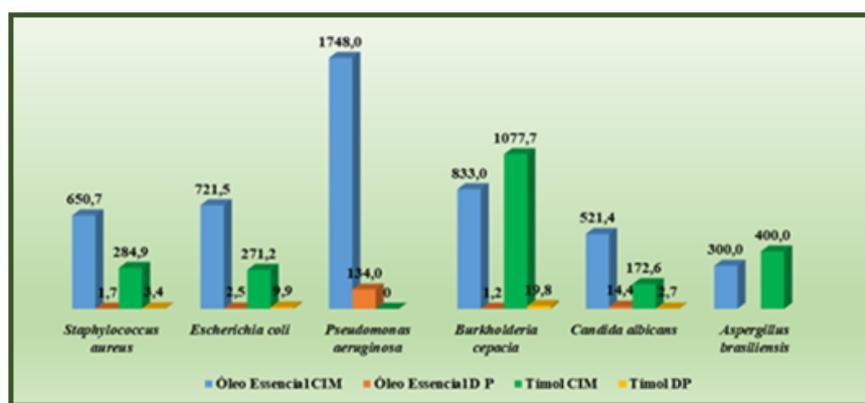
^a Tempo de retenção-coluna DB-5; ^b Índice de retenção-coluna DB-5; ^c Valores da literatura (ADAMS,2007; NIST); N.I.= não identificado.

Apesar das diferenças de composição química do óleo essencial de *C. scoparioides* encontradas na literatura, o timol sempre está entre os componentes majoritários. Assim, como vários estudos

demonstraram a ampla atividade antimicrobiana do timol¹⁵, podemos supor que esse óleo essencial poderá possuir um potencial antimicrobiano também.

As concentrações inibitórias mínimas do óleo essencial variaram de 200,0 a 1748,0 µg/mL. Quanto ao timol a variação ocorreu de 172,6 à > 2000 µg/mL. Em relação às bactérias tanto para o óleo essencial quanto para o timol a mais resistente foi *P. aeruginosa*. Quanto aos fungos, *A. brasiliensis*, o bolor, foi mais sensível que a levedura *C. albicans* para o óleo essencial e mais resistente frente ao timol, conforme pode ser visto na figura 1.

Figura 1. Concentrações inibitórias mínimas determinadas para o óleo essencial de *C. scoparioides* contra *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e *A. brasiliensis*.



A ação antimicrobiana tanto do óleo essencial quanto do timol se deve provavelmente à natureza hidrofóbica dos dois compostos a qual interfere na integridade da membrana desse micro-organismo. Um outro fator pode ser devido ao grupo hidroxila presente no timol que provoca o rompimento dos gradientes iônicos da célula bacteriana¹⁶. A concentração inibitória mínima muito elevada obtida para *P. aeruginosa* ocorreu, muito provavelmente, devido a sua capacidade de formação de biofilme, o que as tornam mil vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que quando encontradas em forma planctônica¹⁷. Um outro fator que leva a uma maior resistência de *P. aeruginosa*, que pode estar relacionado a membrana externa do gênero, por ser predominantemente impermeável aos compostos fenólicos do OE, devido a existência de mecanismos de bombas de efluxo e inibição junto a porina que protegem a bactéria contra a ação de óleos essenciais¹⁸.

As associações realizadas com o óleo essencial e parabenos observou-se que houve inibição do crescimento microbiano de 95 a 100% para bactérias tanto Gram positivas quanto Gram negativas. Para a levedura *C. albicans*, observou-se uma inibição de aproximadamente 78%.

Através da análise estatística dos resultados das associações, foram calculadas as curvas contorno para a porcentagem de inibição y(x) das diferentes associações para cada micro-organismo em função das três variáveis (X₁, X₂, X₃) bem como sua representação em gráficos de calor. Estes resultados podem ser vistos na figura 2.

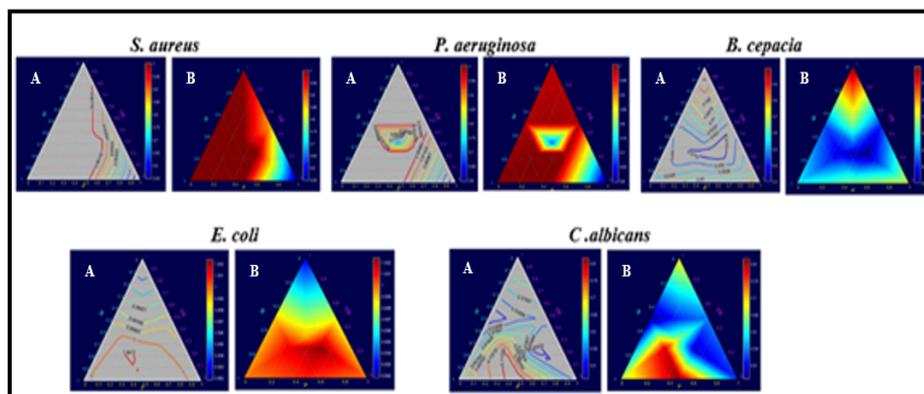
Com esses resultados podemos observar o efeito positivo da associação do óleo essencial com os parabenos, pois foi possível utilizar uma concentração abaixo da CIM de cada componente. Usando *S. aureus* como exemplo, isoladamente o metilparabeno apresenta um CIM 2000 µg/mL, porém na associação podemos ter sua inibição com 400 µg/mL, para o propilparabeno o valor obtido

na associação foi de 250 µg/mL enquanto sua CIM é de 500 µg/mL, já para o óleo essencial cuja a CIM é de 700µg/mL a inibição foi observada a partir de 560 µg/mL na mistura.

Conclusões

O óleo essencial de *C. scoparioides* apresentou o timol como um dos principais compostos que já foi testado como agente antimicrobiano. O potencial antimicrobiano do óleo essencial determinado contra contaminantes cosméticos sozinho e associado aos parabenos, indicou que esse pode ser um promissor candidato para compor uma mistura conservante, contendo um ingrediente natural, em formulações cosméticas.

Figura 2. Curva de contorno (A) e gráfico de calor (B) das associações frente aos microorganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *E. coli*, *C. albicans* e *A. brasiliensis*.



Agradecimentos

CAPES, International Flavors & Fragrances (IFF) e Natura Cosméticos S/A.

Referências

1. Miguel, L. M. Revista Geográfica de América Central **2011**, 1–15.
2. Flor, J. et al. Cosmetics & Toiletries **2019**, 30–36.
3. Packer; Luz, M. M. Brazilian Journal of Pharmacognosy **2007**, 102–107.
4. Barakat, H. British Journal of Applied Science & Technology **2014**, 1934–1951.
5. Santos, F.S.; Novales, M. G. Current Opinion in Biotechnology **2012**, 136–141.
6. Araújo, F.V. et al. Plantas da Amazônia para produção cosmética: uma abordagem química- 60 espécies do extrativismo florestal não-madeireiro da Amazônia **2007**
7. Manual de Boas Práticas de Produção de Pataqueira, Natura Campus **2016**.
8. Moreno, P. R. et al. The Journal of Essential Oil Research **2009**,190-192.
9. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Sixth Edition; **2003**.
10. NCCLS. Method for Broth Dilution Tests to Determine the Antifungal Susceptibility of Filamentous Fungi; **2002**.
11. NCCLS. Method for Broth Dilution Tests to Determine the Antifungal Susceptibility of Yeasts, Second Edition; **2002**.
12. Moreno, P. R. et al. Current Topics in Medicinal Chemistry **2013**, 3040-3078.

13. Neto, B. D. et al. Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria, **2010**, 315-361.
14. Issa, F. Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Apoclada simplex* McClure & Smith (Poaceae: Bambusoideae) **2015**.
15. Wang, Y.; Yam, K. L. Food Packaging and Shelf Life **2018** 92–96.
16. Sim, J. X. F. et al. Veterinary Dermatology **2019**, 524-530.
17. Drenkard, E. Microbes and Infection **2003**, 1213–1219.
18. Hossain, S. et al. Laboratory Animal Research **2017**,195.

COMPÓSITO MAGNÉTICO DE AMIDO MODIFICADO APLICADO À CONCENTRAÇÃO DE REJEITOS DE MINERAÇÃO VISANDO INCREMENTO NAS RECUPERAÇÕES DE HEMATITA (Fe_2O_3)

Daniel R. S. Nogueira,¹ Mario José Politi¹

¹ – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

drsn_daniel@usp.br

Resumo: A geração e disposição de resíduos são fatores críticos na mineração, com importantes implicações econômicas, ambientais e sociais. A necessidade de dar destinação sustentável aos resíduos da mineração, em especial os rejeitos, ganhou mais relevância após os desastres das barragens de rejeito em Mariana (2015) e Brumadinho (2019), e o aproveitamento econômico desses materiais surge como alternativa à deposição em estruturas como pilhas e barragens. Com base nos dados declarados no Relatório Anual de Lavra (RAL), no período de 2010 a 2019, estima-se que, no Brasil, um total de 3,4 bilhões de toneladas de rejeitos e 8,2 bilhões de toneladas de estéril foram geradas em empreendimentos produtores de ferro, ouro, cobre, fosfato, estanho, alumínio, níquel, carvão, manganês, zinco, cromo e vanádio. Atualmente, para elevação de teores, o processo de concentração mineral mais utilizado é por flotação, processo no qual as propriedades de superfície dos materiais são induzidas à hidrofobicidade por meio de produtos químicos chamados de agentes coletores. Como estratégia à redução da geração de rejeitos verificamos o uso de um compósito magnético de amido modificado aplicado às partículas minerais de forma a induzirmos o magnetismo ambiental das partículas de modo seletivo à hematita, conferindo-lhes maior susceptibilidade magnética durante a concentração magnética de alto campo.

Palavras-chave: economia circular, concentração magnética de alto campo a úmido, amido modificado.

Modified starch magnetic composite applied to concentration of tailings for increasing recoveries of hematite (Fe_2O_3)

Abstract: Waste generation and disposal are critical factors in mining, with important economic, environmental, and social implications. The need to provide sustainable disposal of mining waste, especially tailings, has gained more relevance after the tailings dam disasters in Mariana (2015) and Brumadinho (2019), and the economic use of these materials emerges as an alternative to disposal in structures such as piles and dams. Based on data declared in the Annual Mining Report (RAL), in the period from 2010 to 2019, it is estimated that, in Brazil, a total of 3.4 billion tons of tailings and 8.2 billion tons of waste rock were generated in enterprises producing iron, gold, copper, phosphate, tin, aluminum, nickel, coal, manganese, zinc, chromium and vanadium. Currently, the most used mineral concentration process is froth flotation, a process in which the surface properties of materials are induced to hydrophobicity by means of chemicals called collecting agents. As a strategy to reduce the generation of tailings, we verified the use of a modified starch magnetic composite applied to mineral particles in order to selectively induce the environmental magnetism of the particles to hematite, giving them greater magnetic susceptibility during high-field magnetic concentration.

Keywords: circular economy, wet high intensity magnetic separator, modified starch.

Introdução

Segundo Chaves (2006) a flotação é o método de concentração mais largamente adotado para a faixa granulométrica fina (<150 μm). A concentração de minérios por flotação apresenta boa eficiência em uma dada faixa de tamanho de partícula, fora da qual a recuperação de finos ou grossos é muito baixa. Essa faixa de tamanho depende da espécie mineral, da escala de operação e da concentração de reagentes, e flutua para os minérios de 5 μm e 150 μm . Em razão da baixa recuperação, principalmente nas frações finas e grossas, milhares de toneladas de rejeitos com altos teores têm sido depositados em barragens. Um evento na mineração brasileira, também conhecido

como desastre de Mariana, ocorreu em 5 de novembro de 2015 na barragem do Fundão localizada em ambiente de mina na Cidade de Mariana, Estado de Minas Gerais. O rompimento teve 19 vítimas fatais e provocou a vazão de 32,6 milhões de metros cúbicos de rejeitos da estrutura. Após 3 anos da tragédia de Mariana, no dia 25 de janeiro de 2019, outra barragem de mineração composta de rejeitos de minério de ferro rompeu-se catastróficamente na Cidade de Brumadinho, Minas Gerais, Brasil. A ruptura produziu uma avalanche de lama que se espalhou por 10 km e atingiu o Rio Paraopeba; um importante afluente do rio São Francisco. Apesar do volume de lama derivado do desastre de Brumadinho ser menor do que o de Mariana, o evento causou perdas muito mais significativas de vidas. Tendo em vista o impacto desses tipos de acidente, estudos têm sido realizados para o beneficiamento de rejeitos ou ROM (*run of mine*) induzindo a superfície dos materiais à hidrofobicidade por meio agentes coletores aplicados no processo de concentração por flotação. Entretanto, quando o beneficiamento é realizado pelo processo de concentração magnética depende principalmente da susceptibilidade magnética e do magnetismo ambiental das partículas minerais. Dentro desse contexto, o presente trabalho tem a intenção de contribuir com opções de reaproveitamento de rejeitos e/ou melhorias no ROM, e para isso propôs o uso de um composto magnético de amido modificado aplicado na rota de concentração magnética como forma de induzir seletivamente o magnetismo das partículas minerais e justificar o seu beneficiamento ou melhoria do processo.

Experimental

Amostras de rejeitos de mineração

500g de rejeito de zinco, com umidade de 10%, foram direcionadas para análises de fluorescência e difração de raios-x (modelo Zetim - *Malvern Panalytical*). Para análise de tamanho de partículas utilizamos espalhamento a baixo ângulo de luz laser (LALLS - *Mastersizer 2000 - Malvern Panalytical*).

Gelatinização química do amido de milho modificado de fonte regular

Em um béquer foi pesado 50g/L de amido modificado (base seca), em outro béquer foi pesado água destilada para uma solução à 5% (p/v), adicionou-se essa água destilada ao amido formando uma pasta, em um terceiro béquer, foi pesado 8g/L de uma solução de soda caustica em uma concentração de 50%. Por meio de um agitador mecânico ajustamos a velocidade em 1200 rpm e iniciamos a adição da solução de soda caustica (50%) à solução de pasta de amido, por fim ajustamos o teor de sólidos dessa solução final à 3% (p/v) utilizando água destilada e agitamos por 10min, como controle ao processo foi medido e registrar o valor de pH.

Síntese de partículas magnéticas via coprecipitação

Uma solução de precursores $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 0,2/0,1 mol/L, onde Fe^{3+} (cloreto férrico hexahidratado $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - *Sigma Aldrich*) e Fe^{2+} (Cloreto ferroso tetra hidratado $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - *Sigma Aldrich*) permaneceu em agitação (1000rpm) durante 10 min. Em seguida, uma solução de soda caustica a uma concentração de 50% (v/v) foi adicionada a esses precursores por meio de uma bomba dosadora (5ml/min), por fim aquecemos o sistema a 70 °C, por 20 min, para promover a coprecipitação das partículas magnéticas (Eq.1).



Incorporação do amido gelatinizado nas partículas magnéticas

As partículas magnéticas foram adicionadas no amido gelatinizado 5 g/L e agitadas a 100 rpm. por 30 min com o objetivo de incorporar essas partículas na matriz polimérica de amido modificado.

Resultados e discussão

Amostras de rejeitos de zinco analisadas por difração de raio laser (LALLS) estão apresentadas na figura 1.

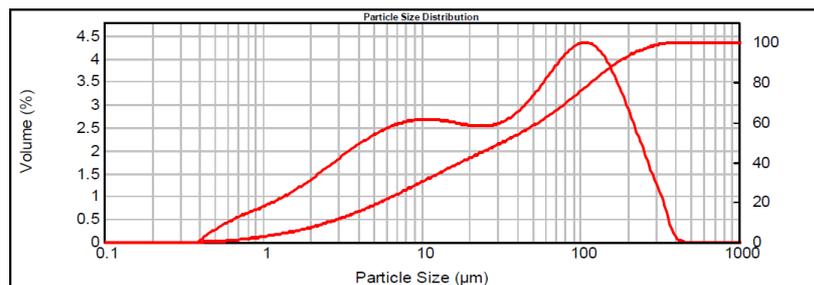


Figura 1: Distribuição granulométrica por difração de raio laser (LALLS)

Observa-se na figura 1 a uma distribuição granulométrica abaixo de 178,25 mm (*size* µm) temos cerca de 90% de volume da amostra. A figura 2, apresenta os resultados da difração de raio-x (analisador XRD) também para os rejeitos de zinco, onde observa-se a presença da fase hematita (Fe_2O_3).

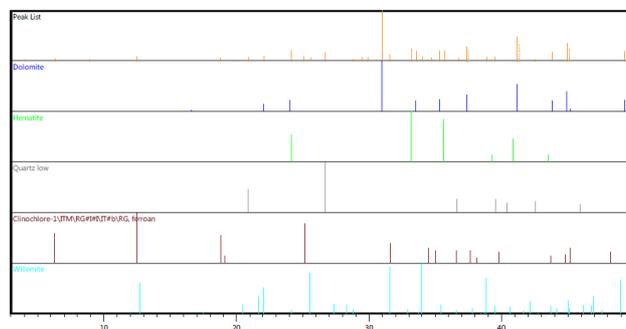


Figura 2: Identificação de fases por difração de raios-X (analisador XRD) dos rejeitos de zinco

A tabela 1 exibe a distribuição modal dos minerais contidos na amostra de rejeitos de zinco em porcentagem por elemento químico, os teores apresentados foram dosados em amostra prensada, na calibração STD-1 (*Standardless*) relativa à análise sem padrões dos elementos químicos compreendidos entre o flúor de urânio. A perda ao fogo (PF) foi realizada a 1020°C por 2h.

Na ₂ O	MgO	Al ₂ O ₃	SiO ₂	P ₂ O ₅	SO ₃	Cl	K ₂ O	CaO	TiO ₂	V ₂ O ₅	Cr ₂ O ₃	MnO	Fe ₂ O ₃	NiO	ZnO	SrO	BaO	PbO	PF
0,24%	13,80%	0,68%	2,69%	0,04%	0,09%	0,01%	0,15%	24,30%	0,07%	nd	nd	0,08%	17,20%	nd	3,71%	<0,01%	0,07%	0,26%	36,40%

Tabela 1: Análise química por fluorescência de raios-X (XRF)

Observamos através da tabela 1 que o teor do contaminante hematita (Fe_2O_3) analisado está presente na forma elementar em 17,20% da amostra de rejeitos de zinco. Na figura 3 temos o WHC-01B um concentrador magnético do tipo “*Wet High Intensity Magnetic Separator*”. O princípio de funcionamento deste equipamento consiste na circulação de corrente elétrica induzida por entre os polos das bobinas resultando em um alto gradiente e intensidade de campo eletromagnético na zona de separação. O equipamento utilizado para os ensaios é composto principalmente por bobina geradora de campo magnético (8000, 10000 e 13800 Gauss) e matrizes do tipo placa ranhurada (1,5 e 2,5 mm). Este equipamento está localizado no laboratório de desenvolvimento do fabricante Inbrás-Eriez.



Figura 3 - *Wet High Intensity Magnetic Separator* (WHIMS)

Slurry com rejeitos de zinco condicionados em um composto magnético de amido modificado

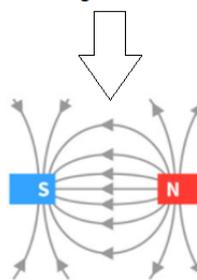


Figura 4 – Esquema simplificado da concentração magnética de rejeitos de zinco e composto magnético de amido modificado

Conforme ilustrado na figura 4, foi adicionada a solução do composto magnético de amido modificado ao “*slurry*” ou polpa (minério e água), condicionados por 2 minutos e direcionados à alimentação do concentrador magnético de alto campo. Ao entrarem na zona de separação, uma certa quantidade de massa chamada de concentrado magnético é atraída pela superfície da matriz. Sob ação da gravidade combinada com a hidrodinâmica do sistema o restante da massa desse “*slurry*” é descartado do processo como rejeito não-magnético. Em seguida o material é filtrado sob pressão, seco em estufa a 110°C, desagregado com auxílio de peneiras, pesado, embalado e destinado às análises de fluorescência de raio-X e espectrometria de absorção atômica para elementos que contém uma faixa de detecção mais baixa (por exemplo o Cádmio).

Os ensaios de concentração magnética foram planejados na etapa “*rougher*”, ou seja, um estágio inicial de qualquer operação de tratamento de minério onde são produzidos concentrados e rejeito de teores supostamente ainda inaceitáveis e que por isso, a depender, precisam ser reprocessados respectivamente nos estágios posteriores chamados de “*cleaner*” e “*scavenger*”. As etapas estão ilustradas abaixo na figura 5, onde classificamos como *alimentação nova* os rejeitos de zinco.

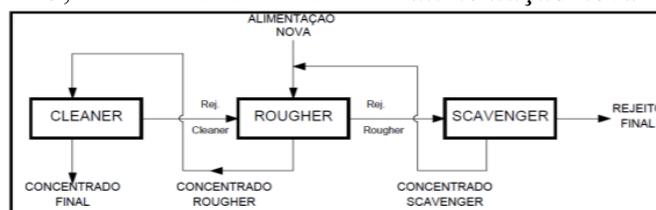


Figura 5 – Esquema representativo das etapas de concentração magnética

Os resultados dos ensaios de concentração magnética utilizando os rejeitos de zinco (alimentação nova) estão relacionados abaixo na tabela 2.

Etapa	Material	Variação da hematita (Fe ₂ O ₃) com uso de um compósito magnético de amido modificado em relação a amostra em branco		
		Aumento de Teor	Aumento de recuperação em massa	Aumento de recuperação metalúrgica
Rougher	Concentrado	5%	25%	30%
Cleaner	Concentrado	2%	30%	45%
Scavenger	Concentrado	20%	60%	25%

Tabela 2: Resultado das variações do contaminante hematita

Conclusões

Embora a escala dos ensaios seja considerada ainda insuficientes para um tratamento estatístico representativo para o volume de rejeitos gerados, os testes demonstram efeitos na remoção da hematita (Fe₂O₃) durante a concentração de rejeitos de zinco por meio de concentração magnética de alto campo e compósito magnético de amido modificado em relação aos ensaios em branco. O incremento de magnetismo causado pelas compósito magnético de amido modificado pode ter auxiliado as partículas finas e ultrafinas de hematita (Fe₂O₃) a se tornarem mais susceptíveis às forças de campo magnético, resultando em efeitos positivos sobre os teores e recuperações (massa/metalúrgica) do material concentrado magneticamente. A continuidade dos testes e a realização de ensaios utilizando o susceptômetro torna-se imprescindível para que possamos alcançar um nível detalhado de conhecimento e controle sobre os efeitos do magnetismo sobre a concentração magnética de rejeitos de zinco e demais materiais. Futuramente seria interessante a realização de mais ensaios de concentração magnética com outros materiais ferrosos e não ferrosos, sulfetados e não-sulfetados, como por exemplo Fe-Nb (ferro-nióbio) e FeTiO₃ (ilmenita).

Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Dr. Arthur P. Chaves.

Agradecemos à Ingredion *Incorporated* pelas amostras de amidos modificados cedidas.

Referências

- 1.0 Evans, M. E.; Heller F.; *Principles and Applications of Enviromagnetics*; Elsevier Science, USA, **2003**.
- 2.0 Bhushan B.; *Springer handbook of nanotechnology*; Ohio: Springer, **2004**.
- 3.0 Oliveira G.B.; *MS Project & Gestão de Projetos*; Pearson Makron Books; São Paulo, **2005**.
- 4.0 Shier; da Costa C.U.; *Custos Industriais*; Ibpx; Curitiba, **2005**.
- 5.0 Chaves, A.P. Teoria e Prática do Tratamento de Minérios: Flotação o Estado da Arte no Brasil. 1 ed., Signus, 2006;
- 6.0 Jeong U. et al.; *Superparamagnetic colloids: controlled synthesis and applications*; Advanced Materials **2007**, 33–60.
- 7.0 Knobel M. et al.; *Superparamagnetism and other magnetic features in granular materials: a review on ideal and real systems*; J Nanosci Nanotechnol. **2008**; 8, 36-57.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-TIROSINASE E CITOTÓXICO DE EXTRATOS DE *PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS* (GOMES) LANDRUM

Rayane O. Mota¹, Paulo R.H. Moreno², Cynthia Murakami³, Maria C.M. Young³, Paola C. Branco⁴, Letícia V. Costa-Lotuf⁴, Fabiana L. Silva^{1,2*}

1 – Faculdade de Farmácia, Universidade Paulista (UNIP), Santana de Parnaíba, SP

2 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

3 – Instituto de Botânica do Estado de São Paulo (IBt), São Paulo, SP

4 – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

falimasilva@hotmail.com

Resumo: Substâncias fenólicas têm se mostrado como alternativas para o tratamento de transtornos não-malignos de hiperpigmentação. *Pimenta pseudocaryophyllus* é uma espécie nativa da Mata Atlântica que contém diversos compostos fenólicos e é reportada como ativa na redução de estresse oxidativo e inflamação induzida por radiação UV-B. No presente estudo, extratos de *P. pseudocaryophyllus* foram preparados e avaliados para atividades *in vitro*. O percentual de atividade antioxidante (em 100 µg/mL: 81-96%) e anti-tirosinase (em 5 mg/mL: 41-60%) foi próximo para todos os extratos, já a atividade citotóxica mais proeminente foi observada para o extrato clorofórmio (em 50 µg/mL: 94%). Através da análise por CG-EM pode-se identificar eugenol, metileugenol e chavibetol como componentes majoritários deste extrato. Para avaliar a atividade desses compostos sobre a enzima tirosinase foi utilizado modelo *in silico* de docagem molecular com tirosinase de cogumelo. Eugenol mostrou a melhor classificação como inibidor e interações por ligação de hidrogênio e ion-dipolo, favoráveis à atividade inibitória.

Palavras-chave: *Pimenta pseudocaryophyllus*, CG-EM, citotoxicidade, inibição da tirosinase, docagem molecular.

Evaluation of anti-tyrosinase and cytotoxic potential of Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) Landrum extracts

Abstract: Phenolic compounds have been shown to be alternatives for the treatment of non-malignant hyperpigmentation disorders. *Pimenta pseudocaryophyllus* is a native species of the Atlantic Forest that contains several phenolic compounds and it is reported to be active in reducing oxidative stress and inflammation induced by UV-B radiation. Extracts from *P. pseudocaryophyllus* were prepared and evaluated for *in vitro* activities. The percentage of antioxidant activity (in 100 µg/mL: 81-96%) and tyrosinase inhibition (in 5 mg/mL: 41-60%) was similar for all extracts, and the most potent cytotoxic activity was observed for the chloroform extract (in 50 µg/mL: 94%). Through GC-MS analysis it is possible to identify eugenol and its derivatives methyl eugenol and chavibetol as major components. To evaluate the activity of these compounds on the tyrosinase enzyme, an *in silico* molecular docking model with mushroom tyrosinase was used. Eugenol showed the best classification as inhibitor and hydrogen bond and ion-dipole interactions, favorable to inhibitory activity.

Keywords: *Pimenta pseudocaryophyllus*, GC-MS, antioxidant activity, cytotoxicity, tyrosinase inhibition, molecular docking.

Introdução

Melanina é o pigmento responsável por proteger a pele de raios ultravioleta, formadores de espécies reativas de oxigênio (EROS), que podem causar câncer de pele. A sua superprodução resulta em hiperpigmentação, manchas ou melasma e o tratamento geralmente está associado ao uso de medicamentos ou cosméticos contendo agentes despigmentantes, que podem atuar por diferentes mecanismos de ação. A enzima tirosinase é uma metaloenzima que ocorre em vários organismos e participa de alguns estágios da melanogênese, por isso é um dos alvos mais investigados no bloqueio

à biossíntese de melanina. Dentre os inibidores de tirosinase utilizados atualmente, um grande número é derivado de fontes naturais, como hidroquinona e ácido kójico, entretanto eles apresentam limitações com relação à alta toxicidade, baixa estabilidade e penetração reduzida na pele. Uma das alternativas a esses agentes são extratos vegetais contendo polifenóis, capazes de modular o metabolismo de pigmentação da pele.¹ *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae) é a única espécie do gênero *Pimenta* Lindl. encontrada no Brasil. Ela é uma árvore de pequeno porte típica da Mata Atlântica. Apresenta três quimiotipos, determinados pelo predomínio de classe de metabólitos encontrados no óleo das folhas: citral (predomínio de monoterpenos), (*E*)-cariofileno (predomínio de sesquiterpenos) e (*E*)-metil isoeugenol (predomínio de fenilpropanoides). Extratos da folha de *P. pseudocaryophyllus* desses quimiotipos apresentaram atividades inibidora do estresse oxidativo e da inflamação induzida por radiação UV-B e antinociceptiva, mostrando substâncias fenólicas como principais constituintes.¹ Considerando a riqueza da biodiversidade da Mata Atlântica associada à promoção de ações sustentáveis, esse estudo visa avaliar o potencial antioxidante, inibidor da tirosinase de cogumelo e a citotoxicidade de extratos de *P. pseudocaryophyllus* com o intuito de aplicação em formulações antipigmentantes que possam agregar valor para essa espécie nativa de importância para a região sudeste.

Experimental

Preparo dos extratos orgânicos

Cerca de 55 g de extrato hidroetanólico de folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (coletada em: Vila Bonsucesso, Guarulhos - 23°23'21"S 46°25'31"W; identificada por: Profa. Dra. Sueli Nicolau, Instituto de Botânica do Estado de São Paulo; depositada em: Herbário IBt sob código OEA 604), obtido de maceração com etanol 96%, foi submetido a partição sólido-líquido com os solventes clorofórmio, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade. A partição foi realizada três vezes com 200 mL de cada solvente e sistema em agitação constante por 15 min. Após filtração, cada extrato foi concentrado até a secura para obtenção do rendimento [extrato clorofórmio (E-1): 5,9%; extrato acetato de etila (E-2) : 5,8%; extrato metanol (E-3): 54.2%].

Triagem fitoquímica preliminar

Triagem fitoquímica qualitativa de E-1, E-2 e E-3 foi realizada por CCD com reativos de visualização para terpenos [sistema de solvente (ss): hexano-acetato de etila, 97:3; revelador: anisaldeído sulfúrico], flavonoides (ss1: acetato de etila-metanol, 90:10; ss2: acetato de etila-ácido fórmico-ácido acético-água, 100:11:11:27; revelador: NP/PEG 1%) e triterpenos e saponinas (ss: clorofórmio-ácido acético-metanol-água, 64:32:12:8; revelador: Liebermann-Burchard).² Solução-padrão de cada extrato foi preparada na concentração de 20 mg/mL de metanol. Cinco microlitros de cada solução foram aplicados em cromatoplaça de sílica gel60 F₂₅₄ e desenvolvida em solvente adequado.

Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

E-1 foi analisado por CG-EM utilizando equipamento e método previamente reportado por nosso grupo.³

Ensaio biológicos in vitro

As triagens antioxidante e citotóxica foram realizadas seguindo metodologias previamente publicadas por nosso grupo.³ Para a atividade antioxidante, a concentração final no poço avaliada para cada

extrato foi de 100 µg/mL; o controle positivo foi quercetina. A citotoxicidade frente a linhagem celular de melanoma (SK-MEL-147) foi analisada nas concentrações de 50 e 5 µg/mL. O controle positivo foi doxorubicina. A capacidade dos componentes dos extratos em inibir a ação da tirosinase foi determinada através de método em microplaca descrito por Macrini *et al.*⁴ As amostras foram dissolvidas em Tween 20®/DMSO (2:8) e em seguida diluídas em tampão PBS (50 mmol/L, pH 6,8) para obter as concentrações finais no poço de 5; 2,5 e 1,25 mg/mL. Ácido kójico foi utilizado como controle positivo.

Docagem molecular

Para avaliar se eugenol e seus derivados podem se ligar diretamente no sítio ativo da tirosinase, simulação de docagem molecular foi realizada usando o programa GOLD 2020.3.0.⁵ A estrutura cristalográfica de raio-X de tropolona em complexo com tirosinase de *Agaricus bisporus* foi obtida do *Protein Data Bank* (PDB 2Y9X, resolução: 2,78 Å).⁵ Para validação do protocolo foi utilizado o método de redocagem do ligante cristalográfico no sítio ativo, considerando bem-sucedida a solução com desvio da raiz média quadrática (RMSD) menor que 2 Å em relação à posse observada na estrutura inicial. O programa Avogadro foi usado para criar as estruturas 3D. As águas moleculares e o ligante co-cristalizado foram removidos e os hidrogênios foram adicionados. Os ligantes foram configurados no programa MarvinSketch,⁵ e as estruturas foram criadas em 3D e minimizadas usando Avogadro.⁵ O protocolo utilizou receptor rígido-ligante flexível, sítio de ligação com 10 Å de distância da tropolona, função ChemPLP com repontuação ASP e algoritmo genético muito flexível. As interações ligante-receptor foram visualizadas por Discovery Studio Visualizer.⁵ Os parâmetros para comparar a capacidade inibitória dos compostos avaliados foram maior pontuação o tipo de interações intermoleculares observadas.

Resultados e Discussão

O estudo fitoquímico dos extratos de *P. pseudocaryophyllus* revelou que E-1 é predominantemente constituído de terpenos. E-2 apresenta os três tipos de metabólitos investigados, enquanto E-3 tem flavonoides e triterpenos/saponinas como principais metabólitos (Tabela 1).

Tabela 1- Triagem fitoquímica de extratos de *P. pseudocaryophyllus*.

Classes de metabólitos	Extratos de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (folha)		
	E-1	E-2	E-3
Terpenos	+	+	-
Flavonoides	-	+	+
Triterpenos/saponinas	-	+	+

E-1: extrato clorofórmio; E-2: extrato acetato de etila; E-3: extrato metanol; (+): Presença; (-): Ausência de compostos dessa classe de metabólitos.

E-1 também foi analisado por CG-EM, revelando a presença de 21 compostos, principalmente fenilpropanoides, como eugenol (2,08%), seus derivados chavibetol (10,87%) e metil eugenol (32,69%), além de elemicina (8,09%) (Tabela 2). O composto majoritário foi metil eugenol e este já foi descrito como majoritário para o quimiotipo coletado em Paranapiacaba – SP.⁶

Os resultados de triagem da atividade antioxidante pelo método de DPPH mostraram que E-2 foi o mais ativo, seguido de E-3 e E-1 (Tabela 3). E-2 e E-3 contêm flavonoides, compostos conhecidos

por essa atividade. Eugenol e metil eugenol, presentes em E-1, também são potentes antioxidantes.⁶ A capacidade de compostos fenólicos em proteger contra o estresse oxidativo está relacionada à possibilidade de doar elétrons ou hidrogênios para radicais livres, transformando-os em compostos estáveis, e deslocar o elétron desemparelhado dentro de sua estrutura aromática.⁶

Tabela 2- Constituintes caracterizados no extrato clorofórmio de *P. pseudocariophyllus* usando CG-EM.

No.	t _R (min)	Composto	Área do pico (%)
1	5,88	eugenol	2,08
2	6,02	chavibetol	10,87
3	6,25	metil eugenol	32,69
4	7,03	(E)-metil isoeugenol	0,76
5	7,43	elemicina	8,09
6	8,21	(Z)-asarone	0,64
7	8,29	veratrato de etila	1,19
8	8,45	β-eudesmol	1,24
9	9,66	criptomeridiol	1,11
10	10,18	palmitato de metila	4,34
11	10,45	ácido palmítico	4,30
12	10,65	palmitato de etila	7,91
13	11,29	heptanoato de etila	0,57
14	11,42	fitol	2,18
15	11,74	linolato de etila	1,16
16	11,77	oleato de etila	1,94
17	11,93	estearato de etila	0,79
18	13,05	oleamida	2,07
19	14,53	behenoato de etila	1,57
20	16,85	α-tocospiro A	3,48
21	17,14	α-tocospiro B	5,30

t_R: tempo de retenção.

Tabela 3 – Percentual de atividades antioxidante, anti-tirosinase e citotóxica para extratos de *P. pseudocaryophyllus*.

Extratos e padrões	Atividade antioxidante (%, \bar{X})		
	100 µg/mL		
E-1	81,2		
E-2	95,8		
E-3	95,3		
Quercetina ^A	3,8*		
	Atividade anti-tirosinase (%, \bar{X})		
	1,2 mg/mL	2,5 mg/mL	5,0 mg/mL
E-1	17,3	27,1	43,5
E-2	17,3	31,3	41,1
E-3	1,9	4,7	59,8
Ácido kójico ^B	11,8*		
	Atividade citotóxica (SK-MEL-147) (%, \bar{X})		
	5 µg/mL	50 µg/mL	
E-1	34,8	94,2	
E-2	12,4	51,7	
E-3	6,4	24,0	
Doxorrubicina ^C	2,7*		

^AControle positivo para atividade antioxidante; ^BControle positivo para atividade anti-tirosinase; ^CControle positivo para atividade citotóxica; SK-MEL 147: linhagem celular de melanona humano; E-1: extrato clorofórmio; E-2: extrato acetato de etila; E-3: extrato metanol; *Resultados de IC₅₀, com valores em µg/mL.

Além disso, as substâncias fenólicas podem atuar na quelação de metais de transição. Como a tirosinase contém cobre, compostos que reduzam esse íon metálico podem ser considerados como inibidores da enzima.⁶ Os resultados obtidos apontam E-3 como o extrato mais ativo, na maior concentração testada (5 mg/mL), entretanto, nas concentrações de 2,5 e 1,25 mg/mL, E-1 e E-2 mostraram atividades próximas e maiores que E-3 (Tabela 3). Dentre os compostos majoritários identificados em E-1, apenas eugenol foi estudado em modelo *in vitro* de inibição da tirosinase, apresentando IC₅₀ de 8,2 µg/mL.⁶ Todavia, flavonoides, observados em E-2 e E-3, são conhecidos por essa atividade

A inibição da tirosinase e a ação sobre o estresse oxidativo são vias de interesse no tratamento da hiperpigmentação, pela redução/bloqueio do escurecimento da pele, porém a pigmentação excessiva já existente também precisa ser reduzida. Para isso, compostos devem atuar na degradação dos melanócitos e queratinócitos hiperpigmentados, células produtoras e armazenadoras de melanina, respectivamente.¹ Nesse estudo, células de melanoma foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade dos extratos de *P. pseudocaryophyllus* e a possibilidade de degradação de melanócitos. Pelos resultados, E-1 mostrou a maior citotoxicidade nas duas concentrações avaliadas, seguida de E-2 (Tabela 3). Eugenol e metil eugenol são citotóxicos frente a linhagens de melanoma,⁶ sugerindo que esses compostos também atuem sobre a linhagem SK-MEL-147.

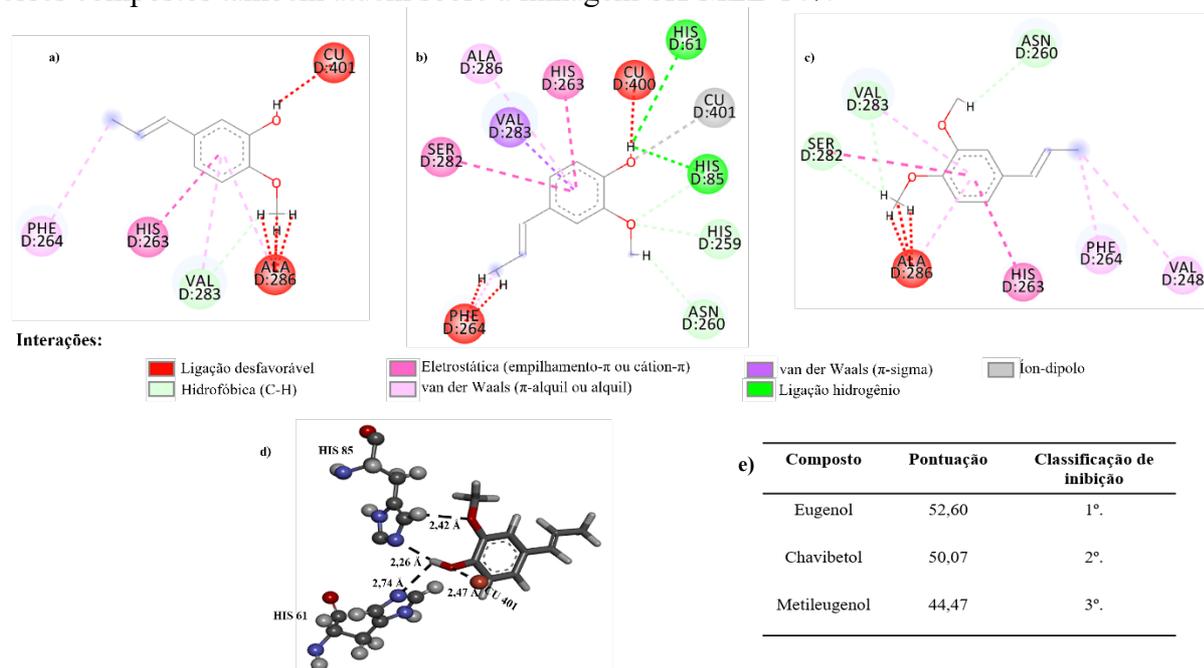


Figura 2 – Modo de ligação predito representado em estrutura 2D para a) Chavibetol, b) Eugenol e c) Metil eugenol no sítio ativo de tirosinase de *Agaricus bisporus* (PDB: 2Y9X); d) Representação em estrutura 3D das ligações hidrogênio e ion-dipolo com eugenol; e) Pontuação de docagem e classificação de inibição para os ligantes testados.

O extrato E-1 apresentou atividades antioxidante, anti-tirosinase e citotóxica. Como eugenol e metileugenol são conhecidos por diferentes atividades, eles e chavibetol (outro composto majoritário e derivado de eugenol) foram selecionados para análise de docagem molecular, para entender suas atividades sobre a enzima tirosinase. O protocolo utilizado foi validado por redocagem, apresentando RMSD de 0,71 Å em relação à estrutura obtida por difração de raios X. O ligante de maior pontuação usando GOLD foi eugenol (Fig. 2e). Todos os ligantes testados apresentaram ligações desfavoráveis (Fig. 2a-c), o que pode afetar a estabilidade da atividade inibitória, já que esse tipo de ligação indica força de repulsão.⁷ Entretanto, para eugenol foram identificadas duas ligações hidrogênio envolvendo os N da cadeia lateral de His 61 e His 85 e a hidroxila fenólica do ligante, o que contribui para o aumento do grau de afinidade deste composto para o sítio de ligação (Fig. 2d). O posicionamento da hidroxila fenólica de eugenol na cavidade de ligação também foi responsável por outra interação importante, íon-dipolo com Cu 401, o que pode potencializar a atividade inibitória (Fig. 2d).

Conclusões

Os extratos de *P. pseudocaryophyllus* mostraram-se ativos nos testes antioxidante, anti-tirosinase e citotóxico *in vitro*. Baseando-se nos compostos caracterizados para o extrato clorofórmio, identificaram-se três compostos possivelmente ativos como inibidores da tirosinase. Os resultados das simulações de docagem identificaram eugenol como o mais promissor. Entretanto, trabalhos futuros devem ser desenvolvidos visando identificar e isolar outros compostos ativos desses extratos, aplicação em formulações antipigmentantes.

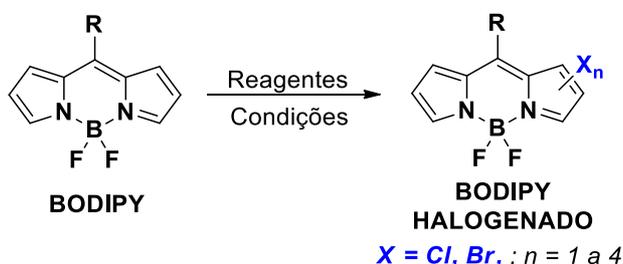
Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro e institucional da Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Paulista (UNIP), Instituto de Química (USP), Instituto de Botânica do Estado de São Paulo (IBt) e Instituto de Ciências Biomédicas (USP).

Referências

1. Solano, F.; Briganti, S.; Picardo, M.; Ghanem, G.; *Pigment Cell Research* **2006**, *19*, 550; D'Angelis, A.S.R.; Negrelle, R.R.B.; *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2014**, *16*.
2. Wagner, H.; Bladt, S.; *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*, 2nd ed.; Springer: Berlin, 2009.
3. Silva, F.L.; Silva, J.L.V.; Silva, J.M.; Marcolin, L.S.A.; Nouailhetas, V.L.A.; Yoshida, M.; Vendramini, P.H.; Eberlin, M.N.; Barbosa-Filho, J.M.; Moreno, P.R.H.; *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2017**, *27*, 346; Silva, F.L.; Santo, A.E.; Branco, P.C.; Costa-Lotufo, L.V.; Young, C.M.Y.; Murakami, C.; Cordeiro, I.; Nicolau, S.A.; Ishibaru, L.M.; Moreno, P.R.H.; *Global Journal of Medical Research: B* **2019**, *19*.
4. Macrini, D.J.; Suffredini, I.B.; Varella, A.D.; Younes, R.N.; Ohana, M.T.; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *45*, 715.
5. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; Leach, A.R.; Taylor, R.; *Journal of Molecular Biology* **1997**, *267*, 727; Ismaya, W.T.; Rozeboom, H.J.; Weijn, A.; Mes, J.J.; Fusetti, F.; Wichers, H.J.; Dijkstra, B.W.; *Biochemistry* **2011**, *50*, 5477; <https://www.chemaxon.com>, accessed in August 2021; Hanwell, M.D.; Curtis, D.E.; Lonie, D.C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G.R.; *Journal of Cheminformatics* **2012**, *4*; Dassault Systemes BIOVIA; *BIOVIA Discovery Studio Visualizer v16.1.0.15350*; Dassault Systemes, San Diego, CA, USA, 2015.
6. Lima, M.E.L.; Cordeiro, I.; Young, M.C.M.; Sobral, M.E.G.; Moreno, P.R.H.; *Pharmacologyonline* **2006**, *3*, 589; Gogoi, R.; Loying, R.; Sarma, N.; Begum, T.; Pandey, S.K.; Lal, M.; *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2020, *21*, 927; Fernandez-Panchon, M.S.; Villano, D.; Troncoso, A.M.; Garcia-Parrilla, M.C.; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2008**, *48*, 649; Amin, E.; Saboury, A.A.; Mansuri-Torshizi, H.; Moosavi-Movahedi, A.A.; *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2010**, *25*, 272; Khunkitti, W.; Veerapan, P.; Hahnvajanawong, C.; *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2012**, *4*, 556; Kim, D.; Park, J.; Kim, J.; Han, C.; Yoon, J.; Kim, N.; Seo, J.; Lee, C.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 935; Arung, E.T.; Matsubara, E.; Kusuma, I.W.; Sukaton, E.; Shimizu, K.; Kondo, R.; *Fitoterapia* **2011**, *82*, 198.
7. Dhorajiwala, T.M.; Halder, S.T.; Samant, L.; *Journal of Applied Biotechnology Reports* **2019**, *6*, 101.

Graphical Abstract



Schematic reproduction of the synthesis of different halogenated bodipys, which can be used as precursors to obtain BODIPY's with different functional groups.

PREPARAÇÃO DE BODIPY'S CLORADOS

Felipe Wodtke^{1*}, Alcindo A. Dos Santos¹

¹ – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

felipewod@usp.br

Resumo: BODIPY's são compostos fluorescentes com altos rendimentos quânticos, que recentemente têm merecido grande atenção em função de diversas aplicações, que vão desde células solares híbridas, até sondas detectoras de diferentes analitos e eventos biológicos complexos. Estratégias de funcionalização desses núcleos são desejáveis para que se possa construir dispositivos altamente seletivos e capazes de atender as demandas fotofísicas para as aplicações planejadas. Dentre as diferentes estratégias de cloração de BODIPY's, foram investigadas, a utilização de TCCA em diclorometano e acetato de etila. Os estudos mostraram que empregando 1,1 equivalente deste reagente permitiu a preparação do BODIPY diclorado em 72% de rendimento em apenas 1 hora de reação. Observou-se também que ao utilizar 2,2 equivalentes de TCCA o produto tetraclorado foi obtido em 52% de rendimento, no mesmo tempo reacional.

Palavras-chave: BODIPY, Ácido tricloroisocianúrico, Halogenação de BODIPY's.

Preparation of chlorinated BODIPY's

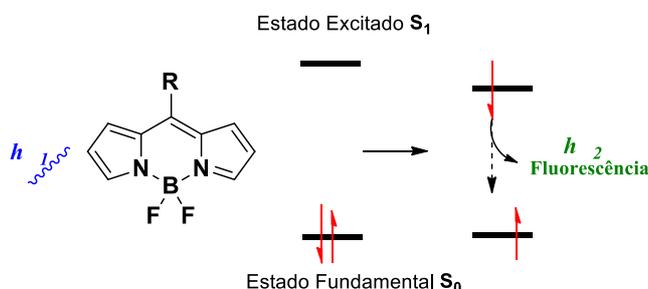
Abstract: BODIPY's are fluorescent compounds with high quantum yields, and recently such compounds have received several applications, ranging from hybrid solar cells to sensor probes for different analytes and complex biological events. Functionalization strategies of these compounds are desirable to build highly selective devices capable of meeting the photophysical demands for the planned applications. Among the different chlorination strategies of BODIPY's, the use of TCCA in dichloromethane and ethyl acetate were investigated. Studies showed that employing 1.1 equivalent of this reagent allowed the preparation of dichlorinated BODIPY in 72% yield in just 1 hour of reaction. It was also observed that by using 2.2 equivalents of TCCA, the tetrachlorinated product was obtained within 52% yield, at the same reaction time.

Keywords: BODIPY, Trichlorocianuric Acid, Halogenation of BODIPY's.

Introdução

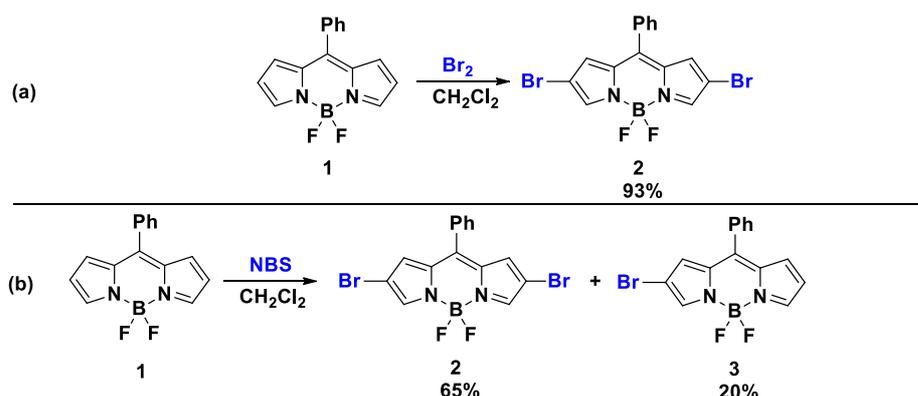
Os 4,4-Difluoro-4-boro-3a,4a-diaza-*s*-indacenos (BODIPY's) são compostos orgânicos cromóforos, de abrangente absorção de energia na região do visível e do ultravioleta e emissão de fluorescência, com rendimentos quânticos (Φ) consideravelmente altos. Na figura 1 está apresentado um esquema simplificado do fenômeno da fluorescência. O BODIPY no estado fundamental (S_0), ao ser submetido a uma radiação $h\nu_1$ passa ao seu estado excitado S_1 . O elétron em S_1 permanece neste estado por um tempo muito curto (de 10^{-10} a 10^{-7} segundos), e ao retornar para o estado fundamental, S_0 emite um fóton, $h\nu_2$. A emissão de fótons da transição radiativa $S_1 \rightarrow S_0$ é a fluorescência, propriamente dita.¹

Figura 1. Representação do fenômeno de fluorescência em um BODIPY, genérico.



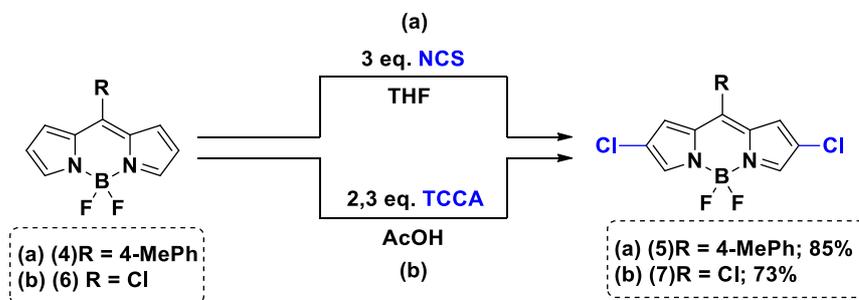
O fenômeno de fluorescência e o comprimento de onda de emissão é altamente dependente da natureza estrutural do fluoróforo e com isso, estratégias de preparação e funcionalização desses compostos são altamente desejáveis. Uma abordagem comum de introdução de grupos funcionais em compostos orgânicos é pela utilização dos derivados halogenados correspondentes, que permitem reações de substituição, acoplamento e ativação de ligações C-X ($X = \text{halogênio}$). Uma série de estratégias e reagentes permitem a halogenação direta de compostos orgânicos e as relacionadas a espécies eletrofílicas de halogênio estão entre as mais versáteis e poderosas. Em 2011, Jiao e col., reportaram a bromação do BODIPY **1** empregando 3 equivalentes de Br_2 , levando ao produto dibromado (**2**) em excelente rendimento (93%)², como apresentado no Esquema 2a. Já em 2016, Prasannan e col. demonstraram que ao utilizar *N*-bromosuccinimida (NBS) como fonte de Br^+ , em diclorometano e temperatura ambiente³ o BODIPY dibromado **2** é obtido em 65% de rendimento, juntamente com o mono-bromado (**3**), em 20% de rendimento, conforme Esquema 2b.

Figura 2. (a) Preparação de BODIPY's 2,6-dibromados via B₂. (b) Reação de BODIPY com NBS e formação de mistura de produtos mono- e di-bromados nas posições 2 e 6.



Para a cloração destes cromóforos, de forma análoga à bromação, é bastante comum a utilização de *N*-clorosuccinimida (NCS). Ao se reagir o BODIPY **4** com 3 equivalentes de NCS, os autores obtiveram o produto diclorado (**5**) em 85% de rendimento⁴ (Esquema 3). O mesmo produto (**7**) foi formado em 73% de rendimento⁵, ao se utilizar ácido tricloroisocianurico (TCCA) em ácido acético.

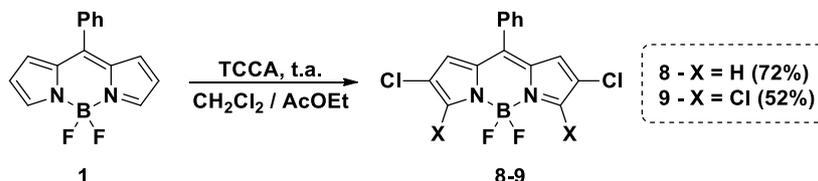
Figura 3. Cloração de BODIPY's via NCS e TCCA



Diante destes relatos de literatura, empregamos condições experimentais adequadas para preparar uma série de halogeno-BODIPY's à fim de utilizá-los como precursores na síntese de calcogeno-BODIPY's, destinados a atuarem como sondas de analitos ambientais e biológicos. Neste trabalho apresentaremos nossos resultados no tocante a preparação de BODIPY's clorados, sob diferentes condições experimentais.

Sessão Experimental

Esquema 1. Preparação de BODIPY's clorados via TCCA



Síntese do BODIPY diclorado 8: Em um balão de 25 mL adicionou-se o composto **1** (58 mg, 0,21 mmol), seguido de CH_2Cl_2 (10 mL) e AcOEt (5 mL). Em seguida, foi adicionado o TCCA (56 mg, 0,24 mmol, 1,1 eq.) e deixou-se sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora. A reação foi monitorada por CCD e ao final da conversão, a reação foi finalizada pela adição de água e salmoura (2 mL). A mistura bifásica foi separada e a fase aquosa, foi extraída com CH_2Cl_2 (3 x 10mL). As fases orgânicas foram reunidas e seca com MgSO_4 . Por fim o solvente foi removido por evaporação. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica de sílica, empregando como sistema eluente, uma solução 95:5 de hexano:acetato de etila, levando ao produto diclorado (**8**) em 72 % de rendimento.

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz, TMS): δ 6.84 (s, 2H); 7.51-7.57 (m, 4H); 7.63 (m, 1H); 7.82 (s, 2H).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz, TMS): δ 128.6; 128.7; 128.8; 128.9; 128.9; 130.4; 131.5; 132.8; 142.2.

Síntese do BODIPY tetraclorado 9: Em um balão de 25 mL adicionou-se o composto **1** (58 mg (0,21 mmol)) e dissolveu-o em CH_2Cl_2 (10 mL) e AcOEt (5 mL). Em seguida, foi adicionado o TCCA (112 mg (0,48 mmol – 2.2 eq.)) e deixou-se reagir por 1 hora. Por fim, a reação foi extraída com CH_2Cl_2 (3x 10mL) e H_2O com NaCl, secou-se com MgSO_4 e rotaevaporou-se o solvente. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica de sílica, com eluente (95:5 Hex: AcOEt), com um rendimento de 52 %.

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz, TMS): δ 6.90 (s, 2H); 7.47-7.49 (m, 2H); 7.53-7.57 (m, 2H); 7.61-7.64 (m, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz, TMS): δ 112.0; 128.9; 130.3; 131.5; 131.6; 131.7; 134.8; 135.2; 142.7.

Resultados e Discussão

Ao empregarmos as condições experimentais descritas neste trabalho, pudemos preparar BODIPY perclorados (**8**, X = H; **9**, X = Cl) sob condições experimentais amenas e com apenas 1,1 e 2,2 equivalente de TCCA, respectivamente. É importante observar que para nossas pretensões, a substituição de ácido acético, como descrito pelos autores⁵, por acetato de etila (solvente biodegradável) e diclorometano, permitiu a preparação de núcleos BODIPY mais funcionalizados, em apenas uma etapa reacional e em ótimos rendimentos. Inicialmente, realizamos a reação com 2,3

equivalentes de TCCA, conforme o procedimento experimental da literatura, contudo apesar do produto desejado ter sido formado, devida a baixa solubilidade de TCCA em diclorometano, o tempo de reação requerido foi bastante superior (> 4 horas). Ao se realizar a reação em uma mistura de acetato de etila e CH_2Cl_2 , (AcOEt 1:2 CH_2Cl_2), resultou maior solubilidade do TCCA, com concomitante diminuição de tempo requerido para formação do produto diclorado em mesma ordem de rendimento.

Conclusões

Diferentemente do reportado em literatura para cloração de BODIPY, sob as condições que empregamos, fomos capazes de preparar BODIPY's di- e tetraclorados simétricos. Do ponto de vista experimental, tanto a estequiometria, quanto a composição da mistura de solventes empregados, permitiram obter produtos com maior grau de funcionalização, com maior aproveitamento atômico, por parte do TCCA. Os produtos clorados foram devidamente caracterizados e empregados em reações subsequentes para preparar BODIPY's estruturalmente mais complexos funcionalizados tanto com átomos de cloro, quanto enxofre, selenio e telúrio, sendo que os átomos de cloro serviram como agentes de direcionamento das reações de calcogenação realizadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pela bolsa concedida (88887.343036/2019-00), à FAPESP pelo suporte financeiro (2018/24434-3) e ao Instituto de Química da USP pela estrutura de pesquisa e suporte para a realização deste trabalho.

Referências

1. Loudet, A.; Burgess, K. *Chemical Reviews*, **2007**, 4891-4932;
2. Jiao, L. et al. *Journal of Organic Chemistry*, **2011**, 9988-9996;
3. Prasannan, D. et al. *RSC Advances*, **2016**, 80808;
4. Duran-Sampedro, G. et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 6335-6350;
5. Zhao, N. et al. *Journal of Organic Chemistry*, **2015**, 8377-8383.

DESENVOLVIMENTO DE EQUIPAMENTO DE BAIXO CUSTO PARA DETERMINAÇÃO DE TAMANHO DE POROS E MOLHABILIDADE DE MATERIAIS POROSOS

Gabriel Felipe Rocha¹, Laíse M. Furtado¹, Denise F. S. Petri^{1,*}

¹ – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP
dfsp@usp.br

Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido um equipamento de baixo custo para determinar o tamanho médio de poros através do fenômeno de ascensão capilar. Medidas com sorção de n-hexano ou n-dodecano permitiram determinar o raio médio de filtros de papel comerciais e máscara cirúrgica descartável através da equação de Washburn. A partir do tamanho médio dos poros e de medidas de sorção de água foi possível determinar o ângulo de contato entre água e os papéis de filtro. Espera-se que alunos dos cursos de graduação do IQ- USP façam uso do aparelho construído neste trabalho, estudando diversos conceitos, tais como molhabilidade, interações intermoleculares, tensão superficial, capilaridade, e o método de Washburn.

Palavras-chave: molhabilidade, Washburn, Arduino, poros

Development of low cost equipment for determining pore size and wettability of porous materials

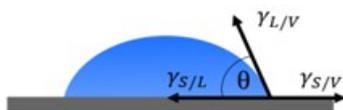
Abstract:

In this work, a low-cost equipment was constructed to determine the mean pore size by the capillary rise. Measurements of n-hexane or n-dodecane sorption allowed determining the mean pore size of commercial filter paper and disposable masks, by means of Washburn equation. From the mean pore size and measurements of water sorption, it was possible to determine the contact angle between water and filter papers. IQ-USP undergraduate students are expected to make use of the device built in this work, studying several concepts, such as wettability, intermolecular interactions, surface tension, capillarity, and the Washburn method.

Keywords: wettability, Washburn, Arduino, pores.

Introdução

A molhabilidade é um conceito relacionado à facilidade de um líquido se espalhar sobre uma superfície. A molhabilidade de uma superfície depende do balanço das forças coesivas do líquido e forças adesivas entre o líquido e a superfície^{1,2}. A equação de Young relaciona o ângulo de contato (θ) entre uma gota de líquido e uma superfície sólida homogênea e plana no equilíbrio^{1,2}:



$$\cos\theta = \frac{\gamma_{S/V} - \gamma_{S/L}}{\gamma_{L/V}} \quad (1)$$

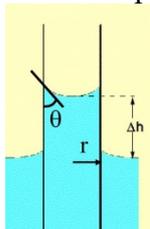
onde $\gamma_{S/L}$, $\gamma_{L/V}$ e $\gamma_{S/V}$ correspondem à tensão interfacial entre líquido e sólido, tensão superficial do líquido e energia superficial do sólido, respectivamente.

Valores de θ menores que 90° indicam molhabilidade espontânea, acima deste valor o líquido não molha o sólido, já em ângulo nulo o líquido molha completamente o sólido. Quanto mais favoráveis forem as interações entre as moléculas do líquido e o sólido menor será o valor de θ ^{1,2}.

O método da gota séssil não é adequado para medir θ de materiais porosos, porque os poros ficam preenchidos por ar, alterando o valor de θ . As medidas de ângulo de contato de materiais porosos devem ser feitas pelo método de sorção. A sorção de líquidos por materiais porosos envolve o fenômeno de ascensão capilar. Esse fenômeno é muito importante no transporte de seiva pelos finos capilares nas plantas e pode ser facilmente observado ao introduzir capilar fino de vidro em um recipiente contendo água. A água molha bem o vidro devidos às ligações de H com os grupos silanóis da superfície do vidro. Nestas situações, as forças adesivas são maiores que as forças coesivas. Se o raio (r) do capilar de vidro é pequeno, haverá a formação de um menisco curvo. Laplace mostrou que a pressão do lado côncavo ($P_{\text{côncavo}}$) de uma interface curva é sempre maior que a do lado convexo (P_{convexo}) e esta diferença de pressão depende da tensão superficial do líquido ($\gamma_{L/V}$) e do ângulo de contato entre a parede do capilar e do líquido^{1,2}:

$$P_{\text{côncavo}} - P_{\text{convexo}} = \frac{2\gamma_{L/V}}{r} \cos\theta \quad (2)$$

A diferença de pressão é compensada pela pressão hidrostática da coluna de líquido de altura Δh :



$$\Delta h \times \rho \times g = \frac{2\gamma}{r} \cos\theta \quad (3)$$

onde ρ e g são a densidade do líquido e a aceleração da gravidade, respectivamente.

A equação de Washburn deriva da combinação da equação de Laplace (eq. 2) (forças capilares) e da equação de Poiseuille (forças viscosas) para um fluido incompressível em fluxo laminar através de um cilindro de seção transversal de raio r constante^{1,2}:

$$\frac{h^2}{t} = \frac{r \gamma \cos\theta}{2\eta} \quad (4)$$

onde h é altura da coluna de líquido que subiu por capilaridade em um dado período de tempo t e η é a viscosidade do líquido.

Experimental

O equipamento foi desenvolvido com peças de Lego®, placa Arduino® e peças finas de madeira (**Figura 1a**). As análises foram realizadas com água destilada, n-hexano e dodecano fornecidos pela Labsynth. O equipamento foi utilizado para caracterizar papel de filtro com gramatura de 80 g/m² e 0,2 mm de espessura, e outro com gramatura de 250 g/m² e espessura de 0,5 mm, e a camada interna de máscara hospitalar de polipropileno (**Figura 1b**). As amostras foram cortadas em tiras de 10 cm de altura por 1 cm de largura e 10 cm de altura e 0,5 cm de largura para avaliar o efeito da área da fita de papel na ascensão capilar. Em seguida, as amostras foram fixadas na presilha, o líquido foi adicionado no copo dosador e posicionado na plataforma elevatória. A câmera do celular foi posicionada para a gravação da ascensão capilar, que durou ~ 90 s. Para a edição do vídeo foi utilizado

o software Windows Movie Maker (Microsoft), ele foi dividido em 20 frames, que foram convertidos em imagens pelo Free video to jpg converter. Com as imagens foram obtidos dados de h em função do tempo (t). Todos os ensaios foram realizados em duplicata, na temperatura de 23 ± 1 °C.

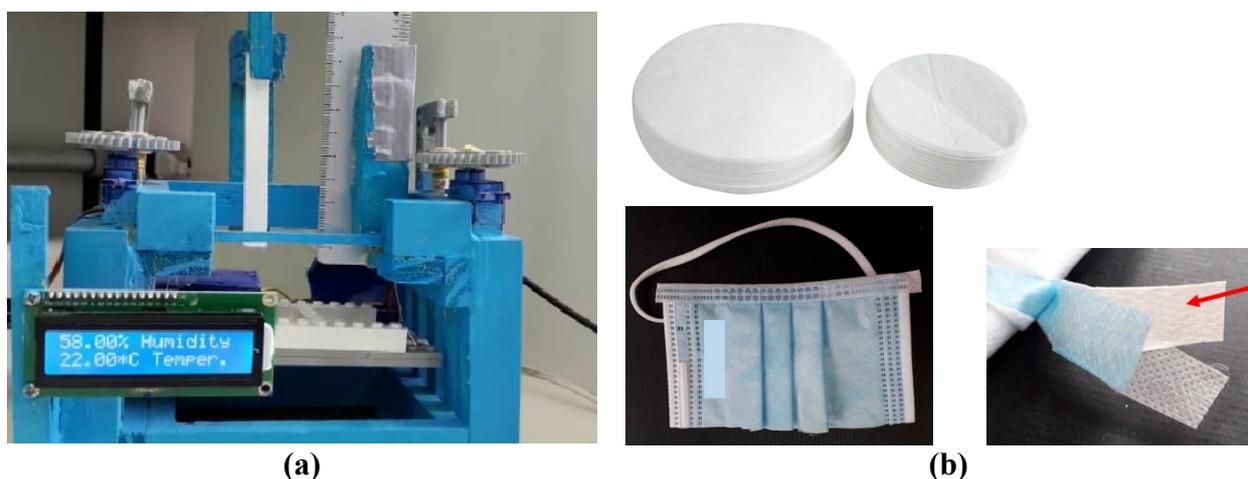


Figura 1. Fotografia (a) do equipamento automatizado desenvolvido com peças de Lego®, placa Arduino® e peças finas de madeira e (b) dos materiais porosos investigados.

Primeiramente, foram realizados ensaios com n-hexano ($\theta = 0^\circ$) e n-dodecano ($\theta = 0^\circ$), para estimar o raio médio (r) dos poros através da equação (4). Em seguida, foram realizadas medidas com água para determinação de θ . Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas para os três materiais recobertos com ouro (~ 5 nm) no microscópio Jeol Neoscope JCM-5000 operando com tensão de 10 kV para comparar o tamanho médio dos poros obtidos pelos dois métodos.

Resultados e Discussão

A **Figura 2** mostra os valores da altura da ascensão capilar do solvente no substrato ao quadrado (h^2) em função do tempo para o n-hexano para os dois tipos de filtros e a membrana interna da máscara. Em 23 ± 1 °C n-hexano³ apresenta γ_{LV} e η de $17,89 \times 10^{-3}$ N/m e $0,300 \times 10^{-3}$ Pa.s, respectivamente. Como o sistema é aberto e o n-hexano é volátil³ ($T_{\text{ebulição}} 69$ °C), a evaporação do n-hexano ao longo dos 90 s poderia abaixar a temperatura local. Por isso, algumas medidas foram feitas com n-dodecano³ que também possui baixa γ_{LV} ($17,89 \times 10^{-3}$ N/m) e η ($1,383 \times 10^{-3}$ Pa.s), mas é menos volátil³ ($T_{\text{ebulição}} 216,2$ °C). Os resultados experimentais obtidos com n-hexano e n-dodecano apresentaram diferenças menores que 10%. Desta forma, somente os resultados com n-hexano serão apresentados e discutidos. A variação de h^2 com t foi linear para os dois tipos de papel de filtro. A partir dos valores de inclinação das retas foram estimados os valores de raio médio dos poros para os papéis de filtro de gramaturas 250 g/m² e 80 g/m² como sendo $0,195 \mu\text{m} \pm 0,002 \mu\text{m}$ e $0,084 \mu\text{m} \pm 0,005 \mu\text{m}$, respectivamente. A ascensão capilar na máscara apresentou um processo mais rápido até 30 s e um segundo estágio mais lento de 40 s a 90 s, evidenciado pelas inclinações das retas. A partir do processo mais rápido, foram obtidos valores de raio médio de $0,92 \pm 0,08 \mu\text{m}$ e do processo mais lento, poros de tamanho médio de $0,236 \pm 0,019 \mu\text{m}$.

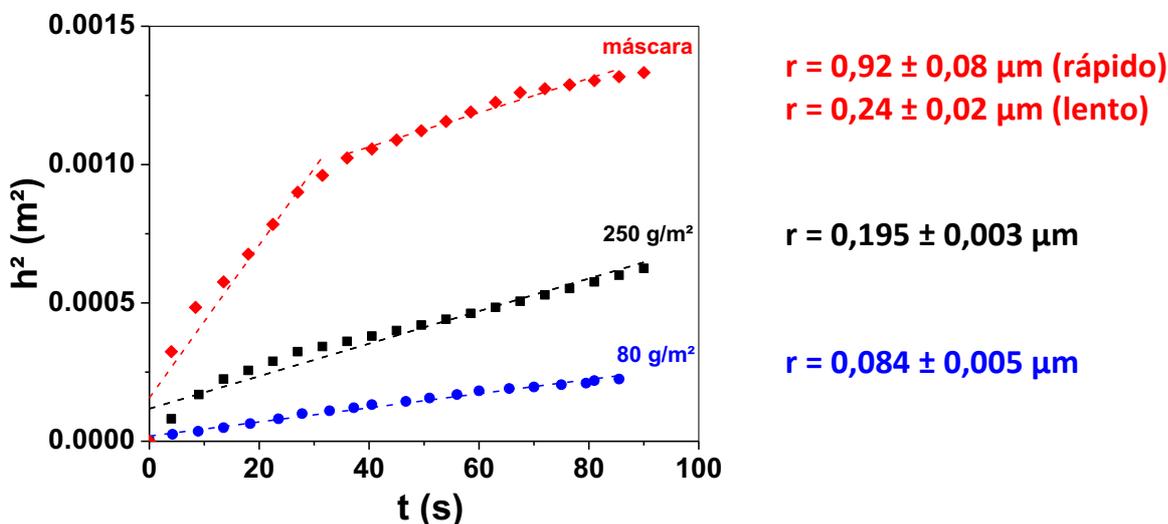


Figura 2. Valores de h^2 (m^2) em função de t (s) para n-hexano no papel de filtro de 250 g/m^2 (símbolo preto), 80 g/m^2 (símbolo azul) e máscara (símbolo vermelho); valores de coeficientes angulares são $5,88 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ (250 g/m^2), $2,56 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ (80 g/m^2) e para máscara, $2,76 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}$ no estágio rápido e $6,18 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ no estágio lento. Os valores de raio médio de poro estão indicados.

Os experimentos de ascensão capilar com água foram realizados para determinar o ângulo de contato θ entre água e o papel, para avaliar a molhabilidade dos materiais. A água não molhou a membrana interna da máscara porque é feita de polipropileno (PP), material muito hidrofóbico. Por outro lado, para os papéis de filtro de 250 g/m^2 e 80 g/m^2 foram determinados valores de $\cos\theta = 0,987$ ($\theta = 9^\circ$) e $\cos\theta = 1,007$ ($\theta \sim 0^\circ$), respectivamente. Indicando que os papéis de filtro são altamente hidrofílicos, como esperado.

A **Figura 3** mostra as imagens de MEV obtidas para os três materiais. As fibras celulósicas nas **Figuras 3 (a)** e **(b)** apresentam maior rugosidade, do que as fibras de PP (**Figura 3c**). As fibras de PP de espessura $\sim 10 \mu\text{m}$ se sobrepõem formando uma malha com uma larga distribuição de tamanho de poros, muitos sendo micrométricos. Sabendo que o corona vírus⁴ tem dimensões de 50 a 200 nm, é mais adequado adicionar mais uma camada de filtro (de papel, por exemplo) para que as fibras cruzadas criem poros menores e dificultem a passagem do vírus. Os valores de raio médio de poro determinados por ascensão capilar para a máscara com fibras de PP foram de $0,92 \pm 0,08 \mu\text{m}$ e $0,236 \pm 0,019 \mu\text{m}$, indicando que o método é sensível para uma faixa submicrométrica de poros. O papéis de filtro de 250 g/m^2 e 80 g/m^2 apresentam dimensões dos espaços entre as fibras bem variadas. O tamanho médio dos poros informado pelo fabricante é de $18 \mu\text{m}$ e $26 \mu\text{m}$, respectivamente. Esse tamanho médio indicado pelo fabricante é determinado por porômetro, aparelho que mede a pressão necessária para a primeira bolha de ar atravessar os poros⁵. A pressão é inversamente proporcional ao raio do poro (eq. 2). Os raios médios de poro determinados pelo método de Washburn com n-hexano para os filtros 250 g/m^2 e 80 g/m^2 foram $0,195 \mu\text{m} \pm 0,003 \mu\text{m}$ e $0,084 \mu\text{m} \pm 0,005 \mu\text{m}$, respectivamente, e correspondem provavelmente ao tamanho de poros na estrutura das fibras celulósicas e não ao espaço vazio entre as fibras.

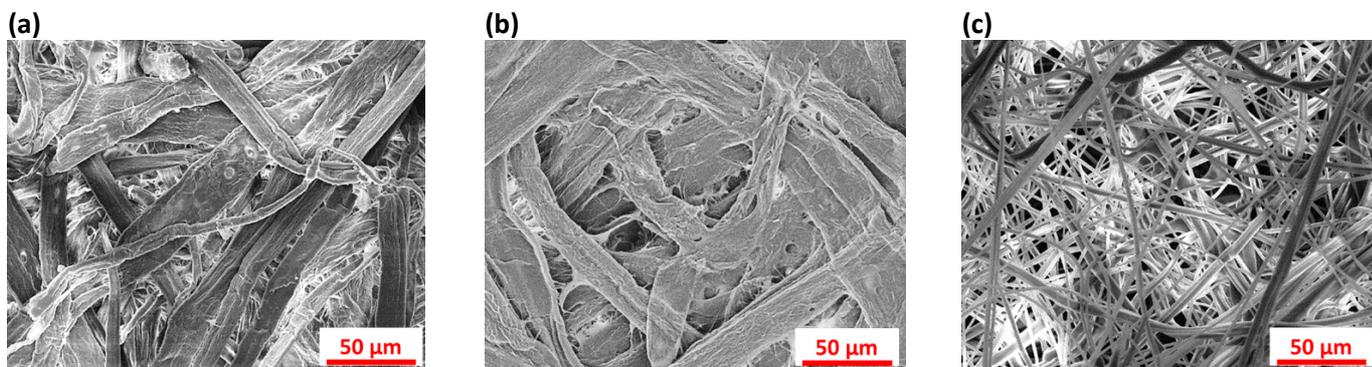


Figura 3. Imagens de MEV para filtro de papel com gramatura (a) 250 g/m² e (b) 80 g/m² e (c) membrana interna de polipropileno (PP) da máscara hospitalar.

Conclusões

A instrumentação de baixo custo (~ US\$ 100) aliada à câmera do celular, se mostrou eficiente para medidas reprodutíveis de ângulo de contato de materiais celulósicos porosos. Os baixos valores de ângulo de contato encontrados para água em papéis de filtro são condizentes com a alta molhabilidade dos materiais pela água, mostrando que a instrumentação é confiável para medidas de molhabilidade de materiais porosos. Os tamanhos médios de poro determinados por ascensão capilar ficaram aproximadamente duas ordens de grandeza abaixo dos valores nominais determinados por porômetro. A principal diferença é que na ascensão capilar o n-hexano (ou n-dodecano) permeia livremente por todos os poros micrométricos e sub-micrométricos, enquanto no porômetro, ar comprimido é pressionado para atravessar o papel de filtro, o que faz com o que o ar procure os caminhos mais fáceis, ou seja, os maiores poros. As análises de MEV revelaram que os poros nos papéis de filtro e membrana interna da máscara são vazios formados pela sobreposição de fibras naturais ou sintéticas.

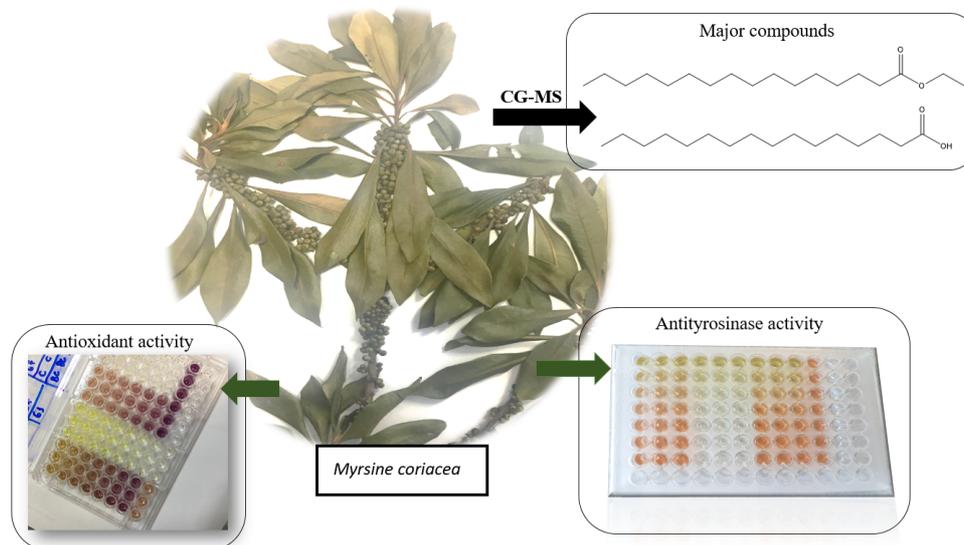
Agradecimentos

Agradecimento ao Programa Unificado de Bolsas da USP, Projeto 141-Desenvolvimento de novos experimentos para compreensão de equilíbrio químico e capilaridade. LMF e DFSP agradecem ao CNPq (171250/2017, 306848/2017 e 421014/2018-0) pelo suporte financeiro.

Referências

1. Kontogeorgis, G.M.; Kill, S. Introduction to Applied Colloid and Surface Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, 2016.
2. Berg, J. C. An Introduction to Interfaces and Colloids: The Bridge to Nanoscience, 2010, World Scientific Publishing, Singapore, 2010.
3. West, R. C.; Astle, M.J.; Beyer, W.H. CRC Handbook of chemistry and physics. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1985.
4. Chen, N. et al. *Lancet* **2020**, 395, 507-513.
5. Norma técnica ASTM F316-03 176 2019.

Graphical Abstract



Evaluation of antioxidant and antityrosinase activity of *Myrsine coriacea*

ATIVIDADE ANTITIROSinASE E ANTIOXIDANTE DE *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. (PRIMULACEAE)

Emanoella S. de Almeida^{1*}, Paulo Roberto H. Moreno^{2*}

¹ – Programa de Pós-Graduação de Fármaco e Medicamentos - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP
emanoellasalmeidai@usp.br

² – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP
prmoreno@iq.usp.br

Resumo: *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. (Primulaceae) conhecida popularmente como capororoquinha ou capororoca, se destaca das demais por ser a espécie mais encontrada no Brasil, trata-se de uma espécie nativa de fácil adaptação, encontrada nas regiões Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. Anteriormente foi evidenciado quanto à atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, como também a identificação de ácidos mirsinóicos em cascas de seus caules, ramos e folhas, além de seus derivados semi-sintéticos. Vale ressaltar que são escassos de estudos sobre o perfil fitoquímico e as propriedades farmacológicas na literatura da espécie. Atualmente a indústria cosmética tem uma demanda de novos ativos naturais para o tratamento da hiperpigmentação. Assim, este trabalho teve como objetivos avaliar o potencial antityrosinase e antioxidante de extratos e frações de *M. coriacea* e identificar os possíveis compostos responsáveis por essas atividades. As partes aéreas da espécie vegetal foram coletadas em Osasco/SP. Os extratos brutos de folhas, frutos e caules foram preparados por maceração, durante 72 horas, em solução hidro-etanólica 70% seguido de turbólise. O solvente foi eliminado em rota-evaporador à vácuo e a umidade remanescente eliminada em chapa aquecida a 60°C. Os extratos brutos foram particionados por extração sólido-líquido com solventes de polaridades crescentes (hexano, clorofórmio e acetato de etila). A composição química das frações foi determinada por CG-EM. A determinação da capacidade antioxidante foi feita pelo método de sequestro do radical DPPH. A inibição da enzima tirosinase foi determinada pela oxidação de *L*-DOPA para dopacromo. Através da análise por CG-EM foi possível identificar 34 compostos nas frações das diferentes partes de *M. coriacea*. O hexadecanoato de etila e o ácido hexadecanoico foram os compostos majoritários. A atividade antioxidante das amostras variou entre 16,56 e 198,15 µg/mL, a maior atividade foi encontrada no extrato bruto dos frutos com CI₅₀ de 16,56 ± 1,2 µg/mL. A capacidade de inibição da atividade tirosinase variou entre 40,94–10,21% para a concentração de 1 mg/mL de extratos e frações, o extrato bruto dos frutos foi o mais potente na inibição da enzima (40,94%), seguido da fração de acetato de etila do caule (38,83%) e da fração de clorofórmio do caule (34,93%). Das amostras testadas, o extrato bruto dos frutos, fração de acetato de etila e clorofórmio dos caules apresentaram um bom potencial antioxidante e inibidor da tirosinase, essas

amostras serão analisadas criteriosamente nas etapas seguintes desse estudo, com uma análise dos compostos químicos presentes nessas amostras, o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, em seguida será feito um ensaio *in silico* de acoplamento molecular, para direcionar os compostos bioativos que possivelmente serão considerados como candidatos a novos ativos contra a hiperpigmentação da pele.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Inibidores da tirosinase; *Myrsine coriacea*.

ANTITYROSINASE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. (PRIMULACEAE)

Abstract: *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. (Primulaceae) popularly known as capororoquinha or capororooca, stands out from the others for being the most found species in Brazil, it is a native species of easy adaptation, found in the Northeast, Midwest, Southeast and South regions of Brazil. Previously, it was evidenced regarding its anti-inflammatory, antimicrobial activity, as well as the identification of myrsinoic acids in the bark of its stems, branches and leaves, in addition to its semi-synthetic derivatives. It is noteworthy that there are few studies on the phytochemical profile and pharmacological properties in the literature of the species. Currently, the cosmetic industry has a demand for new natural actives for the treatment of hyperpigmentation. Thus, this work aimed to evaluate the antityrosinase and antioxidant potential of extracts and fractions of *M. coriacea* and identify the possible compounds responsible for these activities. The aerial parts of the plant species were collected in Osasco/SP. The crude extracts of leaves, fruits and stems were prepared by maceration, for 72 hours, in a 70% hydro-ethanolic solution followed by turbolysis. The solvent was eliminated in a vacuum rota-evaporator and the remaining moisture eliminated in a plate heated to 60°C. The crude extracts were partitioned by solid-liquid extraction with increasing polarity solvents (hexane, chloroform and ethyl acetate). The chemical composition of the fractions was determined by GC-MS. The determination of the antioxidant capacity was made by the DPPH radical scavenging method. Inhibition of the tyrosinase enzyme was determined by the oxidation of L-DOPA to dopachrome. Through GC-MS analysis it was possible to identify 34 compounds in the fractions of different parts of *M. coriacea*. Ethyl hexadecanoate and hexadecanoic acid were the major compounds. The antioxidant activity of the samples ranged between 16.56 - 198.15 µg/mL, the highest activity was found in the crude extract of fruits with IC₅₀ of 16.56 ± 1.2 µg/mL. The capacity to inhibit tyrosinase activity varied between 40.94–10.21% for the concentration of 1 mg/mL of extracts and fractions, the crude fruit extract was the most potent in inhibiting the enzyme (40.94%), followed by the stem ethyl acetate fraction (38.83%) and the stem chloroform fraction (34.93%). Of the tested samples, the crude extract of the fruits, ethyl acetate fraction and the chloroform of the stems showed a good antioxidant and tyrosinase inhibitory potential, these samples will be carefully analyzed in the following steps of this study, with an analysis of the chemical compounds present in these samples, the content of phenolic compounds and total flavonoids, then an *in silico* molecular coupling assay will be performed, to target the bioactive compounds that will possibly be considered as candidates for new actives against skin hyperpigmentation.

Keywords: Antioxidant activity; Tyrosinase inhibitors; *Myrsine coriacea*.

Introdução

A riqueza da genética vegetal que o Brasil apresenta é algo fascinante, tornando-o o país com a maior diversidade de plantas do mundo, com alta predominância de espécies endêmicas¹. A respeito disso, fica evidente o quão o país pode aplicar esses dados na busca de novos compostos bioativos, no combate das inúmeras patologias que necessitam de tratamentos seguros, eficazes e com qualidade, para as distintas enfermidades². Neste sentido, vale ressaltar que pouco se sabe sobre as espécies pertencentes a Primulaceae encontradas no Brasil, uma família que representa interesse medicinal, por acumularem derivados de benzoquinona³. *Myrsine* L. encontra-se dentro dessa família, conhecidas popularmente como capororoquinha ou capororooca. Conforme os dados da literatura, benzilisoquinonas e triterpenoides são componentes conhecidos neste gênero^{4,5}. Dentre as espécies do gênero, *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult.) se destaca das demais por ser a espécie mais encontrada no Brasil⁶, trata-se de uma espécie nativa de fácil adaptação, encontrada nas regiões

Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul do Brasil^{4,5}. Foi avaliada anteriormente, quanto à atividade antiinflamatória^{4,5}, antimicrobiana⁷, como também a identificação de ácidos mirsinóicos em cascas de seus caules⁸, ramos e folhas⁹, além de seus derivados semissintéticos. Vale ressaltar que são escassos de estudos sobre o perfil fitoquímico e as propriedades farmacológicas na literatura. O emprego dos produtos naturais, abrange várias formas de administração farmacêutica, o que desperta o interesse das indústrias de cosméticos nesse ramo. A área de cosméticos apresenta um vasto crescimento exponencial, em paralelo, a busca constante de novos compostos para dar origem a produtos de alta qualidade e benefícios ao paciente. Dentre os produtos de interesse, destacam-se os produtos cosméticos de grau 2, cujas formulações apresentam princípios ativos capazes de proporcionar o tratamento de distúrbios fisiológicos da pele, como o melasma, eczema, acne, sinais de idade, combate dos radicais livres e outros¹⁰. Sendo os distúrbios pigmentares o terceiro transtorno dermatológico mais comum no mundo, além disso, as alternativas de tratamentos existentes tornam o quadro mais preocupante, por não existir alternativas de tratamento medicamentoso para as referidas patologias¹¹.

Tendo em vista a busca de novos fármacos para o tratamento da hiperpigmentação, esse trabalho tem como objetivos avaliar o potencial antitirozinase e antioxidante de extratos e frações de *M. coriacea* e identificar os possíveis compostos responsáveis por essa atividade.

Experimental

Coleta e identificação

A espécie vegetal foi coletada em Osasco estado de São Paulo. Posteriormente foi encaminhada para identificação botânica, pela Dra. Inês Cordeiro, tendo as exsiccatas (MORENO 604) depositadas no Herbário do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo.

Preparo dos extratos brutos e frações

O material foi seco em uma estufa de ar circulante na temperatura de 40°C, depois foi colocado em um moinho de facas, para obter o pó. Posteriormente, o pó foi submetido à extração por maceração durante 72 horas, seguido de turbólise utilizando solução hidro-etanólica 70% como solvente. O solvente foi eliminado em rota-evaporador à vácuo e a umidade remanescente eliminada em chapa aquecida a 60°C. Os extratos brutos foram particionados por extração sólido-líquido com solventes de polaridades crescentes (hexano, clorofórmio e acetato de etila).

Análises por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

A análise da composição química foi realizada em um CG-EM Agilent® (série 6890) acoplado a espectrômetro de massas, com sistema quadrupolo (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector). A coluna capilar utilizada foi DB-5 (30m x 0,25mm de diâmetro interno, 0,25µm), o gás de arraste utilizado foi Hélio, com fluxo contínuo de 1 mL/min; a energia de ionização empregada foi de 70 eV e o volume de injeção de amostra, cuja concentração era de aproximadamente 0,1 mg/mL, foi igual a 2,0µL. A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros de massas obtidos e índices de retenção linear calculados por comparação com uma série homóloga de *n*-alcanos dos espectros de massas encontrados em dados da literatura e na biblioteca do equipamento¹².

Determinação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante e de concentração inibitória 50% do oxidante (CI₅₀) com o método colorimétrico em microplaca, utilizando o ácido 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)¹³. A quercetina di-hidratada (98%) foi utilizada como controle positivo. O controle do branco foi o metanol. A leitura das microplacas foi em λ de 520nm.

Determinação da atividade inibitória de tirosinase

A capacidade de inibição da ação catalítica da tirosinase na oxidação de L-DOPA para dopacromo foi determinada através de método enzimático em microplaca¹⁴. O ácido kójico foi utilizado como controle positivo. A leitura da absorbância foi em λ de 475nm.

Resultados e Discussão

Foram analisadas 9 amostras por CG-EM onde foi possível identificar 34 compostos nas frações das diferentes partes de *M. coriacea*. O hexadecanoato de etila (Figura 1a) e o ácido hexadecanóico (Figura 1b) foram os compostos majoritários, tendo o hexadecanoato de etila presente em todas as amostras, sendo a maior quantidade encontrada na fração de hexano dos frutos (53,24%). Adicionalmente, em todas as amostras dos frutos este composto foi um dos majoritários. A maior quantidade do ácido hexadecanóico esteve presente na amostra da fração de clorofórmio do caule (28,51%). Vale ressaltar a presença do composto octadeca-9,12-dienoato de etila na fração de hexano dos frutos com 27,33% da composição desta amostra, diferente do hexadecanoato de etila e o ácido hexadecanóico, o octadeca-9,12-dienoato de etila possui uma cadeia insaturada.

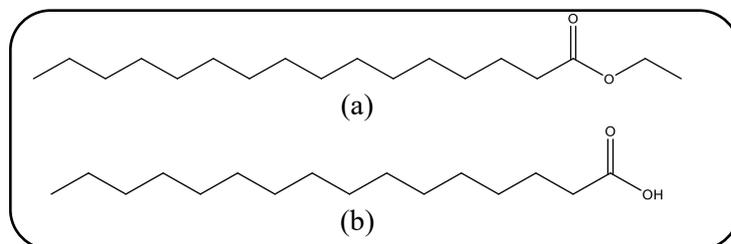


Figura 1 – Compostos majoritários (a) hexadecanoato de etila e (b) ácido hexadecanóico.

A atividade antioxidante dos extratos brutos e frações resultou no total de 12 amostras avaliadas, dessas a melhor atividade antioxidante foi do extrato bruto dos frutos com CI₅₀ de $16,56 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, seguindo da fração de clorofórmio do caule (CI₅₀ $23,4 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$), sendo que as amostras das frações com hexano tiveram as menores atividades antioxidantes, a menor delas foi a amostra das folhas com CI₅₀ $198,15 \pm 2,5 \mu\text{g/mL}$. Os resultados da atividade antioxidante estão dispostos na Tabela 1.

A capacidade de inibição da atividade tirosinase variou entre 40,94–10,21% (Tabela 2) para a concentração de 1mg/mL de extratos e frações, o extrato bruto dos frutos foi o mais potente na inibição da enzima (40,94%), seguido da fração de acetato de etila do caule (38,83%) e da fração de clorofórmio do caule (34,93%).

Tabela 1– Valores de CI_{50} do sequestro do radical livre DPPH expressos em $\mu\text{g/mL}$.

AMOSTRAS	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
EB CAULES	25,57 \pm 1,39
EB FOLHAS	24,30 \pm 0,49
EB FRUTOS	16,56 \pm 1,17
Fr Hexano CAULES	134,87 \pm 6,90
Fr Hexano FOLHAS	198,15 \pm 2,54
Fr Hexano FRUTOS	170,17 \pm 10,53
Fr Clorofórmio CAULES	23,40 \pm 2,76
Fr Clorofórmio FOLHAS	153,00 \pm 9,45
Fr Clorofórmio FRUTOS	48,17 \pm 8,39
Fr Acetato de etila CAULE	36,00 \pm 1,95
Fr Acetato de etila FOLHAS	31,88 \pm 1,11
Fr Acetato de etila FRUTOS	43,34 \pm 0,90
Quercetina	2,98 \pm 0,20

EB – Extrato Bruto; Fr – Fração.

Tabela 2 – Valores da atividade antitirosinase das amostras de *M. coriacea*.

AMOSTRAS	ATIVIDADE ANTITIROSinASE
	(%)
EB CAULES	34,60 \pm 5,56
EB FOLHAS	19,87 \pm 2,45
EB FRUTOS	40,94 \pm 5,12
Fr Hexano CAULES	18,81 \pm 6,78
Fr Hexano FOLHAS	10,21 \pm 2,51
Fr Hexano FRUTOS	18,85 \pm 2,27
Fr Clorofórmio CAULES	34,93 \pm 1,81
Fr Clorofórmio FOLHAS	31,10 \pm 3,85
Fr Clorofórmio FRUTAS	21,72 \pm 8,74
Fr Acetato de etila CAULES	38,83 \pm 4,24
Fr Acetato de etila FOLHAS	27,00 \pm 3,23
Fr Acetato de etila FRUTOS	22,43 \pm 5,79

EB – Extrato Bruto; Fr – Fração.

Conclusões

O extrato bruto dos frutos obteve um bom potencial antioxidante como também foi capaz de inibir da tirosinase *in vitro*, além dessa amostra a fração de acetato de etila e clorofórmio dos caules resultaram em um bom percentual de inibição da enzima, como também as duas amostras apresentaram uma boa atividade antioxidante. Essas três amostras mostraram-se promissoras para as atividades farmacológicas nesta pesquisa, sendo elas, analisadas criteriosamente nas etapas seguintes desse

estudo, serão analisados os compostos químicos presentes nessas amostras, o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, em seguida será feito um ensaio *in silico* de acoplamento molecular, para direcionar os compostos bioativos que possivelmente possa ser considerados como candidatos a novos ativos contra a hiperpigmentação da pele.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio financeiro da CAPES.

Referências

1. Maia, L. C. et al.; *Rodriguesia* **2015**, 66(4), 1033-1045.
2. Ramos, M. F. D. S.; Vaucher, A. C.; *Revista Fitos* **2018**, 12(3).
3. Luna, B. N. et al.; *Botany* **2014**, 92(10), 757–766.
4. Dal Mas, J. et al. *Int. J. Nanomed.* **2016**, 11, 4495–4507.
5. Hess, S. et al. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, 33, 209–215.
6. Freitas, M. F.; Kinoshita, L. S.; *Rodriguesia* **2015**, 66(1), 167–189.
7. Burger, M.C. et al. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2015**, 25, 451-454.
8. Baccarin, T. et al. *Talanta* **2011**, 85, 1221–1224.
9. Zermiane, T. et al. *Arab. J. Chem.* **2016**, 9, 872-881.
10. Hubert, J. et al.; *Planta Medica* **2016**, 82, 1351-1358.
11. Sofer, B. et al.; *Skin Therapy Letter* **2016**, 21(1), 1-7.
12. Assis, C. M. et al.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, 19(2B), 626-631.
13. Brand-Williams, W. et al.; *Lebensm Wiss Technology* **1995**, 28, 25-30.
14. Macrini, D. J. et al.; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, 45(2), 715-721.

IDENTIFICAÇÃO DE EXTRAÍVEIS VOLÁTEIS PRESENTES NA EMBALAGEM PRIMÁRIA DE UM SPRAY NASAL

Ângela Oliveira Francisco^{1,2*}, Celso Blatt³, Daniele de Souza Freitas², Paulo R. H. Moreno^{1*}

1 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

2 – Ache Laboratórios Farmacêuticos

3 – Agilent Technologies do Brasil

prmoreno@iq.usp.br; angela.francisco@ache.com.br

Resumo: Extraíveis são substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, liberadas de um sistema de embalagem utilizado para acondicionar um medicamento, em condições de laboratório. Essas substâncias têm o potencial de lixiviar para um produto farmacêutico nas condições normais de armazenamento durante seu período de validade, sendo portanto, denominadas de lixiviáveis. Este trabalho investigou a composição química de origem volátil presente nos componentes individuais do material de embalagem de um spray nasal em análise por *headspace* em cromatógrafo a gás acoplado à espectrometria de massas (CG-EM). A identificação destes compostos foi obtida através da comparação dos índices de retenção linear, dos espectros de massa obtidos com as bibliotecas instaladas no equipamento e da literatura, utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos, analisada nas mesmas condições experimentais. Os principais compostos presentes em todos os componentes foram dodecano e tetradecano, seguidos de decano e 2, 2, 4, 6, 6-pentametil-heptano. Estes resultados possibilitam uma correlação com os potenciais lixiviáveis, para estabelecer um protocolo de controle de qualidade para o acompanhamento destas substâncias no medicamento, aumentando sua segurança e eficácia, através da avaliação da sua toxicidade, se presentes no medicamento.

Palavras-chave: *spray nasal, compostos voláteis, extraíveis, índice de retenção linear.*

IDENTIFICATION OF VOLATILE EXTRACTABLES IN THE PRIMARY PACKAGING OF A NASAL SPRAY

Abstract: Extractables are organic and inorganic chemical substances, released from a packaging system, under laboratory conditions. These substances have potential to leach into a pharmaceutical product under normal storage conditions during its shelf life, being called by leachables. This work investigated the chemical composition of volatile origin present in the individual components of the packaging material of a nasal spray, which were packaged in a vial and analyzed by *headspace* in a gas chromatograph coupled to mass spectrometry (GC-MS). The identification of these compounds was obtained by a comparison between linear retention index, the mass spectra obtained with the libraries installed in the equipment (NIST 08/Willey 2014) and literature, using a homologous series of *b*-alkanes (Sigma Aldrich, C8 -C40), analyzed under the same experimental conditions. The main compounds present in all components were dodecane and tetradecane, followed by decane and heptane, 2, 2, 4, 6, 6-pentamethyl. These results enable a correlation with the potential leachables, and to establish a quality control protocol for monitoring these substances in the drug, increasing its safety and efficacy, through the assessment of their toxicity, if present in the drug.

Keywords: *nasal spray, volatile compounds, extractables, linear retention index.*

Introdução

O sistema de embalagem deve ser adequado para o seu objetivo de uso, ou seja, deve proteger adequadamente a forma farmacêutica; ser compatível com a dosagem; ter em sua composição materiais considerados seguros para uso conforme a dosagem e a via de administração. Além disso, muitos desses dispositivos são projetados para liberar adequadamente o número de doses, e portanto, precisam demonstrar conformidade de desempenho.¹

Uma variedade de materiais, como vidro, metais, materiais sintéticos ou polímeros naturais são usados para fabricar componentes de embalagem e dispositivos médicos. Destes, os mais frequentemente utilizados são provavelmente materiais poliméricos, isto é, materiais que consistem em moléculas de cadeia longa e/ou reticulada, compostas por unidades chamadas monômeros.²

Uma impureza é qualquer componente do medicamento que não seja a substância medicamentosa ou um excipiente. Durante a produção e armazenamento do medicamento, podem ocorrer impurezas desde o processo de fabricação, devido à falta de estabilidade da substância medicamentosa, ou como resultado de incompatibilidade com excipientes. Impurezas podem ser classificadas nos seguintes grupos: impurezas orgânicas (voláteis, semi-voláteis e não voláteis), impurezas inorgânicas e solventes residuais.² Alguns componentes provenientes do processo de manufatura do material de embalagem podem migrar para o produto farmacêutico, formando uma classe de impurezas conhecidas como lixiviáveis.³ Já os extraíveis são substâncias químicas orgânicas e inorgânicas que são liberadas de um sistema de embalagem, em um solvente de extração em condições de laboratório. Essas substâncias têm o potencial de lixiviar para um produto farmacêutico nas condições normais de armazenamento e no seu período de validade, sendo, portanto, denominadas de lixiviáveis.⁴

A via de administração deve ser considerada ao avaliar o risco potencial de um lixiviável, porque sua toxicidade depende da rota de entrada no organismo. Por exemplo, um mesmo composto pode ser oralmente ingerido com segurança em determinados níveis pré-estabelecidos, mas pode ter um efeito tóxico se o mesmo nível for inalado diretamente nos pulmões. As vias de administração de maior preocupação são as vias inalatória, injetável, seguida da oftálmica, transdérmica e nasal.⁵

Com a finalidade de otimizar os resultados são empregados métodos ortogonais para maximizar a probabilidade de que todos os extraíveis predominantes sejam detectados e devidamente avaliados.⁶ A primeira abordagem é avaliar os componentes voláteis presentes em um sistema de embalagem, pois há probabilidade de que esses compostos lixiviem para a formulação. O método mais usado nessa análise é o *headspace* em cromatógrafo a gás acoplado à espectrometria de massas (CG-EM).

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho é identificar as substâncias voláteis presentes nos materiais poliméricos que compõem o sistema de embalagem primária de uma formulação aquosa de um glicocorticoide de uso nasal. O spray nasal proposto neste estudo, possui um sistema de embalagem primária composto por material polimérico e metálico, sendo frasco de polietileno (PE), válvula de polipropileno (PP), copolímero de etileno com acetato de vinila (EVA) e fios de prata. Com esses resultados teremos os primeiros passos para propor um protocolo de controle de qualidade para o acompanhamento destas substâncias, aumentando sua segurança e eficácia, através da avaliação da toxicidade dos lixiviáveis, se presentes no medicamento.

Experimental

O sistema de embalagem completo, e a nomenclatura referente a cada componente do material de embalagem analisado, são indicados na Figura 1.

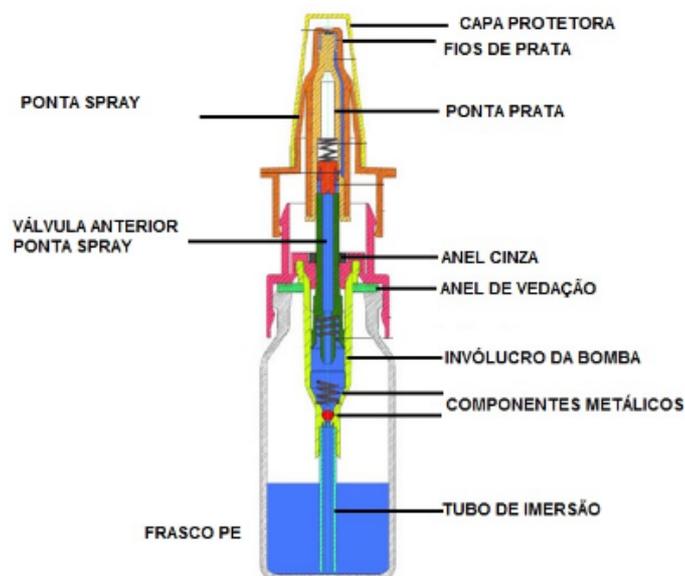


Figura 1 – Sistema de embalagem do spray nasal, adaptado ⁷

Os frascos para análise de *headspace* foram previamente descontaminados por aquecimento em estufa à 300°C. Os componentes foram então pesados e acondicionados, sendo 1 componente inteiro por frasco, exceto para o frasco de PE, com massas que variam de 0,016g até 3,0g, em triplicata, conforme Figura 2:



Figura 2 – Acondicionamento dos componentes individuais para análise por *headspace* em cromatógrafo a gás acoplado à espectrometria de massas

Os componentes foram analisados individualmente por *Headspace* 7697A em Cromatógrafo a gás Agilent 7890B Series GC (Agilent Santa Clara, CA, USA) acoplado a detector de massas 5977B Quadrupolo (Agilent Santa Clara, CA, USA) e equipado com coluna HP-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA). As condições cromatográficas seguiram conforme descrito: 40°C por 1 minuto, com aquecimento subsequente de 10°C/minuto até 300°C, manteve-se esta temperatura final por 10 minutos; gás de arraste Hélio fluxo de 1,2 mL/minuto; temperatura do injetor de 125°C; modo split 1:20, liner 250µL, temperatura do forno 120°C por 30 minutos, tempo de aquecimento dos vials 30 minutos, temperatura da primeira linha de transferência 130°C, temperatura da segunda linha de transferência 310°C, fonte de ionização por elétrons 70 eV,

temperatura da fonte 300°C, temperatura do quadrupolo 150°C, intervalo de detecção do MS 33-600 (m/z).

O índice de retenção de linear (IR) foi calculado de acordo com Dool e Kratz⁸, utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (Sigma Aldrich, C8-C40) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica das amostras. A identificação dos compostos voláteis foi realizada através da comparação dos índices de retenção, espectros de massa obtidos com as bibliotecas instaladas no equipamento (NIST 08/Willey 2014) e literatura^{9,10}.

A avaliação de toxicidade para os compostos identificados foi feita através do software de predição *in silico* Derek/Sarah[®] da Lhasa Limited (Leeds, Reino Unido, Nexus 2.3.0).

Resultados e discussão

A Tabela 1 contém a composição química encontrada para os compostos voláteis presentes no material polimérico, obtidos por componente individual do material de embalagem. Os compostos com menos de 8 carbonos não tiveram seus índices de retenção calculados, pois o primeiro alcano da série de padrões foi o *n*-octano cujo índice de retenção é 800.

Os compostos dodecano e tetradecano foram obtidos em todos os componentes individuais do sistema de embalagem, seguidos de decano e 2, 2, 4, 6, 6-pentametil-heptano, ausentes apenas no frasco de polietileno. A maioria dos compostos listados na Tabela 1 são hidrocarbonetos alifáticos, provenientes do processo de síntese dos componentes poliméricos.

Tabela 1. Compostos voláteis identificados em CG-EM pela biblioteca de espectros de massa e índice de retenção linear

Composto	IR ^a	IR _{Lit.} ^b	Parte da Embalagem								
			% Área								
			PE	TI	IB	AV	AC	VPS	PP	PS	
2-metil-1-penteno*	-	584	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-
1,3,5-trioxano*	-	650	-	-	-	-	-	-	-	-	6,1
Heptano*	-	700	-	-	2,0	2,9	0,5	-	-	-	-
4-metil-heptano*	-	764	-	-	-	-	-	-	-	4,6	-
2,4-dimetil-1-heptano	822	822	-	-	17,6	-	-	-	-	-	-
2,4-dimetil-1-hepteno	841	842	-	-	-	-	-	-	-	12,0	-
4-metil-octano	861	864	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-
2, 2, 4, 6, 6-pentametil-heptano	993	995	-	9,9	6,9	6,6	12,4	3,9	3,1	7,9	-
decano	1001	1000	-	7,0	4,9	6,7	18,7	7,4	7,7	5,0	-
NI	1011	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	-
NI	1014	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
2,6-dimetil-nonano	1015	1022	-	-	-	-	-	-	-	2,4	-
2,2,4,4-tetrametiloctano	1031	1045	-	-	-	-	2,6	-	-	0,5	-
NI	1053	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-
NI	1060	-	-	-	-	-	7,2	-	-	8,0	-
2-metil-decano	1066	1069	1,4	-	-	-	5,3	0,8	-	-	-

*: compostos identificados apenas pelo espectro de massas, ^aÍndice de Retenção Calculado, ^bÍndice de Retenção da Literatura, PE: frasco de polietileno, TI: tubo de imersão, IB: invólucro da bomba, AV: anel de vedação, AC: anel cinza, VPS: válvula da ponta do spray, PP: ponta próxima ao fio de prata, PS: ponta spray, NI: não identificado
Cont.

Tabela 1. Cont.

Composto	IR ^a	IR _{Lit.} ^b	Parte da Embalagem								
			% Área								
			PE	TI	IB	AV	AC	VPS	PP	PS	
NI	1075	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
NI	1082	-	-	-	-	-	4,0	-	-	4,7	-
NI	1097	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-
undecano	1101	1100	4,5	-	-	-	5,5	-	-	-	-
NI	1104	-	-	-	-	3,8	-	1,8	11,6	-	-
NI	1107	-	-	2,1	1,5	-	-	-	-	-	-
4-metil-undecano	1117	1160	-	-	-	-	5,1	-	4,3	-	-
5-2-metilpropil nonano	1130	1185	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
2-metil-undecano	1166	1164	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-
dodecano	1201	1200	52,3	35,4	24,8	27,9	36,5	29,5	10,2	38,6	-
1,3-bis (1,1-dimetil etil) benzeno	1260	1249	6,7	-	-	-	-	-	-	-	-
tridecano	1302	1300	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-
NI	1309	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1	-
NI	1323	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-
2,7,10-trimetil-dodecano	1329	1320	-	-	-	-	-	-	-	8,0	-
NI	1346	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	-
4,6-dimetil-dodecano	1348	1325	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-
tetradecano	1402	1400	31,7	45,6	32,0	44,3	1,3	29,8	5,6	32,8	-
2-bromo-dodecano	1509	1493	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
hexadecano	1602	1600	-	-	10,2	7,7	-	18,1	1,8	9,6	-
octadecano	1803	1800	-	-	-	-	-	8,7	-	-	-

*: compostos identificados apenas pelo espectro de massas, ^aÍndice de Retenção Calculado, ^bÍndice de Retenção da Literatura, PE: frasco de polietileno, TI: tubo de imersão, IB: invólucro da bomba, AV: anel de vedação, AC: anel cinza, VPS: válvula da ponta do spray, PP: ponta próxima ao fio de prata, PS: ponta spray, NI: não identificado

Através da predição toxicológica feita pelo software, foi atribuída uma classificação com respeito ao potencial mutagênico e carcinogênico dos compostos, baseada nas diretrizes do ICH M7¹¹. Nesta avaliação, todos os compostos voláteis foram classificados como classe 5, exceto 1,3,5-trioxano e 2-bromo-decano, pertencentes à classe 3. Aqueles classificados como classe 5, não possuem alertas estruturais para mutagenicidade. Contudo, os classe 3 poderão ser reclassificados, após avaliação dos dados obtidos por um toxicologista. O controle destas impurezas será necessário, se de fato estes compostos forem lixiviáveis, ou seja, estiverem presentes no medicamento.

Conclusões

A análise dos compostos voláteis presentes no material de embalagem primária de um spray nasal, identificou a presença majoritária de hidrocarbonetos alifáticos provenientes do processo de síntese do material polimérico. A avaliação de toxicidade dos compostos voláteis encontrados foi obtida através da predição *in silico*, indicando que maioria dos compostos não possuem alerta estrutural para mutagenicidade (classe 5). Apenas dois compostos apresentaram um alerta de classe

3 que necessitam revisão de um toxicologista para atribuição de um limite de controle, caso estes compostos sejam posteriormente encontrados como lixiviáveis.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio do Aché Laboratórios Farmacêuticos, Agilent Technologies do Brasil e Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Referências

1. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidancedocuments/container-closure-systems-packaging-human-drugs-and-biologics>, disponível em outubro de 2021.
2. Rodriguez, L., et al. *International Journal of Pharmaceutics* **2020**, 583. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119332>.
3. Jenke, D. et al. *PDA J Pharm Sci and Tech* **2017**, 71, 68.
4. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-5B829ECA-165E-46C5-A244-3FF958BBC190_3_en-US?source=Quick%20Search&highlight=1663, disponível em outubro de 2021.
5. Moyer, K. L., et al. *Specification of Drug Substances and Products : Extractables and Leachables*. Oxford : Elsevier **2020**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102824-7.00020-8>
6. Jenke, D., et al. *PDA Journal Pharmaceutical Science and Technology* **2013**, 67, 448-511.
7. Klocker, N., et al. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 489-493.
8. Dool, V. D. H., Kratz, P. D. *Journal Chromatography A* **1963**, 11, 463-471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
9. Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography Mass Spectrometry*. Academic Press: New York **2007**. ISBN 978-1-932633-21-4
10. NIST. National Institute of Standards and Technology. US. Department of Commerce. <https://webbook.nist.gov>, disponível em novembro de 2021.
11. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m7-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential>, disponível em novembro de 2021.

Graphical Abstract



The use of micronized PET as an organic filler in flexible polyurethane foams has both an economic and an ecological appeal, providing a value-added destination for recycled PET. Its even and homogeneous distribution throughout the foam cell structure guarantees the accomplishment of the standard physical properties.

MARCAÇÃO FLUORESCENTE PARA VISUALIZAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE PET RECICLADO EM ESPUMAS DE POLIURETANO

Roberto V. Luiz^{1*}, Frank H. Quina^{1*},

¹–Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

roberto.luiz@usp.br

quina@usp.br

Resumo:

A produção de espumas flexíveis de poliuretano usa 98% de produtos *commodities* e 2% de especialidades químicas. Como consequência, os *commodities* representam mais de 90% do custo das matérias primas. Historicamente a indústria sempre buscou alternativas para substituí-los, ao menos de forma parcial. Durante décadas foram utilizadas cargas minerais diversas em substituição aos *commodities*, mas estas foram abolidas em 2011 pela normatização dos colchões pela ABNT e INMETRO, que estipulou um teor de cinzas igual a zero. O uso de PoliEtileno Tereftalato (PET) reciclado micronizado como uma carga orgânica alternativa é tecnicamente viável até pelo menos 21,9% PET, o que representaria uma redução de custo de 5 a 10% por bloco de espuma produzido, além do apelo ecológico de oferecer um destino mais nobre para um material reciclado. A marcação fluorescente do PET permite visualizar a distribuição tridimensional do PET reciclado nas espumas de poliuretano e relacioná-la à manutenção das propriedades físicas normatizadas quando do emprego de surfactante especial adequado.

Palavras-chave: *poliuretanos, espumas flexíveis, PET, fluorescente, ABNT, propriedades físicas*

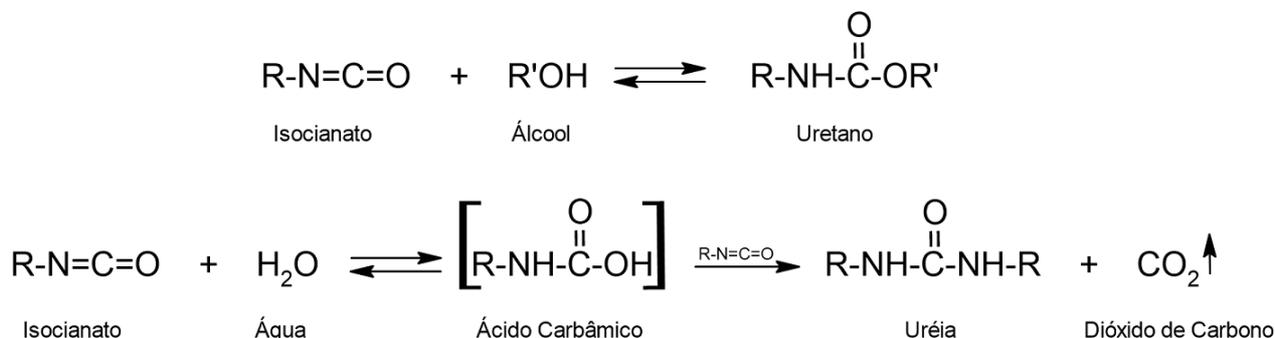
Fluorescent marking to view the distribution of recycled PET in Polyurethane Foams

Abstract: The production of flexible polyurethane foams uses 98% commodity products and 2% specialty chemicals. As a consequence, commodities represent more than 90% of the raw material costs. Historically, the industry has always procured alternatives to replace them, at least partially. Therefore, for decades, different mineral fillers were used to replace commodities, but these were prohibited by the 2011 ABNT standardization of mattresses that stipulated an ash content equal to zero. The use of micronized recycled PolyEthylene Terephthalate (PET) as an organic filler is technically feasible up to at least 21.9%, representing a cost reduction of 5 to 10% per foam block produced, in addition to the ecological appeal of offering a more noble destination for recycled material. The fluorescent marking of PET permits the visualization of the three-dimensional distribution of recycled PET in Polyurethane Foams and relate it to the maintenance of the standard physical properties when an adequate surfactant is employed.

Keywords: polyurethanes, flexible foams, PET, fluorescent, ABNT, physical properties.

Introdução

A produção do poliuretano se dá basicamente através de duas reações químicas principais (Esquema 1), ou seja, a reação de polimerização entre um polioli e um isocianato, resultando na formação do poliuretano e a reação de expansão entre o isocianato e a água, formando o gás carbônico, fundamental para expandir o polímero final nas dimensões desejadas. A ocorrência simultânea dessas duas reações produz, então, um polímero expandido ou espuma de poliuretano.¹



Esquema 1. A formação do uretano e a formação de CO₂, que produz a expansão da espuma.

Com o objetivo de reduzir os custos de produção das espumas, ao longo de vários anos foram adicionadas cargas minerais mais baratas, principalmente CaCO₃,² na formulação das espumas de poliuretano. Entretanto, a redução de custos implicava num certo comprometimento das propriedades físicas, durabilidade, performance e conforto das espumas finais produzidas. O uso de cargas minerais passou a ser proibido a partir de 2011 com a normatização das propriedades de colchões pela ABNT³ e INMETRO, que zerou o teor de cinzas das espumas. As especificações da Norma ABNT NBR 13579-1:2011 são resumidas na Tabela 1 para espumas flexíveis de densidades (em kg/m³) D18 a D45, que determina a dureza do colchão e suas faixas de fator de conforto, fadiga e deformação permanente após compressão e resiliência. As determinações dessas propriedades seguem as normas ABNT NBR 8537-1:2015 (densidade); NBR 8619:2015 (resiliência); NBR 8797:2015 (deformação permanente à compressão); NBR 9177:2003 (fadiga dinâmica); e NBR 14961:2016 (teor de cinzas).

Tabela 1. Norma ABNT NBR 13579-1:2011: Espuma flexível de poliuretano³

Propriedades	D18 ^c	D20	D23	D26	D28	D33	D40	D45
Força de indentação (F.I.) Dureza a 40%, N (min)	80	95	110	130	145	165	185	200
Fator de conforto ^b (min)	2,0		2,1		2,2			
Fadiga dinâmica Perda de espessura, % (max)	8	6	5			4		
Fadiga dinâmica Perda de F.I. a 40%, % (max)	32	27				23		
Deformação permanente à compressão de 90%, % (max)	12	10	10		8		8	
Resiliência, % (min)	30		35				40	
Teor de cinzas, % (max)	1							
^a A força de indentação pode ser expressa por F.I., referindo-se a espuma não fadigada								
^b A força de conforto pode ser expresso por F.C.								
^c Densidade utilizada somente para colchões de uso infantil (berço)								

Embora a normatização tenha inviabilizado o uso de cargas inorgânicas como CaCO₃² ou esteatita,⁴ é possível utilizar cargas orgânicas nas espumas. Nos últimos anos, um grande número de aditivos orgânicos e biomateriais foram ensaiados como aditivos em espumas flexíveis e rígidas de poliuretano: nanotubos de carbono;^{5,6} poliuretano reciclado;⁷ celulose;⁸ borracha reciclada;⁹ fibras naturais;^{10,11} noz moscada;¹² Poli(Etileno Tereftalato) (PET) glicosilado;¹³⁻¹⁵ ou PET reciclado micronizado.¹⁶ Esta última possibilidade é particularmente interessante dada a larga aplicação de PET para embalagens e a natureza não-biodegradável do PET, que contribui significativamente à poluição do planeta por plásticos.^{17,18} No presente estudo desenvolvemos uma técnica que permite o mapeamento tridimensional da distribuição de PET em espumas flexíveis de poliuretano de densidade D28 contendo até 21,9% de PET reciclado (em relação à massa do polioliol) que cumprem todas as normas ABNT para espumas flexíveis de poliuretano.

Experimental

A metodologia de produção das espumas consiste nas seguintes etapas: Agitar uma mistura de polioliol poliéter, polioliol copolimérico, água, catalisador à base de amina terciária, surfactante a base de polisiloxano, 2-etil-hexanoato de estanho (II) e PET fluorescente micronizado (40 mesh) a 700 RPM durante 45 segundos. Em seguida, adicionar o tolueno diisocianato (TDI 80/20) e agitar a 1000 RPM por 6 segundos. Despejar a massa total dentro de uma caixa de espumação (*box foamer*) de laboratório de 25 x 25 x 25 cm e acompanhar os parâmetros da expansão conforme as definições a seguir: tempo de creme (o início da reação ou formação de fase cremosa, no *box foamer*), o tempo de crescimento (alcance da altura máxima pelo bloco de espuma), *blow-off* (a expulsão dos gases imediatamente após atingir a altura máxima do bloco - um primeiro indicativo de boa qualidade) e relaxamento (em

centímetros entre a altura máxima alcançada e a altura final do bloco ainda quente). Lembrando que o fenômeno de relaxamento ocorre após o *blow-off* e indica a expulsão dos gases em excesso com consequente perda de altura do bloco de espuma em média de 5 cm aproximadamente. Após a cura (12 h a temperatura ambiente), o bloco de espuma é seccionado usando uma serra de fita para obter os corpos de prova (Figura 1). Os corpos de prova foram analisados de acordo com as normas ABNT correspondentes utilizando um Dinamômetro marca EMIC, um Fadigômetro marca Cofama, um Resiliômetro para determinação de resiliência, uma mufla (calcinação) e um aparelho de passagem de ar por coluna de água que indica se a estrutura celular da espuma está aberta ou fechada.

O PET fluorescente marcado com fluoresceína foi gentilmente fornecido pela Cristalmaster de Itupeva/SP e micronizado pela Lyondell de Sumaré/SP pela técnica de moagem mecânica em partículas de 40 mesh. Importante ressaltar que o PET fluorescente se trata de um *masterbatch* de PET na cor verde transparente industrialmente preparado e contendo 5% de pigmento à base de fluoresceína. Os corpos de prova contendo PET fluorescente foram cortados nos sentidos vertical e horizontal (Figura 1) em fatias com espessura de ca. 2 cm para poder visualizar a distribuição do PET fluorescente através do bloco. A fluorescência e fotografia do PU marcado com PET fluorescente foram realizadas utilizando excitação por uma lâmpada de UV (366 nm) para visualização de placas de cromatografia em camada delgada da UV Products. As imagens microscópicas foram adquiridas num microscópio de fluorescência da Zeiss diretamente na superfície das fatias da espuma.



Figura 1. Um bloco de espuma de PU de 25x25x25 cm contendo 10% de PET micronizado fluorescente, ilustrando o fatiamento do bloco de espuma nos sentidos horizontal (H) e vertical (V) para obter os corpos de prova e avaliar a distribuição espacial da fluorescência.

Resultados e Discussão

O uso de PET como carga orgânica exige um bom conhecimento técnico em ajustar as formulações e em usar surfactantes adequados, de modo a manter as propriedades físicas das espumas dentro das normas. Neste trabalho foram produzidos blocos de espumas com densidade 28 kg/m³ (D28) de 25 x 25 x 25 cm num *box foamer* de laboratório com uma quantia de PET micronizado fluorescente nas formulações variando de 0 a 21,9% em relação ao poliol. Nas formulações, foram utilizados dois tipos de surfactantes, um surfactante de silicone comumente empregado na ausência do PET (tecnologia SiC) e um surfactante especial de silicone (tecnologia SiOC) previamente otimizado para uso em formulações contendo PET. O surfactante especial é desenvolvido para formulações que demandam um maior poder de emulsificação, nucleação e estabilização na presença por exemplo de partículas sólidas, como o PET reciclado, único sólido portanto dentro da mistura reacional líquida. Este surfactante especial desempenha, portanto, as funções fundamentais de emulsificação, nucleação, estabilização e distribuição do PET dentro da espuma. Após a cura, as espumas foram fatiadas nos sentidos vertical e horizontal para obter fatias com espessura de ca. 2 cm que serviram como os corpos de prova (Figura 1). A fluorescência do PU marcado com PET fluorescente foi fotografada utilizando excitação por uma lâmpada ultravioleta (366 nm) e imagens ampliadas obtidas por microscopia de fluorescência (Figura 3). Como mostrado na Figura 2, com o uso do surfactante especial, a distribuição qualitativa do PET na espuma é um pouco mais uniforme com relação ao surfactante comum.

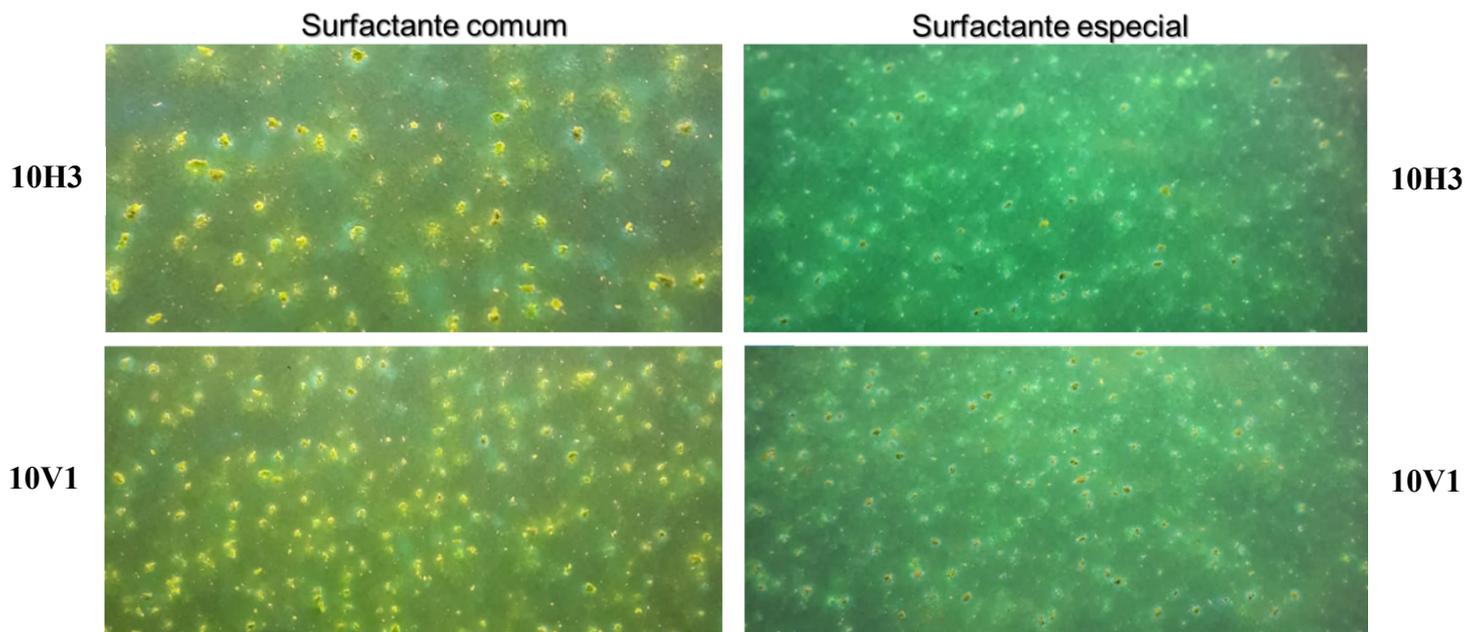


Figura 2. Fotografia da distribuição da fluorescência na superfície de corpos de prova internos nos sentidos horizontal (imagens superiores) e vertical (inferiores) em blocos de PU contendo 10% de PET fluorescente.

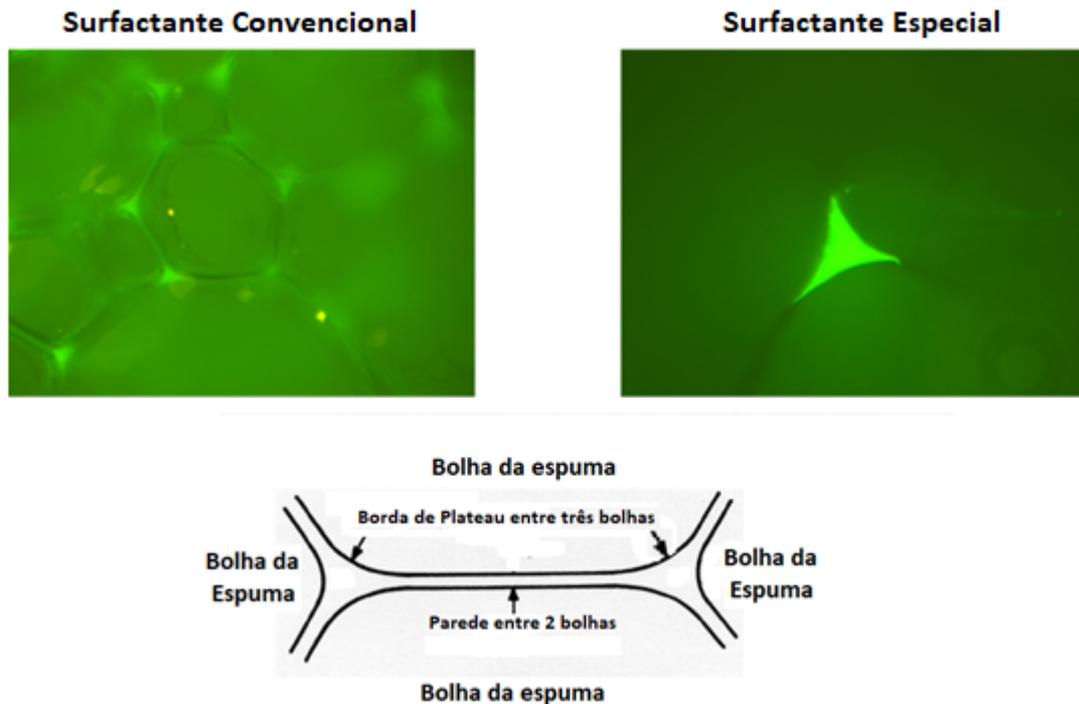


Figura 3. Micrografias (aumento de 10x, imagem da esquerda, e 40x, imagem da direita) indicando o acúmulo da fluorescência nas bordas de Plateau (indicada no diagrama) nas espumas de PU marcadas com PET fluorescente.

Conclusões

A utilização de PET reciclado micronizado permitiu o mapeamento macro e microscópico da distribuição tridimensional do PET na estrutura celular da espuma de Poliuretano. Tanto nas espumas produzidas com o surfactante comum ou com o surfactante especial, a fluorescência está concentrada nas bordas de Plateau na junção entre as bolhas da espuma. Qualitativamente, a distribuição do PET na espuma é um pouco mais uniforme nas espumas preparadas com o surfactante especial, fato explicado por seu maior poder de emulsificação, nucleação e estabilização. Esta distribuição mais uniforme de PET na espuma com uso de surfactante especial está de acordo com a manutenção das propriedades físicas da espuma dentro das normas mesmo na presença de PET. Esta técnica de marcação fluorescente permite ir além de medidas puramente macroscópicas de propriedades físico-químicas das espumas finais e realizar uma avaliação da localização preferencial do PET na espuma, bem como da eficácia de diferentes surfactantes na homogeneização da distribuição do PET dentro da estrutura da espuma de PU.

Agradecimentos

Os nossos sinceros agradecimentos à empresa Evonik Industries por todo suporte técnico e pelos ensaios físicos realizados. Nossos agradecimentos também à Crismaster e à Lyondell pelo fornecimento e micronização do PET fluorescente, respectivamente.

Referências

1. Herrington, R.; Hock, K., eds. Flexible Polyurethane Foams, Dow Chemical Co: Midland, MI, 1997.
2. Sá e Sant'Anna, S.; Souza, D. A.; Araujo, D. M.; Carvalho, C. F.; Yoshida, M. I. *Materials Res.* 2008, 11, 433-438.
3. ABNT NBR 13579-1:2011: Colchão e Colchonete de espuma flexível de poliuretano e bases - Parte 1: Requisitos e métodos de ensaio. ABNT NBR 8537-1:2015: Espuma flexível de poliuretano-Determinação da densidade. ABNT NBR 8619:2015: Espuma flexível de poliuretano-Determinação da resiliência. ABNT NBR 8797:2015: Espuma flexível de poliuretano-Determinação da deformação permanente à compressão. ABNT NBR 9177:2003: Espuma flexível de poliuretano-Determinação da fadiga dinâmica. ABNT NBR 14961:2016: Espuma flexível de poliuretano-Determinação do teor de cinzas. Disponíveis em: <https://www.abntcatalogo.com.br>, acessados em: 13/06/2020.
4. Carvalho Pinto, P. C.; Ribeiro da Silva, V.; Yoshida, M. I.; Oliveira, M. A, L. *Polím.: Ciên. Tecnol.* 2018, 28, 323-331.
5. Zhang, L.; Yilmaz, E. D.; Schjødt-Thomsen, J.; Rauhe, J. C.; Pyrz, R. *Compos. Sci. Technol.* 2011, 71, 877-884.
6. Stiebra, L.; Cabulis, U.; Knite, M. J. *Phys.: Conf. Ser.* 2016, 709, 012002.
7. Usman; M. A.; Ayoola, W. A.; Edward, K. K. *ABUAD J. Engineer. Res. Dev.* 2018, 1, 346-350.
8. Kastner, J.; Kicking, R.; Salaberger, D. J. *Cell. Plast.* 2011, 47, 567-578.
9. Bhadra, A., MS Thesis, Oklahoma State Univ., 2010. <https://shareok.org/handle/11244/9896>
10. Kuranska, M.; Prociak, A. *Compos. Sci. Technol.* 2012, 72, 299-304.
11. Członka, S.; Strąkowska, A. *Pospiech. P.; Strzelec, K. Materials* 2020, 13, 1781.
12. Członka, S.; Strąkowska, A.; Kairyte, A.; Kremensas, A. *Polym. Test.* 2020, 86, 106479.
13. Yeganeh, H.; Shamekhi, M. A. *J. Appl. Polym. Sci.* 2006, 99, 1222-1233.
14. Macijauskas, G.; Jankauskaitė, V. *Materials Sci. (Medžiagotyra)* 2013, 19, 283-290.
15. Čuk, N.; Fabjan, E.; Grželj, P.; Kunaver, M. J. *Appl. Polym. Sci.* 2015, 132, 41522.
16. Mello, D.; Pezzin, S. H.; Amico, S. C. *Polym. Test.* 2009, 28, 702-708.
17. Sinha, V.; Patel, M. R.; Patel, J. V. *J. Polym. Environ.* 2008, 18, 8-25.
18. Geyer, B.; Lorenz, G.; Kandelbauer, A. *eXPRESS Polym, Lett.* 2016, 10, 559-586.