

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

MARCELO JUNG EBERHARDT

Síntese de iodeto de *N*-(2,3-dimetil-6-benzotiazolio)decanamida e incorporação em  
niosomas visando potencial aplicação antibacteriana

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

MARCELO JUNG EBRAHRDT

Síntese de iodeto de *N*-(2,3-dimetil-6-benzotiazolio)decanamida e incorporação em niossomas visando potencial aplicação antibacteriana

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso - QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Profa. Dra. Fernanda Poletto  
Orientadora

Porto Alegre  
2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Jorge e Janice pelo apoio que sempre me deram, pelas oportunidades disponibilizadas, pelos conselhos e pelo carinho. Ao meu irmão pela zueira. Aos meus avós pelo carinho. Aos meus amigos, Leonardo, César, Jessé e Gabriel pela brotheragem, pelas cevas e por compartilhar causas e experiências.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Fernanda Poletto pela oportunidade, pelos ensinamentos e paciência ao corrigir esse trabalho de conclusão. Aos meus colegas de laboratório sempre ajudando e fazendo a convivência mais alegre, em especial à mestrandia mais legal que eu conheço, Maira.

Às Professoras Silvia Guterres (Faculdade de Farmácia – UFRGS) e Adriana Pohlmann (IQ-UFRGS) pela disponibilização do equipamento para determinação do diâmetro de nanopartícula e mobilidade eletroforética. Ao Centro de Nanociência e Nanotecnologia (CNANO) da UFRGS pelo acesso ao equipamento de SAXS. À Central Analítica do IQ-UFRGS pelo acesso aos equipamentos necessários para a caracterização estrutural dos produtos de síntese deste trabalho.

## RESUMO

O presente trabalho apresenta a síntese de iodeto de *N*-(2,3-dimetil-6-benzotiazolio)decanamida, partindo-se do 2-metil-6-nitrobenzotiazol, e o desenvolvimento de niossomas contendo esse composto visando potencial vetorização para aplicação no combate a infecções bacterianas. Três etapas foram realizadas para sintetizar o iodeto de *N*-(2,3-dimetil-6-benzotiazolio)decanamida, o qual foi obtido em bons rendimentos. Seu ponto de fusão inferior a 100 °C demonstrou que o mesmo também pode ser classificado como um líquido iônico. Os sistemas supramoleculares foram constituídos de fitantriol e polissorbato 80 em meio aquoso, e concentrações crescentes do composto anfifílico foram incorporadas nos niossomas. Observou-se que concentrações mais elevadas do composto resultaram em sistemas monodispersos, com valores de mobilidade eletroforética positivos e diâmetros inferiores a 400 nm. Sua estrutura supramolecular provavelmente consiste de vesículas, com compartimento aquoso em seu interior. Os resultados indicam que os sistemas dispersos apresentam características tecnológicas adequadas para aplicação biológica. Ensaio de atividade antibacteriana do composto isolado e dos sistemas dispersos são perspectivas deste estudo.

## ABSTRACT

This work presents the synthesis of *N*-(2,3-dimethyl-6-benzothiazolium)decanamide iodide using 2-methyl-6-nitrobenzothiazole as starting material, and the development of niosomes as potentially targeting systems for application as antibacterials. A route of three synthetic steps was carried out to obtain *N*-(2,3-Dimethyl-6-benzothiazolium)decanamide iodide, which was synthesized in good yields. Its reduced melting point (lower than 100 °C) demonstrated that the compound can also be classified as an ionic liquid. The supramolecular systems were composed of phytantriol and polysorbate 80 in aqueous medium. Increasing concentrations of *N*-(2,3-Dimethyl-6-benzothiazolium)decanamide iodide were loaded into the niosomes. The niosomes with higher concentrations of the compound were monodispersed, with positive electrophoretic mobility values and mean diameter values lower than 400 nm. The supramolecular structure of the systems is probably a vesicle with an inner aqueous compartment. The results indicate that the dispersed systems present technological characteristics suitable for biological application. Assays of antibacterial activity of the isolated compound and the dispersed systems are perspectives of this study.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas de (a) benzotiazóis e (b) sais de benzotiazolio. ....	4
Figura 2 Exemplos de fármacos como núcleos derivados de benzotiazóis como <i>scaffolds</i> e que estão disponíveis no mercado.....	5
Figura 3. Ilustração esquemática de um surfactante, com destaque para (a) cabeça polar e (b) cauda hidrofóbica.....	6
Figura 4 Representação esquemática da estrutura de uma micela (corte transversal). .....	8
Figura 5. Esquema de reação de redução de 2-metil-6-nitrobenzotiazol ( <b>1</b> ), com formação de 2-metil-6-benzotiazolamina ( <b>2</b> ). ....	12
Figura 6. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto 2 (solvente: CDCl <sub>3</sub> ). ....	13
Figura 7. Esquema de acoplamento entre 2-metil-6-benzotiazolamina ( <b>2</b> ) e ácido decanoico ( <b>3</b> ) para obtenção da <i>N</i> -(2-metil-6-benzotiazolil)decanamida ( <b>4</b> ). ....	14
Figura 8. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto 4 (solvente: CDCl <sub>3</sub> ). ....	15
Figura 9. Procedimento one-pot de acoplamento entre ácido carboxílico (a) e amina primária (g) empregando TBTU (b). Adaptado de Valeur & Bradley (2009) .....	16
Figura 10. Esquema da reação entre <i>N</i> -(2-metil-6-benzotiazolil)decanamida ( <b>4</b> ) com iodeto de metila para obtenção do iodeto de <i>N</i> -(2,3-dimetil-6-benzotiazolio)decanamida ( <b>5</b> ). ....	17
Figura 11. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto 5 (solvente: DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	18
Figura 12. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN do composto 5 (desacoplado, solvente: DMSO-d <sub>6</sub> ). .....	19
Figura 13. Espectro de infravermelho por refletância total atenuada do composto 5. .....	20
Figura 14. Imagem das formulações contendo concentrações crescentes do composto 5, evidenciando seu aspecto translúcido. ....	23
Figura 15. Distribuição de tamanho de partícula das formulações preparadas com concentrações crescentes do composto 5: (a) F-0, (b) F-1, (c) F-2, (d) F-5, (e) F-10, por espalhamento de luz dinâmico (meio dispersante: água). Cada amostra foi medida	

em triplicata, sendo cada replicata representada como uma curva individual. A função de autocorrelação temporal ( $G(\tau)$ ) no insert de cada gráfico de distribuição de diâmetro é representativa de três medidas. .... 25

Figura 16 Perfis de espalhamento de raios X a baixos ângulos das amostras (a) F-0, (b) F-1, (c) F-2, (d) F-5 e (e) F-10 (fonte de raios X convencional, porta-amostra de capilar de quartzo, temperatura ambiente). O espalhamento do solvente foi descontado das medidas das amostras. .... 29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Solubilidade a 25 °C do composto <b>5</b> em diferentes solventes.....	21
Tabela 2. Caracterização das formulações contendo quantidades crescentes do composto <b>5</b> , a partir de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (n = 3).....	26
Tabela 3. Valores de mobilidade eletroforética das formulações contendo quantidades crescentes do composto <b>5</b> (n = 6). .....	27
Tabela 4 Composição das formulações contendo quantidades crescentes do composto ( <b>5</b> ). .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\text{CDCl}_3$  – Clorofórmio deuterado

$\text{DMSO } d_6$  – Dimetilsulfóxido deuterado

$\text{Et}_3\text{N}$  – Trietilamina

OMS – Organização Mundial da Saúde

PABA – Ácido *para*-aminobenzoico

PIB – Produto interno bruto

TBTU – Tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

$^1\text{H}$ -RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

$^{13}\text{C}$ -RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
3.1 BENZOTIAZOL E BENZOTIAZOLIO .....	4
3.2 SURFACTANTES.....	6
3.3 ANTIMICROBIANOS .....	8
3.4. NIOSSOMAS .....	10
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>12</b>
4.1 OBTENÇÃO DA 2-METIL-6-BENZOTIAZOLAMINA .....	12
4.2 OBTENÇÃO DA <i>N</i> -(2-METIL-6-BENZOTIAZOLIL)DECANAMIDA.....	13
4.3 OBTENÇÃO DE IODETO DE <i>N</i> -(2,3-DIMETIL-6-BENZOTIAZOLIO)DECANAMIDA .....	16
4.4 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA SUPRAMOLECULAR .....	21
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>6. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b> .....	<b>32</b>
6.1 MATERIAIS .....	32
6.3 SÍNTESE DE <i>N</i> -(2-METIL-6-BENZOTIAZOLIL)-DECANAMIDA .....	33
6.4 SÍNTESE DE IODETO DE <i>N</i> -(2,3-DIMETIL-6-BENZOTIAZOLIO)DECANAMIDA .....	34
6.5. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DOS PRODUTOS .....	35
6.6. PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS DISPERSOS .....	35
6.7. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ.....	36
6.8. DETERMINAÇÃO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA.....	36
6.9. ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXOS ÂNGULOS .....	36
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Conforme relatório publicado em 2016 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), são registradas anualmente 700000 mortes relacionadas a infecções de micro-organismos resistentes a antimicrobianos. Se medidas não forem tomadas, a projeção anual de mortes alcança impressionantes 10 milhões até 2050, número maior do que registrado atualmente em relação a mortes causadas por câncer (O'NEILL, 2016).

O aumento da morbidade e da mortalidade elevam também os custos relacionados a estas doenças, diretamente e indiretamente. Uma vez que envolvem resistência antimicrobiana, o custo de tratamento é maior quando comparado a infecções comuns e produz maior desgaste ao paciente e à comunidade. Como custos indiretos, têm-se os gastos sociais com desabilitados, mortes prematuras e redução da força de trabalho. O banco mundial estima que em 2050 possa haver uma perda de 3,8% no produto interno bruto (PIB) mundial devido a micro-organismos resistentes a antimicrobianos (OLUSOJI *et al.*, 2017).

Tendo em vista estes dados, são necessários novos antimicrobianos para combater estes micro-organismos. Uma estratégia promissora envolve o uso de compostos catiônicos derivados de *scaffolds* com atividade antimicrobiana, pois combinam mecanismos inespecíficos e específicos de ação. Nesse contexto, sais de benzotiazolio podem ser uma alternativa interessante, pelo seu caráter catiônico e atividade antibacteriana conhecida (EIBERGEN *et al.*, 2012; NEGM *et al.*, 2011). Apesar de sua ação farmacológica, sais de benzotiazolio podem apresentar certo grau de toxicidade. A promoção de estratégias para tornar esses compostos altamente seletivos contribuiria sobre maneira para reduzir sua toxicidade, aumentar a eficácia e retardar o desenvolvimento de resistência por parte dos micro-organismos sensíveis. Como forma de aumentar a interação com as células bacterianas, o presente projeto propõe a síntese de novo surfactante derivado desta classe de compostos, assim esperando que as características anfífilas da espécie possam corroborar com a atividade antimicrobiana. Por ser um composto surfactante, é conveniente incorporá-lo em um sistema supramolecular capaz de vetorização para bactérias como alvos.

O composto de interesse foi sintetizado e caracterizado com sucesso, podendo ser classificado como um surfactante e também (devido ao seu baixo ponto de fusão) como um líquido iônico. O sistema supramolecular desenvolvido foi caracterizado como niossoma, onde o aumento da concentração do composto sintetizado modifica a carga da partícula. Isso pode vir a corroborar na ação antimicrobiana, uma vez que a carga positiva na partícula pode aumentar a interação com as células dos microorganismos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar o surfactante iodeto de *N*-(2,3-dimetil-6-benzotiazolio)decanamida e incorporá-lo em niossomas com características adequadas à aplicação biológica, visando potencial aplicação no combate a infecções bacterianas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter iodeto de *N*-(2,3-dimetil-6-benzotiazolio)decanamida a partir de rotas sintéticas de baixo custo e fácil execução, partindo-se de 2-metil-6-nitrobenzotiazol como precursor.
- Desenvolver niossomas de fitantriol e polissorbatato 80 com características nanotecnológicas adequadas à aplicação biológica.
- Incorporar concentrações crescentes de iodeto de *N*-(2,3-dimetil-6-benzotiazolio)decanamida às formulações e verificar mudanças nas características físico-químicas das nanopartículas decorrentes dessa incorporação.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BENZOTIAZOL E BENZOTIAZOLIO

Benzotiazóis são compostos aromáticos heterocíclicos, caracterizados por apresentar um anel tiazol fundido com um anel benzeno (Figura 1 (a)). Estes compostos podem ser obtidos empregando-se diversas rotas sintéticas. Uma das maneiras comuns é a condensação com catálise ácida, onde *orto*-aminotiofenóis reagem com aldeídos substituídos, usando como catalisador H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCl (PRAJAPATI *et al.*, 2014).

Em geral, estes compostos são insolúveis em água. Uma forma de aumentar sua solubilidade neste meio consiste em convertê-los a sais de benzotiazolio, nos quais o nitrogênio do anel tiazol fica positivamente carregado pela adição de um grupo R<sub>3</sub> (Figura 1 (b)), de forma análoga ao íon imínio. A síntese de sais de benzotiazolio é tipicamente realizada através de metodologias de reações via mecanismo S<sub>N</sub>2 entre benzotiazóis e nucleófilos (geralmente haletos de amônio), no qual o par de elétrons não-ligante do nitrogênio ataca o nucleófilo, levando à formação dos compostos de interesse (GARMAISE *et al.*, 1969; HROBÁRIK *et al.*, 2010).

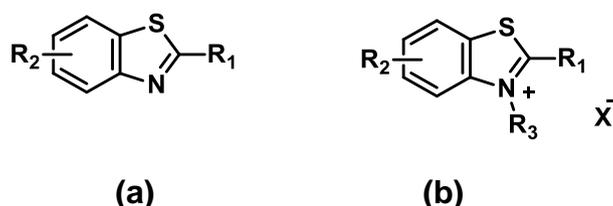


Figura 1: Estruturas químicas de (a) benzotiazóis e (b) sais de benzotiazolio.

O conceito de *scaffold* é amplamente empregado no contexto da química medicinal para representar estruturas-chave de compostos bioativos. Esse conceito permite, até certo ponto, prever a atividade farmacológica de compostos químicos (SHARGEL *et al.*, 2015). Os núcleos benzotiazol são *scaffolds* de compostos com ampla diversidade de aplicações biomédicas. Pode-se citar, entre elas, atividade antituberculose, antimicrobiana, antimalárica, anticonvulsiva, analgésica, anti-inflamatória, antidiabética e antitumoral (KERI *et al.*, 2015). Benzotiazóis vêm sendo

empregados na terapêutica de desordens neurodegenerativas, isquemia cerebral e câncer, além de apresentarem atividade como relaxantes musculares, com fármacos para uso humano já disponíveis no mercado (Figura 2). Devido à facilidade de sua obtenção, estes compostos encontram utilidade também em outras áreas de aplicação, como a indústria de corantes. Um exemplo notório é a tioflavina, muito utilizada em estudos de biofísica relacionados à agregação de proteínas (GILL, RAWAL, BARIWAL, 2015).

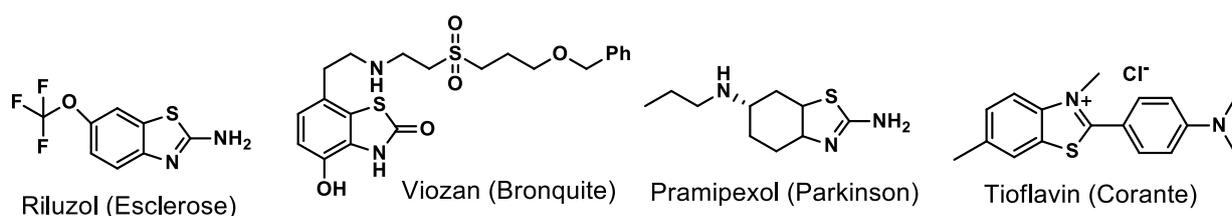


Figura 2 Exemplos de fármacos como núcleos derivados de benzotiazóis como *scaffolds* e que estão disponíveis no mercado.

Por sua vez, sais de benzotiazolio, por serem derivados de Benzotiazóis, guardam semelhanças com estes últimos quanto à sua vasta aplicação biológica, com registros de patentes dessa classe de compostos como bactericidas agrícolas desde 1966. Além disso, demonstram atividade contra células cancerígenas e atuam como inibidores de óxido nítrico em células, antimicrobianos e antifúngicos (YUZO *et al* 1966; NEGM *et al.*, 2011; PIANKA, HALL, 1957; TUNTIWECHAPIKUL *et al.*, 2002). Outros estudos expandem a aplicação desses compostos para áreas como sensores de metais e de grupos funcionais, catalisadores, materiais óticos e corantes com aplicações biomédicas. ( GRZELAKOWSKA, 2015; LEE *et al.*, 2017; NILSSON, 2009; TATAY *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2011)

Sabe-se que compostos positivamente carregados tendem a apresentar atividade antimicrobiana inespecífica, conforme discutido mais detalhadamente no item 3.3. Uma característica notável dos sais de benzotiazolio é justamente sua carga positiva que, somada à atividade do anel heterocíclico em si, confere a esta classe de compostos um grande potencial como antimicrobianos.

## 3.2 SURFACTANTES

Agentes de ação superficial, também denominados surfactantes (cuja palavra deriva de contração do inglês *surface active agent*), são substâncias capazes de reduzir a tensão interfacial em uma mistura. Tensão interfacial é o trabalho necessário para expandir a interface, correspondendo à energia livre de superfície por unidade de área. A redução da tensão superficial por surfactantes é diretamente proporcional ao empacotamento dos mesmos na interface. A força motriz que rege a adsorção de um surfactante em uma interface é a diminuição da energia livre entre as faces do sistema (ROSEN, 2004; HOLMBERG *et al.*, 2002).

As moléculas de surfactantes são constituídas ao menos de duas partes, uma sendo solúvel em um fluido específico (parte liofílica) e a outra sendo insolúvel neste fluido (parte liofóbica). Assim, explica-se o fato dos surfactantes serem moléculas anfifílicas (*anfi*, do grego ambos). Quando o fluido em questão é água, o surfactante tipicamente apresenta uma porção hidrofóbica e uma hidrofílica (Figura 3). Surfactantes são estruturalmente diversificados, não se restringindo a uma cabeça polar e uma cauda apolar, embora essa seja a estrutura mais comum. Estruturas menos convencionais dessa classe de compostos incluem os surfactantes *gemini* (diméricos) e bolaform (com cabeças hidrofílicas nas duas extremidades da cauda hidrofóbica) (ROSEN, 2004).

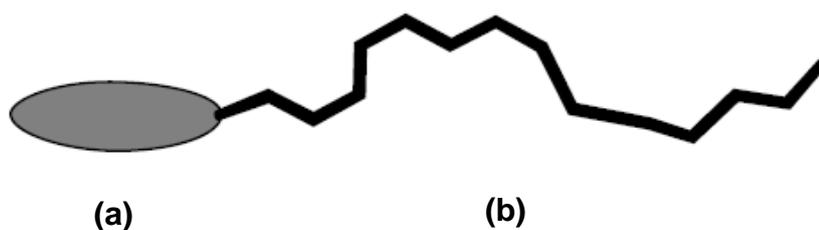


Figura 3. Ilustração esquemática de um surfactante, com destaque para (a) cabeça polar e (b) cauda hidrofóbica.

Surfactantes podem ser classificados de acordo com a natureza de sua cabeça polar, sendo divididos nas classes aniônica, catiônica, não-iônica e zwitteriônica. Industrialmente, os surfactantes aniônicos correspondem a 60 % da produção mundial, que se deve ao baixo custo e à facilidade de manufatura. Estes compostos

são amplamente empregados para produção de saneantes. Os surfactantes catiônicos podem ser utilizados como agentes anticorrosivos e dispersantes na industrial de metais e de tintas. Os surfactantes não-iônicos são aplicados quando se necessita trabalhar com eletrólitos, uma vez que suas propriedades de autoassociação não são afetadas por cargas no meio externo. Por possuírem excelente compatibilidade dermatológica, os zwitteriônicos são bastante aplicados em produtos que terão contato com o corpo humano (ROSEN, 2004).

Surfactantes não são necessariamente um produto da invenção humana. Há diversos exemplos de surfactantes de origem natural, sendo abundantes em todos os organismos vivos. Surfactantes biológicos são empregados pelos organismos para superar problemas de solubilidade, emulsificar, dispersar, modificar superfícies, entre outros. Como exemplos de surfactantes na natureza, podem-se citar os sais da bile e as misturas de fosfolipídios empacotadas na forma de bicamada, constituindo as membranas das células (HOLMBERG *et al.*, 2002).

Uma das características fundamentais dos surfactantes é a tendência dos unimeros (unidades monoméricas da supraestrutura) em agregarem-se em solução, formando micelas (Figura 4). A micelização pode ser vista como um mecanismo alternativo à adsorção a interfaces, protegendo os grupos hidrofóbicos do contato com a água e, conseqüentemente, reduzindo a energia livre do sistema. Micelas são geradas em concentrações muito baixas, características de cada sistema. A concentração na qual as mesmas começam a se formar é denominada de concentração micelar crítica (CMC). Para melhor compreensão desse conceito, pode-se propor o seguinte exemplo: no caso de um surfactante determinado que apresente CMC de 1mM em água, a concentração do unimero dissolvido livremente em solução nunca irá ultrapassar esse valor, independentemente da quantidade de surfactante adicionada à solução. O surfactante em excesso necessariamente estará autoassociado na forma de micelas (HOLMBERG *et al.*, 2002).

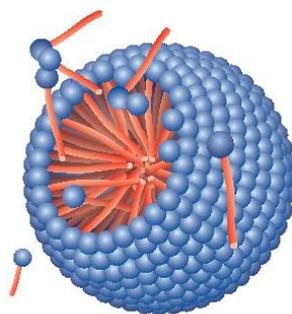


Figura 4 Representação esquemática da estrutura de uma micela (corte transversal).

Surfactantes apresentam diversas aplicações industriais. Podem ser componentes de tintas à base de água, óleos de motor utilizados em carros, medicamentos, produtos de higiene e limpeza, agentes de flotação para beneficiamento de minérios, entre outros (ROSEN, 2004). Além destas, novas aplicações para surfactantes vêm sendo desenvolvidas no âmbito da indústria química e pesquisa acadêmica, tais como componente para separações e extrações em cromatografia iônica e eletroforese capilar (GEROLA *et al.*, 2017), para melhoramento de propriedades de cimentos (SINDU, SASMAL, 2017), recobrimento de nanopartículas (TIWARI *et al.*, 2015) e também como agentes antimicrobianos (FU *et al.*, 2016).

### 3.3 ANTIMICROBIANOS

O combate a micro-organismos por meio da administração de fármacos se faz necessário quando o corpo do próprio hospedeiro não consegue sobrepujar a infecção. Estes fármacos, conhecidos genericamente como antimicrobianos, matam ou interferem no desenvolvimento dos micro-organismos. É importante salientar que antimicrobianos não são equivalentes a desinfetantes. Apenas os primeiros detêm a premissa de apresentar toxicidade seletiva, assim não causando danos às células do hospedeiro (MADIGAN *et al.*, 2013).

Desde o descobrimento dos primeiros fármacos antimicrobianos (sulfas e penicilinas), uma revolução ocorreu no tratamento de doenças infecciosas. Desde então, diversos antimicrobianos foram incorporados para o uso clínico, com atividades contra fungos, bactérias e parasitas (CALVO, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2009). Em se

tratando de compostos para tratamento de infecções bacterianas, uma das formas de classificação é baseada no mecanismo de ação. Nesse contexto, antimicrobianos podem ser inibidores da síntese da parede celular, inibidores da síntese proteica, disruptores da membrana citoplasmática (aumentando sua permeabilidade), inibidores da síntese de ácidos nucleicos e inibidores competitivos da síntese de metabolitos essenciais (antagonismo metabólico) (TORTORA *et al.*, 2013).

Para a inibição da síntese da parede celular, os peptidoglicanos são um dos principais alvos. Por serem somente encontrados nas bactérias, prevenir a síntese desses compostos se torna um meio de afetar as células bacterianas sem afetar as células do hospedeiro. Ao prevenir a síntese de peptidoglicanos, a parede celular fica fortemente enfraquecida, o que leva à lise do micro-organismo. Como esses antibióticos têm como alvo o processo de síntese, somente células em crescimento são afetadas (TORTORA *et al.*, 2013).

No mecanismo de inibição da síntese protéica, busca-se tirar vantagem da diferença estrutural dos ribossomos bacterianos e do hospedeiro, buscando-se uma ação seletiva. Entretanto, como os ribossomos eucarióticos presentes nas mitocôndrias possuem similaridade com os ribossomos bacterianos 70S, antimicrobianos que inibem a síntese protéica em bactérias também inibem a síntese proteica nessas organelas. Um exemplo clássico disto é a ação das tetraciclinas, que afetam as mitocôndrias eucarióticas, porém em doses muito mais elevadas que aquelas necessárias para combater as bactérias (MADIGAN *et al.*, 2014).

Antimicrobianos que causam modificações permanentes na membrana celular levam à perda de importantes metabolitos celulares do interior da célula microbiana, resultando na sua morte. Como exemplo dessa classe de compostos, pode-se citar o miconazol. Este fármaco é efetivo para o tratamento de uma ampla gama de infecções fúngicas, pois se combina com esteróides específicos da membrana dos fungos levando ao aumento de sua permeabilidade (TORTORA *et al.*, 2013).

Inibidores da síntese de ácidos nucleicos interferem no processo de replicação e transcrição do DNA. Essa classe de fármacos geralmente tem uso muito limitado, uma vez que interferem também na replicação e transcrição de DNA e RNA humanos. Como exemplo, cita-se a actinomicina, que inibe a síntese do RNA ao se combinar com o DNA, bloqueando o prolongamento do RNA (MADIGAN *et al.*, 2014).

Uma atividade enzimática específica pode ser inibida competitivamente devido a um antimetabólito, o qual se assemelha ao substrato da enzima. Como exemplo de

um inibidor competitivo, pode-se citar o antimetabolito sulfanilamida, que se assemelha ao substrato ácido *para*-aminobenzoico (PABA). A sulfanilamina compete com o PABA pela enzima dihidropteroato sintetase, inibindo as reações enzimáticas necessárias para a síntese do ácido fólico (TORTORA *et al.*, 2013).

### 3.4. NIOSSOMAS

Nanopartículas preparadas com surfactantes não-iônicos são conhecidas como niossomas. Os niossomas são similares em termos de estrutura e propriedades aos lipossomas, sendo utilizados como sistemas de vetorização de fármacos, aumentando a solubilidade de fármacos pouco solúveis, a biodisponibilidade e a estabilidade de fármacos vetorizados (KUMAR, RAJESHWARRAO, 2011; MARIANECCI *et al.*, 2014).

Essas supraestruturas foram reportados pela primeira vez nos anos 70 por pesquisadores da indústria cosmética (HANDJANI-VILA *et al.*, 1979). Desde então um crescente interesse quanto às suas propriedades e aplicações vem sendo mostrado nos campos farmacêutico, cosmético e da indústria de alimentos.

Os principais fatores que influenciam na autoassociação de surfactantes para formar niossomas são termodinâmicos e físico-químicos. Pode-se citar o balanço hidrofílico-lipofílico, características geométricas da molécula, como o comprimento da cadeia lipídica, o empacotamento da cadeia e a assimetria de membrana (TIWARI, RAJESHWARRAO, 2011).

Dentre os métodos existentes para a produção de niossomas estão os métodos de aquecimento, dióxido de carbono supercrítico, extrusão, concentração hidrodinâmica microfluída e deslocamento de solvente. Este último método se utiliza do efeito Ouzo para formar formulações monodispersas e estáveis. (BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2010; MARIANECCI *et al.*, 2014)

Carreadores niossomais são adequados para vetorização de inúmeros agentes farmacológicos e de diagnóstico, sendo utilizados como sistemas de liberação dérmicos e transdérmicos, oculares, orais, pulmonares e até mesmo gênicos. Formulações com niossomas apresentam melhor penetração na pele, liberação sustentada e maior estabilidade em comparação com lipossomas. A

permeação cutânea elevada dos niossomas se deve à fusão da partícula com o estrato córneo (CHOI, MAIBACH, 2005; TIWARI, RAJESHWARRAO, 2011)

Vale ressaltar que os niossomas superam desvantagens associadas aos lipossomas, pois os surfactantes são facilmente derivatizados levando a uma maior versatilidade para as suas estruturas vesiculares. Além disso, possuem custo inferior e estabilidade superior em comparação com fosfolipídios. (TIWARI, RAJESHWARRAO, 2011; MARIANECCI *et al.*, 2014)

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DA 2-METIL-6-BENZOTIAZOLAMINA

A fim de se obter a molécula de interesse, partiu-se de 2-metil-6-nitrobenzotiazol (**1**), previamente sintetizado conforme descrito por Larina e colaboradores (LARINA, LOPYREV, 2009). Para isso, empregou-se cloreto de estanho (II) como agente redutor em ultrassom (GAMBLE *et al.*, 2007). Esta metodologia foi adotada devido ao tempo de reação reduzido em comparação com a metodologia convencional de redução, que utiliza hidrogênio gasoso e catalisadores metálicos de paládio (CLAYDEN *et al.*, 2012). Além disso, a redução com cloreto de estanho (II) em ultrassom evita a necessidade de sistemas pressurizados com gás.

A síntese da 2-metil-6-benzotiazolamina (**2**) foi realizada à temperatura ambiente em etanol, utilizando-se cloreto de estanho (II) em excesso (Figura 5).

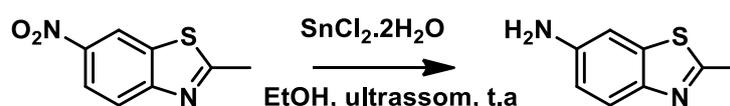


Figura 5. Esquema de reação de redução de 2-metil-6-nitrobenzotiazol (**1**), com formação de 2-metil-6-benzotiazolamina (**2**).

Ao término da reação, o solvente foi removido, o bruto foi ressolubilizado em acetado de etila e foi realizada extração líquido-líquido com solução de hidróxido de potássio para remoção do excesso de cloreto de estanho (II). Após esse procedimento, o bruto de reação foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano e acetato de etila (80:20 v/v) como fase móvel. O composto purificado apresentou aspecto sólido de coloração amarela, tendo sido obtido em rendimento de 82 %.

A estrutura química do composto **2** foi determinada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (<sup>1</sup>H-RMN) em CDCl<sub>3</sub> (Figura 6). O singleto em 2,74 ppm é referente aos hidrogênios H<sub>1</sub> da metila ligada ao anel heterocíclico aromático. Os hidrogênios H<sub>5</sub> da arilamina podem ser identificados pelo pico largo em 3,46 ppm. O hidrogênio aromático H<sub>3</sub> apresenta um sinal como duplo dubleto em 6,78 ppm devido a acoplamento com H<sub>4</sub> (<sup>3</sup>J = 8,6 Hz) e com H<sub>2</sub> (<sup>4</sup>J = 2,1 Hz). O dubleto em 7,05 ppm,

refere-se a H<sub>2</sub>, o qual está acoplado a H<sub>3</sub>. Por sua vez, o duplete em 7,69 ppm, também acoplado a H<sub>3</sub>, é referente ao hidrogênio H<sub>4</sub>. Com base no resultado espectroscópico, é possível afirmar que o composto **2** foi obtido com alta pureza.

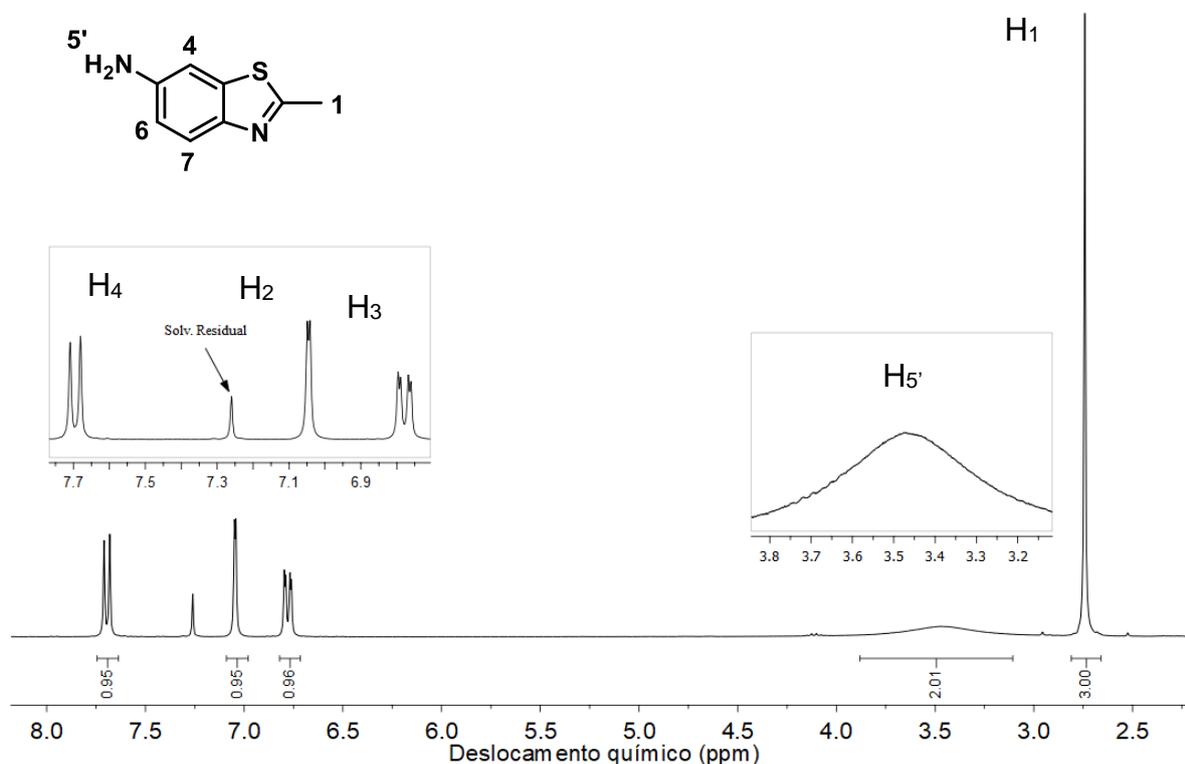


Figura 6. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto **2** (solvente: CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.2 OBTENÇÃO DA *N*-(2-METIL-6-BENZOTIAZOLIL)DECANAMIDA

Visando a obtenção de uma molécula com caráter anfifílico, foi realizado o acoplamento de uma cauda hidrofóbica de 10 carbonos à estrutura da 2-metil-6-benzotiazolamina (**2**). Para isso, empregou-se como agente de acoplamento o composto tetrafluoroborato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU). A escolha do mesmo foi pautada em diversas vantagens descritas na literatura (VALEUR, BRADLEY, 2009), tais como eficácia em condições reacionais brandas com alto rendimento do produto final e formação de subprodutos de fácil remoção, o que facilita o processo de purificação.

Inicialmente, ácido decanoico (**3**) foi dissolvido em uma mistura de diclorometano e acetonitrila na presença de trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}$ ), para desprotonar a carboxila. Adicionou-se o agente de acoplamento TBTU, a fim de ativar o grupo carboxilato (Figura 8). Após período determinado, o composto **2** foi adicionado ao meio reacional, resultando na formação da *N*-(2-metil-6-benzotiazolil)decanamida (**4**).

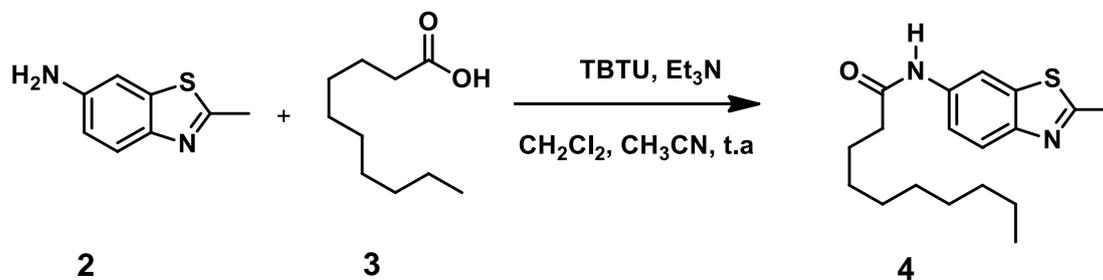


Figura 7. Esquema de acoplamento entre 2-metil-6-benzotiazolamina (**2**) e ácido decanoico (**3**) para obtenção da *N*-(2-metil-6-benzotiazolil)decanamida (**4**).

Após o término da reação, o produto bruto foi evaporado e re-solubilizado em acetato de etila. Os subprodutos foram removidos com água destilada por extração líquido-líquido. A purificação do produto, que permaneceu na fase orgânica, foi realizada por meio de coluna cromatográfica, utilizando-se sílica gel como fase estacionária e mistura de hexano e acetato de etila (80:20 v/v) como fase móvel. Ao final desse procedimento, o produto **4** foi recristalizado em hexano. O composto purificado apresenta-se como um sólido branco ceroso, tendo sido obtido com 74 % de rendimento.

A caracterização do composto **4** foi feita por  $^1\text{H}$ -RMN em  $\text{CDCl}_3$  (Figura 8). Os hidrogênios ligados ao anel aromático ( $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_4$ ) sofrem desblindagem devido ao campo magnético local induzido pela nuvem  $\pi$  em resposta ao campo magnético externo. O duplo dubleto em 7,24 ppm é referente ao  $\text{H}_6$ , que acopla-se a  $\text{H}_7$  ( $^3J = 8,7$  Hz) e  $\text{H}_4$  ( $^4J = 2,1$  Hz). O dubleto em 7,83 ppm. é referente ao  $\text{H}_4$ , o qual acopla-se a  $\text{H}_3$ . Por sua vez, o sinal de  $\text{H}_2$  ocorre em 8,43 ppm, o qual está também acoplado a  $\text{H}_3$ . Em 7,60 ppm observa-se um singlete referente ao hidrogênio  $\text{H}_5$  ligado ao nitrogênio da porção amida da molécula. Com relação aos hidrogênios alifáticos, tem-se o singlete em 2,81 ppm, que é referente aos hidrogênios  $\text{H}_1$  da metila ligada ao anel heterocíclico aromático, tal qual observado previamente no precursor (composto **2**). Em 2,38 ppm observa-se um tripleto referente aos hidrogênios  $\alpha$ -carbonílicos  $\text{H}_9$ . Em

1,70 ppm, pode-se observar um multipeto referente aos hidrogênios  $\beta$ -carbonílicos H<sub>11</sub>. O multipeto em 1,28 ppm é referente aos hidrogênios internos da porção alifática da molécula, indicados na estrutura como H<sub>12-17</sub>. O tripleto em 0,87 ppm é referente aos hidrogênios terminais da cauda alifática, H<sub>18</sub>.

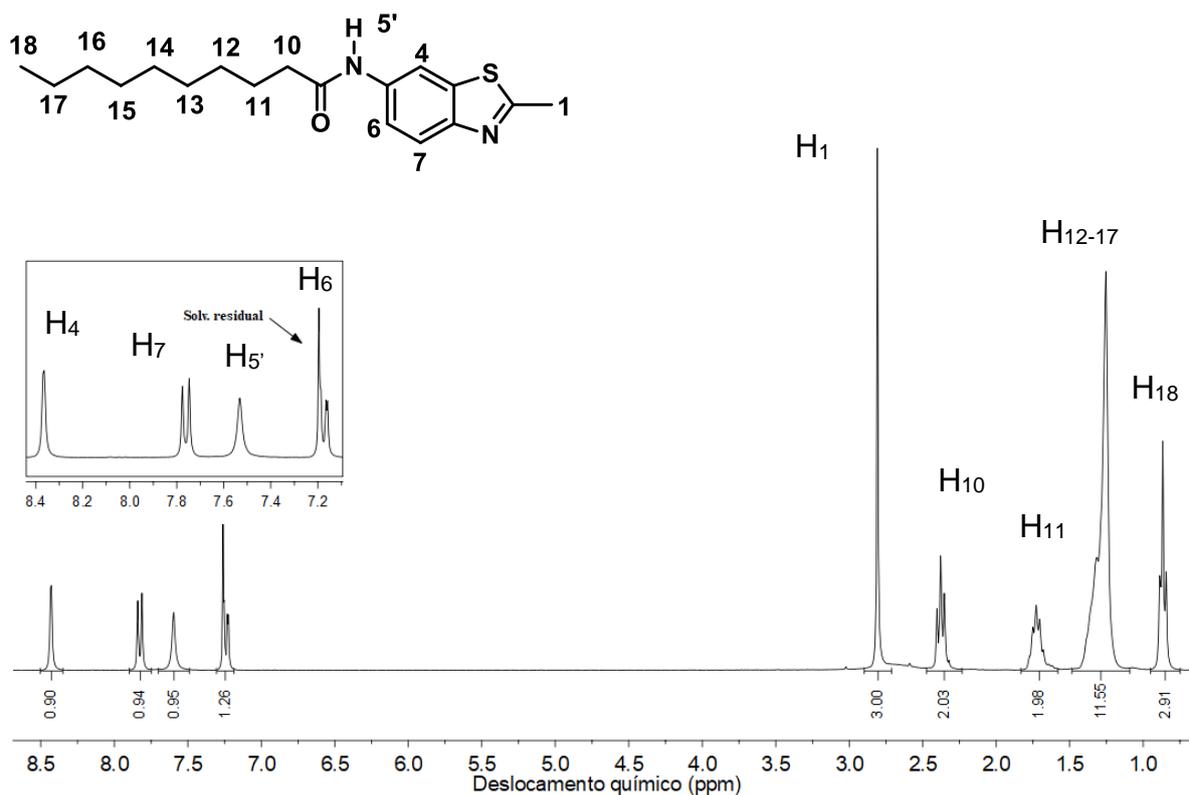


Figura 8. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto **4** (solvente: CDCl<sub>3</sub>).

Este acoplamento ocorre em processo *one-pot* (Figura 9) na presença de base em meio anidro [ref – ver legenda da fig]. A base presente no meio abstrai o hidrogênio do grupo carboxila do ácido (a). O ácido desprotonado reage com o TBTU (b) para formar uma espécie com acila ativada (c) e sal de 1-hidroxibenzotriazol (d). Este ataca a carbonila do ácido ativado, formando o intermediário (e) e um derivado de ureia (f) solúvel em meio aquoso. O intermediário (e) sofre ataque do par de elétrons do nitrogênio da amina primária (g) a ser acoplada ao ácido, formando a amida (h) e liberando 1-hidroxibenzotriazol, também solúvel em água. O produto tende a ser insolúvel em água, tornando a extração líquido-líquido uma opção viável para

purificação da mistura reacional. A força motriz dessa reação consiste na formação do derivado de ureia (f).

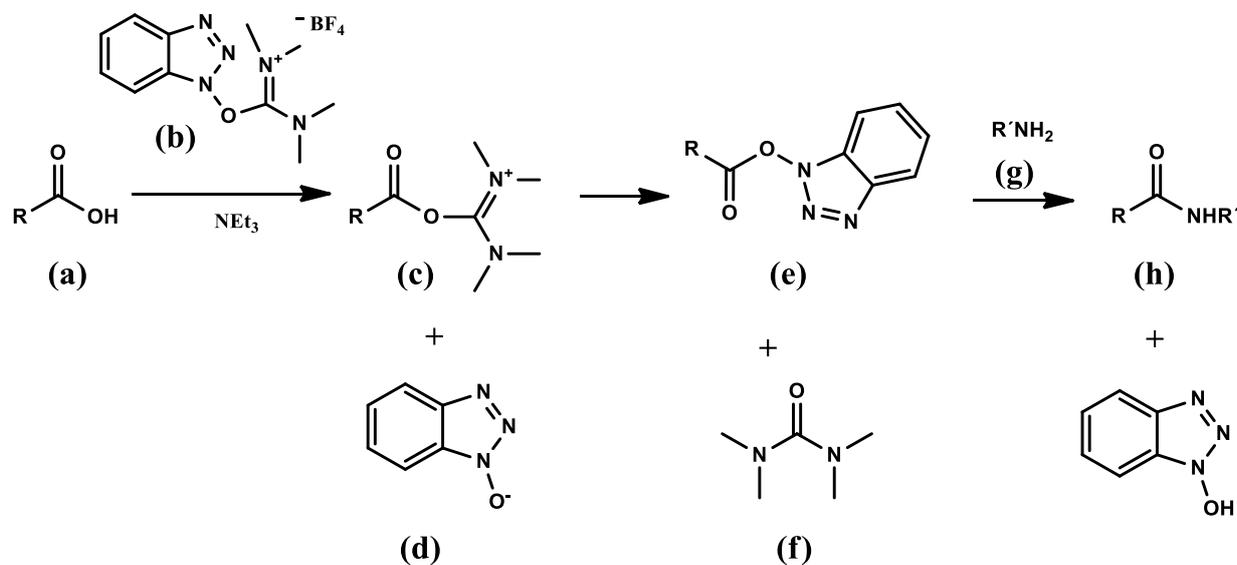


Figura 9. Procedimento one-pot de acoplamento entre ácido carboxílico (a) e amina primária (g) empregando TBTU (b). Adaptado de Valeur & Bradley(2009)

#### 4.3 OBTENÇÃO DE IODETO DE *N*-(2,3-DIMETIL-6-BENZOTIAZOLIO)DECANAMIDA

Como última etapa sintética deste estudo, reagiu-se *N*-(2-metil-6-benzotiazolil)decanamida com iodeto de metila para a obtenção de iodeto de *N*-(2,3-dimetil-6-benzotiazolio)decanamida (5). Iodeto de metila é amplamente empregado como agente metilante para obtenção de derivados de benzotiazolio. (GRZELAKOWSKA, 2015; LUYT, WONG, CHOW, 2016; OKOH *et al.*, 2014) Cabe mencionar que a metilação do composto 4 leva à formação de iodeto como contra-íon, o qual possui reconhecida atividade antimicrobiana. (COSTA, CARVALHAL, 2013) Como solvente desta reação, utilizou-se tolueno devido à baixa solubilidade do composto 4 em outros solventes mais propícios a reações com mecanismo do tipo  $S_N2$ . Após o término da reação, o solvente foi removido à pressão reduzida e o produto de interesse foi purificado por recristalização em acetato de etila. O composto purificado apresenta-se como um sólido avermelhado ceroso, tendo sido obtido com 68 % de rendimento. O esquema desta reação pode ser visualizado na Figura 10.

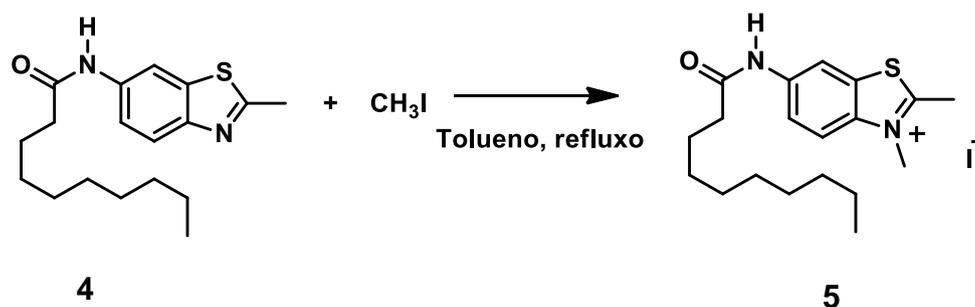


Figura 10. Esquema da reação entre *N*-(2-metil-6-benzotiazolil)decanamida (**4**) com iodeto de metila para obtenção do iodeto de *N*-(2,3- dimetil-6-benzotiazolio)decanamida (**5**).

A caracterização do composto anfifílico **5** foi realizada por meio de  $^1\text{H}$ -RMN em  $\text{DMSO-d}_6$ , ressonância magnética nuclear de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) em  $\text{DMSO-d}_6$ , espectroscopia na região do infravermelho por refletância total atenuada (IR-ATR), ponto de fusão (PF) e verificação da solubilidade em diversos solventes de uso comum em laboratório.

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto **5** (Figura 11) é compatível com a estrutura química esperada. O duplo dubleto em 7,84 ppm é referente ao  $\text{H}_3$  acoplado a  $\text{H}_4$  ( $^3J = 9,2$  Hz) e  $\text{H}_2$  ( $^4J = 2,0$  Hz). O dubleto em 8,20 ppm corresponde ao sinal de  $\text{H}_4$ , enquanto que dubleto em 8,84 ppm refere-se ao sinal de  $\text{H}_2$ . O singleto em 10,44 ppm é referente ao  $\text{H}_5$ , o qual encontra-se mais desblindado em relação ao observado no composto **4**. Quanto aos hidrogênios da cadeia alifática da amida, observa-se um tripleto em 2,39 ppm relativo ao sinal de  $\text{H}_6$ , multiplete em 2,21 ppm referente a  $\text{H}_7$ , multiplete em 1,62 ppm de  $\text{H}_8$  e tripleto em 0,85 ppm relacionado ao sinal de  $\text{H}_9$ . Os hidrogênios  $\text{H}_1$  da metila estão associados ao singleto em 3,12 ppm. O sinal dos hidrogênios  $\text{H}_{10}$  da metila ligada ao nitrogênio positivamente carregado do anel aromático é observado como um singleto em 4,15 ppm.

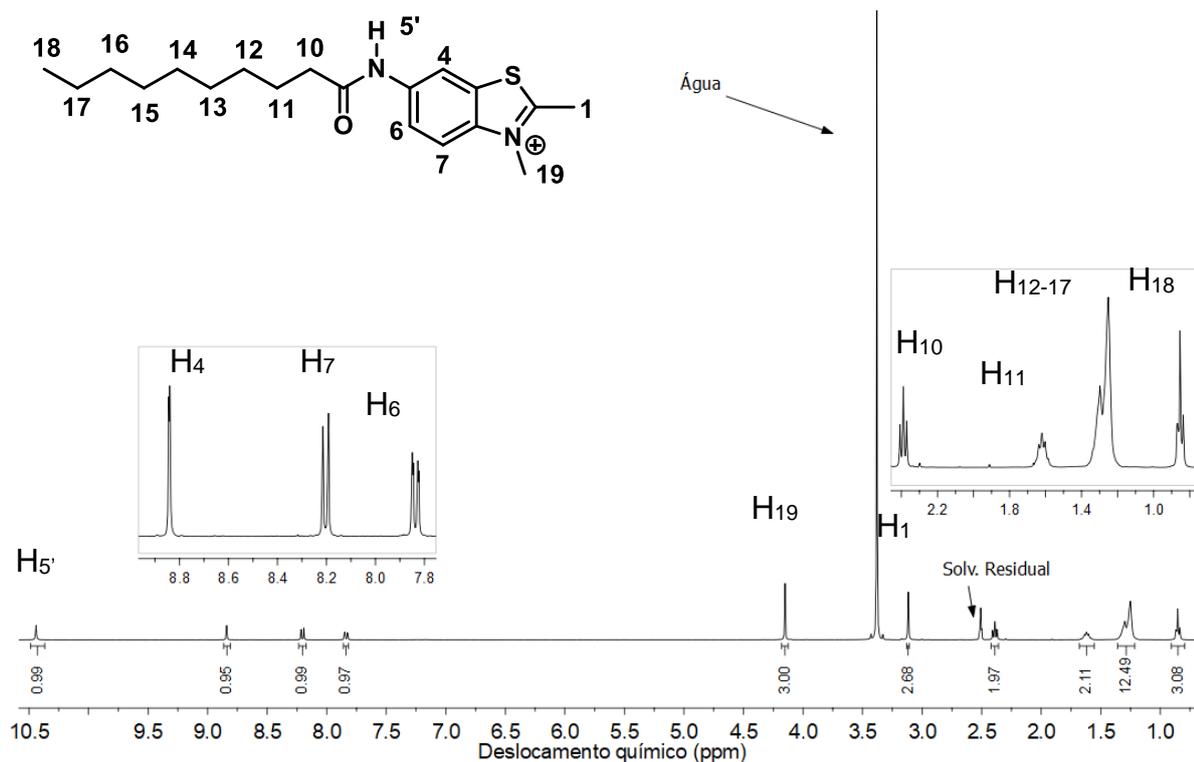


Figura 11. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto **5** (solvente: DMSO- $d_6$ ).

O espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN desacoplado (Figura 12) do composto **5** foi obtido em DMSO- $d_6$  como solvente. Os carbonos mais desblindados apresentam sinais no espectro em 175,2 ppm ( $\text{C}_9$ ) e em 172,5 ppm ( $\text{C}_2$ ). O carbono  $\text{C}_9$  é desblindado tanto pelo efeito da eletronegatividade do oxigênio e do nitrogênio vizinhos, quanto pelo efeito de anisotropia diamagnética, associado aos elétrons  $\pi$  da carbonila. Da mesma forma, o carbono  $\text{C}_2$  é desblindado pelo efeito de eletronegatividade do nitrogênio e do enxofre vizinhos. Os carbonos  $\text{C}_3$ , com sinal em 137,2 ppm, e  $\text{C}_7$ , com sinal em 130,1 ppm, estão na posição *meta* em relação ao grupo amida, e encontram-se mais desblindados que os carbonos em posições *orto* ( $\text{C}_4$  com sinal em 117,4 ppm e  $\text{C}_6$  com sinal em 113,4 ppm) e *para* ( $\text{C}_8$  121,4 ppm).. O sinal de  $\text{C}_3$  apresenta maior valor de deslocamento químico que  $\text{C}_7$ , pois está ligado diretamente a um átomo de enxofre. O carbono  $\text{C}_5$ , por estar na posição *ipso* em relação ao grupo amida, encontra-se mais desblindado, com sinal no espectro em 139,5 ppm. Dentre os carbonos alifáticos, destacam-se os carbonos  $\text{C}_{19}$  em 36,9 ppm e  $\text{C}_{10}$  em 36,6 ppm. O carbono  $\text{C}_{19}$  se refere à metila ligada ao nitrogênio que, por estar carregado

positivamente, causa desblindagem por efeito indutivo. Por sua vez, C<sub>10</sub> é o carbono  $\alpha$ -carbonílico, desblindado por efeito indutivo. O sinal do carbono  $\beta$ -carbonílico C<sub>11</sub> em 31,7 ppm, bem como dos carbonos C<sub>12</sub> em 29,4 ppm, C<sub>13</sub> em 29,2 ppm, C<sub>14</sub> em 29,1 ppm e C<sub>15</sub> em 29,1 ppm apresentam deslocamentos químicos próximos, uma vez que estão na porção interna da cauda alifática do composto **5**. Os carbonos da porção final da cauda alifática apresentam-se mais blindados que os demais. São eles C<sub>16</sub>, com sinal em 25,4 ppm, C<sub>17</sub> em 22,6 ppm e C<sub>18</sub> em 14,4 ppm. Também é mais blindado o C<sub>1</sub>, cujo sinal é observado em 17,4 ppm.

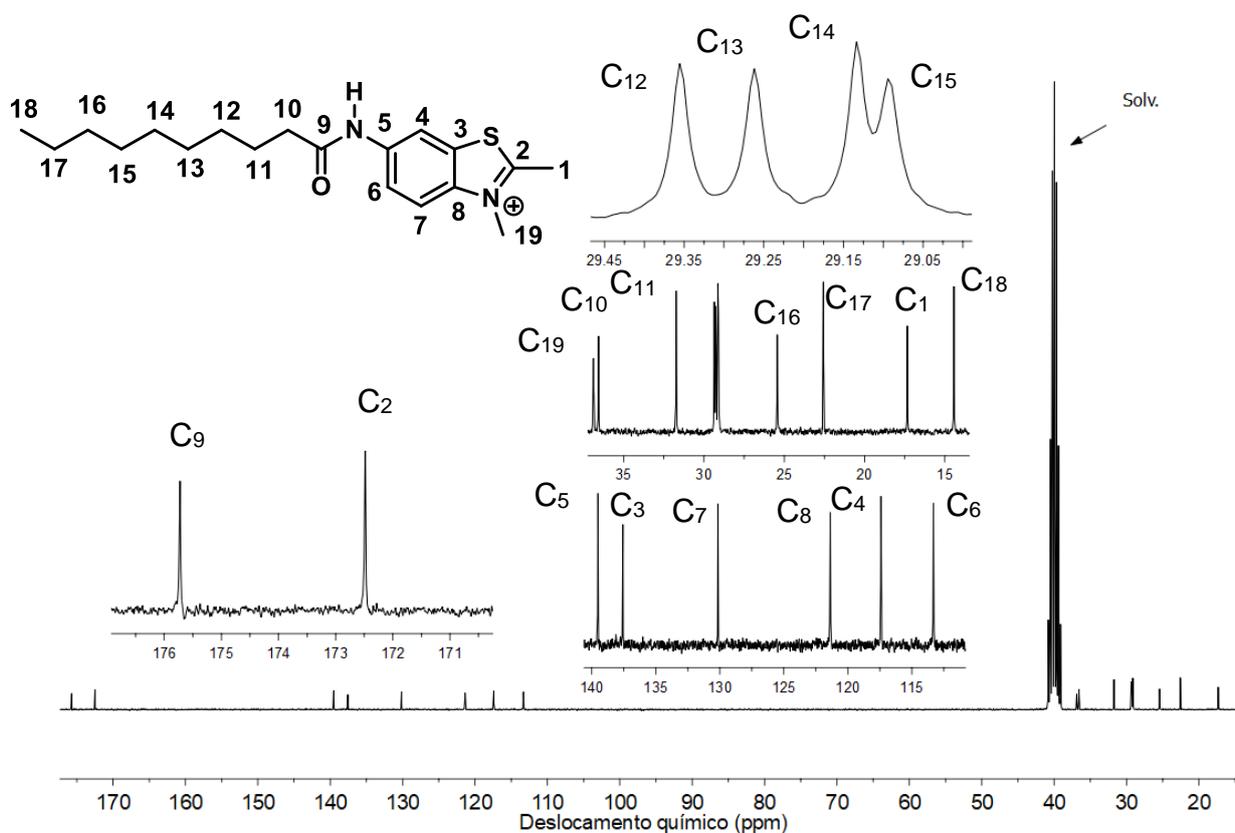


Figura 12. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN do composto **5** (desacoplado, solvente: DMSO-d<sub>6</sub>).

O espectro de IR-ATR do composto **5** (Figura 13) apresenta banda de estiramento de ligação N-H de amida secundária em 3300 cm<sup>-1</sup> e estiramento de C=O de amida em 1670 cm<sup>-1</sup>. O sinal em cerca de 3500 cm<sup>-1</sup> provavelmente está a água residual. Em cerca de 3070 cm<sup>-1</sup> é possível observar bandas de estiramento de =C-H de composto aromático. Bandas típicas de estiramento simétrico e assimétrico de –C-H alifática podem ser visualizadas em 2920 cm<sup>-1</sup> e 2850 cm<sup>-1</sup>. Observa-se banda de estiramento de C=C em 1606 cm<sup>-1</sup>. A deformação axial C-S pode ser vista em 721

cm<sup>-1</sup> Além disso, bandas típicas de deformações angulares fora do plano de ligações C-H do anel aromático podem ser observadas na região abaixo de 800 cm<sup>-1</sup>.

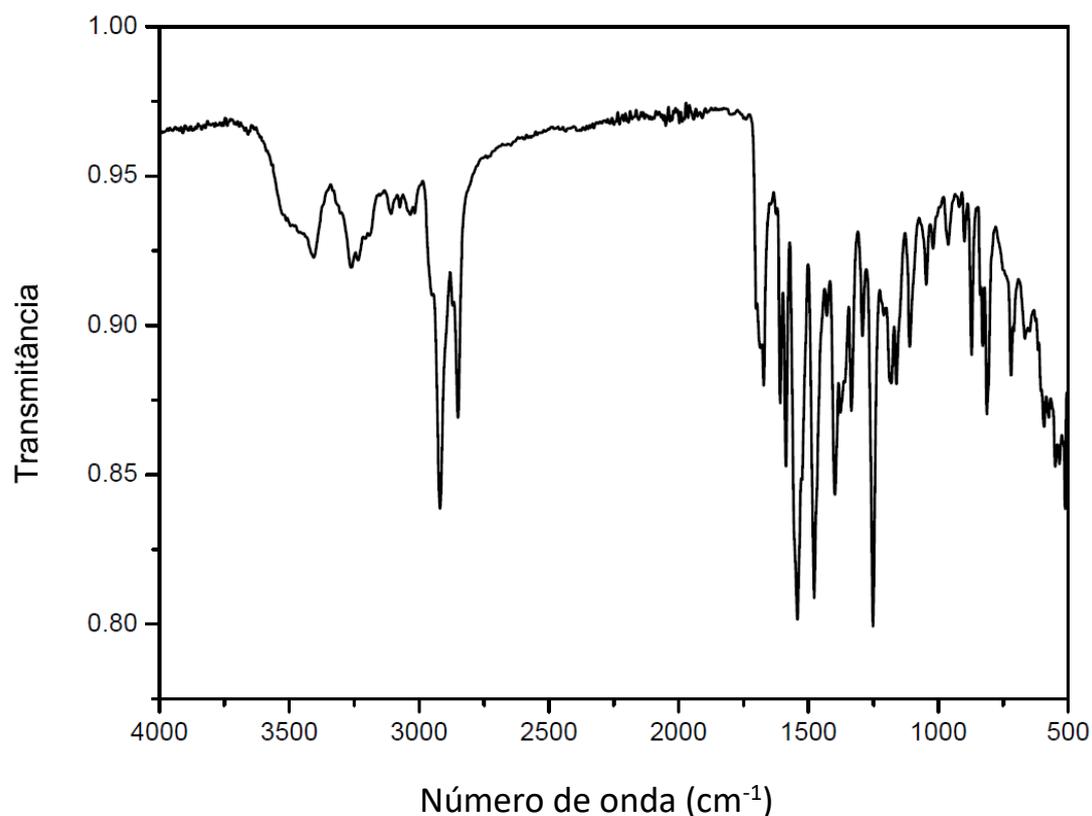


Figura 13. Espectro de infravermelho por refletância total atenuada do composto 5.

O composto 5 apresenta ponto de fusão de 53,5 °C, apesar de um ponto de decomposição de 230 °C ter sido relatado para o iodeto de 2,3-dimetil-6-benzotiazolio. (BUFFA R *et al*, 2001) Essa diferença se dá devido à presença da cauda alifática no composto 5, que dificulta as interações intermoleculares, como interações  $\pi$  *stacking*, Van der Waals e Debye, tornando o processo de transição de fase menos energético. Um paralelo a esse comportamento pode ser traçado para o ácido decanoico, que possui ponto de fusão de 31,6 °C. O baixo ponto de fusão encontrado caracteriza o composto 5 como um líquido iônico, uma vez que esta classe de moléculas é definida por ser um composto orgânico iônico (ou seja, consiste de cátions e ânions) com ponto de fusão inferior a 100 °C (ENDRES, ZEIN, ABEDIN, 2006). O fato do composto 5 ser um líquido iônico corrobora para que o mesmo possua atividade antimicrobiana, uma vez que há relatos dessa propriedade para tais compostos, podendo-se citar em

particular os estudos de Chauhan e colaboradores (2017) e Pendleton & Gilmore (2015).

A solubilidade a 25 °C do composto **5** foi verificada em diferentes solventes (Tabela 1). Considerou-se que o composto é solúvel quando a solubilidade é maior que 0,1 mol L<sup>-1</sup>, parcialmente solúvel quando está entre 0,01 e 0,1 mol L<sup>-1</sup> e insolúvel quando for menor que 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Devido à cauda alifática de 10 carbonos do composto **5**, o mesmo é insolúvel em água apesar de sua característica iônica. Entretanto, o mesmo se apresenta solúvel em etanol. O fato do composto **5** ser insolúvel em água e solúvel em etanol possibilita sua incorporação em niossomas visando administração *in vivo* deste composto. Essas características de solubilidade são essenciais para a viabilização da formulação desses sistemas, conforme discutido posteriormente neste trabalho. Já a baixa solubilidade em acetato de etila corrobora a utilização desse solvente para sua purificação, conforme descrito anteriormente.

Tabela 1. Solubilidade a 25 °C do composto **5** em diferentes solventes.

Solvente	Solubilidade
Acetato de etila	Pouco solúvel
Acetona	Solúvel
Água	Insolúvel
Diclorometano	Solúvel
Etanol	Solúvel
Hexano	Insolúvel
Tetraidrofurano	Solúvel

#### 4.4 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA SUPRAMOLECULAR

Devido à insolubilidade do composto **5** em água (conforme demonstrado pelos resultados descritos no item 4.3), sua administração *in vivo* como antimicrobiano seria um desafio. Estratégias convencionais para casos como esse envolvem a dispersão do composto insolúvel em misturas de água e solventes polares de menor toxicidade, como dimetilsulfóxido. No entanto, essas dispersões tipicamente resultam em absorção errática e incompleta, dificultando a predição do comportamento

farmacocinético (SHARGEL *et al.*, 2015). Além disso, há um limite máximo quanto à proporção de solvente na mistura para aplicação *in vivo*, muitas vezes sendo insuficiente para a adequada dispersão da molécula bioativa. Portanto, a segunda etapa deste estudo consistiu em devotar esforços para desenvolver um sistema supramolecular em meio aquoso capaz de incorporar o composto **5**, visando sua futura aplicação *in vivo* para tratamento de doenças de origem microbiana.

O composto **5** apresenta caráter anfifílico e alta solubilidade em etanol. Essas características abrem a possibilidade de sua incorporação em niossomas empregando-se métodos de preparação do tipo *bottom-up*, em particular aqueles baseados no efeito Ouzo (LEPELTIER, BOURGAUX, COUVREUR, 2014). Este efeito ocorre quando soluções são rapidamente levadas a uma condição metaestável (supersaturação) pela mistura de dois solventes miscíveis entre si (por exemplo, etanol e água), porém de forma que apenas um destes é capaz de dissolver o soluto. Se a supersaturação é expressiva, a nucleação se torna espontânea devido a pequenas flutuações locais (este processo é conhecido como nucleação homogênea). Os núcleos tem uma concentração de soluto maior do que a média do sistema. Como resultado, novas nucleações somente ocorrem em regiões distantes daquelas dos núcleos já existentes (VITALE, KATZ, 2003).

As formulações foram preparadas pelo método de deslocamento de solvente (o qual é baseado no efeito Ouzo), empregando-se fitantriol e polissorbato 80 como componentes estruturantes e de baixa toxicidade do niossoma. Concentrações crescentes do composto **5** foram adicionadas, resultando em formulações com aspecto translúcido, sugerindo que as nanopartículas contêm água em seu interior (Figura 14).



Figura 14. Imagem das formulações contendo concentrações crescentes do composto **5**, evidenciando seu aspecto translúcido.

As formulações foram caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico para determinar a distribuição de tamanho dos niossomas (Figura 16). Nesta técnica, um feixe de laser que incide na amostra é espalhado pelas partículas, que estão em movimento browniano. A intensidade da luz espalhada é detectada ao longo do tempo. O movimento das partículas na amostra causa interferências construtivas e destrutivas, de forma que a intensidade de luz espalhada flutua ao longo do tempo. A flutuação da intensidade da luz espalhada é correlacionada a intervalos curtos de decaimento ( $\tau$ ), na forma de uma função de autocorrelação temporal  $G(\tau)$  (Equação 1).

$$G(\tau) = 1 + b \cdot e^{-2D_t q^2 \tau} \quad (1)$$

onde  $b$  é uma constante relacionada à óptica do equipamento,  $D_t$  é o coeficiente de difusão translacional e  $q$  é o vetor de espalhamento, que pode ser obtido conforme abaixo (Equação 2):

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \text{sen} \left( \frac{\theta}{2} \right) \quad (2)$$

onde  $n$  é o índice de refração do solvente,  $\lambda_0$  é o comprimento de onda do laser no vácuo e  $\theta$  é o ângulo de espalhamento da luz. O diâmetro hidrodinâmico ( $d_h$ ) de partícula pode ser relacionado a  $D_t$  através da equação de Stokes-Einsten (Equação

3), onde  $k_b$  é a constante de Boltzman,  $T$  é a temperatura, e  $\eta$  é a viscosidade do dispersante. (THOMAS *et al*, 2017)

$$D_t = \frac{k_b T}{3\pi\eta d_h} \quad (3)$$

Uma vez que os sistemas reais em geral são polidispersos, o resultado consiste em uma soma de decaimentos exponenciais. Dessa forma, métodos matemáticos são necessários para se extrair informação da função de autocorrelação. Um dos métodos mais comuns para extrair informações da função de autocorrelação é o método dos cumulantes. A partir dele, é possível obter  $d_h$  e informações sobre a variância do sistema. Entretanto, este método é confiável somente para valores baixos de  $\tau$  e amostras com distribuições estreitas (KOPPEL, 1972) Por sua vez, o algoritmo CONTIN é um método baseado em uma transformada de Laplace inversa que permite analisar a função de autocorrelação de sistemas com várias populações. (PROVENCHER, 1982)

A análise da luz espalhada, aplicando-se o método dos cumulantes, resultou em valores de diâmetro (*Z-average*) entre 229 e 383 nm (Tabela 2). Este valor apresentou tendência de aumento com incrementos da concentração do composto **5** na formulação. O diâmetro obtido por esta técnica considera a camada de hidratação da partícula, a qual é influenciada pela presença de compostos carregados. Portanto, a tendência de aumento do diâmetro hidrodinâmico pela adição de concentrações crescentes do composto **5** não está necessariamente relacionada a um aumento do raio de giro dos niossomas, mas sim a uma provável expansão da sua camada de hidratação. Observa-se que as formulações F-0, F-2, F-5 e F-10 apresentam distribuição de tamanho monomodal. O mesmo não ocorre com a amostra F-1, que apresentou mais de uma população. Isso pode estar relacionado com a presença esparsa de carga positiva na superfície destas partículas, tornando-as heterogêneas quanto à carga de superfície e favorecendo a agregação via interação eletrostática. Uma vez que a formulação F-1 é polidispersa, deve ser analisada pelo algoritmo CONTIN, conforme discutido acima, o qual indica que a população com diâmetro médio de 563 nm é aquela de maior relevância. O conjunto de resultados demonstra que a formulação F-1 não é adequada para aplicação biológica. As demais, por sua vez, apresentam valores de diâmetro adequados para aplicação *in vivo*.

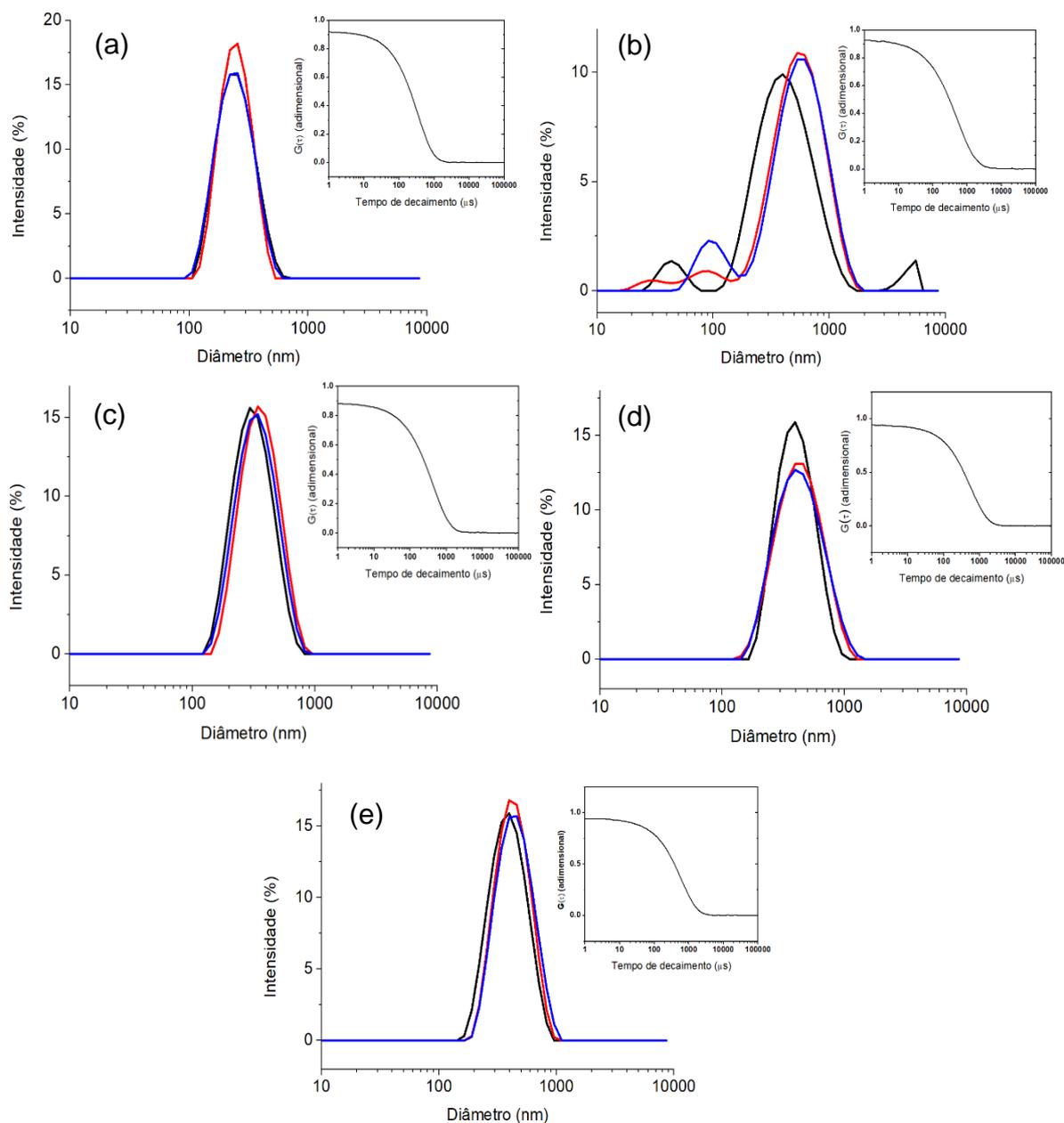


Figura 15. Distribuição de tamanho de partícula das formulações preparadas com concentrações crescentes do composto **5**: (a) F-0, (b) F-1, (c) F-2, (d) F-5, (e) F-10, por espalhamento de luz dinâmico (meio dispersante: água). Cada amostra foi medida em triplicata, sendo cada replicata representada como uma curva individual. A função de autocorrelação temporal ( $G(\tau)$ ) no *insert* de cada gráfico de distribuição de diâmetro é representativa de três medidas.

Tabela 2. Caracterização das formulações contendo quantidades crescentes do composto **5**, a partir de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (n = 3).

Formulação	Método dos cumulantes		Algoritmo CONTIN		
	Z-average (nm)	PDI (adimensional)	d <sub>h</sub> (nm)	d <sub>h</sub> (nm)	d <sub>h</sub> (nm)
F-0	229 ± 4	0,11 ± 0.02	255 ± 3	0 ± 0	0 ± 0
F-1	346 ± 38	0,43 ± 0.09	563 ± 88	78 ± 29	1630 ± 2797
F-2	293 ± 17	0,22 ± 0.01	377 ± 13	0 ± 0	0 ± 0
F-5	383 ± 6	0,14 ± 0.01	445 ± 23	0 ± 0	0 ± 0
F-10	377 ± 25	0,15 ± 0.00	438 ± 29	0 ± 0	0 ± 0

PDI = índice de polidispersão

d<sub>h</sub> = diâmetro hidrodinâmico

A incorporação do composto **5** nas partículas deve levar a mudanças nas suas características de superfície. Isso é relevante, pois a carga de superfície influencia na interação entre nanopartículas e proteínas, tanto eucarióticas quanto procarióticas (TORTORA, 2013). No entanto, não é comum determinar diretamente a carga de superfície, mas sim a diferença de potencial entre o meio aquoso externo e a camada aquosa estacionária presa à nanopartícula (camada de hidratação). Este valor de potencial é fortemente influenciado pelo pH, temperatura e força iônica do meio. Sua determinação pode ser realizada por várias metodologias, desde que a força iônica do meio seja conhecida. No caso das formulações do presente estudo, optou-se por não adicionar sais ao meio, capazes de tornar a força iônica conhecida, porém com o risco de influenciar as características das nanopartículas. Portanto, o valor do potencial mencionado acima não pode ser determinado. Considerou-se, em seu lugar, a mobilidade eletroforética  $U_E$  como indicativo da influência do composto **5** na carga de superfície das nanopartículas. Para isso, as formulações foram analisadas por técnica de microeletroforese, onde uma voltagem é aplicada a um par de eletrodos nas extremidades de uma cubeta contendo as nanopartículas em meio aquoso, que tendem a migrar para o eletrodo de carga oposta. A velocidade das nanopartículas em movimento nessas condições, sob um campo elétrico aplicado, é expressa como  $U_E$ .

Os valores de  $U_E$  obtidos para as formulações (Tabela 3) variaram de -1,48 a +0,94  $\mu\text{m cm/V s}$ , com tendência de mudança de sinal (de negativo para positivo) devido à adição de concentrações crescentes do composto **5**. Isto é esperado, pois o composto **5** tem caráter anfifílico com cabeça catiônica, de forma que sua cauda hidrofóbica se acomoda internamente na partícula enquanto que a cabeça polar fica exposta para o meio aquoso. Como fitantriol e polissorbato 80 (constituintes das nanopartículas) possuem hidroxilas em suas estruturas químicas, a formulação F-0 apresentou valor de  $U_E$  negativo. O mesmo foi observado para as formulações com concentrações menores do composto **5** (F-1 e F-2). Por sua vez, houve inversão de sinal nas formulações com maiores concentrações do composto **5** (F-5 e F-10). Com a finalidade de aplicação dessas formulações como potenciais antimicrobianos, são mais promissoras as formulações F-5 e F-10. Estas são carregadas mais positivamente, o que provavelmente aumentará sua interação com as células bacterianas.

Tabela 3. Valores de mobilidade eletroforética das formulações contendo quantidades crescentes do composto **5** (n = 6).

Formulação	Mobilidade eletroforética ( $\mu\text{m cm/V s}$ )
F-0	- 1,31 $\pm$ 0,07
F-1	- 1,48 $\pm$ 0,06
F-2	- 0,51 $\pm$ 0,06
F-5	0,11 $\pm$ 0,02
F-10	0,94 $\pm$ 0,06

Medidas de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) com fonte de raios X convencional foram realizadas à temperatura ambiente para determinar se de fato a estrutura de fase dos sistemas é vesicular. Nesta técnica, um feixe monocromático de raios X incide sobre a amostra e interage com seus elétrons, sendo então espalhado. Os raios X que sofreram espalhamento quasi-elástico em ângulos próximos a zero (tipicamente  $< 5^\circ$ ) em relação à direção do feixe incidente são detectados, de forma que os dados obtidos (2D) correspondem a uma medida de intensidade de fótons detectada em função do vetor de espalhamento  $\vec{q}$ . O vetor de

espalhamento é definido como a diferença entre os vetores de onda dos raios X espalhados ( $\vec{k}'$ ) e dos incidentes ( $\vec{k}$ ), conforme Equação 4 (GLATTER, 1982).

$$|\vec{q}| = |\vec{k}' - \vec{k}| = \frac{4\pi \cdot \sin \theta}{\lambda} \quad (4)$$

sendo  $\lambda$  o comprimento de onda dos raios X incidentes e  $2\theta$  o ângulo entre os vetores  $k'$  e  $k$ . O dado bidimensional é posteriormente reduzido a curvas 1D de intensidade de espalhamento  $I(q)$ . O resultado de SAXS é influenciado pelo tamanho, forma e volume do objeto espalhante, concentração, contraste (diferença de densidade eletrônica entre o espalhante e o meio), distância da amostra em relação ao detector, resolução e colimação do feixe (GLATTER, 1982). As curvas de espalhamento podem ser ajustadas a modelos matemáticos com o objetivo de acessar informações relativas à estrutura do objeto espalhante (fator forma).

As amostras de niossomas, cujo espalhamento da água foi subtraído, apresentaram perfis relativamente semelhantes. Em todas as curvas, observa-se um pico alargado (Figura 16) que tipicamente pode estar associado a sistemas vesiculares (FONG *et al*, 2017). O pico largo observado deve ser oriundo de contrastes de densidade eletrônica da bicamada e do meio externo. Picos de difração característicos de sistemas multilamelares não foram observados. Cabe salientar que o ajuste das curvas a modelos matemáticos que descrevem o fator forma da estrutura é uma análise avançada e complexa, a qual está em andamento e constitui-se em perspectiva imediata de continuidade deste trabalho. Apenas após o adequado ajuste a modelos apropriados, será possível afirmar com segurança que os niossomas desse estudo são de fato vesículas unilamelares.

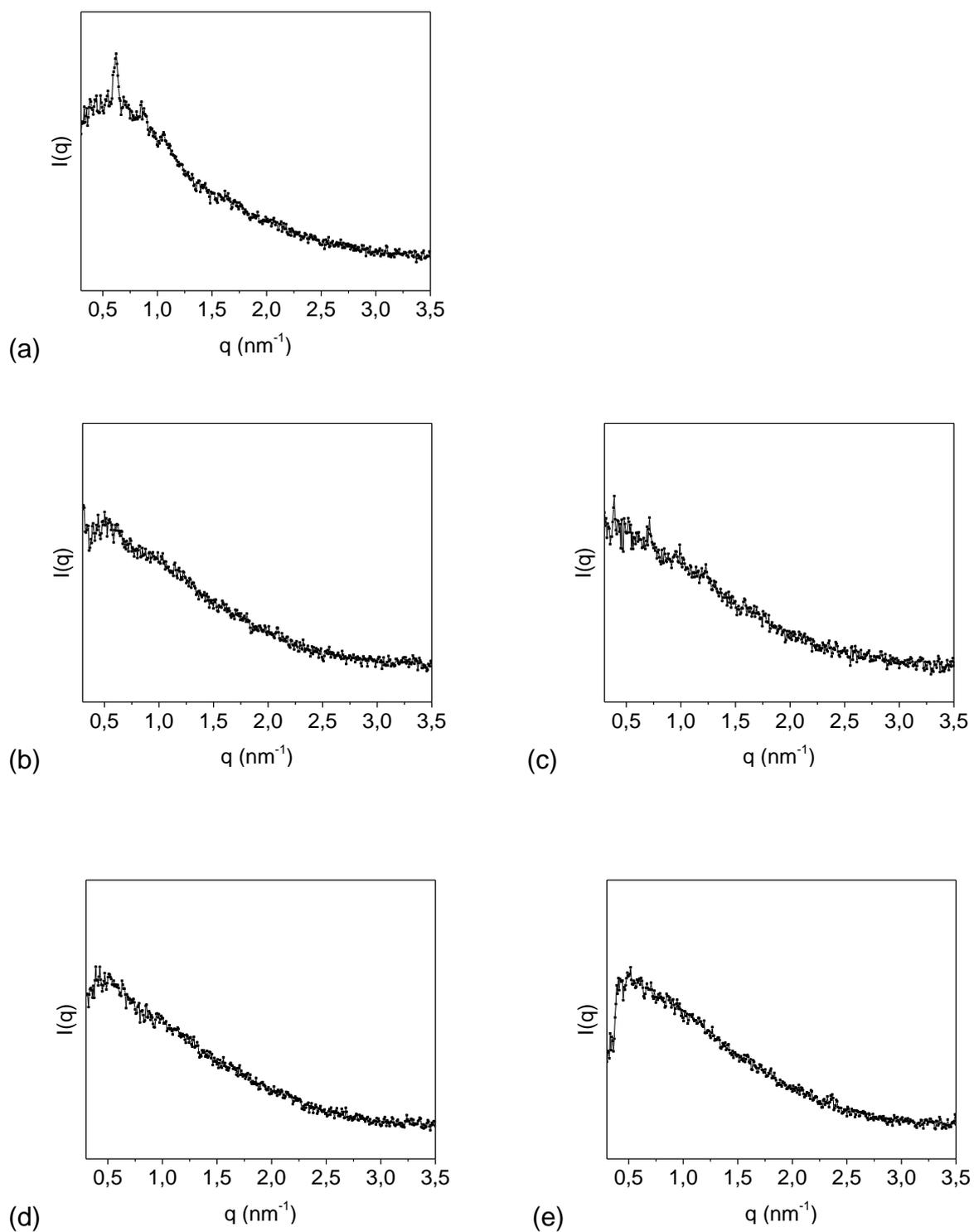


Figura 16 Perfis de espalhamento de raios X a baixos ângulos das amostras (a) F-0, (b) F-1, (c) F-2, (d) F-5 e (e) F-10 (fonte de raios X convencional, porta-amostra de capilar de quartzo, temperatura ambiente). O espalhamento do solvente foi descontado das medidas das amostras.

É possível observar claramente na curva da amostra F-0, e menos nitidamente nas curvas das amostras F-1 e F-2, a presença de picos de difração com posição relativa  $\sqrt{2}, \sqrt{4}, \sqrt{6}$ , que caracterizam uma estrutura líquido-cristalina de fase cúbica bicontínua reversa, mais especificamente de grupo espacial  $Im3m$ . Os índices de Miller da estrutura  $Im3m$  para esse picos são (110), (200) e (211), respectivamente. Sabe-se que determinadas proporções de fitantriol e polissorbat 80 em excesso de água resultam na estrutura do tipo  $Im3m$ . (POLETTO *et al*, 2017). O planejamento dos niossomas nesse estudo foi pautado no fato de que vesículas tendem a apresentar menor toxicidade que fases cúbicas bicontínuas reversas. No entanto, a proporção de fitantriol e polissorbat 80 usada na formulação F-0 não resultou em uma totalidade de niossomas, havendo também a coexistência de cubossomas (estruturas com fase  $Im3m$ ). Este é um balanço delicado, pois o aumento da proporção de polissorbat 80 em relação ao fitantriol poderia levar à formação de micelas ao invés de vesículas. A desvantagem das micelas em relação às outras estruturas mencionadas acima é justamente sua baixa resistência à pressão osmótica, que levaria à sua fácil ruptura após administração *in vivo* (pois o comportamento do sistema na circulação sanguínea é semelhante ao do sistema em meio altamente diluído, abaixo da CMC). A adição de compostos positivamente carregados tende a desestruturar fases líquido-cristalinas, o que de fato ocorreu nas amostras F-5 e F-10, que apresentam maior teor do composto **5**, visto que os picos de difração de fase  $Im3m$  não são observados nas curvas de SAXS dessas amostras (Figura 17).

## 5. CONCLUSÃO

No presente trabalho, sintetizou-se um composto anfifílico inédito, o iodeto de *N*-(2,3-dimetil-6-benzotiazolio)decanamida, o qual foi obtido com bons rendimentos e caracterizado espectroscopicamente por meio de  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, IV-ATR, também sendo analisados o ponto de fusão e solubilidade. O composto em questão pode ser caracterizado como um surfactante catiônico. Além disso, devido ao seu ponto de fusão inferior a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , o mesmo pode ser classificado também como um líquido iônico.

Devido a suas características de solubilidade, o composto em questão seria de difícil administração em pacientes. Isso se tornou potencialmente viável através de sua incorporação em sistemas supramoleculares nanotecnológicos do tipo niossoma, compostos por fitantriol e polissorbato 80. Esses sistemas foram caracterizados por técnicas de espalhamento de luz e raios-X, as quais evidenciaram que a concentração do composto anfifílico afetou o tamanho das partículas e sua estruturação. Apenas em concentrações mais elevadas do composto anfifílico, obteve-se diâmetro médio inferior a  $400\text{ nm}$  e perfil de distribuição monomodal (considerado adequado para aplicação biológica), bem como um único tipo de estrutura, a qual é provavelmente vesicular. Medidas de mobilidade eletroforética indicaram que a presença do composto anfifílico contribuiu para tornar as partículas positivamente carregadas, o que poderia aumentar a interação partícula-bactéria. Espera-se que a cauda hidrofóbica do composto seja capaz de interagir com a parede celular bacteriana. Ensaios para verificar a atividade do composto isolado e do sistema supramolecular frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas é uma perspectiva imediata de continuidade deste trabalho.

## 6. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

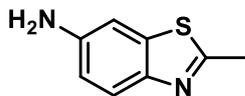
A síntese dos compostos orgânicos e preparação dos niossomas foi realizada no Laboratório de Química Supramolecular para Aplicações Biomédicas (Instituto de Química-UFRGS). As medidas de caracterização dos compostos e dos sistemas supramoleculares foram realizadas no Instituto de Química e Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### 6.1 MATERIAIS

A síntese dos compostos descritos neste estudo foi realizada empregando-se ácido decanoico (pureza 98%, Sigma-Aldrich®, EUA), ácido clorídrico 38 % (Vetec®, Brasil), cloreto de estanho (II) di-hidratado (pureza 98%, Merck®, Alemanha), hidróxido de potássio (pureza, 95% Vetec®, Brasil), iodeto de metila (pureza 99% Merck®, Alemanha), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU, pureza 97%, Sigma-Aldrich®, EUA), trietilamina (pureza 99.5%, Sigma-Aldrich®, EUA) e sulfato de magnésio (pureza 98%, Sigma-Aldrich®, EUA). Utilizaram-se os solventes acetonitrila PA, diclorometano PA, acetato de etila PA, hexano PA e tolueno PA. Peneira molecular 4 Å (Sigma-Aldrich®, EUA) foi utilizada para secagem dos solventes, conforme descrito em (WILLIAMS; LAWTON, 2010). Sílica gel 60 (Merck®, Alemanha) foi utilizada como fase estacionária para cromatografia em coluna.

A preparação dos sistemas supramoleculares foi realizada empregando-se fitantriol (3,7,11,15-tetrametilexadecano-1,2,3-triol, pureza > 95%, lote: UQ40907005, produzido por DSM® Nutritional Products e fornecido por Sarfam®, Brasil) e polissorbato 80 (pureza 98%, lote MKBV7222V, Sigma-Aldrich® EUA), bem como água ultrapura (tipo 1, resistividade de 18 mΩ.cm a 25°C). Água ultrapura foi utilizada para diluir os sistemas dispersos na realização das medidas de diâmetro e mobilidade eletroforética.

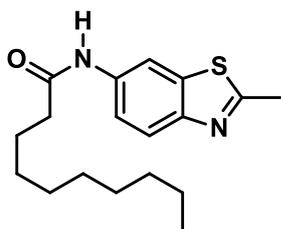
## 6.2 SÍNTESE DE 2-METIL-6-BENZOTIAZOLAMINA



Em um balão monotubulado de 25 mL foram adicionados 2-metil-6-nitrobenzotiazol (1) (1 mmol) e cloreto de estanho (II) dihidratado (10 mmol). Etanol (5 mL) foi adicionado para dissolução dos reagentes. A mistura reacional foi levada a banho de ultrassom (Embrasol, Limpsonic, Brasil) à temperatura ambiente por 3 h. O solvente foi removido à pressão reduzida (evaporador rotativo IKA®, RV-10, China) mantendo-se a temperatura controlada em 40 °C. O bruto de reação foi redissolvido em acetato de etila (20 mL) e realizou-se extração líquido-líquido com solução aquosa de KOH 5 M. Este procedimento foi repetido com 3 porções de 25 mL de acetato de etila. Ao final da extração, as porções orgânicas foram combinadas e filtradas na presença de sulfato de magnésio. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo à pressão reduzida (evaporador rotativo IKA®, RV-10, China), com temperatura de 40 °C. O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica gel como fase estacionária e a mistura hexano/ acetato de etila (80:20 v/v) como fase móvel.

O produto foi obtido como um sólido de coloração amarelada. Rendimento 82%. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 7,69 (d, *J*= 8,6 Hz, 1H), 7,05 (d, *J*=2,1 Hz, 1H), 6,78 (dd, *J*= 8,6Hz, *J*= 2,1Hz, 1H), 3,46 ppm (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,74 (s, 3H).

## 6.3 SÍNTESE DE *N*-(2-METIL-6-BENZOTIAZOLIL)-DECANAMIDA

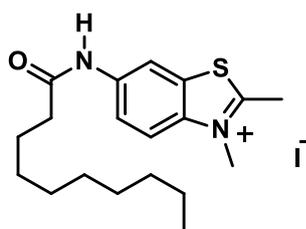


Foi preparada uma solução de TBTU (1,33 mmol) em acetonitrila (5 mL). Em um frasco separado foi preparada uma solução de ácido decanoico (1,33 mmol) e trietilamina (1,33 mmol) em diclorometano (5 mL) Após a dissolução de ambas as soluções, as duas foram vertidas em um balão monotubulado de 25 mL e a mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, adicionou-se 2-metil-6-benzotiazolamina (1 mmol) ao meio reacional, o qual permaneceu sob agitação por 2 h à temperatura ambiente. Os solventes foram removidos à pressão reduzida em evaporador rotativo. O bruto reacional foi solubilizado em diclorometano (20 mL). Realizou-se a extração de produtos secundários com 3 porções de solução aquosa de HCl 0,1 M (20 mL). A

fase orgânica foi filtrada na presença de sulfato de magnésio e concentrada à pressão reduzida em evaporador rotativo. O resíduo bruto foi purificado em coluna cromatográfica com sílica gel como fase estacionária, empregando-se a mistura de solventes hexano e acetato de etila (80:20 v/v) como fase móvel. As frações contendo o produto foram levadas à secura em evaporador rotativo e recristalizadas em hexano.

O produto foi obtido como um sólido de coloração branca e aspecto de cera. Rendimento de 74 %. RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 8,43 (s, 1H), 7,76 (d,  $J=8,7$  Hz, 1H), 7,60 (s, 1H, NH), 7,25 (dd,  $J=8,7$  Hz,  $J=2,1$  Hz, 1H), 2,81 (s, 3H), 2,38 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H), 1,82-1,64 (m, 2H), 1,44-1,12 (m, 12H), 0,87 (t,  $J=6,5$ , 3H).

#### 6.4 SÍNTESE DE IODETO DE N-(2,3-DIMETIL-6-BENZOTIAZOLIO)DECANAMIDA



Em um reator de Schlenk âmbar de 25 mL foram adicionados *N*-(2-metil-6-benzotiazolil)-decanamida (1 mmol), iodeto de metila (5 mmol) e tolueno anidro (5 mL). O sistema foi mantido sob refluxo por 18 h. Após esse período, o solvente foi removido à pressão reduzida e o bruto reacional foi dissolvido em 20 mL de acetato de etila quente (60 °C). O sistema foi resfriado lentamente, a fim de precipitar o produto, e o sobrenadante foi removido. O processo foi repetido 3 vezes.

O produto foi obtido como um sólido avermelhado de aspecto ceroso. Rendimento de 68 %. Ponto de fusão: 50,4-53,5 °C. IV-ATR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3300 (estiramento N-H amida secundária) 3070 (deformação axial C-H aromática), 2920 ( $\nu_s$  C-H), 2850 ( $\nu_{as}$  C-H), 1670 ( $\nu$  C=O da amida), 1606 (deformação axial C=C aromática), 721 (deformação axial C-S). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$  (ppm): 10,44 (s, 1H, NH), 8,84 (d,  $J=2,0$  Hz, 1H), 8,20 (d,  $J=9,2$  Hz, 1H), 7,84 (dd,  $J=9,2$  Hz,  $J=2,0$  Hz, 1H), 4,15 (s, 3H), 3,12 (s, 3H), 2,39 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H), 1,63-1,51 (m, 2H), 1,41-1,12 (m, 12H), 0,85 (t,  $J=6,5$  Hz, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,4 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$  (ppm): 175,7; 172,5; 138,5; 137,6; 130,14; 121,4; 117,4; 113,3; 36,9; 36,6; 31,8; 29,4; 29,3; 29,1; 29,1; 25,4; 22,6; 17,3; 14,4.

## 6.5. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DOS PRODUTOS

As medidas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram realizadas em espectrômetro Bruker® BioSpin GmbH, Alemanha. Os espectros de hidrogênio foram obtidos a 300 MHz ou 400 MHz, enquanto que os espectros de carbono foram medidos a 75,4 MHz. Os produtos foram dissolvidos em clorofórmio deuterado (Sigma-Aldrich®, EUA) ou dimetilsulfoxido deuterado (Sigma-Aldrich®, EUA) e as soluções foram transferidas para tubos de 5 mm de diâmetro. A medida de espectroscopia na região do infravermelho por refletância total atenuada (ATR) foi feita em um espectrofotômetro Bruker® ALPHA II (Alemanha) com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  com 20 varreduras. O ponto de fusão foi obtido com auxílio de um equipamento de ponto de fusão a seco (Quimis®, Q340S, Brasil).

## 6.6. PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS DISPERSOS

Preparou-se uma solução etanólica (20 mL) contendo uma mistura de fitantriol (90 mg) e concentrações crescentes de iodeto de N-(2,3-dimetil-6-benzotiazolio)decanamida (Tabela 4), bem como uma solução aquosa (45 mL) contendo polissorbato 80 (50 mg). Ambas foram mantidas sob agitação magnética branda a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  até completa dissolução. Após esse período, a fase orgânica foi injetada na fase aquosa e mantida sob agitação por 10 min a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . O etanol e parte da água foram removidos à pressão reduzida em evaporador rotativo (IKA® RV-10, Alemanha) a  $40\text{ }^\circ\text{C}$ . O volume final da formulação foi ajustado a 10 mL com água ultrapura.

Tabela 4 Composição das formulações contendo quantidades crescentes do composto (5).

Formulação	Fitantriol (mg)	Polissorbato 80 (mg)	Composto 5 (mg)
F-0	90	50	0.0
F-1	90	50	1.0
F-2	90	50	2.5
F-5	90	50	5.0
F-10	90	50	10.0

## 6.7. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ

As medidas de diâmetro por espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizadas em equipamento Zetasizer ZS (Malvern®, Reino Unido). Para as leituras, alíquotas de cada amostra foram previamente diluídas em água ultrapura visando evitar influência do espalhamento múltiplo. Para cada formulação, foram realizadas três medidas de diâmetro hidrodinâmico a 25°C. O diâmetro médio e o índice de polidispersão (PDI, equação 5) foram medidos em ângulo de detecção de 173° e modo automático.

$$PDI = \frac{\mu_2}{\Gamma^2} \quad (5)$$

onde  $\Gamma$  and  $\mu_2$  representam a taxa de decaimento médio e sua variância, respectivamente.

## 6.8. DETERMINAÇÃO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA

A mobilidade eletroforética  $U_E$  foi determinada pela técnica de espalhamento de luz eletroforético em equipamento Zetasizer ZS (Malvern®, Reino Unido). Para isso, as amostras foram diluídas em água ultrapura antes das medidas e injetadas em cubetas equipadas com dois eletrodos. Um campo elétrico foi aplicado e a velocidade das partículas em migração foi monitorada pela técnica Laser Doppler. Utilizou-se o modo automático do equipamento, a 25 °C, realizando-se 6 medidas para cada formulação.

## 6.9. ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXOS ÂNGULOS

Experimentos de SAXS foram realizados no equipamento Nano-InXider (Xenocs®, França) disponível no Centro de Nanociência e Nanotecnologia da UFRGS (CNANO/Porto Alegre-RS). O equipamento opera com detector Dectris Pilatus 3 e fonte de raios X  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 0,154$  nm), sendo calibrado com padrão de behenato de prata. As formulações foram transferidas para capilares de vidro fino com uma abertura (Charles Supper Company, Estados Unidos), que foram selados e colocados

no porta-amostra de líquidos do equipamento. Medidas consecutivas de 60 s foram realizadas à temperatura ambiente, ao longo de 3 h, para cada amostra, no modo '*medium resolution*'. O mesmo procedimento foi realizado para um capilar contendo água, cujo sinal foi subtraído do sinal das amostras. A redução das imagens 2D a gráficos 1D foi realizada empregando-se o programa Foxtrot versão 3.2.7 (SOLEIL, França).

## REFERÊNCIAS

GRZELAKOWSKA, A.; KOLIŃSKA, J.; SOKOŁOWSKA, J. Synthesis, spectroscopic characterisation, and potential application of dyes containing a carbostyryl skeleton as sensors for thiols. **Coloration Technology**, v. 132, n. 2, p. 121–129, abr. 2016.

BECK-BROICHSITTER, M. et al. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the "ouzo region" upon drug loading. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 244–253, 2010.

BUFFA, R.; ZAHRADNIK, P.; FOLTINOVA, P. Computer aided benzothiazole derivatives. Synthesis, structure and Biological study of new push-pull conjugated benzothiazolium salts. **Heterocyclic Communications**, v. 7, n. 4, p. 331–336, 2001.

CALVO, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 1, p. 44–52, jan. 2009.

CLAYDEN et al. **Organic Chemistry**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 2012

CHAUHAN, S. et al. Micellar and antimicrobial activities of ionic surfactants in aqueous solutions of synthesized tetraalkylammonium based ionic liquids. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 535, n. July, p. 232–241, 2017.

CHOI, M. J.; MAIBACH, H. I. Liposomes and Niosomes as Topical Drug Delivery Systems. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 18, n. 5, p. 209–219, 2005.

COSTA, R. O.; CARVALHAL, A. Uso do iodeto de potássio na Dermatologia : considerações Use of potassium iodide in Dermatology : updates on an old drug. v. 88, n. 3, p. 401–407, 2013.

EIBERGEN, N. R. et al. Identification of a Novel Protein Synthesis Inhibitor Active against Gram-Positive Bacteria. **ChemBioChem**, v. 13, n. 4, p. 574–583, 5 mar. 2012.

ENDRES, F.; ZEIN EL ABEDIN, S. Air and water stable ionic liquids in physical chemistry. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, n. 18, p. 2101, 2006.

FONG, W.-K. et al. Dynamic formation of nanostructured particles from vesicles via invertase hydrolysis for on-demand delivery. **RSC Advances**, v. 7, n. 8, p. 4368–4377,

2017.

FU, S. Q. et al. Synthesis, physicochemical property and antibacterial activity of gemini quaternary ammonium salts with a rigid spacer. **RSC Advances**, v. 6, n. 20, p. 16507–16515, 2016.

GAMBLE, A. B. et al. Aryl Nitro Reduction with Iron Powder or Stannous Chloride under Ultrasonic Irradiation Aryl Nitro Reduction with Iron Powder or Stannous Chloride under. **Journal Synthetic Communications**, v. 37, n. 37, p. 2777–2786, 2007.

GARMAISE, D. L. et al. Anthelmintic quaternary salts. III. Benzothiazolium salts. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 30–36, jan. 1969.

GEROLA, A. P. et al. Zwitterionic surfactants in ion binding and catalysis. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 32, p. 39–47, nov. 2017.

GILL, R. K.; RAWAL, R. K.; BARIWAL, J. Recent advances in the chemistry and biology of benzothiazoles. **Archiv der Pharmazie**, v. 348, n. 3, p. 155–178, 2015.

GLATTER, O. **Small- angle X-rays scattering**. ed 1. Londres: London: Academic Press, 1982.

HANDJANI-VILA, R. M. et al. Dispersions of lamellar phases of non-ionic lipids in cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 1, n. 5, p. 303–314, 1979.

HOLMBERG et al. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. ed 2. Nova Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, 2002

HROBÁRIK, P. et al. Molecular Engineering of Benzothiazolium Salts with Large Quadratic Hyperpolarizabilities: Can Auxiliary Electron-Withdrawing Groups Enhance Nonlinear Optical Responses? **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 50, p. 22289–22302, 23 dez. 2010.

KERI, R. S. et al. A comprehensive review in current developments of benzothiazole-based molecules in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 207–251, jan. 2015.

KOPPEL, D. E. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation

Spectroscopy: The Method of Cumulants. **The Journal of Chemical Physics**, v. 57, n. 11, p. 4814–4820, 1972.

KUMAR, G. P.; RAJESHWARRAO, P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 1, n. 4, p. 208–219, 2011.

LARINA, L.; LOPYREV, V. **Nitroazoles: Synthesis, Structure and Applications**. New York, NY: Springer New York, 2009.

LEE, S.-H. et al. Benzothiazolium Single Crystals: A New Class of Nonlinear Optical Crystals with Efficient THz Wave Generation. **Advanced Materials**, v. 29, n. 30, p. 1701748, 2017.

LEPELTIER, E.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 71, p. 86–97, 2014.

LU, Y.-J. et al. Molecular Engineering of Thiazole Orange Dye: Change of Fluorescent Signaling from Universal to Specific upon Binding with Nucleic Acids in Bioassay. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 4, p. 1019–1029, 15 abr. 2016.

MADIGAN M.T et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 14 ed. São Francisco: **Benjamin-Cummings Publishing Company**, 2012.

MARIANECCI, C. et al. Niosomes from 80s to present: The state of the art. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 205, p. 187–206, mar. 2014.

NEGM, N. A. et al. Benzothiazol-3-ium cationic schiff base surfactants: Synthesis, surface activity and antimicrobial applications against pathogenic and sulfur reducing bacteria in oil fields. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 512–518, 2011.

NILSSON, K. P. R. Small organic probes as amyloid specific ligands - Past and recent molecular scaffolds. **FEBS Letters**, v. 583, n. 16, p. 2593–2599, 2009.

OKOH, O. A. et al. Promising near-infrared non-targeted probes: benzothiazole heptamethine cyanine dyes. **Journal of Sulfur Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 42–56, 2 jan. 2014.

OLUSOJI, O. et al. **Drug-resistant infections : a threat to our economic future (Vol. 2) : final report.** The World Bank, Março, 2017

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: Final report and Recommendations.** World Health Organization, Maio, 2016.

PENDLETON, J. N.; GILMORE, B. F. The antimicrobial potential of ionic liquids : A source of chemical diversity for infection and biofilm control. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 2, p. 131–139, 2015.

PIANKA, M.; HALL, J. C. Studies in fungitoxicity I.—Fungitoxicity of certain carbocyanines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, n. 7, p. 432–437, jul. 1957..

PRAJAPATI, N. P. et al. Recent advances in the synthesis of 2-substituted benzothiazoles: a review. **RSC Advances.**, v. 4, n. 104, p. 60176–60208, 2014.

PROVENCHER, S. W. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. **Computer Physics Communications**, v. 27, n. 3, p. 229–242, set. 1982.

ROSEN, M. J. **Surfactants And Interfacial Phenomena.** ed 3. Nova Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, 2004.

SHARGEL, et al . **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics.** ed 7. Nova York: McGraw-Hill Education / Medical, 2015

SINDU, B. S.; SASMAL, S. Properties of carbon nanotube reinforced cement composite synthesized using different types of surfactants. **Construction and Building Materials**, v. 155, p. 389–399, 2017.

TATAY, S. et al. Optical mercury sensing using a benzothiazolium hemicyanine dye. **Organic Letters**, v. 8, n. 17, p. 3857–3860, 2006.

TIWARI, A. K. et al. Study on metal nanoparticles synthesis and orientation of gemini surfactant molecules used as stabilizer. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 445, p. 76–83, maio 2015.

THOMAS, S, et al. **Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization.** 1ed. Amsterdam: Elsevier, 2017

TORTORA, G. J, et al .**Microbiology : an introduction**. ed 11. Londres Pearson, 2013

TUNTIWECHAPIKUL, W. et al. DNA modification by 4-aza-3-ene-1,6-diyne: DNA cleavage, pH-dependent cytosine-specific interactions, and cancer cell cytotoxicity. **Biochemistry**, v. 41, n. 16, p. 5283–5290, 2002.

VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**., v. 38, n. 2, p. 606–631, 2009.

VITALE, S. A.; KATZ, J. L. Liquid droplet dispersions formed by homogeneous liquid-liquid nucleation: “The ouzo effect”. **Langmuir**, v. 19, n. 10, p. 4105–4110, 2003.

WILLIAMS, D. B. G.; LAWTON, M. Drying of organic solvents: Quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 24, p. 8351–8354, 2010.

Konoshiroku Photo, Tóquio, Japão. YUZO, et al. **Cyanide dyes as agricultural bactericide**. 3.245874,United States Patente Office. 18 de Fevereiro,1963 - 12 de Abril, 1966.

Patente. Entidade responsável e/ou autor, título, número da patente e datas (do período de registro)

ZHOU, X. S. et al. Novel Br<sup>+</sup>-based-acidic ionic liquids based on benzothiazolium cations as catalysts for esterification reactions. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 76, n. 12, p. 1607–1615, 2011.