

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FRANCIELA ARENHART SOARES

**Síntese e Estudo da Interação de Novos Ésteres
Benzotiazepínicos com a Proteína BSA via Espectroscopia de
Fluorescência**

Porto Alegre

2016

FRANCIELA ARENHART SOARES

**Síntese e Estudo da Interação de Novos Ésteres
Benzotiazepínicos com a Proteína BSA via Espectroscopia de
Fluorescência**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Síntese orgânica, química medicinal e fotoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr^a. Leandra Franciscato Campo

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Soares, Franciela Arenhart
Síntese e Estudo da Interação de Novos Ésteres
Benzotiazepínicos com a Proteína BSA via
Espectroscopia de Fluorescência / Franciela Arenhart
Soares. -- 2016.
140 f.
Orientadora: Leandra Franciscato Campo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de
Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Química Orgânica. 2. Fluorescência. 3. Interação
com proteína . 4. BSA. I. Campo, Leandra Franciscato,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido entre outubro de 2014 e dezembro de 2015 no Grupo de Pesquisa em Fotoquímica Orgânica Aplicada, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob a orientação da Professora Doutora Leandra Franciscato Campo. A presente dissertação foi desenvolvida inteiramente pela autora.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável”.

Galileu Galilei

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais, pela dedicação e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Leandra por me acolher no grupo e pela orientação concedida durante o mestrado. Agradeço a ela, também, a amizade construída durante o período e às lições de superação e fé no futuro.

Agradeço aos demais professores do grupo GPFOA pelas dicas valiosas, risadas, puxões de orelha e pelo convívio durante esse um ano e meio.

Agradeço em especial à Professora Fernanda por aceitar ser minha orientadora no estágio docência e pela confiança depositada em mim durante as aulas.

Agradeço aos técnicos e servidores do instituto de química pelas análises de RMN, pelos empréstimos do laboratório de orgânica, pelo serviço prestado pelo pessoal do almoxarifado e pela cordialidade com que todos estão dispostos a nos tratar, mesmo nos momentos de aperto.

Aos colegas dos laboratórios K202 e E206-B pelos inúmeros empréstimos de materiais e vidrarias. Aos colegas do GPFOA pelos bons momentos compartilhados e pelas discussões sobre química e afins que fizeram do laboratório um lugar agradável de trabalhar. Agradeço em especial aos ICs por estarem sempre disponíveis para ajudar e por espalharem o bom humor dentro do grupo.

Agradeço aos meus amigos Adriana, Jônatas, Aline, Rafael e Allan pelo apoio e por entenderem meu sumiço devido ao trabalho.

Agradeço aos meus pais e às minhas duas avós por todo apoio, pelo carinho e pelas diversas guloseimas importadas de Cruzeiro do Sul, mas principalmente por entenderem que a distância é apenas algo temporário entre nós.

Agradeço ao meu namorado Juarez pelo companheirismo e incentivo para continuar a seguir adiante, mas principalmente por entender minhas preocupações e angústias, que não foram poucas durante o mestrado.

À CAPES pela provisão da bolsa de mestrado.

E a Deus, pois sem Ele, nada seria possível.

RESUMO

Este trabalho apresenta a síntese de ésteres da Tianeptina, bem como o estudo fotofísico envolvendo a interação da Tianeptina e derivados com a proteína albumina sérica bovina. Os derivados sintetizados apresentaram absorção na região do ultravioleta na mesma região do precursor Tianeptina, cujos valores do coeficiente de absorvidade molar mostraram-se coerentes com transições $n-\pi^*$. Com o objetivo de avaliar interações entre BSA e os derivados foram realizadas medidas de fluorescência em diferentes temperaturas. A Tianeptina e os derivados **3a**, **3b**, **3d** e **3e** apresentaram diminuição da intensidade de fluorescência da proteína e os mecanismos de supressão foram avaliados como sendo estáticos segundo a equação de Stern-Volmer apenas para a Tianeptina. Também foram calculadas as constantes de ligação, o número de sítios de interação com a proteína e obtidos os espectros de fluorescência sincronizada.

Palavras-chaves: Tianeptina, albumina sérica bovina, supressão de fluorescência, fluorescência sincronizada.

ABSTRACT

This work presents the synthesis of Tianeptide esters and the photophysical study of the interaction of Tianeptide and derivatives with bovine serum albumin. The derivatives showed absorption in the ultraviolet at the same range of the Tianeptide precursor, with values of molar extinction coefficient coherent with $n-\pi^*$ transitions. In order to investigate interactions between BSA and derivatives, a fluorescence study was performed at different temperatures. Tianeptide and derivatives **3a**, **3b**, **3d** and **3e** decreased the fluorescence intensity of the protein and the suppression mechanism was identified as static by the Stern-Volmer equation only to Tianeptide. It also was calculated the binding constants, the number of binding sites and the synchronous fluorescence spectra was acquired.

Keywords: Tianeptide, bovine serum albumin, fluorescence quenching, synchronous fluorescence.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Substâncias Psicotrópicas Utilizadas no Tratamento da Depressão.	3
2.2. A Tianeptina	6
2.3. Albuminas Séricas	10
2.4. Processos Fotofísicos	12
2.4.1. Absorção de radiação região do UV-Visível.....	12
2.4.2. Emissão de Fluorescência	14
2.4.3. Supressão de fluorescência	15
2.4.4. Fluorescência sincronizada.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivos Gerais:	18
3.2. Objetivos Específicos:	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Extração e purificação da Tianeptina comercial.....	19
4.2. Síntese e caracterização espectroscópica dos derivados da Tianeptina	22
4.2.1. Síntese do composto [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il](metil)amino]-7 ácido heptanóico (2)	22
4.2.2. Síntese do [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino]-7-heptanoato de butila (3a).....	25
4.2.3. Síntese do [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino]-7-heptanoato de hexila (3b)	27
4.2.4. Síntese do [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino]-7-heptanoato de octila (3c)	29
4.2.5. Síntese do [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino]-7-heptanoato de (E)-but-2-en-1-ila (3d)	31
4.2.6. Síntese do composto [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino] -7-heptanoato de 3-hidroxipropila (3e).....	33

4.2.7. Síntese do [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il](11-hidroxiundecil)amino]-7-heptanoato de 11-hidroxi-undecila (3f)	36
4.2.8. Síntese do [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il] amino]-7-heptanoato-(6-hexanoato de etila) (3g)	38
4.3. Estudo das interações entre a BSA, a Tianeptina e os ésteres por Espectroscopia de Fluorescência e UV-vis	40
4.3.1. Espectroscopia de absorção na região do UV-vis	41
4.3.2. Espectroscopia de emissão de fluorescência	43
4.4. Estudo das interações entre supressor e proteína	63
4.4.1. Fluorescência Sincronizada	66
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	72
6. PARTE EXPERIMENTAL	74
6.1. Materiais e métodos	74
6.2. Obtenção do ácido - [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il]amino]-7 heptanoíco (1a)	75
6.3. Procedimento para a preparação do ácido [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il](metil)amino]-7 heptanoíco (2)	76
6.4. Procedimento geral para a preparação dos ésteres tianeptínicos (3a - f)	77
6.4.1. [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il]-amino]-7-heptanoato de butila (3a)	77
6.4.2. [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il]-amino]-7-heptanoato de hexila (3b)	78
6.4.3. [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il]-amino]-7-heptanoato de octila (3c)	78
6.4.4. [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il]-amino]-7-heptanoato de (E)-but-2-en-1-ila (3d)	79
6.4.5. [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino] -7-heptanoato de 3-hidroxipropila (3e)	80

6.4.6. [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)(11-hidroxiundecil)amino]-7-heptanoato de 11-hidroxi-undecila (3f)	80
6.5. Procedimento geral para a preparação do éster [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)amino]-7-heptanoato-(6-hexanoato de etila) (3g).....	81
7. REFERÊNCIAS	83
8. ANEXOS.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Neurotransmissores do sistema nervoso central.	3
Figura 2: Alguns dos medicamentos mais comuns empregados no tratamento da depressão.	4
Figura 3: Simulação do efeito de um antidepressivo ao longo do tempo.	6
Figura 4: Estrutura química da Tianeptina e da forma comercial de sal sódico da Tianeptina.	7
Figura 5: Semelhanças estruturais entre a Tianeptina e os ADTs.	10
Figura 8: a) Espectro de absorção e b) representação dos subníveis eletrônicos.	14
Figura 9: Diagrama de Jablonski.	14
Figura 10: Estrutura dos aminos ácidos e seus comprimentos de onda de emissão: triptofano a) e tirosina b).	16
Figura 11: Derivados da Tianeptina a serem estudados nesse trabalho.	18
Figura 12: Espectro de infravermelho em KBr da Tianeptina.	20
Figura 13: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3-d) da Tianeptina.	21
Figura 14: Espectro de RMN de ^{13}C - APT (CDCl_3-d , 75 MHz) da Tianeptina: a) ampliação da região dos aromáticos e carbonila e b) ampliação da região dos alifáticos.	21
Figura 15: Espectro de infravermelho em KBr do derivado 2	22
Figura 16: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3-d) do derivado 2 : a) ampliação da região dos aromáticos e b) ampliação da região dos alifáticos.	23
Figura 17: Reação de substituição eletrofílica no oxigênio.	25
Figura 18: Espectro de infravermelho em KBr de 3a	26
Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3-d) do éster 3a	27
Figura 20: Espectro de infravermelho em KBr do éster 3b	28
Figura 21: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3-d) de 3b	28
Figura 22: Espectro de infravermelho em KBr do éster 3c	30
Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3-d) de 3c	31
Figura 24: Espectro de infravermelho em KBr do éster 3d	32
Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3-d) do éster 3d : a) ampliação da região dos aromáticos e prótons metilênicos e b) ampliação da região dos alifáticos. ...	33
Figura 26: Espectro de infravermelho em KBr do éster 3e	34
Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3-d) do éster 3e	35

Figura 28: Acoplamento complexo entre os hidrogênios H8, H9 e H10.	35
Figura 29: Espectro de infravermelho em KBr do éster 3f	36
Figura 30: RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ - <i>d</i>) do derivado 3f	37
Figura 31: Espectro de infravermelho em KBr do éster 3g	39
Figura 32: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ - <i>d</i>) do derivado 3g	40
Figura 33: Espectros de absorção no UV-vis da Tianeptina e dos ésteres 3a-g em CHCl ₃ (Q = 10 ⁻⁴ M).....	41
Figura 34: Medidas de absorção no UV-vis da BSA em tampão fosfato.....	43
Figura 35: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de Tianeptina em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de Tianeptina na temperatura de 20°C (R = 0,989).	44
Figura 36: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de Tianeptina em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de Tianeptina na temperatura de 30°C (R = 0,994).	45
Figura 37: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de Tianeptina em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de Tianeptina na temperatura de 40°C (R = 0,996).	45
Figura 38: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3a em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3a na temperatura de 20°C (R = 0,992).	46
Figura 39: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3a em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3a na temperatura de 30°C (R = 0,941).	47
Figura 40: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3a em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3a na temperatura de 40°C (R = 0,809).	47
Figura 41: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3b em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de	

fluorescência com o aumento da concentração de 3b na temperatura de 20°C (R = 0,990).	48
Figura 42: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3b em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3b na temperatura de 30°C (R = 0,961).	49
Figura 43: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3b em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3b na temperatura de 40°C (R = 0,898).	49
Figura 44: Representação estrutural da BSA.....	50
Figura 45: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3c em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3c na temperatura de 20°C.....	51
Figura 46: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3c em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3c na temperatura de 30°C.....	51
Figura 47: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3c em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3c na temperatura de 40°C.....	52
Figura 48: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3d em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3d na temperatura de 20°C (R = 0,948).	53
Figura 49: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3d em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3d na temperatura de 30°C (R = 0,953).	53
Figura 50: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3d em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3d na temperatura de 40°C (R = 0,956).	54
Figura 51: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3e em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de	

fluorescência com o aumento da concentração de 3e na temperatura de 20°C (R = 0,930).	55
Figura 52: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3e em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3e na temperatura de 30°C (R = 0,976).	55
Figura 53: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3e em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3e na temperatura de 40°C (R = 0,962).	56
Figura 54: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3f em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3f na temperatura de 20°C.	57
Figura 55: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3f em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3f na temperatura de 30°C.	57
Figura 56: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3f em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3f na temperatura de 40°C.	58
Figura 57: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3g em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3g na temperatura de 20°C (R = 0,951).	59
Figura 58: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3g em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3g na temperatura de 30°C (R = 0,706).	59
Figura 59: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de 3g em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de 3g na temperatura de 40°C.....	60
Figura 60: Gráfico da concentração <i>versus</i> intensidade de fluorescência da BSA na presença de Tianeptina a 20°C (R = 0,992).....	61
Figura 61: Gráfico do logaritmo da concentração <i>versus</i> o logaritmo de $(F_0 - F)F$ da BSA na presença de Tianeptina a 30°C:.....	64

Figura 62: Efeito da Tianeptina no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.	67
Figura 63: Efeito do éster 3a no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.	68
Figura 64: Efeito do éster 3b no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.	68
Figura 65: Efeito do éster 3c no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.	69
Figura 66: Efeito do éster 3d no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.	70
Figura 67: Efeito do éster 3e no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.	71

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Síntese de compostos dioxodibenzo-(1,2-tiazepínicos).....	8
Esquema 2: Síntese do derivado N-metilado:.....	22
Esquema 3: Síntese do derivado N-(<i>n</i> -butil) da Tianeptina.	24
Esquema 4: Síntese dos ésteres tianeptínicos.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Metodologias empregadas para obtenção do éster 3g	38
Tabela 2: Quadro resumo da síntese dos derivados da tianeptina	40
Tabela 3: Dados obtidos a partir do espectro de absorção no UV-vis.....	42
Tabela 4: Equação de Stern-Volmer e constantes de supressão de fluorescência da BSA na presença de Tianeptina e seus ésteres.	62
Tabela 5: Constantes de ligação e número de sítios de ligação dos derivados em diferentes temperaturas.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina

ADTs – Antidepressivos tricíclicos

BDNF – *Brain Derived Neurotrophic Factor*

BSA – *Bovine Serum Albumin*

CCD – Cromatografia em camada delgada

d – Dubleto

HSA – *Human Serum Albumin*

IMAOs – Inibidores de monoamina oxidase

IRSAs – Inibidores de recaptura de serotonina e antagonista alfa 2

ISRSN – Inibidores seletivos de recaptura de serotonina e noradrenalina

ISRSs – Inibidores seletivos de recaptação de serotonina

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento

m – Multipleteo

mg – Miligrama (10^{-3} g)

MHz – 10^6 Hz

mL – Mililitro (10^{-3} L)

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

pH – Potencial de hidrogênio

ppm – Partes por milhão

q – Quarteto

qt – Quintupletto

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^{13}C – APT – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – *Attached Proton Test*

RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – Singleto

sl – Singleto largo

SNC – Sistema Nervoso Central

t – Tripleto

TOC – Transtorno Obsessivo Compulsivo

TPM – Tensão pré-mentrua

Trp – Triptofano

tt – Tripleto de tripleto

Tyr – Tirosina

UV-vis – Ultravioleta-visível

δ – Deslocamento químico

λ_{em} – Comprimento de onda do máximo de emissão

λ_{ex} – Comprimento de onda de excitação

λ_{max} – Comprimento de onda do máximo de absorção

1. INTRODUÇÃO

A depressão é uma desordem mental bastante comum que afeta homens e mulheres de todas as idades. Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que cerca de 350 milhões de pessoas no mundo sofrem com a doença e que cerca de 800 000 suicídios ocorrem a cada ano, sendo essa a segunda maior causa de morte entre jovens de 15 a 29 anos.¹ A depressão, juntamente de outros distúrbios psíquicos, já foi considerada por muitos especialistas como o grande mal do século XXI.² Dentre seus sintomas destacam-se a tristeza profunda, perda de interesse e prazer, distúrbios no sono e no apetite, bem como dificuldade em concentrar-se.

Até a década de 50, pacientes com distúrbios mentais, tal como a depressão, tinham poucas perspectivas com relação a cura e somente com a introdução dos antidepressivos tricíclicos (ADTs) e os inibidores de mono amina oxidase (IMAOs) no mercado, é que alguma esperança surgiu para estes pacientes. Contudo, somente com o surgimento das substâncias conhecidas como inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs), há apenas vinte anos atrás, que os maiores avanços no tratamento da depressão foram evidenciados.³ Os mais conhecidos antidepressivos do grupo ISRSs são a fluoxetina, a paroxetina, a sertralina e o citalopran.

Diversas outras classes de substâncias também foram desenvolvidas com o intuito de diminuir os efeitos colaterais apresentados pelos grupos anteriores, como os inibidores seletivos de recaptura de serotonina e noradrenalina (ISRSN) e os inibidores de recaptura de serotonina e antagonista alfa 2 (IRSAs) entre outros.⁴ Apesar dos avanços no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da depressão, esses novos agentes muitas vezes não são tão eficazes e não possuem ação tão rápida quanto seus predecessores de forma que cerca de 30% dos pacientes não respondem às terapias utilizando esses novos medicamentos.¹

A Tianeptina é um antidepressivo da classe dos benzotiazepínicos, tendo sido o resultado da pesquisa racional para o desenvolvimento de novos agentes antidepressivos. Comercializada no Brasil sob o nome de Stablon®, esse medicamento foi sintetizado pela primeira vez no Instituto Servier, na França.⁵ A Tianeptina é considerada um fármaco de última geração para o tratamento da depressão e outras desordens psiquiátricas, sendo

indicada para o tratamento de estados ansio-depressivos com queixas somáticas e em particular digestivas e também para pacientes etilistas no período de abstinência.⁶

Sendo considerada de mecanismo de ação atípico, pois diferentemente dos IMAOs e dos ISRSs que diminuem a recaptção de serotonina, a Tianeptina estimula a entrada da serotonina pelos neurônios do córtex, hipocampo e sistema límbico.⁷ Esse mecanismo de ação diferenciado é o que tem intrigado muitos cientistas e pesquisadores dessa área e que tem levado a propor novos modelos para explicar o que realmente acontece em um indivíduo com depressão.⁸

Além de ser um medicamento antidepressivo, a Tianeptina também possui outras atividades biológicas benéficas, como atividade antiproliferativa em células de câncer de próstata humanas⁹, atividade neuroplástica e neuroprotetora, além de outros benefícios.¹⁰ Dessa forma, a elaboração de novos derivados da Tianeptina torna-se interessante para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de doenças neurológicas, além da depressão.

Sendo assim, nesse trabalho foram sintetizados sete novos ésteres benzotiazepínicos variando-se o número de carbonos da cadeia alquílica, a fim de verificar a influência dos parâmetros hidrofílicos e hidrofóbicos na interação destes potenciais fármacos com a proteína BSA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Substâncias Psicotrópicas Utilizadas no Tratamento da Depressão.

A noção de que a depressão é proveniente de um desequilíbrio químico no cérebro envolvendo os neurotransmissores como a dopamina, noradrenalina e a serotonina (Figura 1), já foi utilizada até como propaganda na venda de medicamentos antidepressivos.¹¹ Contudo, apesar da depressão influenciar na distribuição destes neurotransmissores, é algo muito mais complicado e que não depende só dos níveis dessas substâncias, mas também de várias contribuições psicológicas e do estilo de vida do indivíduo.

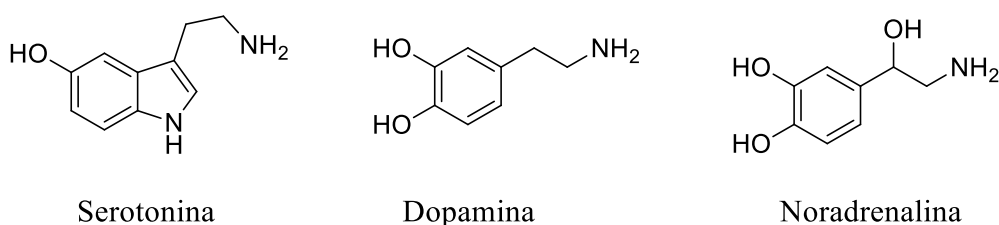


Figura 1: Neurotransmissores do sistema nervoso central.

As substâncias psicotrópicas (*psique* = mente, *tropos* = alteração) são compostos modificadores seletivos do sistema nervoso central (SNC) empregados para o tratamento de distúrbios psíquicos. Seu uso é conhecido desde a antiguidade e hoje são frequentemente empregados na farmacoterapia. Fazem parte do grupo das substâncias psicotrópicas, os ansiolíticos e hipnóticos, os antipsicóticos ou neurolépticos, os alucinógenos e também os antidepressivos.¹²

A depressão é um dos transtornos neurológicos mais comuns e diversos tipos de terapias estão atualmente disponíveis para o tratamento da doença, como as terapias convencionais utilizando medicamentos e a psicanálise, terapias cognitivo-comportamentais e terapias interpessoais, as últimas não envolvem o uso de medicamentos.¹³ Os antidepressivos têm se mostrado um recurso terapêutico importante em depressões de intensidade moderada ou grave. Contudo, apesar da gama variada de tratamentos para depressão, a Organização Mundial da Saúde estima que menos da metade dos pacientes tem acesso a alguma dessas terapias.¹

A maioria dos antidepressivos são substâncias orgânicas, com exceção aos sais de lítio e são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação. Os primeiros a estarem disponíveis comercialmente foram os antidepressivos tricíclicos (ADTs), cujo mecanismo de ação consiste na inibição pré-sináptica da norepinefrina e serotonina (5-HT). Contudo, apesar da sua eficácia comprovada, constituem o grupo propenso a diversos efeitos colaterais como: boca seca, visão turva, retenção urinária, aumento da frequência cardíaca, tremores das mãos, urticárias, entre outros.⁴ Alguns dos representantes dessa classe de compostos são: a imipramina e a amitriptilina (Figura 2).

Os inibidores da monoamina oxidase (IMAOs), como o próprio nome diz, inibem o funcionamento da enzima MAO. São exemplos de medicamentos a iproniazida, isocarboxazida e fenelzina. Porém, apesar de sua atividade antidepressiva, foram observados casos de hipertensão devido ao uso dos medicamentos. Já os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRSs) permitiram grandes avanços no tratamento da depressão. Seu mecanismo de ação envolve a inibição potente e seletiva de serotonina, potencializando a neurotransmissão serotoninérgica. A fluoxetina é o representante mais conhecido desta classe, mas também podemos citar o citalopram, a fluvoxamina e a sertralina (Figura 2) como sendo bastante conhecidos.⁴

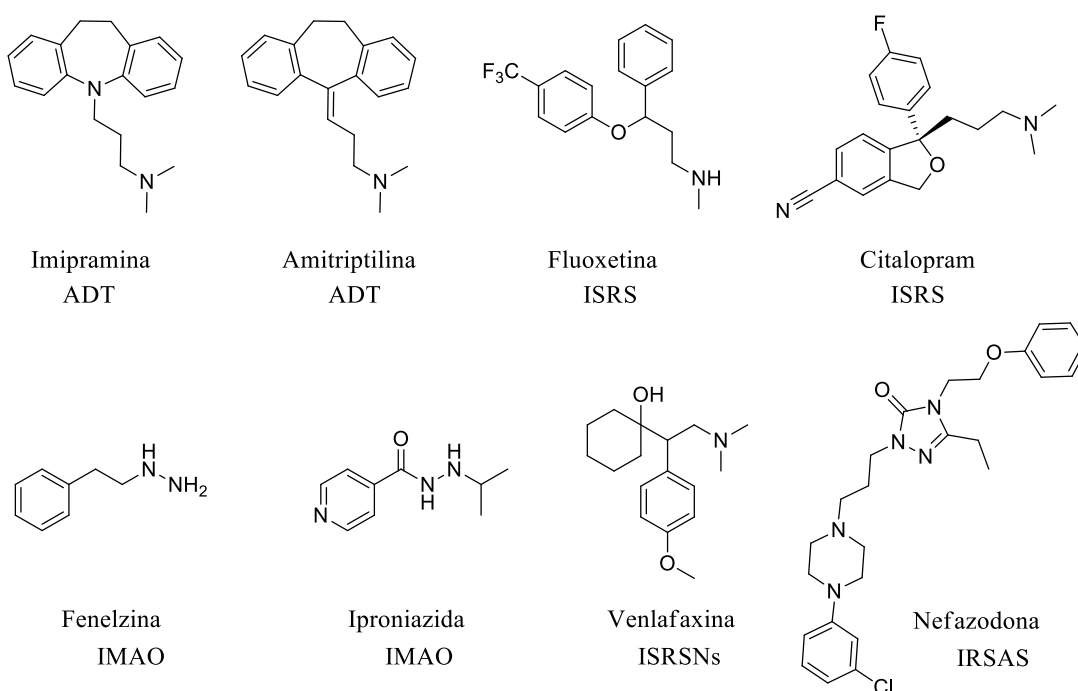


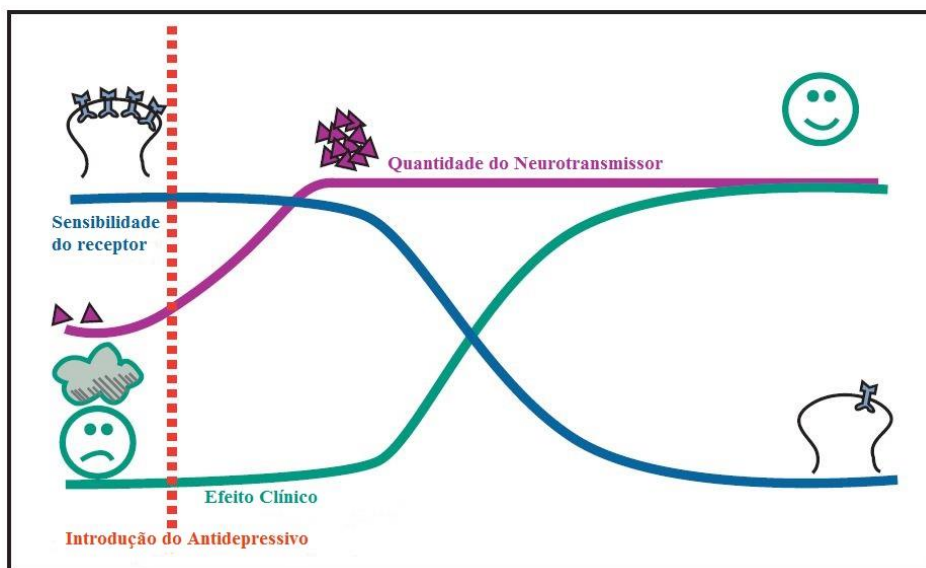
Figura 2: Alguns dos medicamentos mais comuns empregados no tratamento da depressão.

A fluoxetina é o antidepressivo mais comumente utilizado para o tratamento da depressão devido ao seu baixo custo e também a sua larga faixa de atividade para tratamento de distúrbios como o TOC (transtorno obsessivo compulsivo), TPM (tensão pré-menstrual) e bulimia nervosa.¹⁴ Contudo, estudos recentes em ratos, indicam que o uso de fluoxetina pode promover distúrbios no sistema reprodutor, como atraso da puberdade, modificações no desenvolvimento folicular e ovulação.¹⁵ Além disso, outros efeitos colaterais tais como: boca seca, confusão mental e inibição do apetite, também são recorrentes.⁴

A indicação de antidepressivos do grupo ISRSs para gestantes e para casos de depressão pós-parto vem crescendo nos últimos anos.¹⁶ Porém, tanto a fluoxetina, como o citalopram e os demais medicamentos dessa classe são distribuídos para o leite materno e o bebê pode receber até 17% da dose materna do medicamento.⁴

Outros grupos de medicamentos também foram produzidos com o intuito de diminuir os efeitos colaterais dos grupos anteriores, como por exemplo, os inibidores seletivos da receptação de serotonina e noradrenalina (ISRSNs), sendo a venlafaxina um representante deste grupo, e os inibidores de recaptura de serotonina e antagonista alfa 2 (IRSAs), onde a nefazodona e a fenilpiperazina são os representantes (Figura 2).³

A despeito do mecanismo de ação, os antidepressivos levam em geral um período de seis a oito semanas para que seja possível observar se houve ou não uma resposta.¹³ Além disso, outro fato comum aos antidepressivos de diferentes estruturas é que estes possuem a capacidade de aumentar ou diminuir a disponibilidade sináptica de um ou mais neurotransmissores, por meio da ação em diversos receptores e ativação de enzimas específicas.¹⁷ Todavia, isso não explica a demora no tempo de resposta dos medicamentos, mas sugere que a melhora dos sintomas da depressão, requeira mudanças adaptativas na neurotransmissão.



Adaptado de: STAHL, 2013.

Figura 3: Simulação do efeito de um antidepressivo ao longo do tempo.

Essas mudanças adaptativas na neurotransmissão, conforme ilustrado na Figura 3, iniciam com a introdução do antidepressivo. Inicialmente há um aumento rápido da quantidade de neurotransmissor, porém, o efeito clínico é retardado, uma vez que é preciso que ocorra a dessensibilização do receptor envolvido. Conforme a dessensibilização ocorre, o paciente apresenta melhora no estado emocional. Essa relação de tempo é que deu origem a hipótese da mediação das mudanças adaptativas dos receptores por meio dos medicamentos antidepressivos.¹⁷

2.2. A Tianeptina

O ácido 7 - [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)amino] - heptanóico ou de nome trivial Tianeptina **1a** (Figura 4), é um composto antidepressivo tricíclico atípico, sintetizado pela primeira vez no Instituto Servier, na França.⁵ A estrutura da Tianeptina é caracterizada pelo núcleo 3-clorodibenzotiazepina e uma cadeia lateral aminoheptanóica. Pelo menos algumas de suas atividades biológicas¹⁸ dependem da presença da cadeia aminocarboxílica, do sistema tricíclico com heteroátomo doador de elétrons na posição 5' e uma substituição aromática com um átomo aceptor de elétrons na posição 3'.

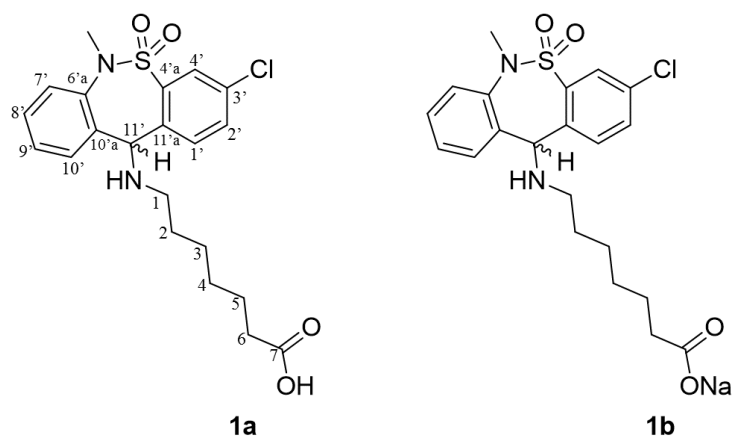
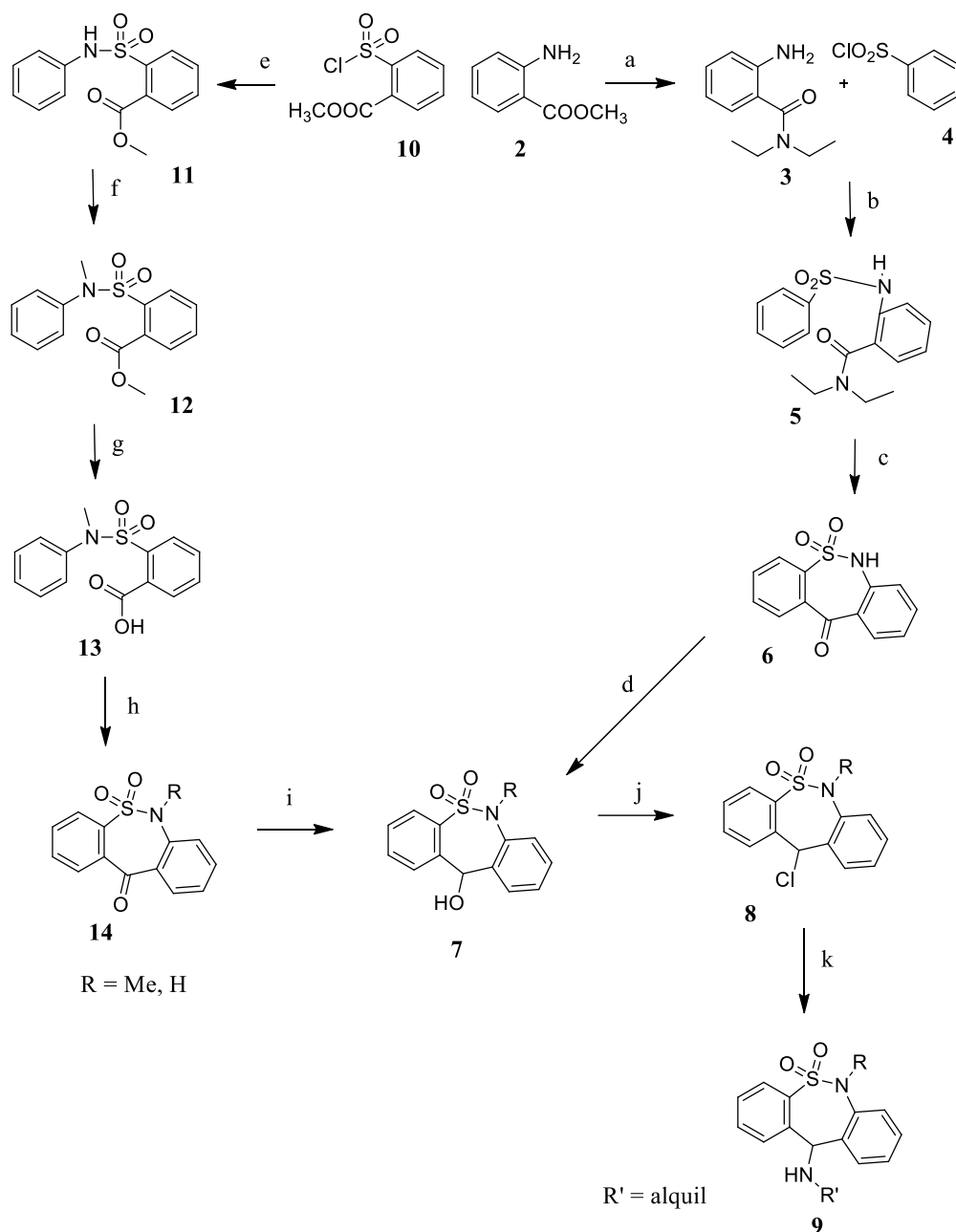


Figura 4: Estrutura química da Tianeptina e da forma comercial de sal sódico da Tianeptina.

A Tianeptina é comercializada em sua forma racêmica, porém estudos indicam que o isômero (-) é a forma ativa.¹⁹ Apesar disso, os estudos *in vivo* não apresentaram efeitos nocivos com relação ao isômero (+) e nem interferência deste sobre a forma (-), que é a forma ativa da Tianeptina.

A síntese de compostos incluindo o núcleo dioxodibenzo-(1,2-tiazepínico), como a Tianeptina, envolve diversas etapas de preparação (Esquema 1). Outros derivados do núcleo dioxodibenzo-(1,2-tiazepínico) também demonstraram propriedades farmacológicas relevantes, como atividade antiproliferativa contra células de câncer de próstata humana e leucemia.^{9, 20}

Esquema 1: Síntese de compostos dioxodibenzo-(1,2-tiazepínicos).



Como pode ser observado no esquema acima, o núcleo dibenzotiazepínico **7** pode ser obtido via dois diferentes conjuntos de reações. Para o caminho iniciado em a), no qual a primeira etapa consiste na reação de amidação do éster **2**, a etapa chave constitui-se em uma reação de acilação de Friedel-Crafts intramolecular entre os intermediários **5** e **6** com rendimentos inferiores a 30%. Já para a rota iniciada em e), no qual a primeira etapa consiste na reação de substituição entre a anilina e o composto **10** levando a formação da fenilsulfonamida **11**, a obtenção do núcleo tricíclico **14** também se dá via acilação de Friedel-Crafts intramolecular, porém os rendimentos observados são bastante superiores 57 – 62%, considerando ambas as etapas de preparação do cloreto de ácido e do fechamento do ciclo.

Além dos efeitos antidepressivos, a Tianeptina também apresenta atividade neuroplástica e neuroprotetora. Em 2010, CHU e colaboradores observaram que a Tianeptina estimulava o crescimento dos axônios e dendritos de células neurais de ratos *in vitro*.¹⁰ Os autores também notaram que a Tianeptina produzia mudanças na expressão de onze proteínas envolvidas no crescimento dos axônios e dendritos, no metabolismo de substâncias neurotróficas endógenas, na formação de sinapses entre outros.

Em 2013, um trabalho do nosso grupo de pesquisa deu origem a uma patente internacional²¹, na qual foram avaliadas as propriedades biológicas de derivados da Tianeptina contendo substituições na posição 11', isto é, ligadas ao nitrogênio secundário do sistema tricíclico. Observou-se para estes compostos capacidade antitumoral, uma vez que diminuiriam a proliferação das células de tumor cerebral do tipo glioblastoma, além de diminuir a expressão de BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) um importante biomarcador.

Apesar das diversas atividades biológicas benéficas da Tianeptina, pouco se sabia sobre sua atuação no organismo, apenas que ele confrontava a tradicional hipótese da depressão ser um transtorno do sistema monoaminérgico. Embora exista semelhança estrutural entre a Tianeptina e os antidepressivos tricíclicos (Figura 5), seu mecanismo de ação é totalmente diferenciado, uma vez que a Tianeptina promove a recaptação da serotonina. Além disso, a Tianeptina apresenta resultados mais rapidamente que outros medicamentos contra alguns sintomas da depressão, é efetiva em pacientes que são resistentes às terapias envolvendo ISRSs²² e apresenta um perfil melhor de efeitos colaterais quando comparada aos ISRSs e os ADTs.⁸

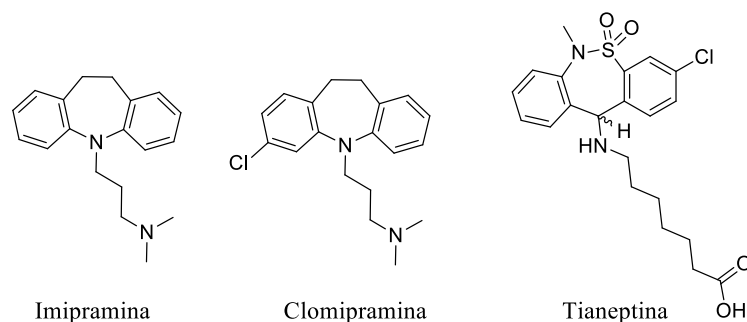


Figura 5: Semelhanças estruturais entre a Tianeptina e os ADTs.

Recentemente, um estudo envolvendo uma nova proposta para mecanismo de ação da Tianeptina foi publicado, sendo considerado um dos artigos *top 10* da *Nature* do ano de 2014.²³ Nesse estudo, foi investigada a interação da Tianeptina com diferentes receptores do cérebro humano onde observou-se que, ao contrário do que foi apresentado por estudo anteriores, que propunham a modulação do sistema aminérgico e glutaminérgico⁸, a Tianeptina interage primeiramente com os receptores μ -opióides e é antagonista dos receptores δ -opióides. Estes resultados apontam para o fato que a ativação dos receptores μ -opióides, ou ambos os receptores, levam ao evento molecular inicial responsável pela modulação causada pela Tianeptina no sistema glutaminérgico e por iniciar vários dos efeitos causados por esse agente, incluindo a sua ação antidepressiva e ansiolítica.

2.3. Albuminas Séricas

As albuminas séricas constituem 60% das proteínas do plasma sanguíneo. O nome albumina deriva do latim *albus* em referência aos precipitados esbranquiçados produzidos pelas proteínas. Nos mamíferos, as albuminas são sintetizadas no fígado e possuem um tempo de vida de cerca de 19 dias no organismo.²⁴

Entre as propriedades dessas proteínas, pode-se citar como a mais marcante de todas, a capacidade de ligar-se reversivelmente a diversas substâncias, tais como ácidos graxos, sais biliares, compostos aromáticos, cátions metálicos, hormônios e fármacos (Figura 6a). Além disso, um grande número de conformações estruturais dependente do pH pode ser observado para as albuminas, tornando-as meio de transporte ainda mais relevantes.²⁴

A albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) é estruturalmente análoga a albumina sérica humana (HSA, do inglês *human serum albumin*), com 76% da sequência de aminoácidos idêntica, sendo comumente usada em estudos de interações envolvendo proteínas devido ao seu baixo custo e fácil obtenção.²⁵⁻²⁹

A BSA possui massa molecular de 66 200 Da e uma única cadeia polipeptídica contendo 583 aminoácidos. Sua estrutura secundária é composta de 67% de α -hélice, aproximadamente 10% de dobramentos e 23% de cadeias estendidas sem nenhuma estrutura do tipo folhas- β ³⁰ (Figura 6b). Além de ser uma proteína transportadora, a BSA também é conhecida por ser uma proteína fluorescente, isto é, possui fluorescência intrínseca com máximo de emissão entre 332 – 350 nm, quando excitada em $\lambda_{ex} = 280$ nm, devido principalmente aos resíduos de triptofano (Trp) Trp-134 e Trp-212, localizados no domínio I e subdomínio IIA, respectivamente.³¹

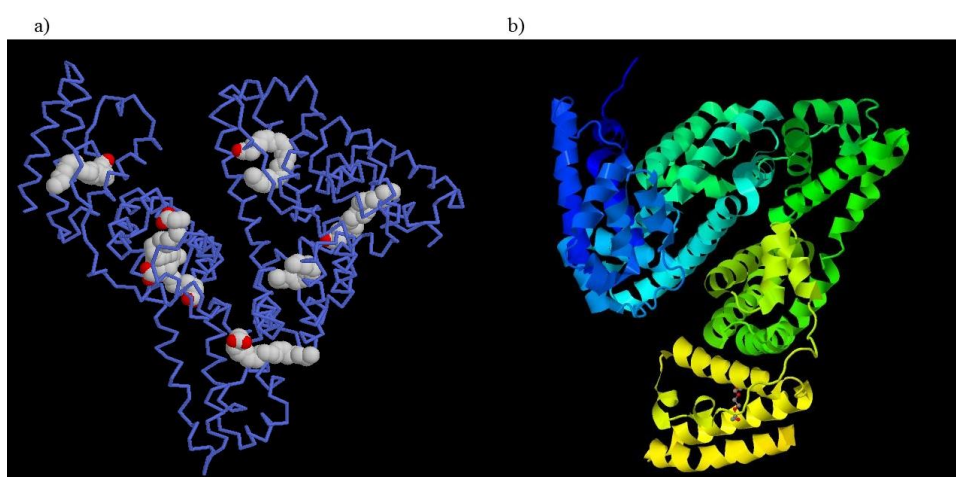


Figura 6: Representação da estrutura tridimensional da BSA: a) representação da interação com ácidos graxos e b) estrutura secundária, vista frontal. Adaptado de: PDB – Protein Data Bank.³²

A BSA vem sendo amplamente empregada para estudos envolvendo interações com fármacos. Em 2015, Abdelhameed e Alanazi publicaram um estudo explorando as interações entre a BSA e finasteride, um medicamento para retenção urinária em homens e outras doenças relacionadas à próstata.²⁸ No início desse ano, os mesmos autores publicaram um novo artigo sobre as interações entre a BSA e o recém aprovado Afatinib,

um fármaco antitumoral.³³ Também foram estudadas as interações de outros fármacos com a BSA como o anti-inflamatório carprofen³⁴ e do anti-psicótico sulpiride.³⁵

Sendo a BSA uma proteína carregadora, é de extrema importância o conhecimento da existência de interações com fármacos, uma vez que estas interações influenciam na farmacocinética e farmacodinâmica da substância. Para tanto, neste trabalho abordamos a característica da fluorescência intrínseca desta proteína, a fim de elucidar os mecanismos de interação da mesma com a Tianeptina e com os novos ésteres obtidos.

2.4. Processos Fotofísicos

2.4.1. Absorção de radiação região do UV-Visível

As radiações ultravioleta (UV) e visível constituem um pequeno conjunto de comprimentos de onda compreendido entre 190 a 800 nm do espectro eletromagnético. Apesar da faixa estreita, essas radiações são de fundamental importância para que diversos fenômenos químicos e físicos possam ocorrer, como, por exemplo, a observação de cor em diversas moléculas orgânicas. Ao interagir com a matéria, parte da luz ultravioleta e visível é absorvida e a energia proveniente dessa absorção é suficiente para que transições eletrônicas possam acontecer, isto é, as moléculas agora podem passar de um estado de mais baixa energia (estado fundamental) para um estado de maior energia (estado excitado).³⁶

Esse processo conhecido como excitação é um processo *quantizado*. Isso significa que a energia absorvida é exatamente igual a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado (Figura 7 - a). Em geral, a transição eletrônica ocorre entre o orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) para o orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO), os quais podem ser do tipo σ , π e n (Figura 7 - b).

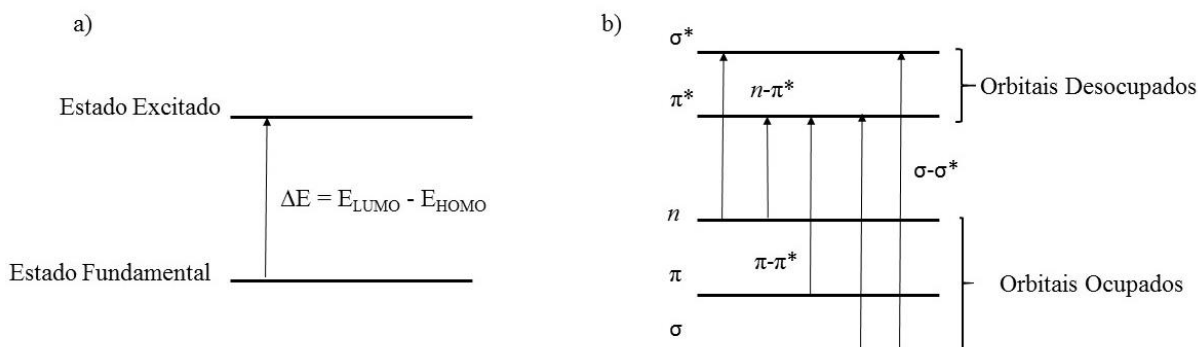


Figura 7: Níveis de energia e transições eletrônicas: a) Processo de mudança de estado e b) possíveis transições eletrônicas em compostos orgânicos. Adaptado de: PAVIA et al., 2008.

Quando moléculas são expostas a radiação UV ou visível com energia correspondente para que uma transição eletrônica possa ocorrer, uma parte da energia é absorvida enquanto um elétron é promovido para um estado eletrônico de maior energia. Denomina-se absorvância (A) essa quantidade de luz absorvida pela molécula e a probabilidade dessa transição eletrônica ocorrer é medida pelo coeficiente de absorvidade molar (ϵ) que é característico de cada molécula. Essas duas grandezas são relacionadas pela lei de Lambert-Beer:³⁷

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

onde b é o caminho óptico e c é a concentração molar do analito. O gráfico de ϵ versus comprimento de onda é chamado de espectro de absorção. A partir do espectro de absorção é possível obter informações como o comprimento de onda máximo de absorção (λ_{\max}) de um composto (Figura 8a). Contudo, o que se observa no espectro de absorção são bandas bastante largas contendo diferentes comprimentos de onda. Isso acontece pois além dos estados eletrônicos, uma molécula possui diversos estados vibracionais e rotacionais que se sobrepõem aos níveis eletrônicos (Figura 8b).

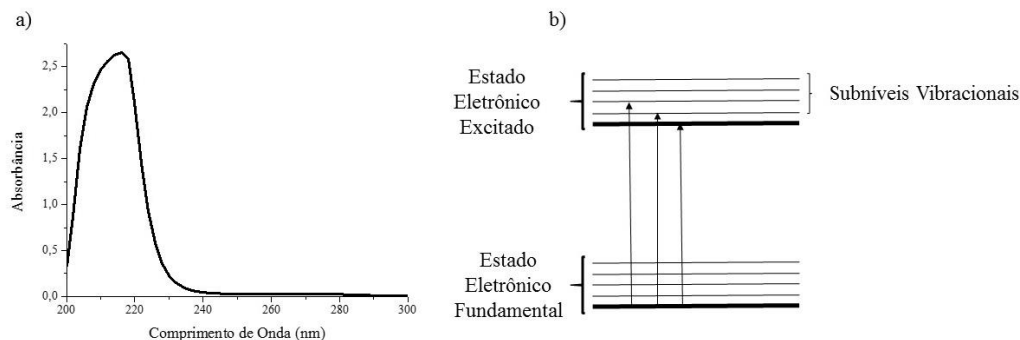


Figura 8: a) Espectro de absorção e b) representação dos subníveis eletrônicos.

2.4.2. Emissão de Fluorescência

À temperatura ambiente, a maioria das moléculas encontra-se no estado fundamental de energia. Quando uma molécula absorve energia e vai para o estado excitado a tendência é que a energia absorvida seja liberada, para que a molécula volte ao estado fundamental. Existem dois mecanismos principais para a liberação da energia absorvida: processos radiativos e processos não radiativos.³⁷

Os processos radiativos são aqueles que envolvem dissipação de energia por meio da emissão de fótons, como a fluorescência e a fosforescência. Já os processos não radiativos, não envolvem a liberação de fótons, mas por meio de outros mecanismos como relaxação vibracional, conversão interna e cruzamento intersistemas.³⁷ Tanto os processos radiativos como os não radiativos podem ser ilustrados pelo diagrama de Jablonski (Figura 9).

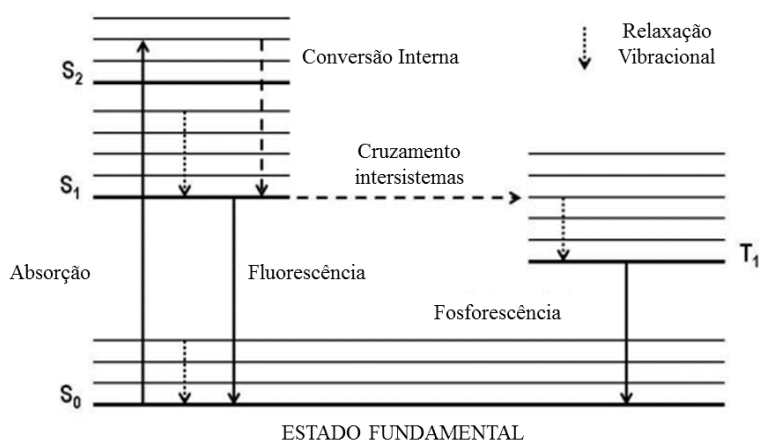


Figura 9: Diagrama de Jablonski.

A fluorescência é um mecanismo de liberação de energia que envolve a emissão de um fóton proveniente do decaimento de um elétron do estado excitado de mais baixa energia singlete (S_1) para o estado fundamental (S_0). Enquanto que a fosforescência envolve a emissão de um fóton proveniente do decaimento de um elétron do estado excitado tripleto (T_1) para o estado fundamental. Pela regra de seleção de spin, processos de relaxação entre dois estados de mesma multiplicidade são permitidos, enquanto que processos de relaxação entre estado de multiplicidade diferente são proibidos.³⁶ Dessa forma, a fluorescência é um processo permitido, pois ocorre entre dois estados singlete e, portanto, ocorre muito rapidamente (8 – 10 ns). Já a fosforescência é um processo proibido por ocorrer entre um estado tripleto e um estado singlete, e por consequência é um processo lento ($10^3 - 1 \text{ s}^{-1}$).³⁸

2.4.3. *Supressão de fluorescência*

A supressão de fluorescência refere-se a qualquer processo que envolva a diminuição da intensidade de fluorescência de uma amostra em estudo. Esse fenômeno tem sido amplamente estudado como uma fonte de informação sobre sistemas bioquímicos, isto é, sistemas envolvendo proteínas, como o desenvolvimento de sondas para membranas^{25, 26, 39} e também para estudos envolvendo aplicações medicinais e proteínas.^{28, 29, 40}

A supressão de fluorescência ocorre devido às interações intermoleculares entre supressor e fluoróforo, as quais incluem transferência de energia, colisões, rearranjos moleculares, formação de complexo no estado fundamental ou reações no estado excitado.³⁸ A supressão colisional ocorre quando o fluoróforo no estado excitado é desativado pela colisão com outras moléculas presentes na solução. As moléculas não são alteradas quimicamente nesse processo.

A supressão da fluorescência por colisões pode ocorrer por meio de dois mecanismos, dinâmico ou estático. No mecanismo dinâmico a supressão da fluorescência é causada pela difusão do supressor, enquanto que no mecanismo estático, ocorre a formação de um complexo no estado fundamental. Ambos os mecanismos dependem da temperatura, contudo no mecanismo dinâmico ao aumentar a temperatura, as constantes de supressão aumentam, enquanto que no mecanismo estático, o inverso é observado,

devido a redução da estabilidade dos complexos formados.^{27, 28} A supressão colisional é descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = K_q\tau_0[Q] + 1 \quad (2)$$

onde F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência do supressor, F é a intensidade de fluorescência, K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer, K_q é a constante de supressão bimolecular, τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo e Q é a concentração do supressor.³⁸

2.4.4. Fluorescência sincronizada

Os estudos envolvendo a espectroscopia de fluorescência sincronizada foram introduzidos na literatura na década de 70, por Lloyd e Evelt⁴¹ e desde então vem sendo cada vez mais empregados para a caracterização das propriedades fluorescentes de amostras complexas, onde um ou mais fluoróforos estão presentes. A técnica consiste na aquisição da excitação e emissão simultânea enquanto a diferença de comprimento de onda ($\Delta\lambda$) entre λ_{ex} e λ_{em} é mantida constante.²⁶

O uso da fluorescência sincronizada para a análise da fluorescência dos resíduos de aminoácidos tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), foi realizado pela primeira vez por Miller, no final da década de 70. Nesse estudo foi avaliada uma mistura dos dois aminoácidos e observou-se que a pequenos valores de $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda = 15$ nm) a fluorescência era característica da tirosina, quanto que para valores maiores de $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda = 60$ nm) o espectro de fluorescência era similar ao do triptofano (Figura 10).⁴²

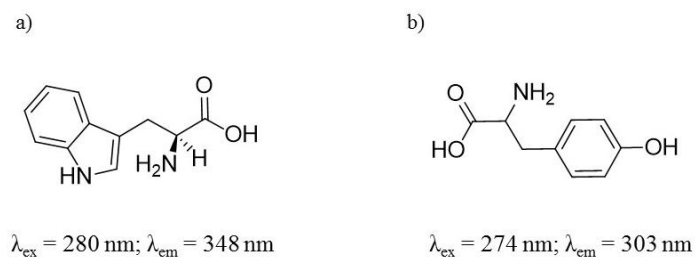


Figura 10: Estrutura dos aminoácidos e seus comprimentos de onda de emissão: triptofano a) e tirosina b).

A fluorescência sincronizada é utilizada frequentemente para caracterizar a interação entre supressores e proteínas, uma vez que esse tipo de estudo permite a análise do microambiente em que se encontra o fluoróforo. Na literatura, encontram-se diversos trabalhos utilizando a fluorescência sincronizada em estudos envolvendo BSA e diferentes supressores de fluorescência.^{26, 28, 43}

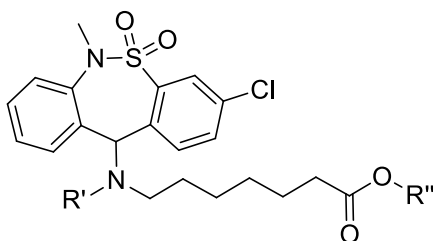
Essas mudanças no microambiente em que se encontra o fluoróforo são identificadas por deslocamentos batocrômicos ou hipsocrômicos do máximo de emissão, como foi o observado por Li e colaboradores em seu estudo envolvendo as interações entre a BSA e uma base Valen-Shiff. Os autores observaram um deslocamento das bandas do resíduo de triptofano o que os levou a concluir que mudanças conformacionais da proteína ocorriam próximo ao aminoácido.²⁶

Conclusões semelhantes também foram obtidas por Zhao e colaboradores ao utilizar a espectroscopia de fluorescência sincronizada para avaliar as interações da BSA com dois complexos de cobre. A presença dos complexos levou a um deslocamento batocrômico do máximo de fluorescência do triptofano, indicando modificações conformacionais na proteína.⁴³

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais:

Sintetizar uma série de análogos estruturais da Tianeptina através das reações de funcionalização (Figura 11) e avaliar a interação desses novos compostos com a proteína albumina do soro bovino utilizando espectroscopia de fluorescência.



R' = Me; R'' = H.

R' = H; R'' = -CH₂(CH₂)₂CH₃, -CH₂(CH₂)₄CH₃, -
CH₂(CH₂)₆CH₃, -CH₂CH=CHCH₃, - CH₂(CH₂)OH, -
CH₂(CH₂)₁₀OH, - CH₂(CH₂)₄COOEt

Figura 11: Derivados da Tianeptina a serem estudados nesse trabalho.

3.2. Objetivos Específicos:

- Sintetizar o derivado N-metil substituído da Tianeptina;
- Sintetizar os ésteres da Tianeptina;
- Caracterização dos novos compostos por meio das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e de ¹³C, infravermelho e ultravioleta.
- Avaliar as interações dos compostos sintetizados com a proteína albumina do soro bovino em diferentes temperaturas por espectroscopia de fluorescência.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante dos resultados promissores envolvendo o derivado N-alquilado apresentados por Campo e colaboradores, buscou-se sintetizar novos compostos derivados da Tianeptina.²¹ Inicialmente, buscou-se a síntese do derivado contendo uma metila ligada ao nitrogênio secundário, a fim de avaliar a influência da substituição nessa posição. Em seguida buscou-se a síntese dos ésteres da Tianeptina, onde procurou-se variar o tamanho da cadeia alquílica inserida com o objetivo de estudar as interações hidrofóbicas com a proteína BSA. Além disto, para avaliar as interações hidrofílicas com a proteína foram sintetizados dois derivados ésteres contendo cadeias carbônicas de tamanhos diferentes e com hidroxila terminais. Ainda para avaliar as interações hidrofílicas, também foi sintetizado um derivado contendo duas funções éster.

A avaliação de interações hidrofóbicas e hidrofílicas com proteínas constitui uma prática comum da química medicinal, e permite a identificação de interações com moléculas biológicas importantes. Desse modo, nesse trabalho busca-se justamente identificar interações da Tianeptina e dos ésteres sintetizados com a proteína carregadora BSA.

4.1. Extração e purificação da Tianeptina comercial

Após a obtenção da Tianeptina e purificação por cromatografia em coluna, foram realizadas as análises infravermelho e RMN de ¹H e ¹³C. Não foi possível a obtenção do ponto de fusão, uma vez que o sólido obtido degradava-se antes de fundir. No espectro de Infravermelho (Figura 12) podem ser observadas as bandas correspondentes às vibrações de: a) em 3260 cm⁻¹ estiramento do grupo N-H; b) estiramentos C-H de aromáticos em 3070 cm⁻¹; c) estiramentos C-H de alcanos provenientes da cadeia aminoheptanóica em 2930 e 2850 cm⁻¹; d) em 1680 cm⁻¹ estiramento assimétrico do grupo carboxilato; e) estiramento de C=C do sistema aromático em 1585 cm⁻¹; f) em 1480 cm⁻¹ estiramento simétrico do grupo carboxilato; g) estiramentos assimétrico e simétrico do grupo SO₂ em 1335 e 1160 cm⁻¹ respectivamente e h) estiramento da ligação C-Cl em 575 cm⁻¹. O espectro de infravermelho obtido mostrou-se de acordo com o apresentado na literatura e indica que a Tianeptina encontra-se na forma de um zwitterion.⁴⁴

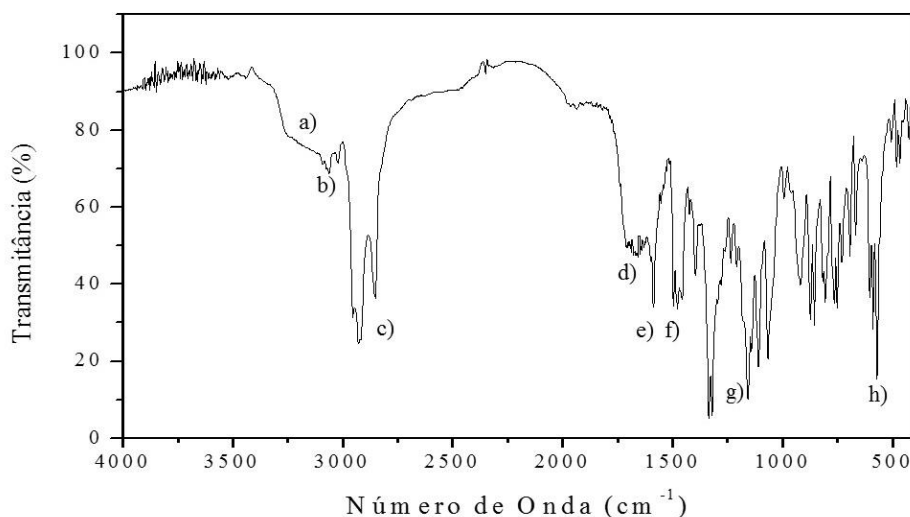


Figura 12: Espectro de infravermelho em KBr da Tianeptina.

A atribuição dos sinais, tanto no RMN de ^1H como no ^{13}C – APT, foi feita com base na literatura.⁴⁵ No RMN de ^1H do sal sódico da Tianeptina (Figura 13) podem-se observar os seguintes sinais: entre 1,21 e 1,34 ppm um multipletto correspondente aos quatro hidrogênios H3 e H4; entre 1,40 e 1,61 ppm um multipletto correspondente aos quatro hidrogênios H2 e H5; em 2,24 ppm um triplete ($^3J_{\text{H6-H5}} = 15 \text{ Hz}$) correspondente aos dois hidrogênios H6; entre 2,37 e 2,53 ppm um multipletto correspondente aos dois hidrogênios H1. É interessante destacar a não equivalência dos hidrogênios H1. Platzer e colaboradores também observaram esse fenômeno ao aumentar a concentração das amostras ou para qualquer concentração quando a análise era feita empregando CDCl_3 . Em 3,32 ppm um singletto referente aos três hidrogênios da metila ligada ao nitrogênio do sistema tricíclico e em 5,17 ppm outro singletto referente ao H11' do sistema tricíclico. A presença do hidrogênio H11' em uma região intermediária do espectro indica que se trata de um próton relativamente ácido, fato importante a ser considerado na escolha de metodologias empregando meios fortemente básicos. A região dos aromáticos pode ser dividida em quatro grupos, o primeiro, um multipletto entre 7,30 e 7,34 correspondendo ao H9', o segundo, um multipletto entre 7,35 – 7,45 ppm correspondendo aos hidrogênios H1', H8' e H10', o terceiro, um multipletto entre 7,46 – 7,49 correspondendo aos hidrogênios H2' e H7' e por fim um multipletto em 7,96 ppm correspondendo ao hidrogênio H4'. No caso do multipletto em 7,96 ppm esperava-se um dubletto devido ao acoplamento em *meta* entre os hidrogênios H2' e H4', contudo, isso não foi observado, possivelmente devido a algum efeito de concentração ou solvente, como no caso dos hidrogênios H1.

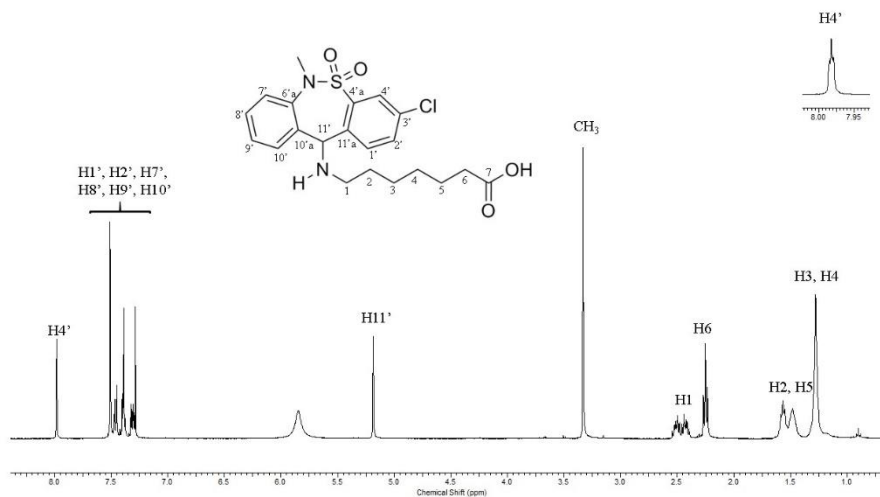


Figura 13: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3-d) da Tianeptina.

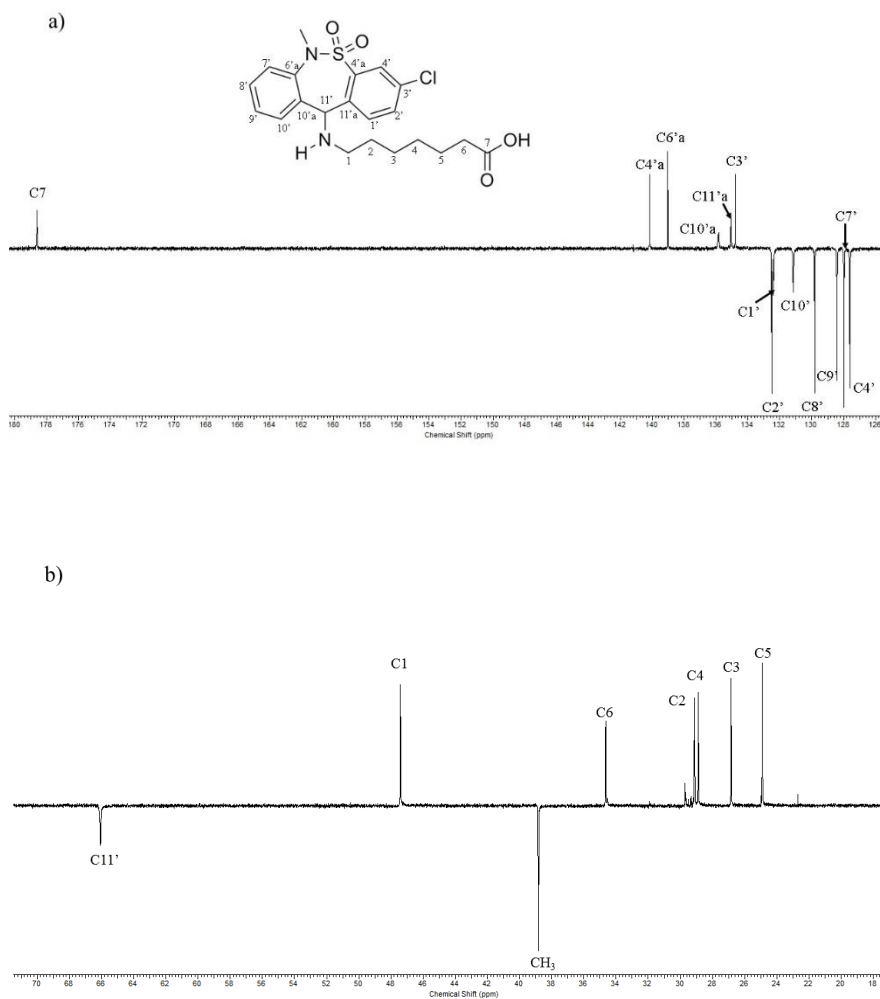


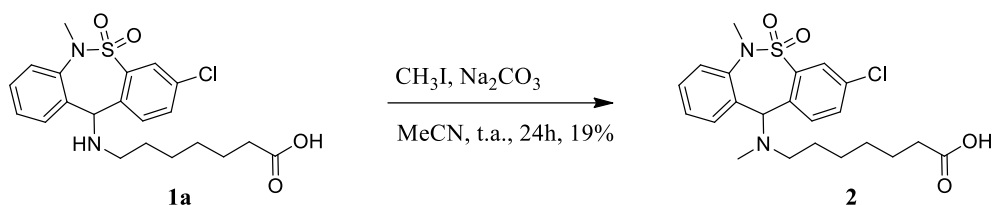
Figura 14: Espectro de RMN de ^{13}C - APT (CDCl_3-d , 75 MHz) da Tianeptina: a) ampliação da região dos aromáticos e carbonila e b) ampliação da região dos alifáticos.

4.2. Síntese e caracterização espectroscópica dos derivados da Tianeptina

4.2.1. Síntese do composto [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il](metil)amino]-7 ácido heptanóico (**2**)

A abordagem inicial para a obtenção dos derivados da Tianeptina foi planejada com base na substituição do grupo aminohexanóico, tendo como ponto de partida a patente de Campo e colaboradores.²¹ Para tanto, o derivado N-metilado **2** foi obtido com rendimento de 19% seguindo a metodologia descrita no Esquema 2. O restante do material de partida sofreu dupla alquilação ou não reagiu, conforme observado via CCD.

Esquema 2: Síntese do derivado N-metilado:



No espectro de infravermelho do derivado **2** (Figura 15) podem ser observadas mudanças nas bandas com relação a Tianeptina, como a ausência da banda de estiramento da ligação N-H de amina secundária em 3350 cm^{-1} . As demais bandas também podem ser observadas: a) em 3070 cm^{-1} estiramento de C-H de aromáticos; b) em 2930 e 2850 estiramento de C-H de alcanos; c) em 1715 cm^{-1} estiramento do grupo C=O; d) em 1580 cm^{-1} estiramento de C=C de aromáticos; e) em 1335 e 1160 cm^{-1} estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente do grupo SO_2 e f) em 570 cm^{-1} estiramento da ligação C-Cl.

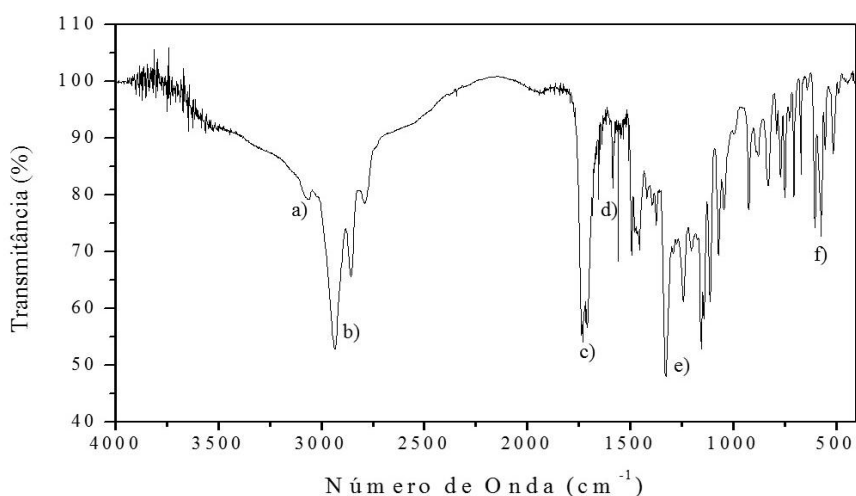


Figura 15: Espectro de infravermelho em KBr do derivado **2**.

A atribuição dos sinais no RMN de ^1H do composto **2** (Figura 16) foi feita comparando-se o espectro obtido com o espectro da Tianeptina. Com relação aos hidrogênios aromáticos, não se observaram mudanças na distribuição dos sinais no espectro, porém, em 7,94 ppm tem-se um dubleto ($^4J_{\text{H4}'\text{-H2}'} = 5,6 \text{ Hz}$) referente ao acoplamento em *meta* entre o hidrogênio H4' e o H2' que no caso da Tianeptina não estava nítido. Os demais hidrogênios aromáticos também saíram na faixa de 7,26 a 7,48 ppm e exibiram a mesma distribuição observada para a Tianeptina conforme apresentado na Figura 16. As diferenças com relação ao espectro da Tianeptina apresentado e que caracterizam a formação do produto **2** são o singlete em 4,26 ppm referente ao hidrogênio 11', que aparece mais blindado devido à presença do grupo metila ligado ao nitrogênio, a inversão na posição dos sinais dos hidrogênios H1 e H6, um singlete em 2,02 ppm referente ao novo grupo metila.

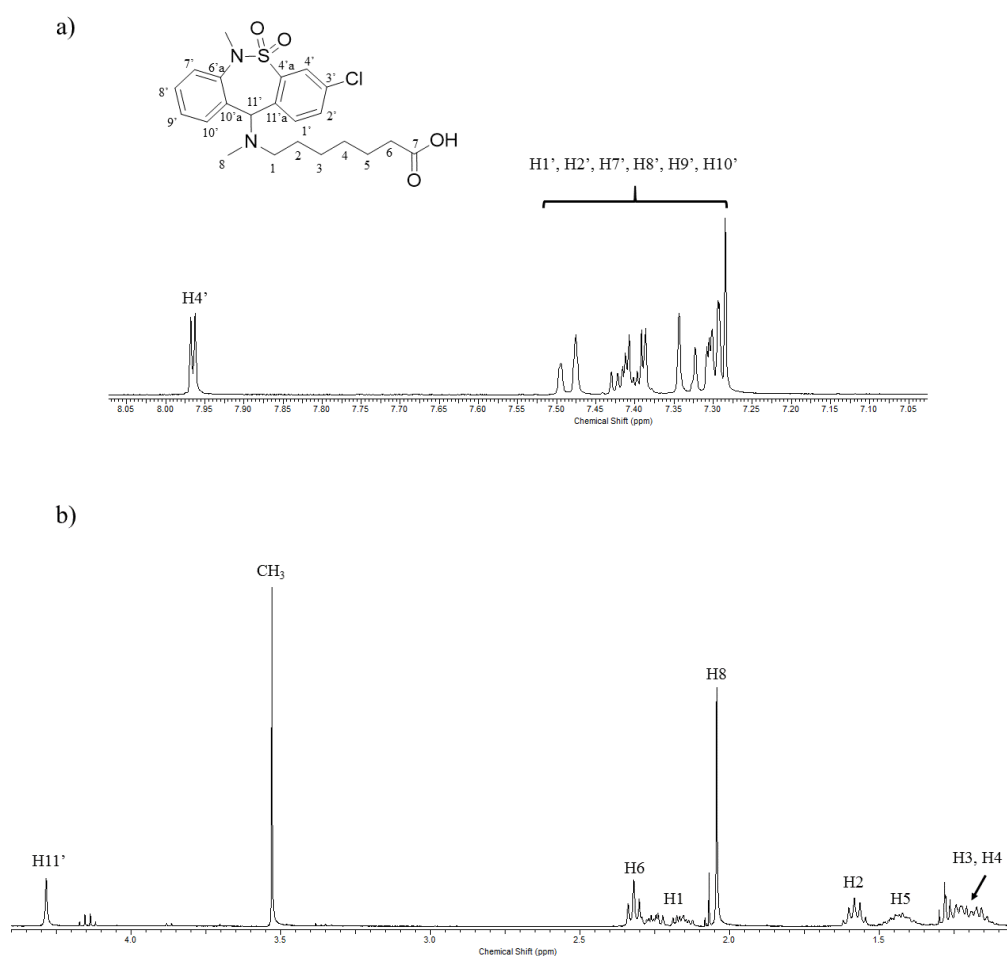
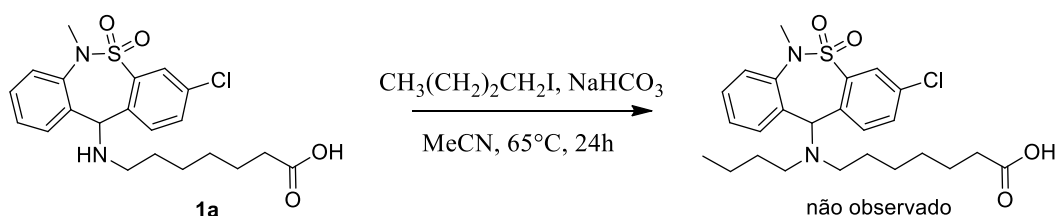


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d$) do derivado **2**: a) ampliação da região dos aromáticos e b) ampliação da região dos alifáticos.

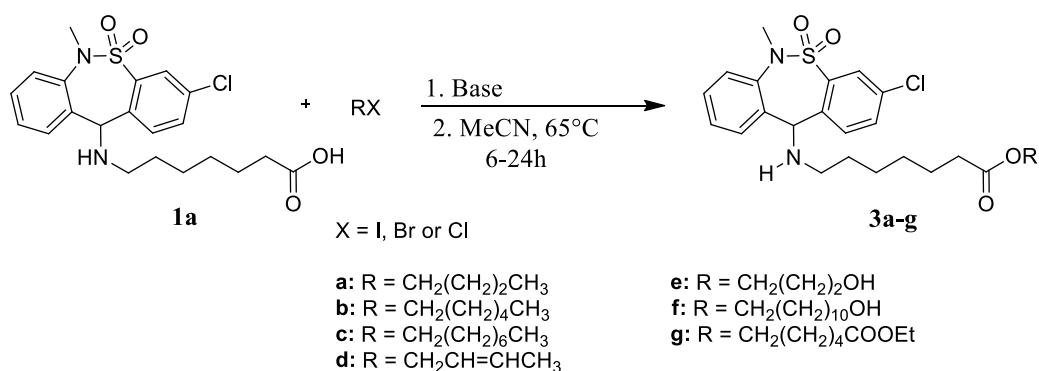
Com o intuito de aumentar o número de carbonos da cadeia alquílica, tentou-se a síntese do derivado N-(*n*-butil) utilizando iodobutano como agente alquilante conforme o Esquema 3. Contudo, após o tratamento da reação e purificação do produto por cromatografia em coluna, observou-se via RMN de ^1H que não ocorreu a formação do derivado N-(*n*-butil), mas sim a formação do respectivo éster da Tianeptina, muito provavelmente devido ao alto impedimento estérico na posição em que pretendia-se realizar a alquilação. A formação do éster foi identificada pelo não deslocamento do sinal de 5,01 ppm para 4,26 ppm referente ao hidrogênio 11', como no caso do derivado **2** e pelo surgimento de um tripleto em torno de 4 ppm, região típica de prótons de ésteres.

Esquema 3: Síntese do derivado N-(*n*-butil) da Tianeptina.



Sendo a síntese de ésteres da Tianeptina um dos objetivos deste trabalho, e, não havendo a disponibilidade no laboratório dos respectivos álcoois, optou-se pela continuidade do uso da mesma metodologia de N-metilação para a obtenção dos ésteres. Além disso, essa metodologia utiliza reagentes brandos e não faz uso de temperaturas elevadas que poderiam levar a degradação da Tianeptina. Dessa forma, a obtenção dos ésteres seguiu a metodologia descrita no Esquema 4.

Esquema 4: Síntese dos ésteres tianeptínicos.



Apesar de pouco usual, a síntese de ésteres em meio básico é uma metodologia conhecida na literatura.⁴⁶⁻⁴⁸ Também chamada de substituição eletrofílica no oxigênio, a reação envolve inicialmente a formação do sal do ácido carboxílico e em seguida ocorre a substituição eletrofílica, onde o eletrófilo é o haleto de alquila e o nucleófilo é o ânion carboxilato, dando origem ao éster e a formação de um sal (Figura 17). Nesse trabalho, entretanto, não foram utilizadas aminas como base nas reações, o que possivelmente influenciou para que os rendimentos obtidos não fossem superiores a 30%. A estrutura dos ésteres obtidos foi comprovada por RMN de ¹H e ¹³C, bem como espectroscopia no infravermelho.

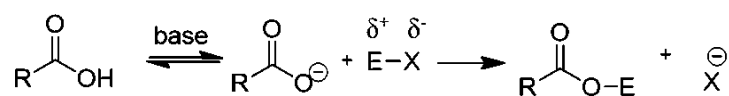


Figura 17: Reação de substituição eletrofílica no oxigênio.

Como colocado anteriormente, a síntese dos ésteres contendo diferentes tamanhos de cadeia alquílica visa o estudo das interações hidrofóbicas com a proteína BSA, uma vez que as principais regiões para a ligação de moléculas são localizadas em regiões hidrofóbicas nos subdomínios IIA e IIIA, os quais são denominados sítios ligantes I e II.³¹ De maneira análoga, foi realizada a síntese de ésteres contendo grupos polares na cadeia alquílica, a fim de estudar a influência das interações hidrofílicas com a proteína.

4.2.2. Síntese do [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino]-7-heptanoato de butila (**3a**)

A síntese do éster **3a** foi realizada empregando Tianeptina, iodo-butano como agente alquilante, Na₂CO₃ como base, em acetonitrila a 65°C durante 24 horas. A reação mostrou-se bastante limpa, uma vez que só foi observado a formação de um único produto na CCD. Após a purificação por cromatografia em coluna utilizando hexano e acetato de etila como eluentes, obteve-se um óleo amarelo claro, com rendimento de 26%.

No espectro de infravermelho do éster **3a** (Figura 18) podem ser observadas as seguintes bandas: a) em 3350 cm⁻¹ estiramento da ligação N-H de amina secundária; b) em 3080 cm⁻¹ estiramento de C-H aromáticos; c) em 2930 e 2860 cm⁻¹ estiramento de C-H de alcanos; d) em 1730 cm⁻¹ estiramento do grupo C=O; e) em 1595 cm⁻¹ estiramento

de C=C do sistema aromático; f) em 1470 cm^{-1} estiramento do grupo COOC de ésteres; g) em 1335 e 1150 cm^{-1} estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente, do grupo SO_2 e h) em 580 cm^{-1} estiramento da ligação C-Cl. A formação do éster ficou evidenciada pelo aparecimento da banda da carbonila em 1730 cm^{-1} , que no caso da Tianeptina não é tão intensa e nem tão definida, e também pela ausência da banda de estiramento do grupo OH do ácido carboxílico.

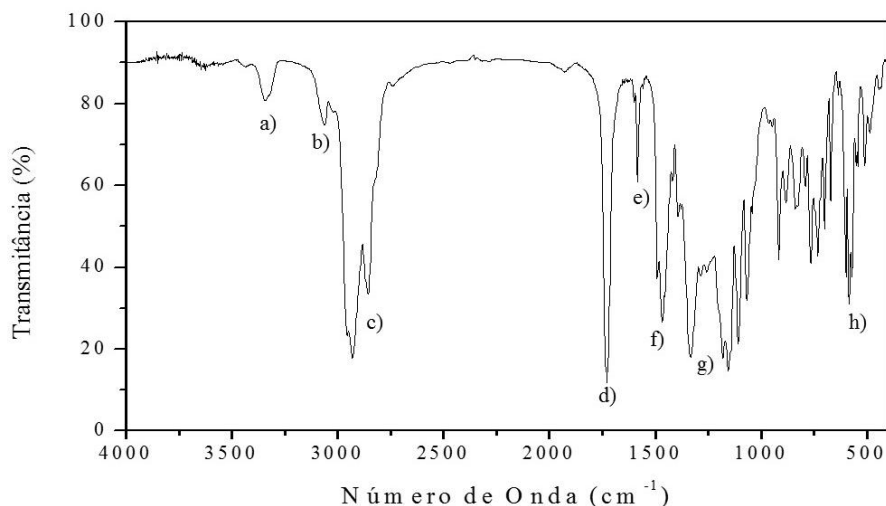


Figura 18: Espectro de infravermelho em KBr de **3a**.

No espectro de RMN de ^1H de **3a** (Figura 19) a formação do éster também ficou evidenciada pela presença de um tripleto ($^3J_{\text{H8-H9}} = 22,5\text{ Hz}$) em $4,06\text{ ppm}$, região típica de prótons de ésteres, correspondendo aos dois hidrogênios H8. É interessante ressaltar que no caso do composto **3a** foi possível observar o sinal referente aos dois hidrogênios H1 como um tripleto bastante definido em $2,45\text{ ppm}$ ($^3J_{\text{H1-H2}} = 23,5\text{ Hz}$). Os demais sinais do espectro são característicos da Tianeptina.

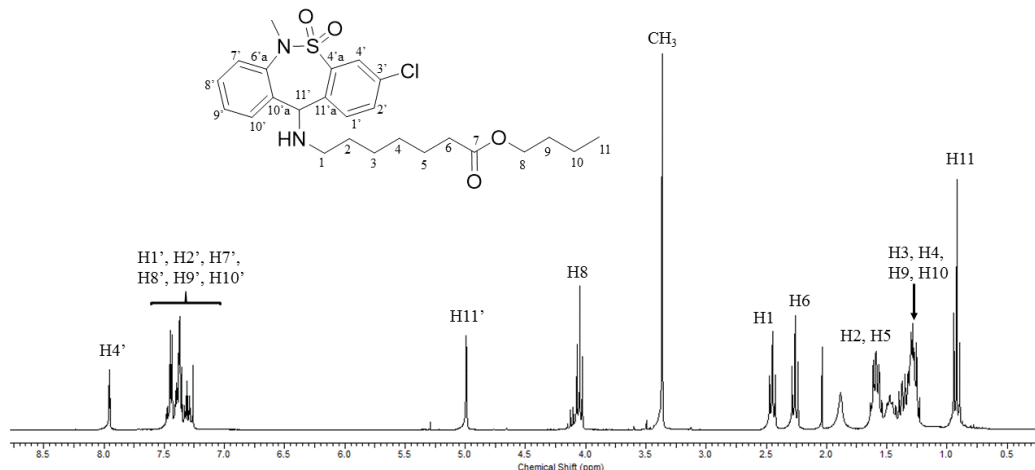


Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3-d) do éster **3a**.

4.2.3. Síntese do [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino]-7-heptanoato de hexila (**3b**)

O derivado **3b** foi sintetizado de forma análoga ao éster **3a**, nesse caso utilizando iodo-hexano como agente alquilante. Do mesmo modo, foi observado a formação de um único produto na CCD e após a remoção do solvente o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando hexano e acetato de etila como eluentes. Ao final obteve-se um óleo amarelo claro com rendimento de 18%.

No espectro de infravermelho do éster **3b** (Figura 20) podem ser observadas as seguintes bandas: a) em 3350 cm^{-1} estiramento da ligação N-H de amina secundária; b) em 3070 cm^{-1} estiramento de C-H de aromáticos; c) em 2930 e 2860 cm^{-1} estiramento de C-H de alcanos; d) em 1730 cm^{-1} estiramento do grupo C=O; e) em 1560 cm^{-1} estiramento C=C do sistema aromático; f) em 1470 cm^{-1} estiramento do grupo COOC de ésteres; g) em 1350 e 1150 cm^{-1} estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, do grupo SO_2 e h) em 583 cm^{-1} estiramento da ligação C-Cl.

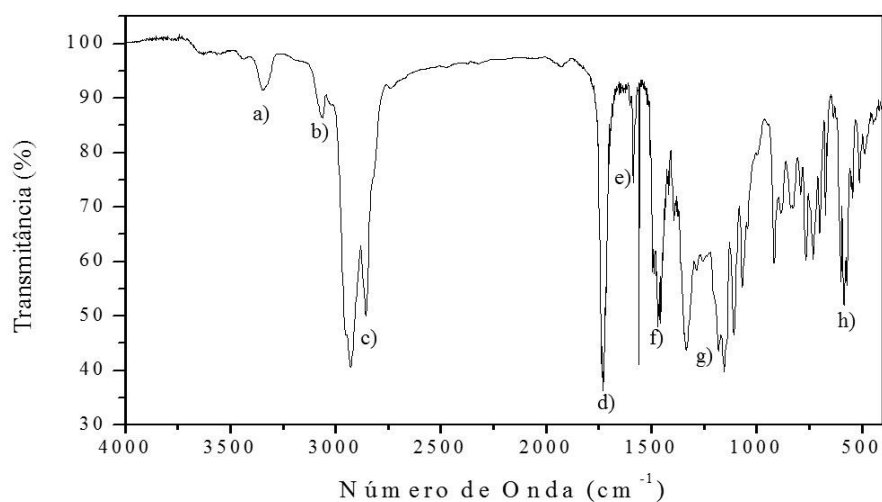


Figura 20: Espectro de infravermelho em KBr do éster **3b**.

No espectro de RMN de ^1H de **3b** (Figura 21) a formação do éster fica evidenciada pela presença de um tripleto em 4,04 ppm ($^3J_{\text{H8-H9}} = 16,6$ Hz), região característica de prótons de ésteres, referentes aos dois hidrogênios H8. Também é possível observar o sinal referente aos três hidrogênios H13 na forma de um tripleto em 0,89 ppm ($^3J_{\text{H13-H12}} = 14,1$ Hz). Os demais sinais referentes à cadeia alquílica inserida aparecem sobrepostos aos sinais dos hidrogênios alifáticos da Tianeptina, promovendo um aumento nos valores integrais de acordo com o esperado para o número de prótons da cadeia (Figura 12A). O restante dos sinais do espectro são característicos da Tianeptina.

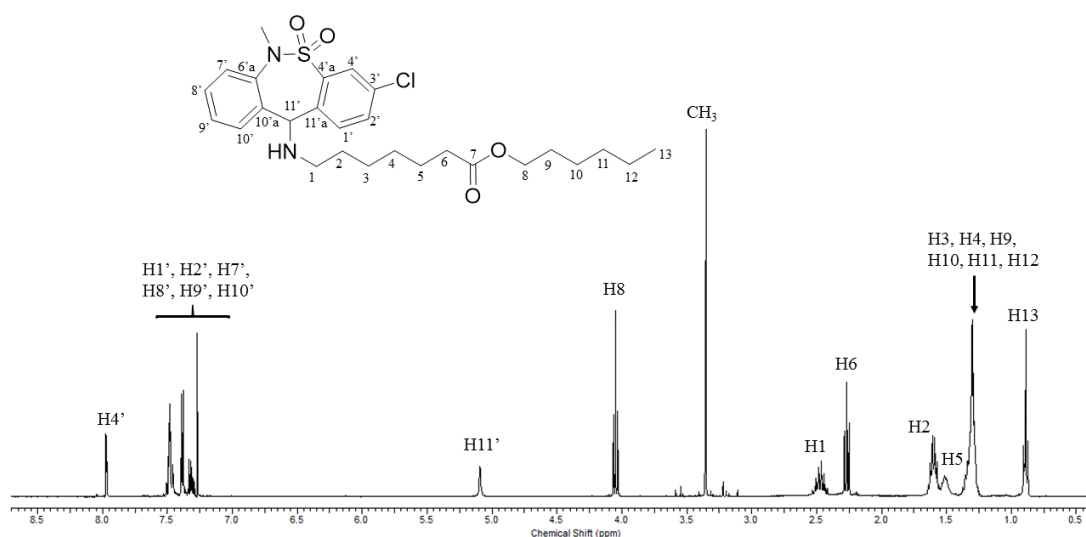


Figura 21: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3-d) de **3b**.

O RMN de ^{13}C – APT não apresentou todos os vinte e sete sinais esperados para o derivado **3b**, mesmo com tempo de aquisição superior a dez horas. Contudo, como pode ser observado no espectro em anexo (Figura 13A), isso pode estar relacionado à baixa concentração da amostra ou a inadequação do tempo de relaxação desses carbonos com o tempo de aquisição, uma vez que outros sinais de carbonos quaternários também se mostraram bastante fracos. Os sinais alifáticos mostraram-se de acordo com o esperado para o derivado **3b**.

4.2.4. Síntese do [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino]-7-heptanoato de octila (**3c**)

O éster **3c** foi obtido de maneira análoga aos anteriores, utilizando iodo-octano como agente alquilante e Na_2CO_3 como base. Também foi testada a síntese utilizando bromo-octano, contudo não se observou a formação do produto na CCD, mesmo para tempos bastante superiores de reação (48 e 72 horas). A purificação do produto bruto foi feita após a remoção do solvente da reação utilizando cromatografia em coluna e hexano e acetato de etila como eluentes na proporção inicial de 90:10 e depois aumentando-se a polaridade até 40:60. Ao final obteve-se um óleo amarelo claro com 28% de rendimento.

No espectro de infravermelho do éster **3c** (Figura 22) podem ser observadas as seguintes bandas: a) em 3340 cm^{-1} estiramento da ligação N-H de amina secundária; b) em 3065 cm^{-1} estiramento de C-H de aromáticos; c) em 2930 e 2850 cm^{-1} estiramento de C-H de alcanos; d) em 1730 cm^{-1} estiramento do grupo C=O; e) em 1595 cm^{-1} estiramento de C=C de aromáticos; f) em 1470 cm^{-1} estiramento do grupo COOC de ésteres; g) em 1335 e 1150 cm^{-1} estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente, do grupo SO_2 e h) em 580 cm^{-1} estiramento da ligação C-Cl.

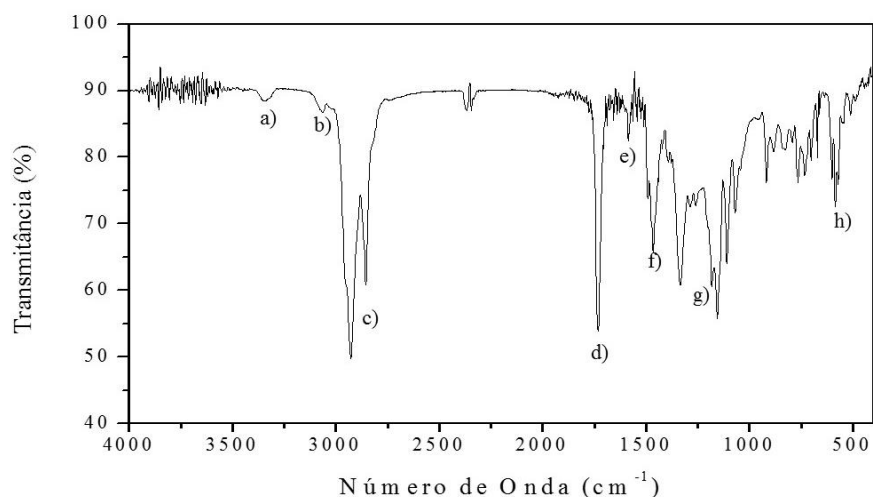


Figura 22: Espectro de infravermelho em KBr do éster **3c**.

No RMN de ^1H de **3c** (Figura 23) podem ser observados os sinais referentes à formação do éster, como o tripleto em 4,04 ppm ($^3J_{\text{H8-H9}} = 22,5$ Hz), região típica de prótons de ésteres, referente aos dois hidrogênios H8. Também pode ser observado um tripleto em 0,88 ppm ($^3J_{\text{H15-H14}} = 21,5$ Hz) referente aos três hidrogênios H15. Os demais sinais referentes aos hidrogênios da cadeia alquílica inserida aparecem sobrepostos aos sinais dos hidrogênios alifáticos da Tianeptina, promovendo um aumento nos valores integrais de acordo com o esperado para o número de prótons da cadeia (Figura 15A). O restante dos sinais do espectro são característicos da Tianeptina.

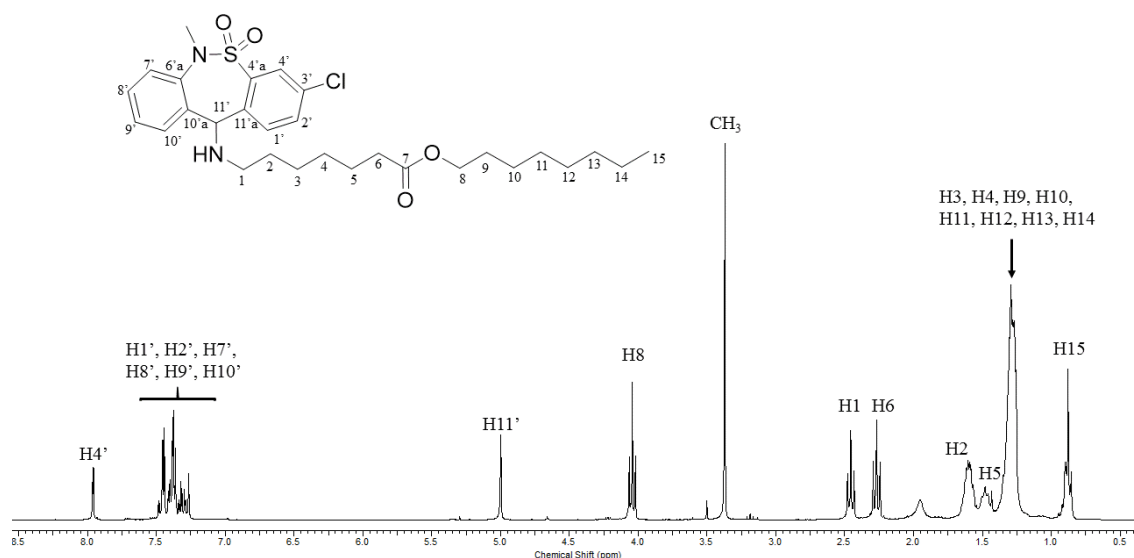


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d$) de **3c**.

4.2.5. Síntese do [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino]-7-heptanoato de (E)-but-2-en-1-ila (**3d**)

O éster **3d** foi sintetizado conforme mostrado no Esquema 4, empregando cloreto de but-2-en-1-ila contendo uma mistura dos isômeros *cis* e *trans*, na proporção 1:6, como agente alquilante, K_2CO_3 como base, em acetonitrila a 65°C durante seis horas. A purificação do produto bruto foi feita após a remoção do solvente da reação utilizando cromatografia em coluna e hexano e acetato de etila como eluentes. Ao final obteve-se um óleo amarelo claro com 29% de rendimento. Também foi testada a síntese do éster **3d** utilizando Na_2CO_3 como base, contudo o rendimento mostrou-se bastante inferior (4% após purificação por cromatografia em coluna).

No espectro de infravermelho do éster **3d** (Figura 24) podem ser observadas as seguintes bandas: a) em 3340 cm^{-1} estiramento da ligação N-H de amina secundária; b) em 3070 cm^{-1} estiramento de C-H de aromáticos; c) em 3020 cm^{-1} estiramento de C-H de alenos; d) em 2930 e 2840 cm^{-1} estiramento de C-H de alcanos; e) em 1730 cm^{-1} estiramento do grupo C=O; f) em 1560 cm^{-1} estiramento de C=C de aromáticos; g) em 1480 cm^{-1} estiramento do grupo COOC de ésteres; h) em 1330 e 1150 cm^{-1} estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente, do grupo SO_2 e i) em 585 cm^{-1} estiramento da ligação C-Cl.

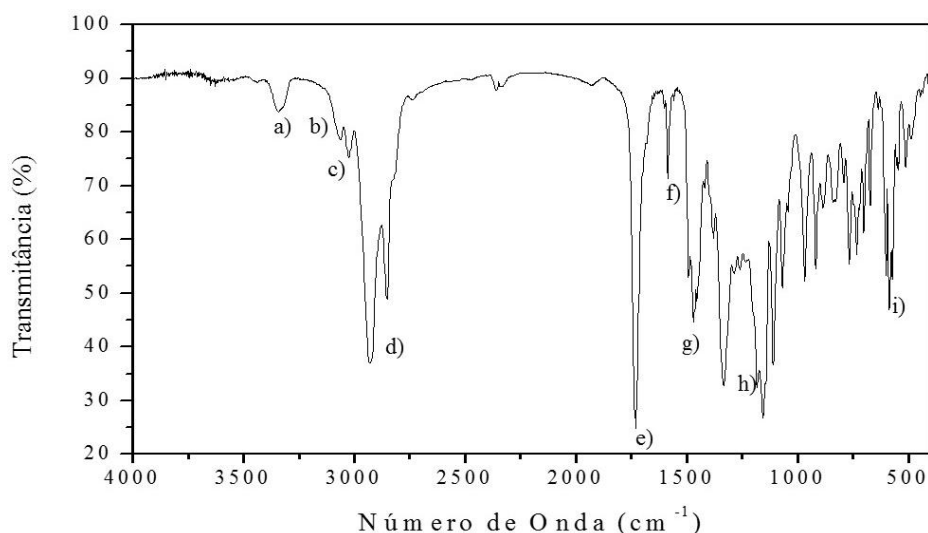


Figura 24: Espectro de infravermelho em KBr do éster **3d**.

Do mesmo modo que no espectro do material de partida o eletrófilo cloreto de 2-buten-1-ila (Figura 17A), a distribuição dos sinais no RMN de ^1H do éster **3d** (Figura 25) apresentou dois sinais referentes ao H8, ambos dubletos com $^3J_{\text{H8-H9}} = 13,7$ Hz em 4,62 e 4,48 ppm. Ambos os sinais se encontram mais desblindados que os prótons dos demais ésteres sintetizados devido à presença da ligação dupla entre C9 e C10. Também é possível observar os dois sinais referentes aos hidrogênios H9 e H10 como dois multipletos entre 5,51 – 5,61 ppm e 5,73 – 5,82 ppm respectivamente. O sinal correspondente aos três hidrogênios H11 aparece como um dubleto 1,72 ppm ($^3J_{\text{H11-H10}} = 12,7$ Hz). Os demais sinais do espectro são característicos da Tianeptina.

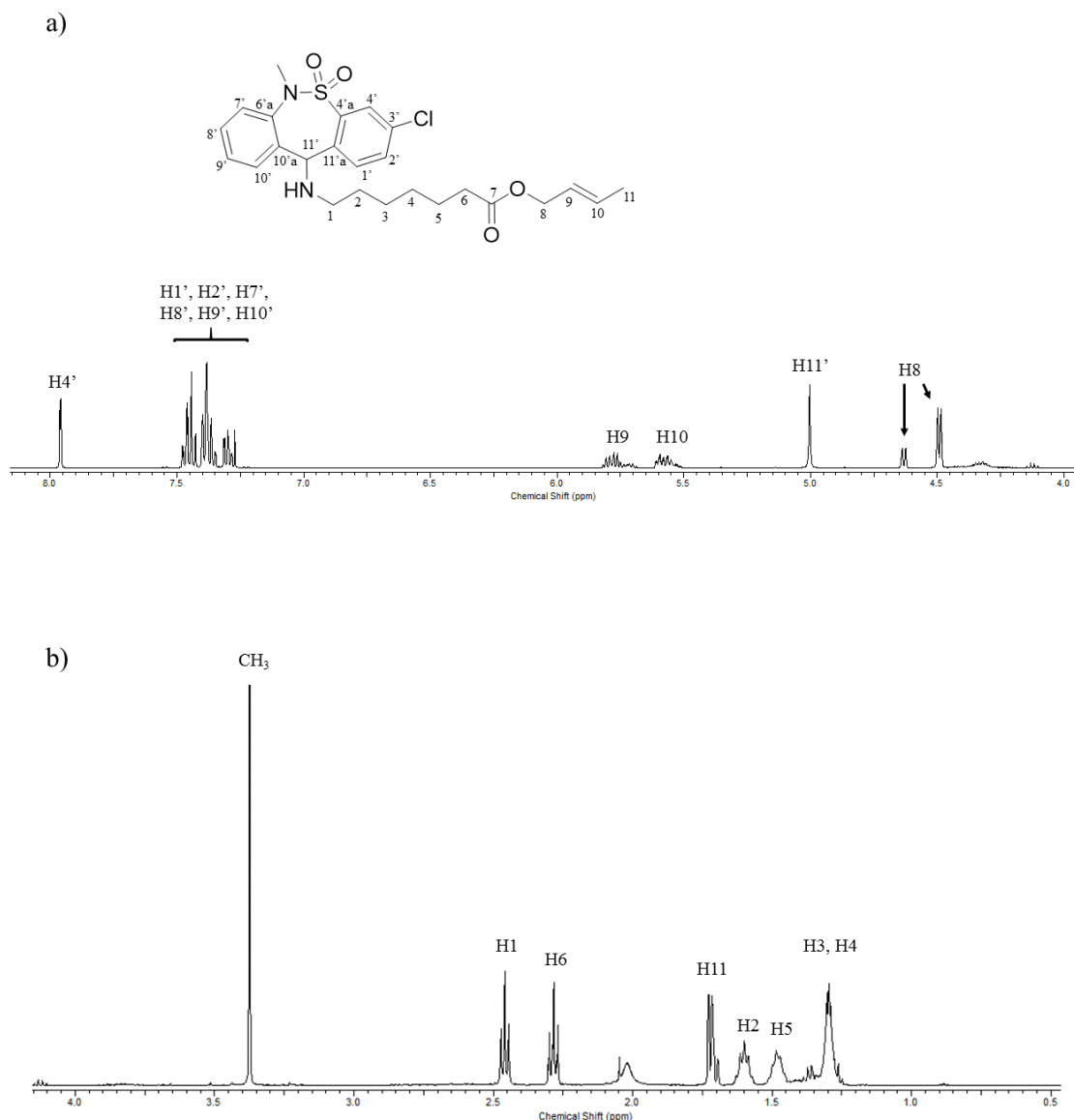


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d$) do éster **3d**: a) ampliação da região dos aromáticos e prótons metilênicos e b) ampliação da região dos alifáticos.

4.2.6. Síntese do composto [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino] -7-heptanoato de 3-hidroxipropila (**3e**)

O éster **3e** foi sintetizado utilizando 3-bromo-1-propanol como agente alquilante e Na_2CO_3 como base, em acetonitrila a 65°C até que não se observassem mais mudanças na CCD. A purificação do produto bruto foi feita após a remoção do solvente da reação utilizando cromatografia em coluna e hexano e acetato de etila como eluentes, na

proporção inicial de 80:20 e depois aumentando-se gradualmente a polaridade até 40:60. Ao final obteve-se um óleo amarelo claro com 21% de rendimento.

No espectro de infravermelho do éster **3e** (Figura 26) podem ser observadas as seguintes bandas: a) entre 3560 e 3300 cm^{-1} estiramento da hidroxila de álcool; b) em 3340 cm^{-1} estiramento da ligação N-H de amina secundária; c) em 3070 cm^{-1} estiramento de C-H de aromáticos; d) em 2930 e 2850 cm^{-1} estiramento de C-H de alcanos; e) em 1730 cm^{-1} estiramento do grupo C=O; f) em 1595 cm^{-1} estiramento de C=C de aromáticos; g) em 1475 cm^{-1} estiramento do grupo COOC de ésteres; h) em 1325 e 1150 cm^{-1} estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente, do grupo SO_2 e i) em 1060 cm^{-1} estiramento da ligação C-O e j) em 590 cm^{-1} estiramento da ligação C-Cl.

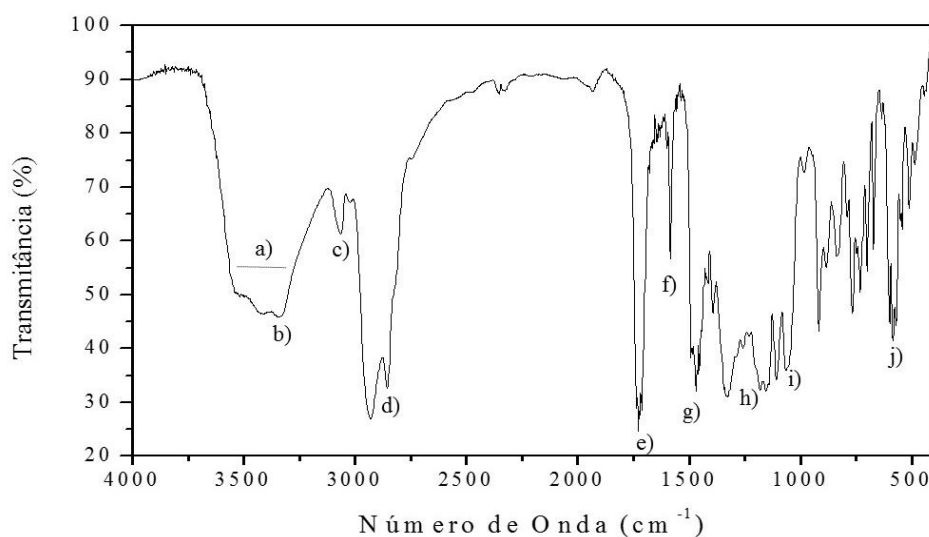


Figura 26: Espectro de infravermelho em KBr do éster **3e**.

No RMN de ^1H de **3e** (Figura 27) podem ser observados os sinais referentes à formação do éster, como o tripleto em 4,22 ppm ($^3J_{\text{H8-H9}} = 20,6$ Hz), região típica de prótons de ésteres, referente aos dois hidrogênios H8. Em 3,67 ppm é possível observar outro tripleto ($J = 20,6$ Hz) referente aos dois hidrogênios H10 vizinhos à hidroxila.

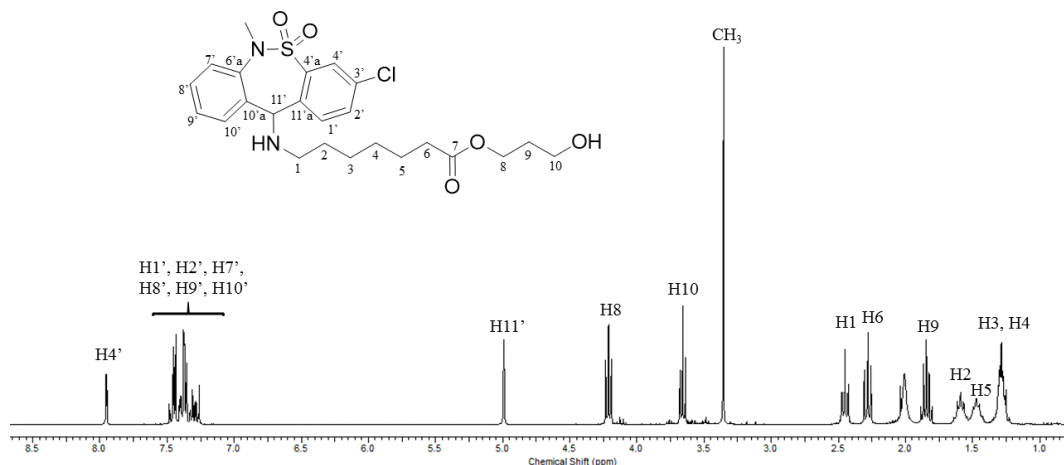


Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3-d) do éster **3e**.

O sinal correspondente aos dois hidrogênios H9 é observado em 1,85 ppm, o qual em primeira análise parece ser um quintupeto coerente com a regra $n + 1$. Contudo, ao calcular a constante de acoplamento foram encontrados dois valores de J : $^3J_{\text{H}_9-\text{H}_8} = 19,6$ Hz e $^3J_{\text{H}_9-\text{H}_{10}} = 21,5$ Hz, indicando a existência de um acoplamento mais complexo, no caso um triplete de triplete (Figura 28). Como ambas as constantes de acoplamento são bastante próximas, o que se observa é uma sobreposição dos picos centrais, dando a forma resultante de um quintupeto, conforme a árvore de acoplamento abaixo.

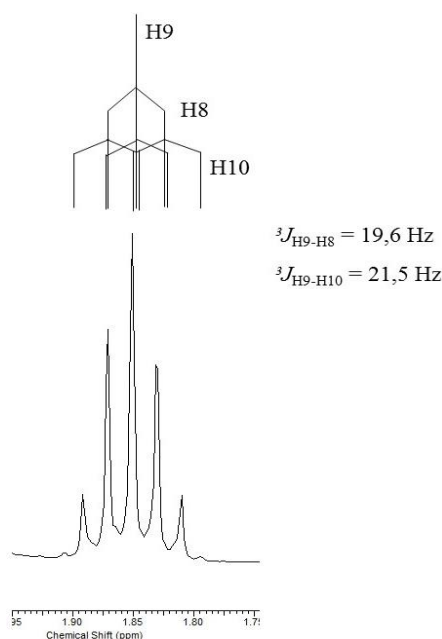


Figura 28: Acoplamento complexo entre os hidrogênios H8, H9 e H10.

4.2.7. Síntese do [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il](11-hidroxiundecil)amino]-7-heptanoato de 11-hidroxiundecila (3f)

O éster **3f** foi sintetizado de maneira análoga ao derivado **3e**, utilizando 11-bromo-1-hidroxiundecanol como agente alquilante. A reação mostrou-se bastante limpa uma vez que somente foi observado a formação de um produto na CCD, no entanto mesmo após 24 horas de reação ainda havia Tianeptina que não havia reagido. Após a remoção do solvente, o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando hexano e acetato de etila como eluentes na proporção inicial de 90:10 e depois aumentando-se gradualmente a polaridade até 40:60. Ao final obteve-se um óleo amarelo com 27% de rendimento.

No espectro de infravermelho do éster **3f** (Figura 29) podem ser observadas as seguintes bandas: a) entre 3560 e 3280 cm^{-1} estiramento da ligação O-H de álcool; b) em 3350 cm^{-1} estiramento da ligação N-H de amina secundária; c) em 3065 cm^{-1} estiramento de C-H de aromáticos; d) em 2930 e 2850 cm^{-1} estiramento de C-H de alcanos; e) em 1730 cm^{-1} estiramento do grupo C=O; f) em 1590 cm^{-1} estiramento de C=C de aromáticos; g) em 1470 cm^{-1} estiramento do grupo COOC de ésteres; h) em 1325 e 1150 cm^{-1} estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente, do grupo SO_2 e i) em 1065 cm^{-1} estiramento da ligação C-O e j) em 585 cm^{-1} estiramento da ligação C-Cl.

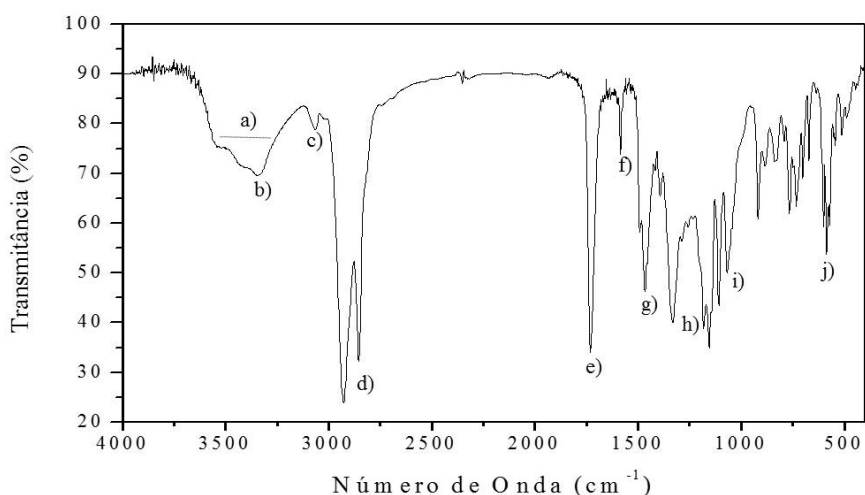


Figura 29: Espectro de infravermelho em KBr do éster **3f**.

No espectro de RMN de ^1H de **3f** (Figura 30) a formação do éster fica evidenciada pela presença de um tripleto em 4,04 ppm ($^3J_{\text{H8-H9}} = 22,5$ Hz), região característica de prótons de ésteres, referentes aos dois hidrogênios H8. Também foi possível observar o sinal referente aos dois hidrogênios H18 na forma de um tripleto em 3,63 ppm ($^3J_{\text{H18-H17}} = 22,0$ Hz). Os demais sinais referentes à cadeia alquílica inserida aparecem sobrepostos aos sinais dos hidrogênios alifáticos da Tianeptina, promovendo um aumento nos valores integrais de acordo com o esperado para o número de prótons da cadeia (Figura 25A). O restante dos sinais do espectro são característicos da Tianeptina.

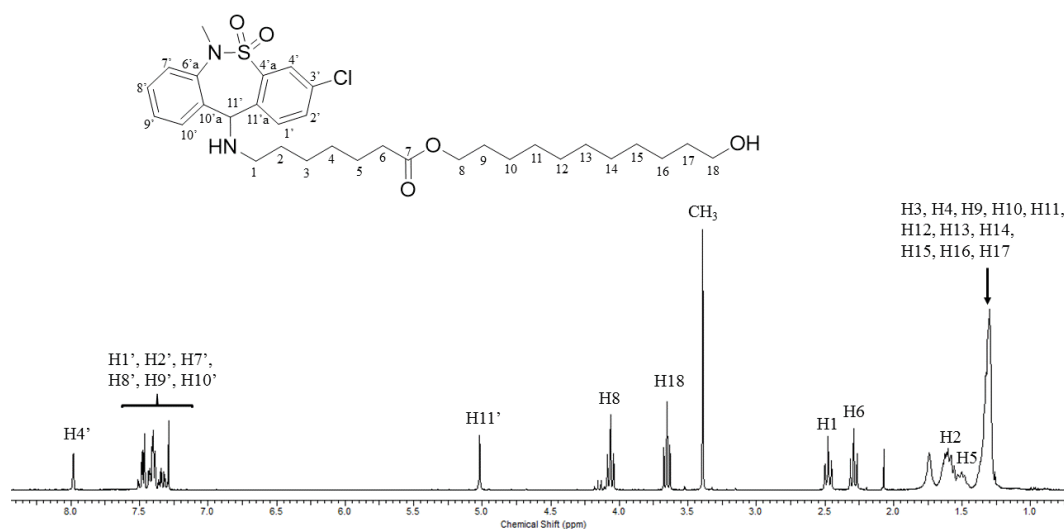


Figura 30: RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3-d) do derivado **3f**.

O RMN de ^{13}C – APT do derivado **3f** (Figura 25A) apresenta os seguintes sinais em ppm: 173,9 (C=O); 140,2, 138,6, 138,5, 136,8 e 134,2 (C4'a, C6'a, C10'a, C11'a e C3'); 132,2, 131,2, 130,0, 129,3, 128,4, 128,1 e 127,9 (C2', C1', C10', C8', C9', C7' e C4'); 66,1 (C11'); 64,4 (C8); 63,0 (C18); 48,1 (C1); 38,7 (CH₃); 34,2 (C6); 32,8 (C9); 29,9 (C2); 29,4 (C4); 26,9 (C3) e 24,8 (C5). Os demais sinais restantes correspondem aos carbonos da cadeia alquílica inserida (C10 a C17), contudo não foi possível estabelecer a correspondência dos sinais devido à proximidade dos deslocamentos químicos desses carbonos. Além disso, ocorre a sobreposição dos sinais uma vez que são esperados nove sinais distintos e no espectro são observados apenas oito sinais.

4.2.8. Síntese do [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina-11-il) amino]-7-heptanoato-(6-hexanoato de etila) (**3g**)

A obtenção do éster **3g** mostrou-se mais desafiadora que a dos demais derivados, uma vez que para uma série de condições reacionais não foi observado a formação do produto por CCD (Tabela 1). O éster **3g** foi sintetizado utilizando o ácido-6-bromo-hexanóico derivatizado, isto é, na forma de éster etílico. Para isso, 300 mg do ácido-6-bromo-hexanóico foram dissolvidos em 10 ml de etanol, aos quais em seguida foram adicionados 0,15 ml de ácido sulfúrico concentrado como catalizador e a reação foi deixada sob refluxo durante uma hora. A reação foi acompanhada por CCD utilizando como revelador vanilina. O produto bruto foi caracterizado por RMN de ^1H (Figura 27A) e tendo a reação sido completa, o produto foi utilizado sem purificação prévia para a síntese do éster **3g**.

A necessidade da derivatização do ácido-6-bromo-hexanóico surgiu devido a não formação do éster tianeptínico desejado em nenhuma das condições apresentadas na Tabela 1. Mesmo utilizando quantidades superiores a dois equivalentes de base, não eram observadas modificações na CCD. Desse modo, optou-se pela proteção do ácido na forma de um éster e só então foi observado a formação do produto

Tabela 1: Metodologias empregadas para obtenção do éster **3g**.

Entrada	Eletrófilo	Base	Solvente	Tempo (h)	Rendimento (%)
1	Ácido-6-bromo-hexanóico	Na_2CO_3	MeCN	30	n.r. ^a
2	Ácido-6-bromo-hexanóico	K_2CO_3	MeCN	26	n.r. ^a
3	Ácido-6-bromo-hexanóico	NaHCO_3	MeCN	48	n.r. ^a
4	Ácido-6-bromo-hexanóico	NaHCO_3	Acetona	24	n.r. ^b
5	6-bromo-hexanoato de etila	Na_2CO_3	MeCN	48	10 ^{a, c}

a = 65°C; b = 55°C, c = produto isolado por cromatografia em coluna; n.r. = não reagiu.

No espectro de infravermelho do éster **3g** (Figura 31) podem ser observadas as seguintes bandas: a) em 3330 cm^{-1} estiramento da ligação N-H de amina secundária; b) em 3070 cm^{-1} estiramento de C-H de aromáticos; c) em 2930 e 2860 cm^{-1} estiramento de C-H de alcanos; d) em 1730 cm^{-1} estiramento do grupo C=O; e) em 1585 cm^{-1} estiramento

de C=C de aromáticos; f) em 1470 cm^{-1} estiramento do grupo COOC de ésteres; g) em 1335 e 1150 cm^{-1} estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente, do grupo SO_2 e h) em 580 cm^{-1} estiramento da ligação C-Cl.

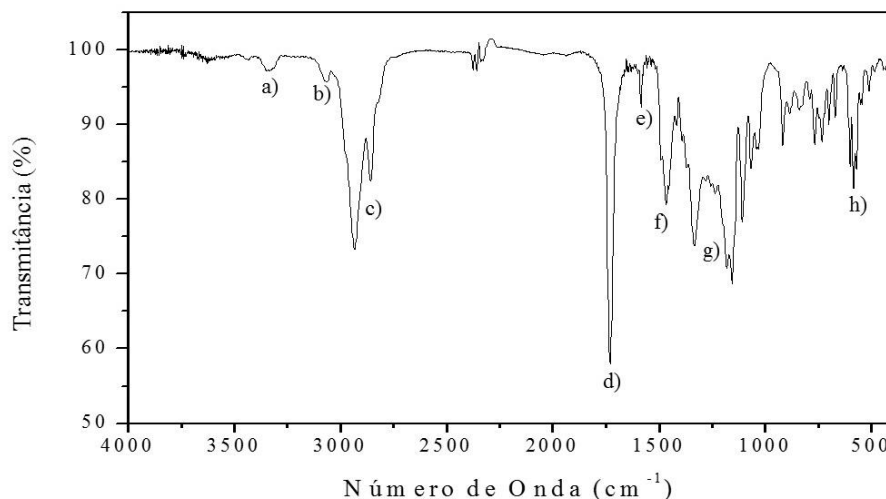


Figura 31: Espectro de infravermelho em KBr do éster **3g**.

No espectro de RMN de ^1H de **3g** (Figura 32) a formação do éster fica evidenciada pela presença de um tripleto em $4,05\text{ ppm}$ ($^3J_{\text{H}8-\text{H}9} = 13,2\text{ Hz}$), região característica de prótons de ésteres, referentes aos dois hidrogênios H8. Um segundo sinal nessa região em $4,12\text{ ppm}$ corresponde aos dois hidrogênios H14, os quais aparecem na forma de um quarteto ($^3J_{\text{H}14-\text{H}15} = 14,3\text{ Hz}$) devido ao acoplamento com os três hidrogênios H15. Em $2,26\text{ ppm}$ tem-se um tripleto ($^3J_{\text{H}12-\text{H}11} = 15,2\text{ Hz}$) referente aos dois hidrogênios H12. Entre $1,55$ e $1,69\text{ ppm}$ tem-se a sobreposição de dois multipletos referentes aos hidrogênios dois hidrogênios H2 da Tianeptina e também aos quatro hidrogênios H9 e H11. Entre $1,44$ e $1,52\text{ ppm}$ tem-se um multipletos referente aos dois hidrogênios H5 da Tianeptina. Entre $1,35$ e $1,41\text{ ppm}$ tem-se um multipletos referente aos dois hidrogênios H10 e entre $1,27$ e $1,33\text{ ppm}$ tem-se um multipletos referente aos quatro hidrogênios H3 e H4. Por fim, em $1,25\text{ ppm}$ tem-se um último tripleto ($^3J_{\text{H}15-\text{H}14} = 14,2\text{ Hz}$) referente aos três hidrogênios H15.

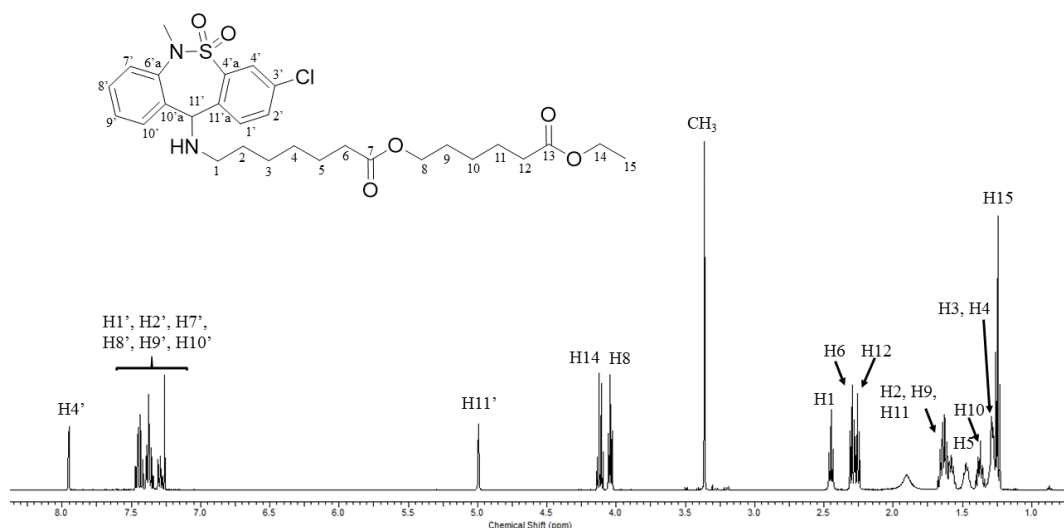


Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d$) do derivado **3g**.

A seguir é apresentado um quadro resumo, Tabela 2, com os derivados tianeptínicos sintetizados e o rendimentos obtidos para cada composto.

Tabela 2: Quadro resumo da síntese dos derivados da tianeptina

Molécula	Estrutura	Rendimento (%) ^a
N-metil	2	19
3a		26
3b		18
3c		28
3d		29
3e		21
3f		27
3g		10

Ⓣ = Tianeptina; a = produto isolado por cromatografia em coluna.

4.3. Estudo das interações entre a BSA, a Tianeptina e os ésteres por Espectroscopia de Fluorescência e UV-vis.

As espectroscopias de absorção no UV-vis e de fluorescência tornaram-se ferramentas importantes no estudo envolvendo aplicações biológicas³³⁻³⁵. Além da alta

sensibilidade, é possível obter informações sobre o tipo de interações de forma rápida e direta por meio da supressão de fluorescência da proteína. Nesse trabalho essas ferramentas foram utilizadas para a investigação de interações entre os novos ésteres tianeptínicos e a proteína BSA, onde buscou-se identificar interações hidrofóbicas e hidrofílicas com a proteína de acordo com as cadeias alquílicas inseridas.

Com base nos resultados obtidos foram propostos os mecanismos de interação com a proteína, identificados sítios ativos e mudanças na conformação da BSA.

4.3.1. Espectroscopia de absorção na região do UV-vis

Não foram observadas mudanças no perfil dos espectros de absorção no UV-vis dos ésteres da Tianeptina (Figura 33) e nem do comprimento de onda do máximo de absorção (λ_{max}), o qual situou-se em torno de 280 nm. Além disso, foram calculados os valores de absorvidade molar (ϵ) para cada um dos derivados e para a Tianeptina (Tabela 2).

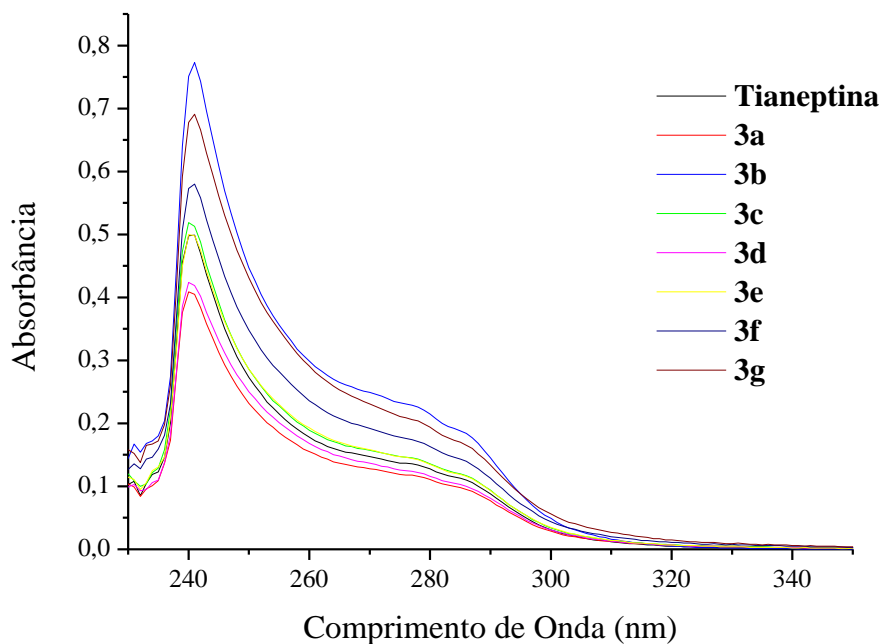


Figura 33: Espectros de absorção no UV-vis da Tianeptina e dos ésteres **3a-g** em CHCl_3 ($Q = 10^{-4}$ M).

Tabela 3: Dados obtidos a partir do espectro de absorção no UV-vis.

Composto	λ_1 (nm)	λ_2 (nm)	ϵ_1 ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϵ_2 ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Tianeptina	240	271	5000	1300
3a	240	272	4100	1100
3b	241	272	7700	2400
3c	240	273	5200	1500
3d	240	272	4200	1300
3e	240	271	5000	1500
3f	241	272	5800	1800
3g	241	273	6800	2200

As transições eletrônicas que podem ocorrer em compostos orgânicos dependem da estrutura molecular. Compostos aromáticos ou altamente insaturados realizam principalmente transições do tipo $\pi-\pi^*$, as quais são transições permitidas por simetria e relacionadas à altas intensidades de absorção, cujos valores de absorvidade molar variam de 10^3 a $10^5 M^{-1}.cm^{-1}$. Além disto, compostos contendo grupos carbonílicos como ésteres, cetonas ou ácidos carboxílicos realizam transições do tipo $n-\pi^*$, sendo estas transições proibidas por simetria. Os valores de ϵ para estas transições são na ordem de $10^2 M^{-1}.cm^{-1}$. O valor obtido da Tianeptina para a absorvidade molar é coerente com transições do tipo $\pi-\pi^*$ o qual indica a existência de um sistema π deslocalizado. Para os derivados foram observados valores bastante semelhantes, uma vez que as modificações realizadas não envolveram o núcleo dibenzotiazepínico.³⁷

Também se mediu a absorção no UV-vis da BSA em PBS nas concentrações de 5 e 15 μM . O comprimento de onda máximo de absorção foi de 280 nm, enquanto que o comprimento de onda do máximo de absorção foi na faixa de 216 a 230 nm (Figura 34). Além disso, pode ser observado um deslocamento do máximo de absorção para o vermelho para a solução mais concentrada de proteína.

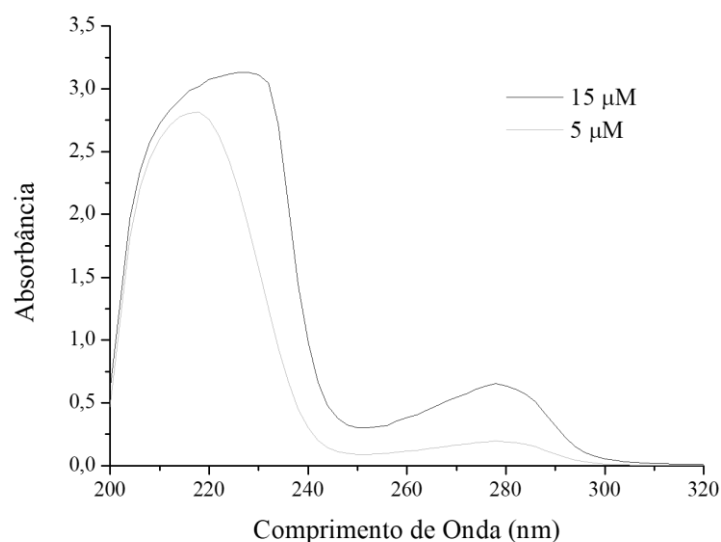


Figura 34: Medidas de absorção no UV-vis da BSA em tampão fosfato.

4.3.2. Espectroscopia de emissão de fluorescência

A espectroscopia de emissão de fluorescência foi utilizada neste trabalho como ferramenta para o estudo das interações entre a BSA e os ésteres de interesse, uma vez que fluorescência intrínseca desta proteína está sujeita a apresentar alterações em função da presença de moléculas orgânicas que possam vir a interagir com os resíduos de aminoácido triptofano e tirosina. Tanto a Tianeptina como seus ésteres não apresentaram fluorescência significativa na faixa de comprimento de onda da BSA (300 – 450 nm), conforme a Figura 31A. Dessa forma, foi utilizada a fluorescência intrínseca da BSA para a avaliação da existência de interações entre a proteína e as moléculas estudadas. Para isso, o comprimento de onda de excitação utilizado foi o do máximo de absorção no UV-vis da BSA ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) e a fluorescência observada na faixa de 300 – 450 nm.

Primeiramente fez-se o estudo por fluorescência da BSA na presença de Tianeptina em diferentes concentrações. Foram preparadas oito soluções em tampão contendo de 0 a 100 μM do fármaco na presença de BSA conforme descrito no procedimento experimental.

Os resultados mostram que à medida que a concentração de **1a** aumenta, a intensidade de fluorescência da BSA diminui de forma linear, evidenciando a existência de interações entre a proteína e a Tianeptina (Figura 35). Esse comportamento também foi observado para as temperaturas de 30°C (Figura 36) e 40°C (Figura 37) estudadas.

Também é interessante observar que o aumento da temperatura das soluções promoveu uma diminuição da intensidade de fluorescência da solução contendo somente a BSA em tampão fosfato ($F = 721,36$ a 20°C , $F = 684,27$ a 30°C e $F = 589,71$ a 40°C). Essa diminuição da intensidade da fluorescência ocorre devido ao aumento da energia cinética das moléculas, o que, por consequência, gera um aumento das desativações do estado excitado por colisões com outras moléculas da solução (vide Figura 9, Diagrama de Jablonski).

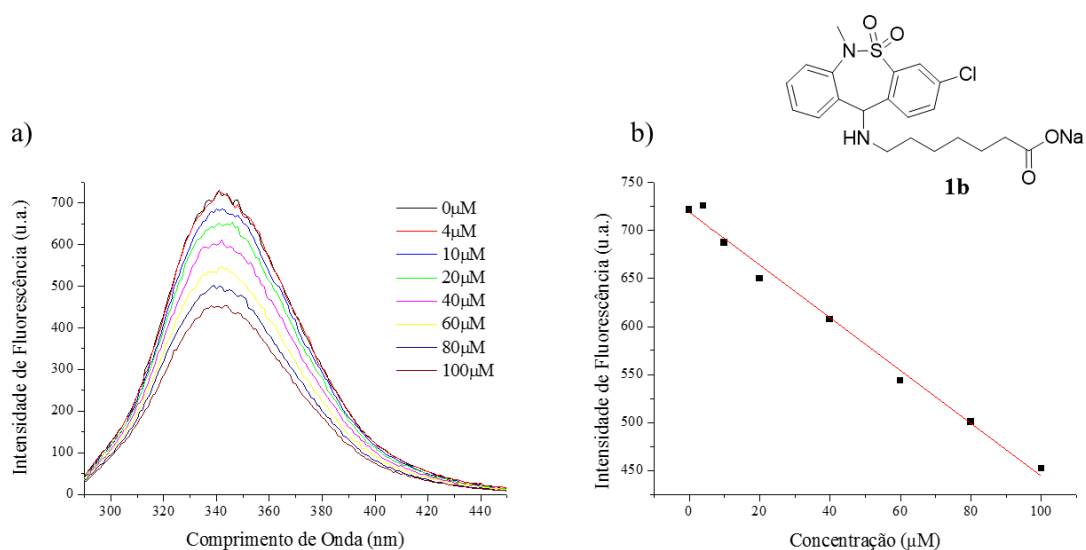


Figura 35: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de Tianeptina em tampão fosfato ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de Tianeptina na temperatura de 20°C ($R = 0,989$).

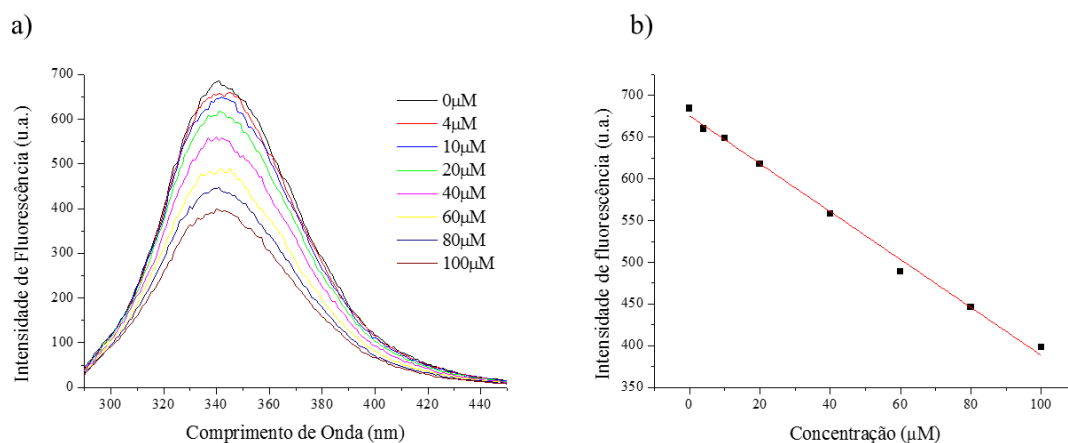


Figura 36: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de Tianeptina em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de Tianeptina na temperatura de 30°C ($R = 0,994$).

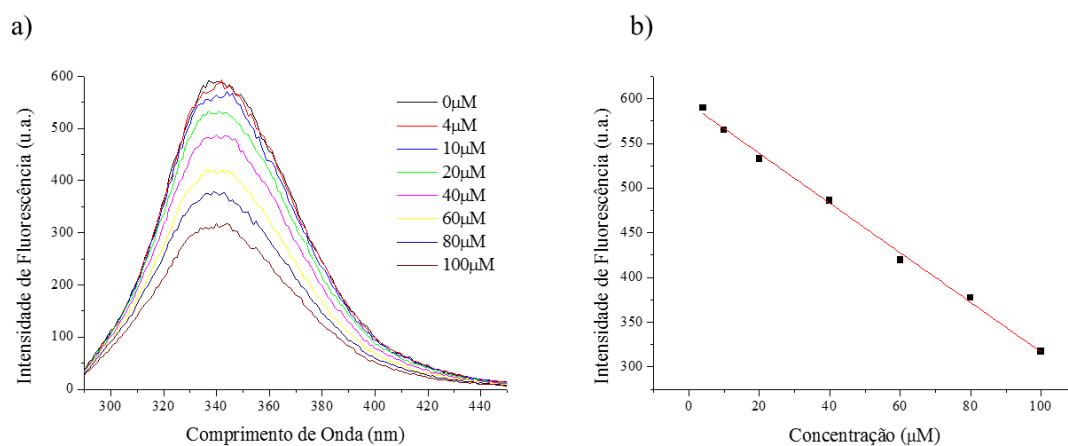


Figura 37: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de Tianeptina em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de Tianeptina na temperatura de 40°C ($R = 0,996$).

Após os experimentos envolvendo a Tianeptina e a BSA, passou-se às análises com os ésteres **3a-g** sintetizados. Contudo, ao contrário da Tianeptina, que foi bastante solúvel nas concentrações estudadas, alguns derivados apresentaram um precipitado branco em concentrações mais elevadas, o que pode ocasionar em erro devido ao espalhamento da luz na cubeta que contém a solução turva. Desse modo, para alguns

derivados foi necessário utilizar soluções mais diluídas e com intervalos menores de concentração para que se mantivesse um número de pontos adequado para a realização dos cálculos posteriores.

Para o éster **3a**, não foi observada a formação de precipitado na faixa concentração estudada, permanecendo os mesmos valores de concentração que foram usados para a Tianeptina, exceto para a solução contendo 100 μM , para a qual observou-se turbidez da solução. Os resultados mostram que para as temperaturas de 20°C (Figura 38) e 30°C (Figura 39) ocorreu a diminuição da intensidade de fluorescência da BSA de forma linear com o aumento da concentração, indicando a existência de interações entre molécula e proteína. Porém, para a temperatura de 40°C (Figura 40) a diminuição da intensidade de fluorescência da proteína mostrou-se bastante aleatória com o aumento da concentração. Possivelmente devido ao aumento do número de conformações possíveis para o éster, ocasionadas pelo aumento da temperatura do sistema. Como a única diferença entre a Tianeptina e o éster **3a** reside na cadeia alquílica adicional, pode-se inferir que esta modificação resultou em uma estrutura mais susceptível a desativar fluorescência por movimentos rotacionais e vibracionais antes de interagir com a proteína.

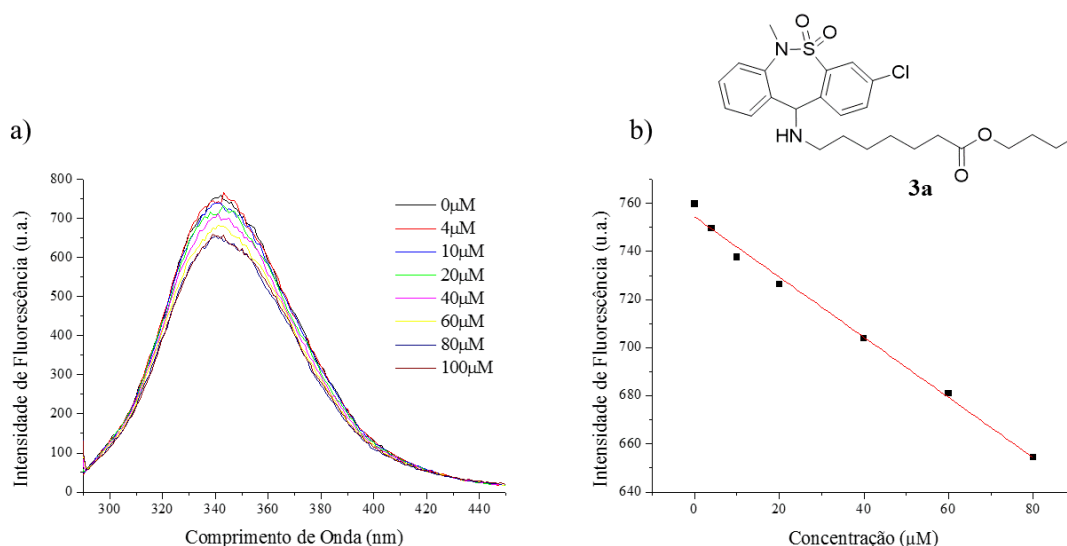


Figura 38: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3a** em tampão fosfato ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3a** na temperatura de 20°C ($R = 0,992$).

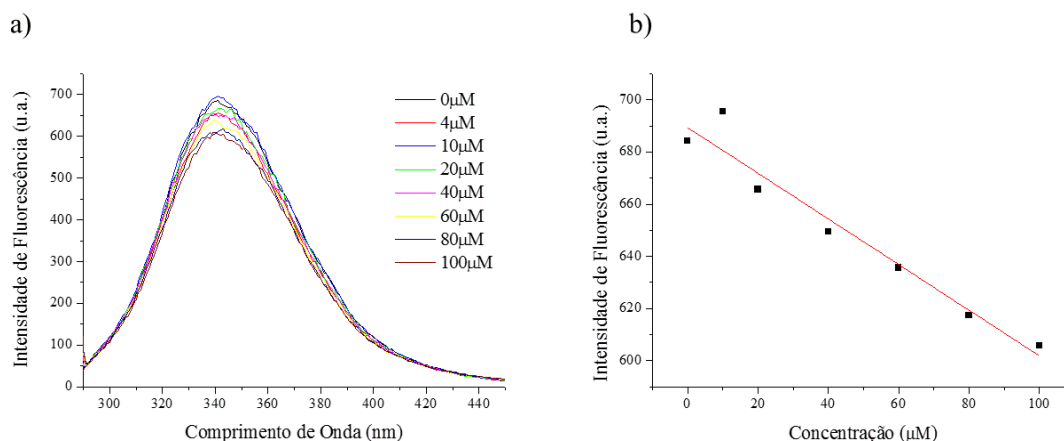


Figura 39: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3a** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3a** na temperatura de 30°C ($R = 0,941$).

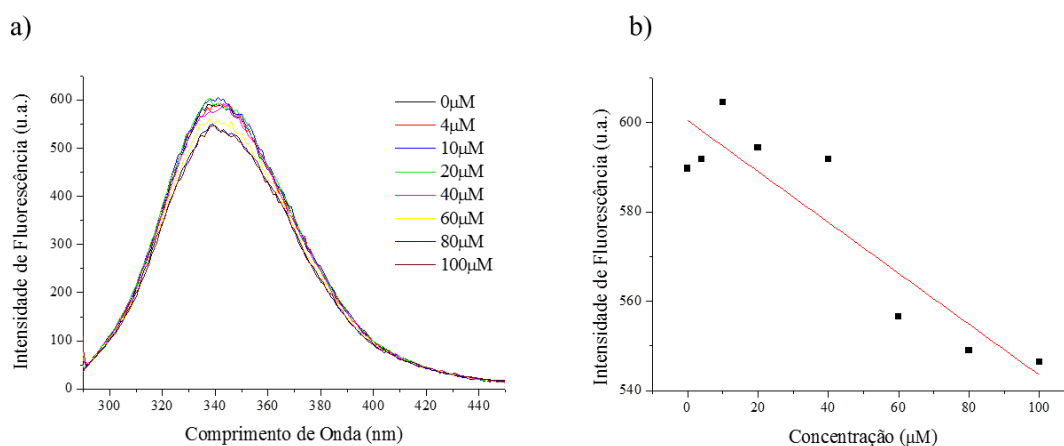


Figura 40: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3a** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3a** na temperatura de 40°C ($R = 0,809$).

Para o derivado **3b** foi necessária a utilização de soluções mais diluídas para as medidas devido a formação significativa de precipitado acima de 50 μM. Apesar da menor diferença de concentração entre as soluções, foi possível observar em todas as temperaturas a diminuição da intensidade de fluorescência da BSA com o aumento da concentração do éster **3b** (Figuras 41 - 43). Além da existência de interações entre o éster e a proteína, também foi possível observar um leve deslocamento hipsocrômico, isto é,

deslocamento para menores comprimentos de onda, do máximo de emissão de fluorescência.

Outro fato importante a ser destacado foi a sobreposição das quatro últimas curvas referentes às soluções contendo 35, 40, 45 e 50 μM do derivado **3b** em todas as temperaturas avaliadas. Isso mostra que ocorre uma saturação dos sítios ligantes da proteína para concentrações superiores a 35 μM , não havendo mais mudanças na intensidade de fluorescência da proteína.

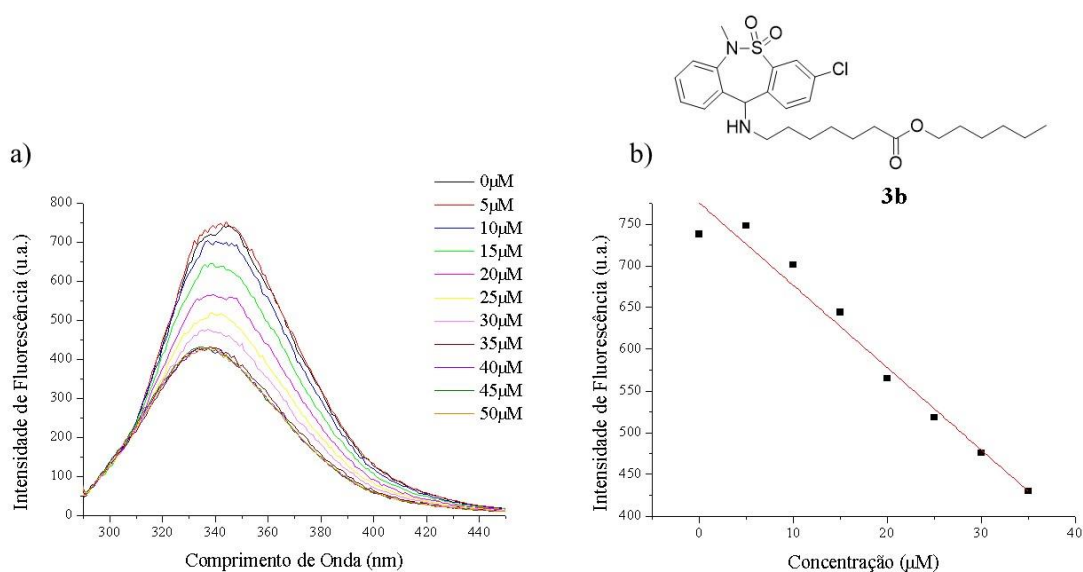


Figura 41: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3b** em tampão fosfato ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3b** na temperatura de 20°C ($R = 0,990$).

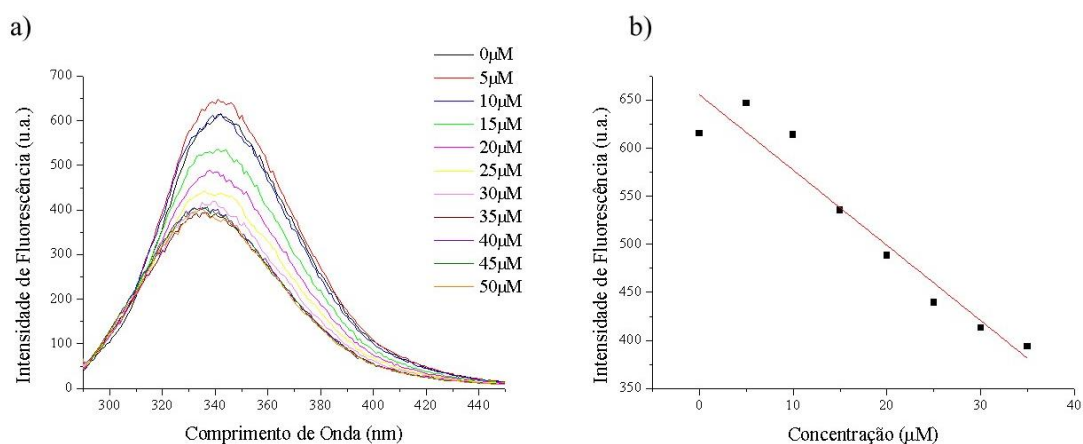


Figura 42: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3b** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3b** na temperatura de 30°C ($R = 0,961$).

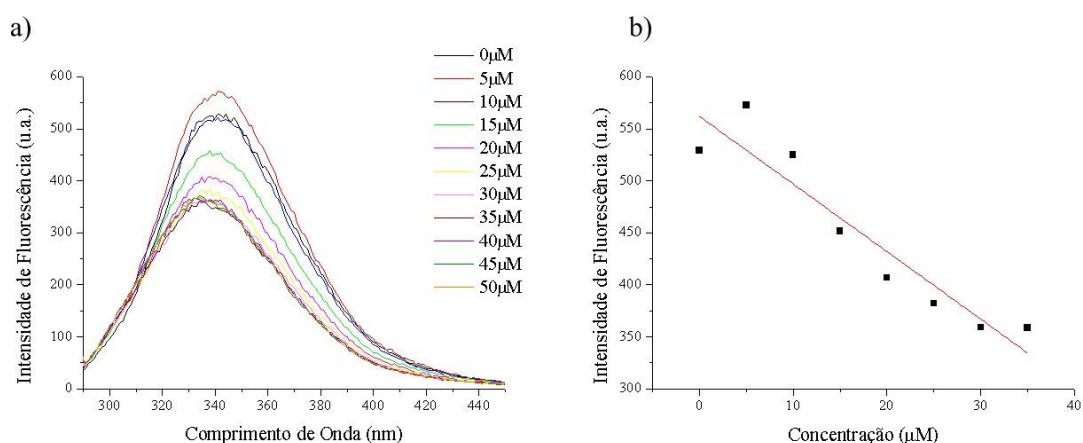


Figura 43: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3b** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3b** na temperatura de 40°C ($R = 0,898$).

A sobreposição das curvas para as concentrações de 35 a 50 μM , além de indicar uma saturação do sítio de ligação, indica que não há mais diminuição da intensidade de fluorescência da proteína independente de concentração do éster. Ou seja, há um segundo resíduo de triptofano que não tem sua fluorescência suprimida pelo éster **3b**. Esse segundo resíduo muito provavelmente trata-se do Trp-134, o qual está situado em uma região mais externa da proteína e, portanto, mais hidrofílica.

Desse modo, pode-se dizer que o sítio de interação da BSA com o éster **3b** encontra-se próximo ao resíduo Trp-212. Como pode ser observado na Figura 44, este resíduo é muito mais interno na proteína, localizado em uma região bastante hidrofóbica, o que não só permite, mas também facilita as interações com o éster.

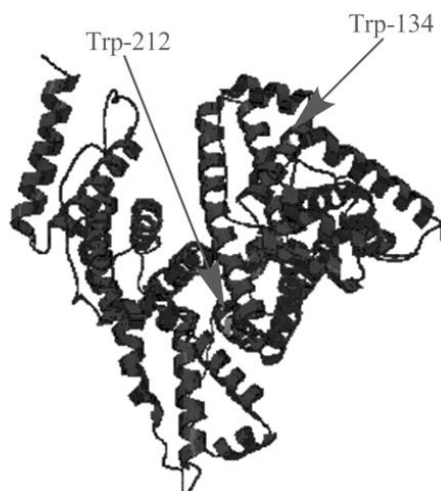


Figura 44: Representação estrutural da BSA.

Adaptado de: ALANAZI, ABDELHAMEED, 2016.

Para o éster **3c** também foi necessário diminuir a concentração das soluções devido à formação de precipitado na solução aquosa tamponada. Porém, ao contrário do observado para os ésteres **3a-b**, o éster **3c** (Figura 45 - 47) não promoveu a diminuição da intensidade de fluorescência da BSA em nenhuma das temperaturas avaliadas. Ao contrário, a adição de 5 μ M do éster **3c** foi suficiente para aumentar cerca de 10% a intensidade de fluorescência da BSA, evidenciando a existência de interações entre a proteína e o éster **3c** diferentes das observadas para os derivados **3a-b**.

Comparando os resultados obtidos para os ésteres **3b** e **3c** pode-se concluir que, além das interações com a proteína serem de naturezas diferentes, há um tamanho limite da cadeia alquílica para interação com o sítio hidrofóbico da BSA, uma vez que o éster **3b** promoveu diminuição da intensidade de fluorescência em todas as temperaturas enquanto que o éster **3c** promoveu o aumento da mesma.

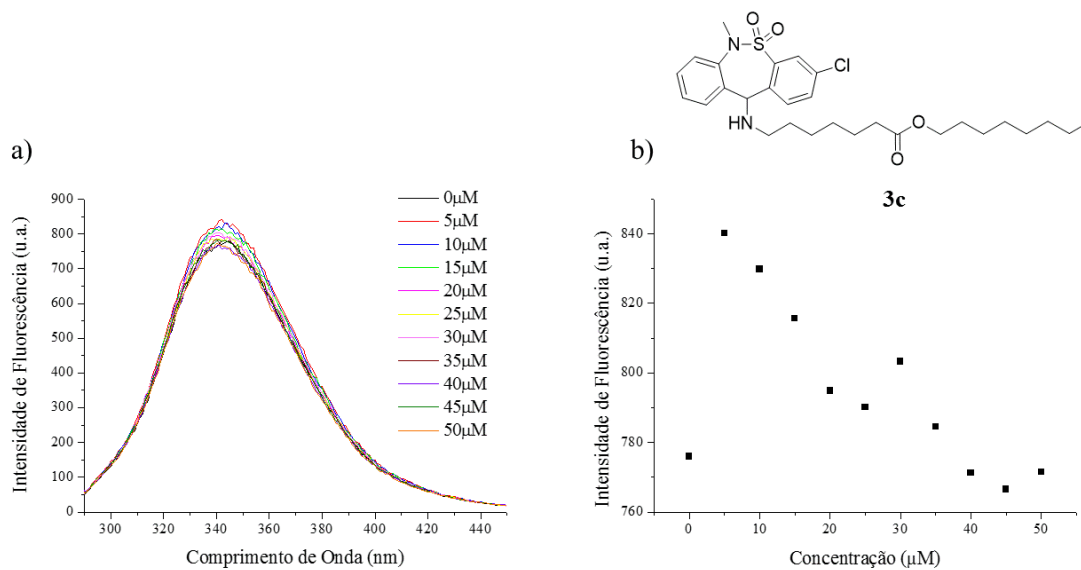


Figura 45: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3c** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3c** na temperatura de 20°C.

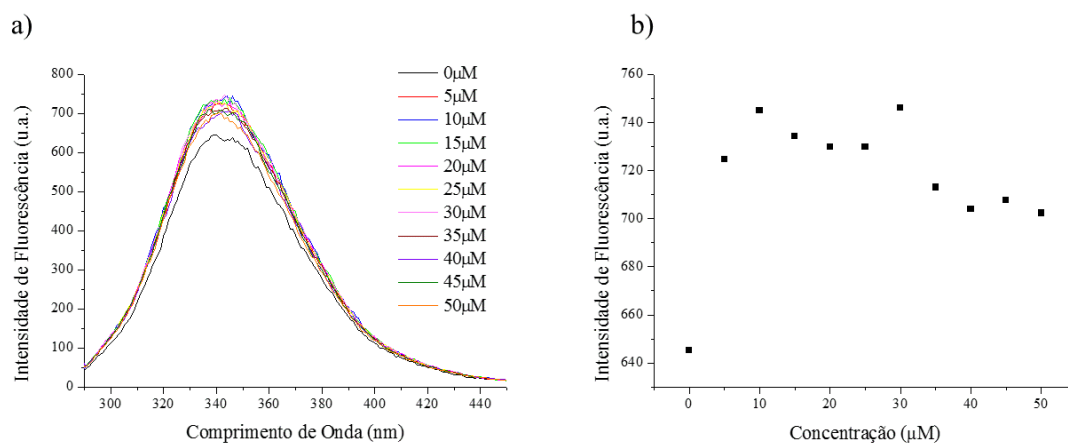


Figura 46: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3c** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3c** na temperatura de 30°C.

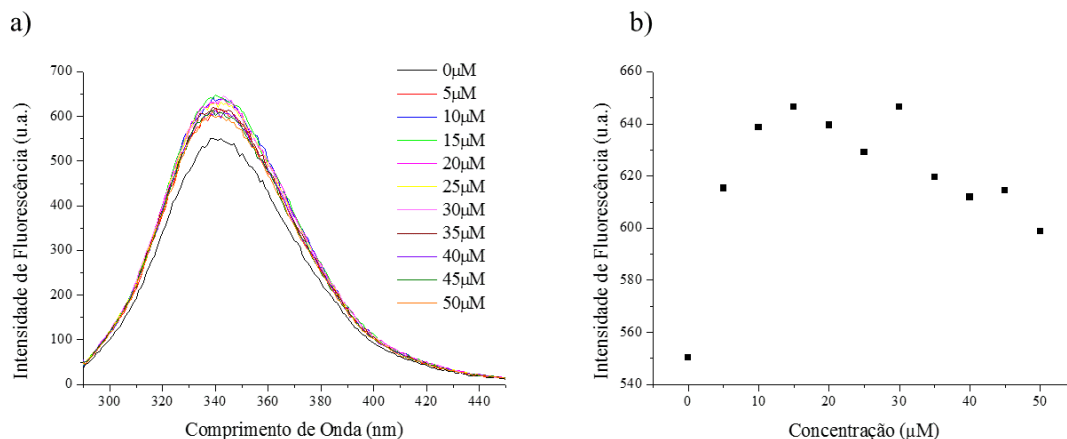


Figura 47: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3c** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3c** na temperatura de 40°C.

Para o derivado **3d** não houve a formação de precipitado na solução aquosa do tampão, permitindo que as mesmas concentrações utilizadas para a Tianeptina pudessem ser utilizadas nas medidas. Somente na concentração de 100 μM do derivado **3d** foi observado um leve turvamento da solução. Os resultados mostram que para as temperaturas de 20°C (Figura 48), 30°C (Figura 49) e 40°C (Figura 50) ocorreu a diminuição da intensidade de fluorescência da BSA de forma linear com o aumento da concentração, indicando a existência de interações entre molécula e proteína.

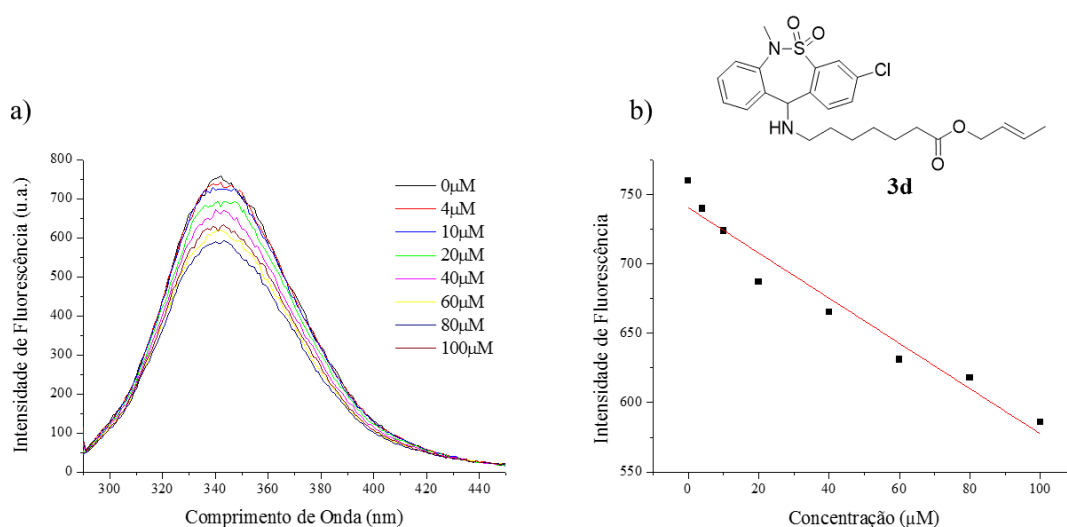


Figura 48: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3d** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3d** na temperatura de 20°C ($R = 0,948$).

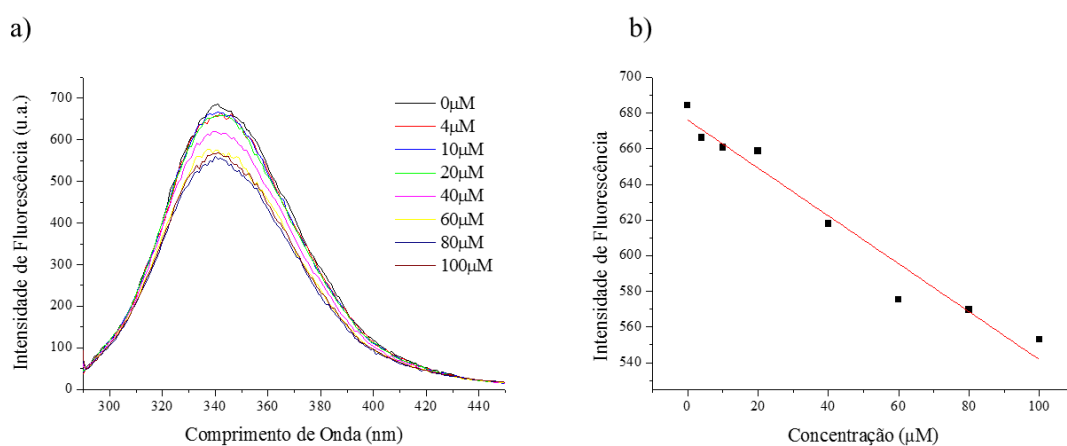


Figura 49: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3d** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3d** na temperatura de 30°C ($R = 0,953$).

É interessante observar que os ésteres **3d** e **3a** também possuem o mesmo número de carbonos ligados na função éster e que a 20 e 30°C apresentaram um comportamento semelhante quando em contato com a BSA. Contudo, a presença da ligação dupla em **3d**

restringe o número de conformações possíveis e a 40°C a diminuição da fluorescência da BSA permanece constante, contrariamente ao éster **3a**.

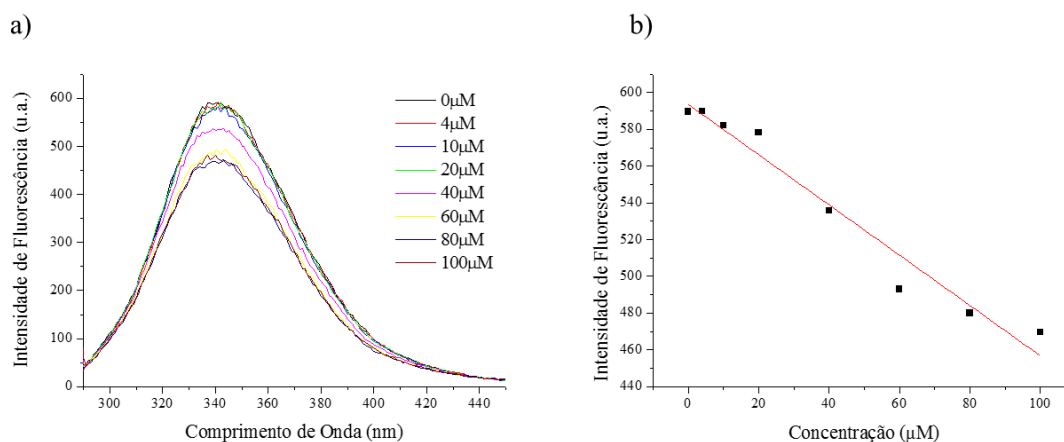


Figura 50: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3d** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3d** na temperatura de 40°C ($R = 0,956$).

O éster **3e** também não apresentou a formação de precipitado na solução aquosa do tampão, de forma que foram utilizadas as mesmas concentrações para a Tianeptina. Os resultados também mostram que ocorreu uma diminuição da intensidade de fluorescência da BSA de forma linear com o aumento da concentração do derivado **3e**, evidenciando a existência de interações entre molécula e proteína para as três temperaturas estudadas (Figura 51 - 53).

A presença da hidroxila na posição terminal possibilita diferentes interações com a BSA, uma vez que a adição de 10 μM do éster **3e** diminuiu cerca de 5% a intensidade de fluorescência da proteína a 20°C, enquanto que para o éster **3a** este valor cai para 3% na mesma temperatura.

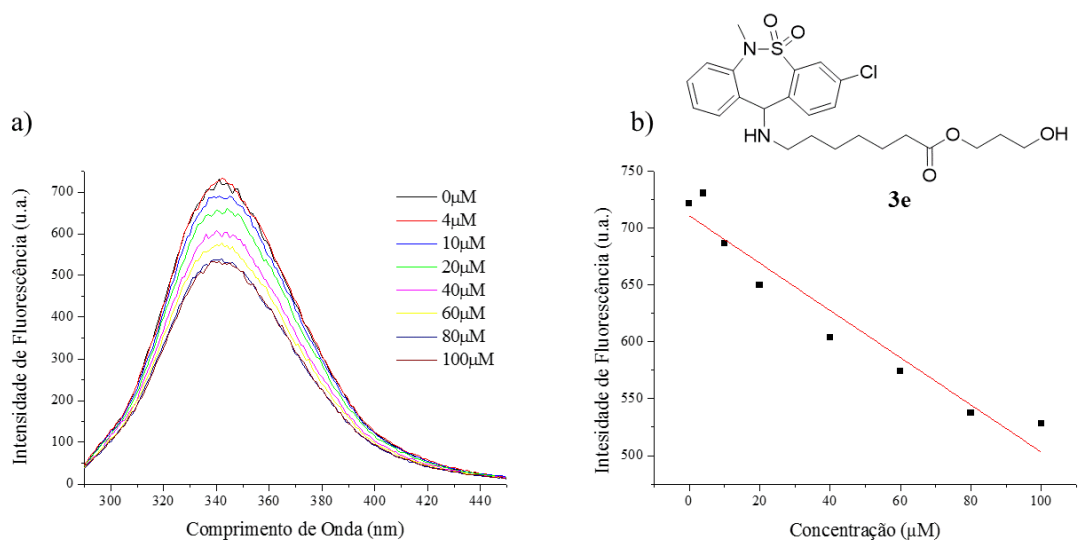


Figura 51: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3e** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3e** na temperatura de 20°C ($R = 0,930$).

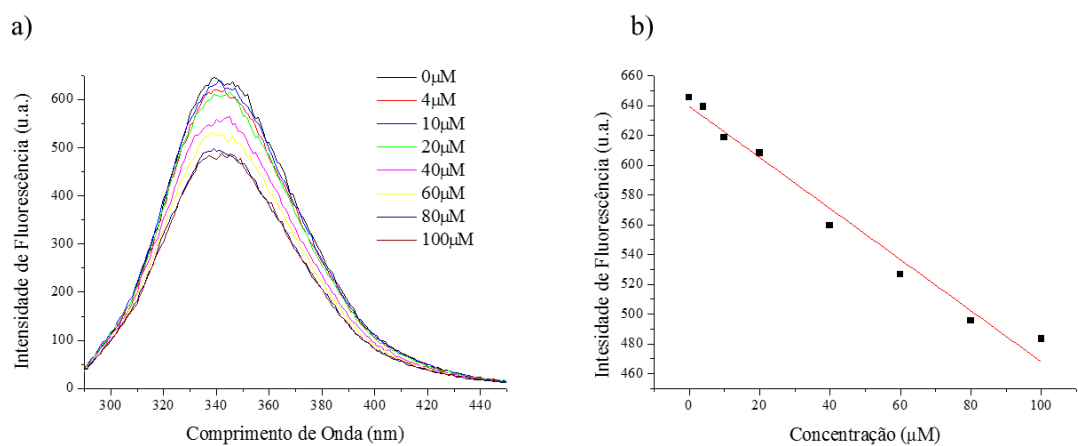


Figura 52: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3e** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3e** na temperatura de 30°C ($R = 0,976$).

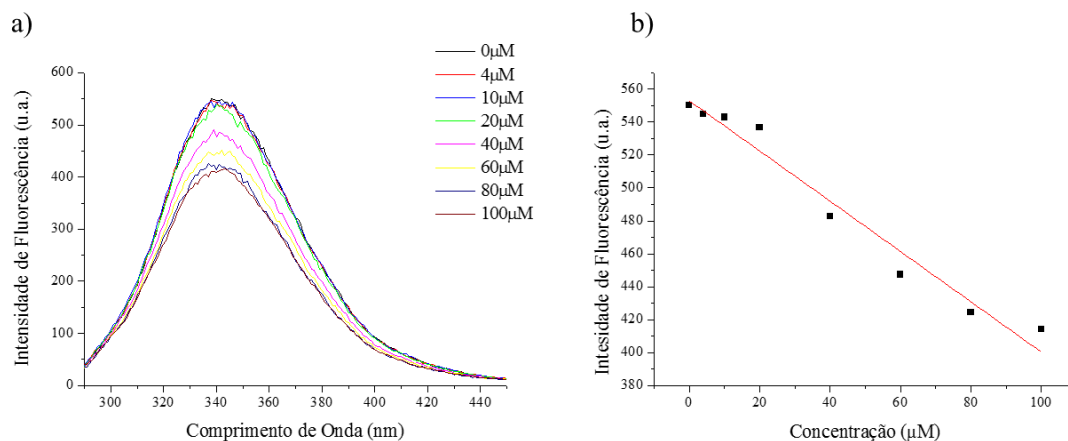


Figura 53: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3e** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3e** na temperatura de 40°C ($R = 0,962$).

O éster **3f**, assim como o éster **3c**, também permitiu que fosse realizada uma avaliação do tamanho da cadeia alquílica para a interação com a proteína. Apesar da presença da hidroxila, o derivado **3f** apresentou interações com a BSA semelhantes às observadas no caso do éster **3c**, uma vez que não ocorreu diminuição da intensidade de fluorescência da proteína na presença do composto (Figura 54 - 56). Para todas as temperaturas estudadas a variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração mostrou-se bastante aleatória. Comparando os resultados obtidos para o derivado **3e** e **3f**, foi possível verificar que há um efeito do tamanho da cadeia alquílica e que este contribuiu de maneira significativa para que o éster **3f** não atingisse o sítio de interação com o triptofano e, portanto, não promovesse diminuição da intensidade de fluorescência da proteína.

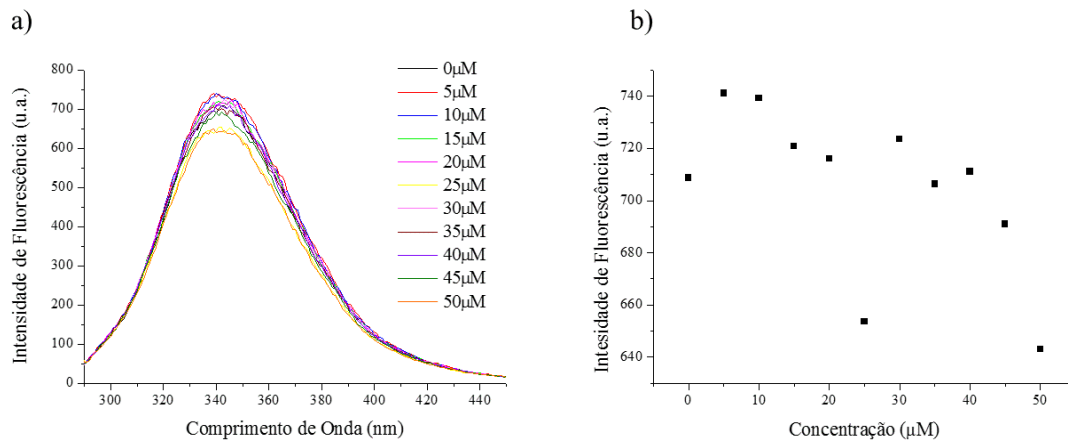


Figura 54: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3f** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3f** na temperatura de 20°C.

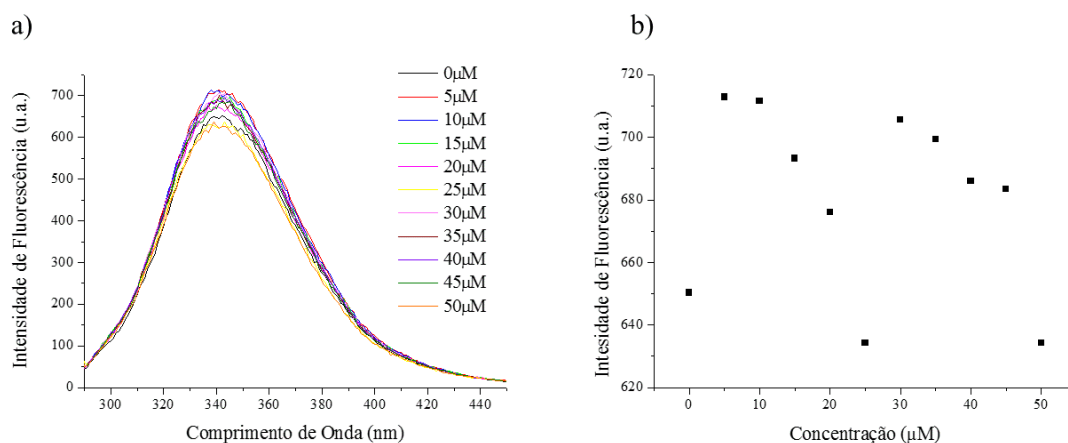


Figura 55: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3f** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3f** na temperatura de 30°C.

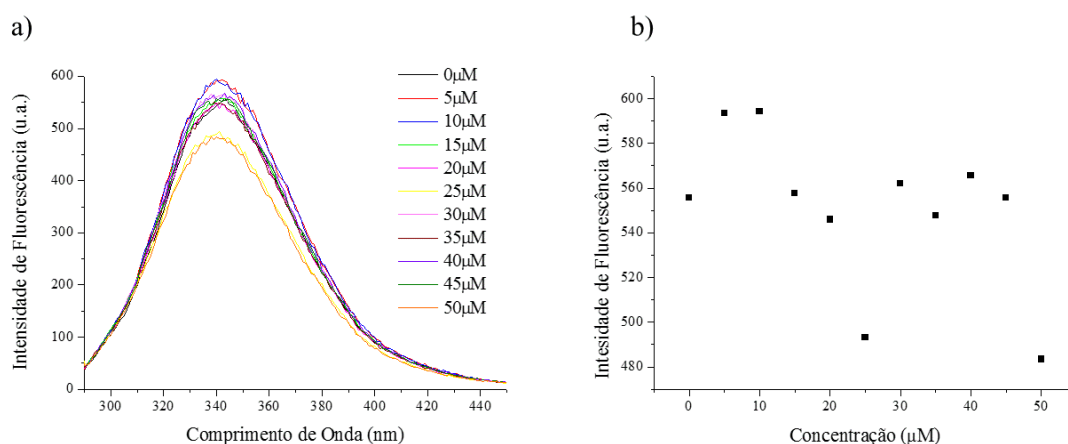


Figura 56: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3f** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3f** na temperatura de 40°C .

Por fim, estudou-se a interação do derivado **3g**, contendo dois grupos ésteres na cadeia alquílica. As medidas mostraram uma diminuição linear da intensidade de fluorescência da BSA com o aumento da concentração do derivado **3g** na temperatura de 20°C (Figura 57). A 30°C (Figura 58) há inicialmente um ligeiro aumento intensidade de fluorescência, mas com o aumento da concentração ocorre a diminuição linear da mesma. Já a 40°C (Figura 59) essa linearidade não foi mais observada, sendo bastante aleatória a diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração.

É interessante observar que apesar do comprimento total da cadeia ser semelhante ao comprimento da cadeia do éster **3c**, o éster **3g** ocasionou a diminuição da intensidade de fluorescência da BSA de forma linear a 20°C . Isso indica uma influência da segunda função éster presente no derivado **3g** quando comparado ao éster **3c**, a qual pode apresentar interações do tipo dipolo-dipolo ou interações de hidrogênio com a proteína, além de ter um caráter hidrofílico mais acentuado, proporcionando diferentes interações com a BSA.

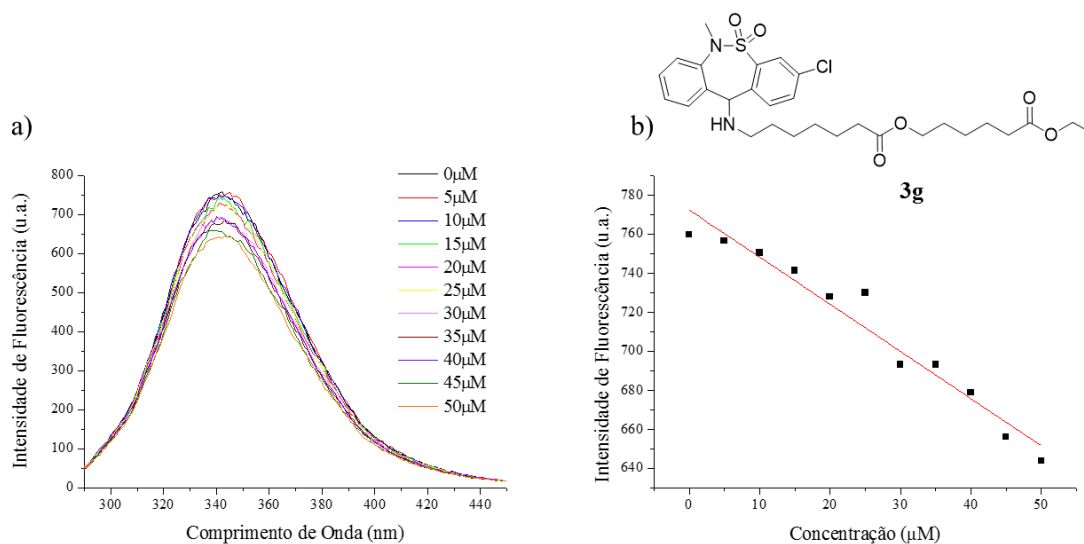


Figura 57: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3g** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3g** na temperatura de 20°C ($R = 0,951$).

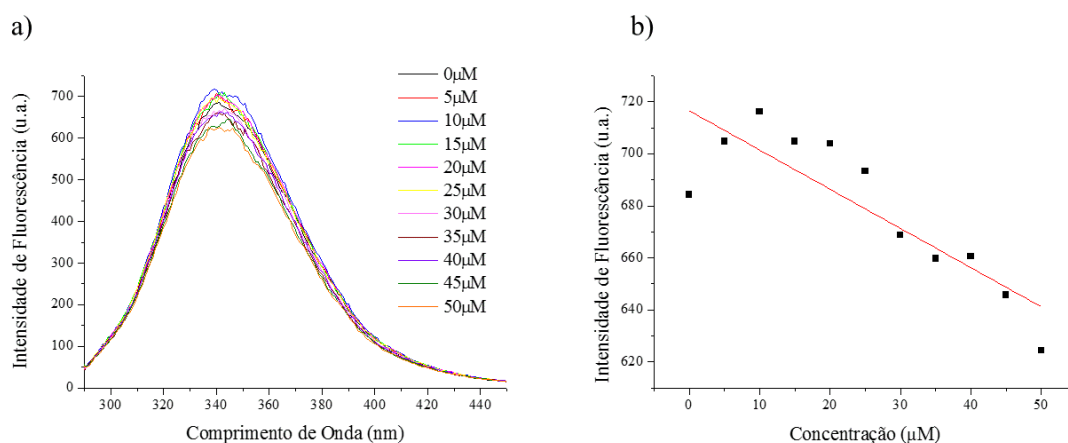


Figura 58: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3g** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3g** na temperatura de 30°C ($R = 0,706$).

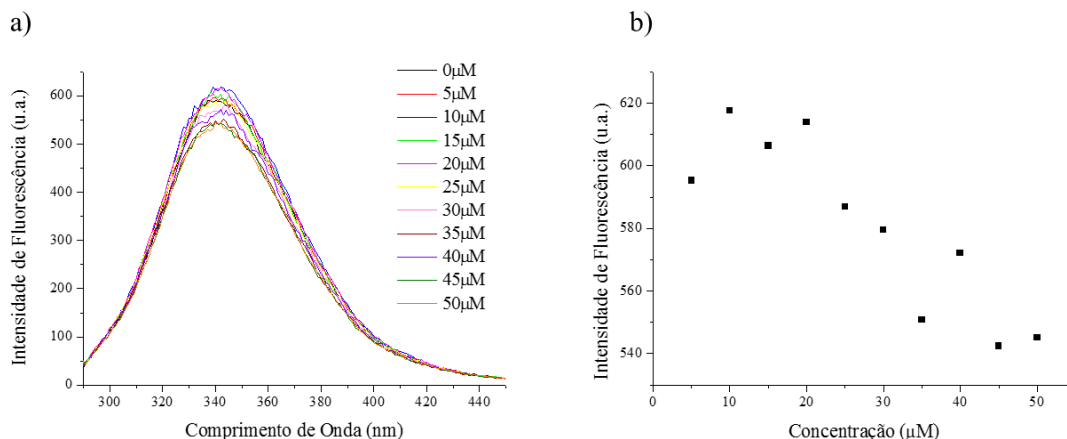


Figura 59: a) Espectros de emissão de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de **3g** em tampão fosfato ($\lambda_{exc} = 280$ nm). b) Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de **3g** na temperatura de 40°C.

4.3.2.1. Avaliação do mecanismo de supressão

A supressão da fluorescência refere-se a qualquer processo que envolva a diminuição da intensidade de fluorescência de uma amostra em estudo. Os derivados **3a**, **3b**, **3d**, **3e** e **3g** podem ser considerados substâncias supressoras de fluorescência, uma vez que diminuíram a intensidade de fluorescência da BSA. Contudo, para entender de que forma ocorreu essa supressão, isto é, qual o mecanismo envolvido, foi utilizada a equação de Stern-Volmer (Equação 2).

A constante de Stern-Volmer foi obtida por meio da equação da reta, ou seja, da regressão linear correspondente aos dados da concentração *versus* intensidade de fluorescência obtidos para cada amostra em uma determinada temperatura (linha em cinza na Figura 60). Na equação, a variável que acompanha o valor de x corresponde a constante de supressão (K_{SV}). Os cálculos mostram que para a Tianeptina ocorre o aumento da constante de supressão com o aumento da temperatura (Tabela 4), indicando um mecanismo de supressão dinâmico. Enquanto que para os derivados **3b**, **3d** e **3e** não foi possível estabelecer um mecanismo de supressão, devido à proximidade dos valores de K_{SV} obtidos e também a variação aleatória destes com o aumento da temperatura.

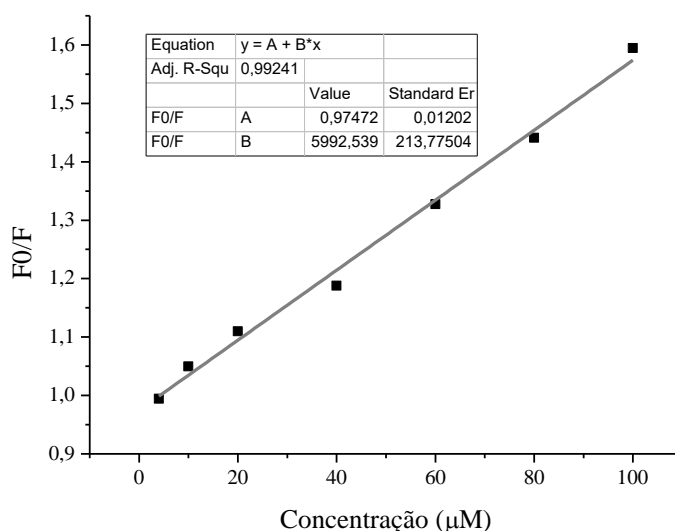


Figura 60: Gráfico da concentração *versus* intensidade de fluorescência da BSA na presença de Tianeptina a 20°C (R = 0,992).

Todavia, ao analisar as constantes de supressão (K_q) (Tabela 4), cujo valor foi obtido segundo a equação abaixo:

$$K_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0} \quad (3)$$

onde τ_0 tempo de meia vida do triptofano na ausência do supressor, no caso $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, é possível observar que seu valor excede o valor máximo para a constante de supressão bimolecular de $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em solução aquosa.³⁸ Esse valor de referência foi obtido para o oxigênio molecular em solução aquosa, um supressor bastante eficiente para diversos fluoróforos. Contudo, a maioria dos supressores de fluorescência são maiores que o oxigênio, fazendo com que valores menores para as constantes de supressão envolvendo difusão sejam esperados, pois moléculas maiores tem menores coeficientes de difusão.

Desse modo, fica evidente que para a interação da Tianeptina com a BSA, apesar das constantes aumentarem com a temperatura, não se trata de um mecanismo dinâmico, mas sim de um mecanismo de supressão estático. Em outras palavras, a diminuição da intensidade da fluorescência da BSA ocorre via a formação de um complexo no estado fundamental com a Tianeptina.

Tabela 4: Equação de Stern-Volmer e constantes de supressão de fluorescência da BSA na presença de Tianeptina e seus ésteres.

Molécula	Temp. (°C)	Regressão Linear	R	K _{sv} (M ⁻¹)	K _q (M ⁻¹ .s)
Tianeptina	20	$F_0/F = 0,97 + 5,99 \times 10^3 [Q]$	0,992	$5,99 \times 10^3$	$5,99 \times 10^{11}$
	30	$F_0/F = 0,98 + 7,04 \times 10^3 [Q]$	0,991	$7,04 \times 10^3$	$7,04 \times 10^{11}$
	40	$F_0/F = 0,93 + 8,49 \times 10^3 [Q]$	0,969	$8,49 \times 10^3$	$8,49 \times 10^{11}$
3a	20	$F_0/F = 1,01 + 1,86 \times 10^3 [Q]$	0,995	$1,86 \times 10^3$	$1,86 \times 10^{11}$
	30	$F_0/F = 1,00 + 1,30 \times 10^3 [Q]$	0,998	$1,30 \times 10^3$	$1,30 \times 10^{11}$
	40	n.c.	-	-	-
3b	20	$F_0/F = 0,83 + 2,35 \times 10^4 [Q]$	0,983	$2,35 \times 10^4$	$2,35 \times 10^{12}$
	30	$F_0/F = 0,82 + 2,18 \times 10^4 [Q]$	0,987	$4,28 \times 10^4$	$4,28 \times 10^{12}$
	40	$F_0/F = 0,85 + 1,99 \times 10^4 [Q]$	0,947	$1,99 \times 10^4$	$1,99 \times 10^{12}$
3d	20	$F_0/F = 1,03 + 2,66 \times 10^3 [Q]$	0,976	$2,66 \times 10^3$	$2,66 \times 10^{11}$
	30	$F_0/F = 1,01 + 2,44 \times 10^3 [Q]$	0,962	$2,44 \times 10^3$	$2,44 \times 10^{11}$
	40	$F_0/F = 0,99 + 2,88 \times 10^3 [Q]$	0,964	$2,88 \times 10^3$	$2,88 \times 10^{11}$
3e	20	$F_0/F = 1,01 + 3,93 \times 10^3 [Q]$	0,990	$3,93 \times 10^3$	$3,93 \times 10^{11}$
	30	$F_0/F = 1,00 + 3,54 \times 10^3 [Q]$	0,989	$3,54 \times 10^3$	$3,54 \times 10^{11}$
	40	$F_0/F = 0,99 + 3,65 \times 10^3 [Q]$	0,978	$3,65 \times 10^3$	$3,65 \times 10^{11}$

n.c.: não calculável.

Para o derivado **3a** não foi possível avaliar o mecanismo de supressão de fluorescência, uma vez que não foi possível a linearização dos dados à 40°C. Já para o derivado **3g** não foi possível avaliar o tipo de mecanismo de supressão de fluorescência, uma vez que somente para a temperatura de 20°C houve diminuição da intensidade de fluorescência em todas as concentrações estudadas.

4.4. Estudo das interações entre supressor e proteína

A partir dos dados de supressão de fluorescência da BSA obtidos, foi possível calcular a relação quantitativa entre a intensidade de fluorescência e a concentração do supressor, desde que se assuma que existam sítios de interação similares e independentes na biomolécula.⁴⁸ Se considerarmos a interação entre uma proteína e um supressor conforme a reação abaixo:



onde n é o número de mols, Q é o supressor de fluorescência, P é a proteína com o fluoróforo e $Q_n + P$ é o complexo formado pelo supressor e proteína, a equação que descreve a constante de ligação K_B entre proteína e supressor é dada por:

$$K_B = \frac{[Q_n+P]}{[P][Q]^n} \quad (5)$$

A relação entre a intensidade de fluorescência e a quantidade de proteína é feita assumindo-se que $[P]/[P_0]$ é igual a F/F_0 ⁴⁸. Desse modo, após algumas substituições e operações matemáticas chega-se a seguinte equação:

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log K_B + n \log Q \quad (6)$$

onde n é o número de sítios de interação. A obtenção dos valores de K_B e n se dá por meio da regressão linear dos dados obtidos do logaritmo de $(F_0 - F)/F$ versus o logaritmo da concentração da molécula em estudo, no caso os ésteres tianeptínicos (Figura 61).

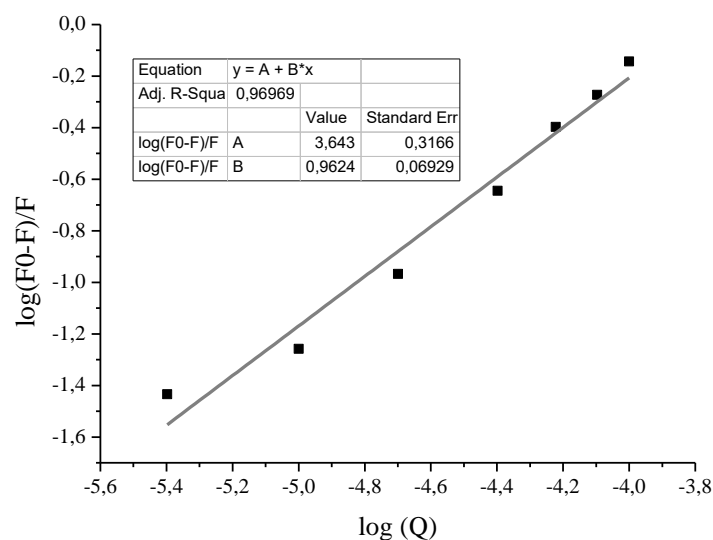


Figura 61: Gráfico do logaritmo da concentração *versus* o logaritmo de $(F_0 - F)/F$ da BSA na presença de Tianeptina a 30°C:

As equações obtidas, bem como os valores de K_B e n nas diferentes temperaturas estudadas estão apresentados na Tabela 5. Os resultados mostraram-se bastante diferentes para cada molécula estudada. De modo geral pode-se observar que tanto maiores os valores de K_B , maior a capacidade de interação dos ésteres com a proteína BSA. Para a Tianeptina, observou-se um aumento das constantes de ligação com a temperatura e apenas a existência de um sítio de ligação entre a proteína e o fármaco. Além disso, pode-se observar que as interações entre a Tianeptina e a BSA são bastante fracas, uma vez que $K_B < 10^5 \text{ L.mol}^{-1}$.^{27, 35}

Para o derivado **3a** não foi possível o cálculo de K_B e n para a temperatura de 40°C, pois não houve linearidade na diminuição da intensidade de fluorescência da BSA com o aumento da concentração do éster. Para as temperaturas de 20°C e 30°C os valores de K_B mostraram-se bastante baixos, indicando fraca interação do derivado com a proteína e o número de sítios ligantes foi igual a um.

Para o derivado **3b** tanto as constantes de ligação como também o número de sítios de interação n diminuíram com o aumento da temperatura, o que indica uma diminuição da estabilidade do complexo formado. É interessante ressaltar que para o derivado **3b** foram observados dois sítios de interação independentes a 20°C enquanto que para a

Tianeptina foi observado apenas um na mesma temperatura. Além disso, chamam a atenção os valores das constantes de ligação bastante superiores do que os observados para a Tianeptina, indicando a existência de interações entre proteína o éster **3b** bem mais fortes. Os valores tanto de K_B quanto de n contribuem para a hipótese levantada anteriormente, sobre a existência de um tamanho limite para a cadeia alquílica do éster para interação com a BSA, uma vez que para o éster **3b** foram observados os maiores valores de K_B .

Tabela 5: Constantes de ligação e número de sítios de ligação dos derivados em diferentes temperaturas.

Molécula	Temp. (°C)	Regressão Linear	R	K_B (L/mol)	n
Tianeptina	20	$\log(F_0 - F)/F = 3,98 + 1,05 \log[Q]$	0,998	$9,59 \times 10^3$	1,05
	30	$\log(F_0 - F)/F = 3,64 + 0,96 \log[Q]$	0,969	$4,39 \times 10^3$	0,96
	40	$\log(F_0 - F)/F = 4,91 + 1,25 \log[Q]$	0,993	$8,07 \times 10^4$	1,25
3a	20	$\log(F_0 - F)/F = 2,43 + 0,80 \log[Q]$	0,994	269,77	0,80
	30	$\log(F_0 - F)/F = 2,94 + 0,96 \log[Q]$	0,997	881,05	0,96
	40	n.c.	-	-	-
3b	20	$\log(F_0 - F)/F = 8,49 + 1,94 \log[Q]$	0,964	$3,09 \times 10^8$	1,94
	30	$\log(F_0 - F)/F = 6,89 + 1,59 \log[Q]$	0,971	$7,76 \times 10^6$	1,59
	40	$\log(F_0 - F)/F = 5,19 + 1,22 \log[Q]$	0,913	$1,55 \times 10^5$	1,22
3d	20	$\log(F_0 - F)/F = 2,41 + 0,73 \log[Q]$	0,988	254,68	0,73
	30	$\log(F_0 - F)/F = 2,26 + 0,72 \log[Q]$	0,968	180,30	0,72
	40	$\log(F_0 - F)/F = 5,32 + 1,46 \log[Q]$	0,947	$2,10 \times 10^5$	1,46
3e	20	$\log(F_0 - F)/F = 3,04 + 0,86 \log[Q]$	0,987	$1,08 \times 10^3$	0,86
	30	$\log(F_0 - F)/F = 3,91 + 1,08 \log[Q]$	0,979	$8,18 \times 10^3$	1,08
	40	$\log(F_0 - F)/F = 4,56 + 1,25 \log[Q]$	0,928	$3,62 \times 10^4$	1,25

n.c.: não calculável.

Outra informação importante que pode ser obtida da interação do éster **3b** com a proteína BSA vem do número de sítios de interação independentes. Como pode ser observado na Tabela 4, há uma diminuição do número desses sítios com o aumento da temperatura, indicando não só um enfraquecimento do complexo BSA-éster, mas também indicando que o processo de interação com a proteína é reversível e que, portanto, tratam-se de interações não covalentes entre o éster e BSA.

Já para o éster **3d** a variação de K_B com o aumento da temperatura mostrou-se bastante aleatória. Além disso, os valores de K_B a 20°C e 30°C mostraram-se bastante baixos, possivelmente devido a interações fracas com a proteína. Igualmente baixos foram os valores correspondentes aos sítios de interação para essas temperaturas. Somente a 40°C o número de sítios foi superior a unidade.

Por fim, para o éster **3e**, assim como para a Tianeptina, foi observado um aumento de K_B com a temperatura, indicando um aumento da capacidade de interação com a temperatura. O mesmo foi observado para o número de sítios, que a 40°C mostrou-se superior a um, indicando que um novo sítio de interação com a proteína passava a ser ocupado.

4.4.1. *Fluorescência Sincronizada*

A fluorescência sincronizada permite a análise de amostras que contenham mais de um fluoróforo. Desse modo, a fluorescência sincronizada mostra somente o espectro referente ao resíduo de tirosina da BSA quando $\Delta\lambda = 15$ nm e somente o espectro referente ao resíduo de triptofano quando $\Delta\lambda = 60$ nm.

Os resultados mostram que para a Tianeptina não há um deslocamento evidente do máximo nos picos. Contudo, observa-se que a diminuição da intensidade de fluorescência dos resíduos de triptofano (Figura 62b) mais intensa do que para os resíduos de tirosina (Figura 62a), o que indica que o sítio de interação entre Tianeptina e BSA deve situar-se mais próximo dos resíduos de triptofano.

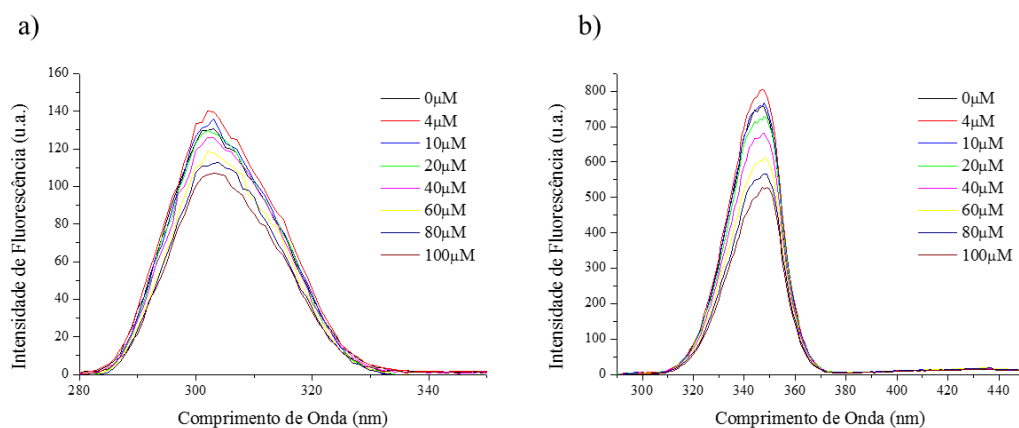


Figura 62: Efeito da Tianeptina no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.

Para o éster **3a** no espectro de fluorescência sincronizada da tirosina (Figura 63a) pode ser observado a presença de sinais tão intensos quanto à fluorescência da tirosina. Esses picos correspondem à formação de precipitados do derivado **3a** na solução aquosa. Contudo, como colocado anteriormente, fora observado a presença de precipitados somente na solução contendo 100 μM do éster, mas sendo a fluorescência uma técnica bastante sensível, fica evidente que ocorreu a precipitação também em concentrações mais diluídas. Desse modo, o espectro de fluorescência sincronizada da tirosina não pode ser utilizado para a averiguar interações do derivado **3a** com este resíduo de amino ácido.

Por outro lado, o espectro de fluorescência sincronizada do triptofano (Figura 63b) apresenta intensidades de fluorescência muito superiores do que o espectro da tirosina, sendo que a presença de precipitado não interfere para a averiguação das interações entre proteína e derivado. O espectro mostra que não há um deslocamento evidente do máximo, indicando que o sítio de interação do derivado com a proteína não se situa próximo aos resíduos de triptofano.

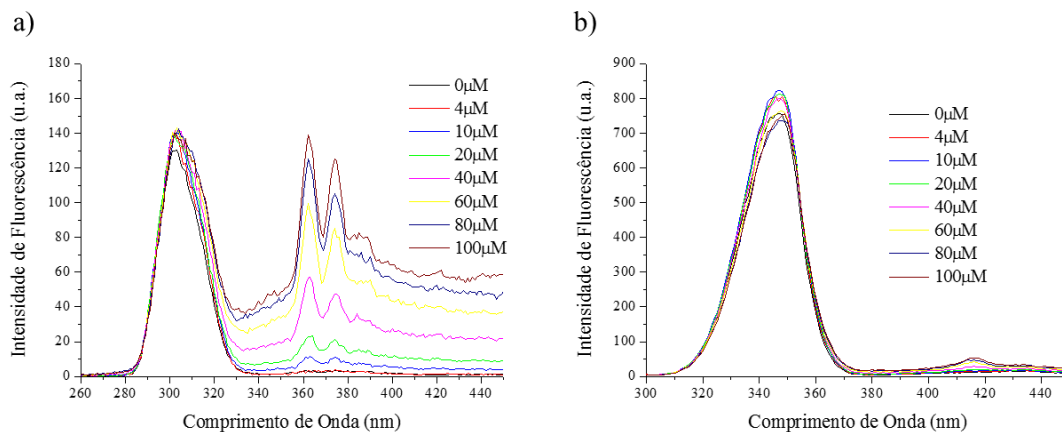


Figura 63: Efeito do éster **3a** no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.

Para o éster **3b** no espectro de fluorescência sincronizada da tirosina (Figura 64a) pode ser observado que há um aumento da intensidade de fluorescência do derivado em todas as concentrações. Esse aumento da intensidade de fluorescência da tirosina pode estar relacionado a mudanças na conformação da proteína devido à interação com o éster **3b**. Também entre 354 e 380 nm são observados sinais pouco intensos referentes à presença de precipitados em solução.

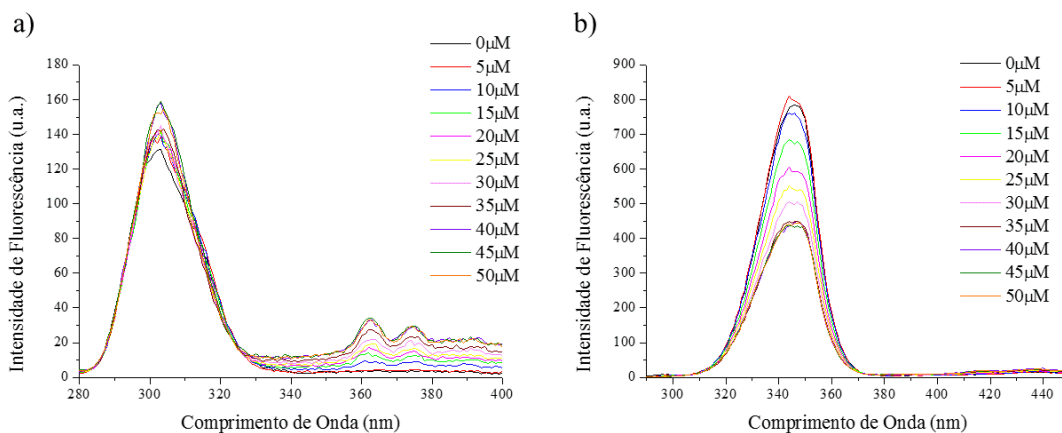


Figura 64: Efeito do éster **3b** no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.

No espectro de fluorescência sincronizada do triptofano (Figura 64b) não é possível observar um deslocamento evidente do máximo do pico. Contudo, a diminuição da intensidade de fluorescência do triptofano com o aumento da concentração do éster **3b**

é bastante intensa, sendo que para 35 μM do derivado a intensidade da fluorescência é reduzida pela metade. Essa redução intensa indica que o sítio de interação da proteína e o éster **3b** deve situar-se bastante próximo dos resíduos de triptofano.

Também foram obtidos os espectros de fluorescência sincronizada das soluções contendo o éster **3c** na presença de BSA. No espectro de fluorescência sincronizada da tirosina (Figura 65a) pode-se observar um aumento da intensidade de fluorescência do aminoácido em todas as concentrações do éster **3c**, possivelmente devido a existência de interações hidrofóbicas entre a BSA e o éster em regiões próximas a este resíduo de aminoácido. É interessante observar que quantidades diferentes do éster não promoveram diferenças no aumento da intensidade de fluorescência indicando que não há ligação com a proteína, mas algum outro tipo de interação. No espectro de fluorescência sincronizada do triptofano (Figura 65b) observa-se apenas um ligeiro aumento da intensidade de fluorescência do aminoácido.

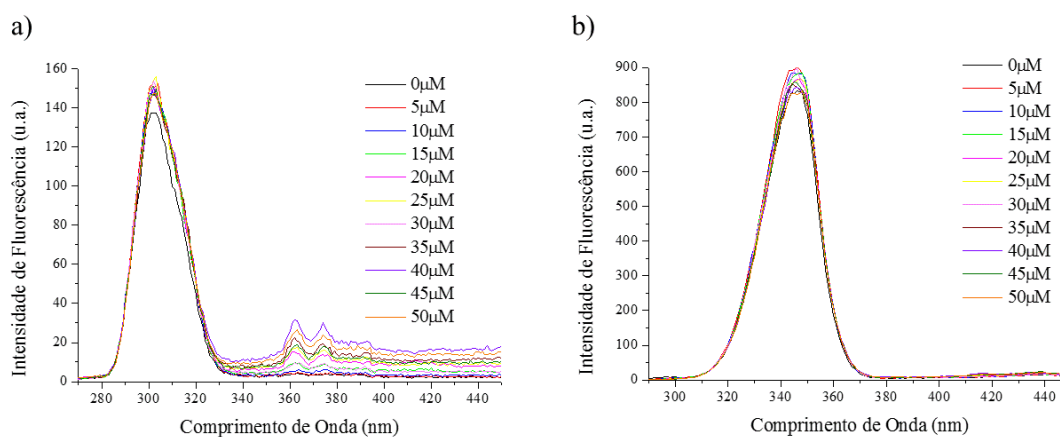


Figura 65: Efeito do éster **3c** no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.

Para o éster **3d** novamente são observados sinais bastante intensos no espectro de fluorescência sincronizada da tirosina (Figura 66a), principalmente acima de 40 μM , referentes à presença de precipitados na solução aquosa. Dessa forma, assim como para o derivado **3a**, não é possível utilizar esse espectro para a obtenção de informações acerca do microambiente envolvendo esse resíduo de amino ácido.

No espectro de fluorescência sincronizada do triptofano (Figura 66b) foi observado uma diminuição da intensidade da fluorescência dos picos com o aumento da concentração do éster **3d**, mas sem um deslocamento evidente dos máximos. Além disso, a diminuição da intensidade de fluorescência não foi tão acentuada como no caso do éster **3b**.

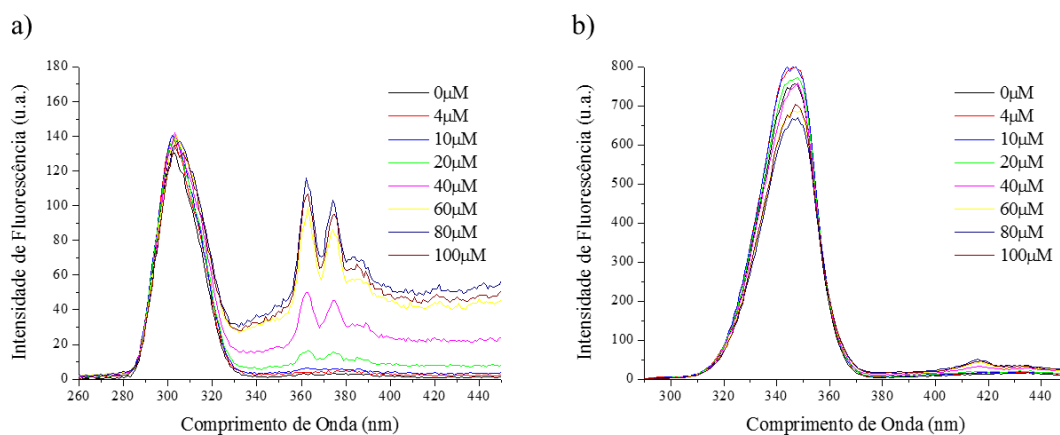


Figura 66: Efeito do éster **3d** no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.

Para o éster **3e**, tanto no espectro de fluorescência sincronizada da tirosina (Figura 67 a) quanto no espectro do triptofano (Figura 67b), é possível observar a diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração. Contudo, não há um deslocamento evidente do máximo em nenhum dos dois espectros.

É interessante ressaltar que apenas para o derivado **3e** houve diminuição da intensidade de fluorescência da tirosina, isso indica que o sítio em que o derivado interage com a BSA pode estar próximo de ambos os fluoróforos nesse caso. Outra hipótese que pode ser levantada é a influência do grupo hidroxila terminal que este derivado possui, o que poderia induzir mudanças conformacionais na proteína levando a diminuição da intensidade de fluorescência de ambos os derivados.

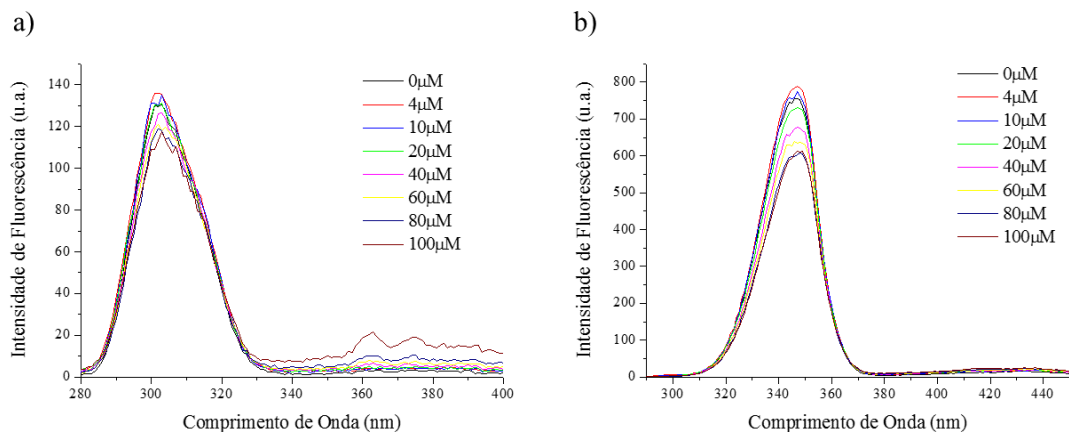


Figura 67: Efeito do éster **3e** no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.

Para avaliar exatamente o que ocorre nesse caso e também para os demais ésteres, seriam necessários estudos envolvendo o rendimento quântico.²⁷ Por meio desse tipo de análise seria possível avaliar a distância entre o fluoróforo e o sítio ligante na BSA. Contudo, no laboratório não há disposição das lâmpadas necessárias ($\lambda_{em} = 280 \text{ nm}$) para a realização da análise.

Para os ésteres **3f** e **3g**, Figuras 32A e 33A dos anexos, não foram observadas mudanças significativas com o aumento da concentração dos derivados tianeptínicos nos espectros de fluorescência sincronizada da BSA, indicando que as interações existentes entre esses ésteres e a proteína não se encontram em regiões próximas aos resíduos de tirosina ou triptofano.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O derivado N-metilado **2** da Tianeptina foi sintetizado e caracterizado espectroscopicamente, contudo os baixos rendimentos obtidos são coerentes com o alto impedimento estérico da posição na qual a substituição foi realizada. Os ésteres **3a-f** da Tianeptina foram sintetizados por meio de uma rota de síntese alternativa envolvendo uma única etapa e rendimentos intermediários. O éster **3g** foi sintetizado em duas etapas: a primeira envolvendo a derivatização do eletrófilo e a segunda envolvendo a esterificação. Todos os derivados foram caracterizados espectroscopicamente.

Realizou-se o estudo fotofísico dos ésteres tianeptínicos através de medidas de absorção na região do UV-vis e espectroscopia de fluorescência. Os valores obtidos para os coeficientes de extinção molar se mostraram bastante semelhantes aos do precursor Tianeptina, sendo coerentes com as transições do tipo $\pi-\pi^*$.

Foi realizado um estudo das interações entre a Tianeptina e seus ésteres com a BSA, proteína análoga a HSA. O estudo foi feito utilizando a fluorescência intrínseca da proteína, uma vez que os derivados não apresentaram fluorescência apreciável na faixa estudada (300 – 450 nm). A Tianeptina e os ésteres **3a**, **3b**, **3d** e **3e** apresentaram diminuição da intensidade de fluorescência da proteína em todas as temperaturas estudadas indicando a existência de interações envolvendo pelo menos um sítio ligante com a proteína, enquanto que o derivado **3g** diminuiu a intensidade de fluorescência da BSA apenas a 20°C. Os derivados **3c** e **3f** promoveram um aumento, cerca de 10% e 7% respectivamente, da intensidade de fluorescência da BSA evidenciando a existência de interações diferentes das apresentadas pelos demais ésteres com a proteína.

O mecanismo de supressão de fluorescência da BSA foi estudado utilizando a equação de Stern-Volmer onde verificou-se a ocorrência do mecanismo estático, tanto para a Tianeptina como para os ésteres **3b**, **3d** e **3e**. Também foram avaliados as constantes de ligação e o número de sítios ligantes com a proteína. A Tianeptina e os ésteres **3a**, **3d** e **3e** apresentaram valores de constantes de ligação intermediários e aleatórios e apenas um sítio de interação com a proteína. Já o derivado **3b** apresentou valores de K_B bastante superiores aos demais derivados, além de ocupar dois sítios de ligação na proteína a 20°C.

A diminuição da intensidade de fluorescência da BSA causada pelo éster **3b** contendo seis carbonos na função éster e o efeito oposto, isto é, o aumento da intensidade de fluorescência causado pelo éster **3c**, indicam a existência de um tamanho máximo de cadeia alquílica para interação com a proteína. Além disso, a presença de hidroxila terminal, no caso do éster **3e**, não contribuiu para interações hidrofílicas com a proteína. Desse modo, pode-se concluir que as interações com a proteína predominantemente foram hidrofóbicas.

Por fim, foram obtidos os espectros de fluorescência sincronizada da tirosina ($\Delta\lambda = 15$ nm) e do triptofano ($\Delta\lambda = 60$ nm). A Tianeptina e os ésteres **3a**, **3d** e **3e** apresentaram redução da intensidade de fluorescência do triptofano, indicando a proximidade a este resíduo de amino ácido. Enquanto que o éster **3b** apresentou redução da intensidade de fluorescência do triptofano e aumento da intensidade de fluorescência da tirosina. O éster **3c** promoveu aumento da intensidade de fluorescência somente do resíduo de tirosina, enquanto os derivados **3f** e **3g** não produziram mudanças significativas nos espectros de ambos os aminoácidos. Estudos complementares, como rendimento quântico de fluorescência, irão contribuir para um estudo mais detalhado da interação desses ésteres, bem como da Tianeptina com a BSA.

A avaliação da existência de interações existentes entre macromoléculas biológicas e candidatos a fármacos constitui uma das fases mais importantes do processo de desenvolvimento de novos medicamentos. Assim, o estudo das interações dos ésteres com a BSA constitui uma etapa relevante para estudos posteriores de farmacodinâmica e farmacocinética desses candidatos à fármacos para o tratamento da depressão.

Como próxima etapa a ser futuramente desenvolvida está o estudo da viabilidade celular e também a avaliação dos níveis de BDNF, os quais permitem estimar a influência dos ésteres tianeptínicos sintetizados nesse trabalho para o tratamento de distúrbios neurais ou neuroproteção.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Materiais e métodos

Os comprimidos de Stablon® foram fornecidos pelo professor Rafael Roesler do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, ICBS-UFRGS e utilizados para a obtenção do princípio ativo Tianeptina. Foram utilizados como reagentes eletrofilicos os seguintes compostos: iodo-metano, iodo-octano, bromo-octano, iodo-hexano, iodo-butano, 3-bromo-1-propanol, 11-bromo-1-undecanol, ácido-6-bromo-hexanóico e *cis,trans*-1-cloro-2-buteno. Também foram utilizados os seguintes sais: Na₂CO₃, K₂CO₃, NaHCO₃, NaCl, KH₂PO₄ e Na₂PO₄.

Os solventes utilizados foram tetrahidrofurano (THF), acetona, diclorometano (DCM), acetonitrila (MeCN), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), clorofórmio (CHCl₃), metanol (MeOH) e etanol (EtOH), todos de pureza analítica e utilizados sem purificação prévia. A cromatografia em coluna foi realizada em sílica gel 60 (70-230 mesh). O acompanhamento das reações foi feito por cromatografia em camada delgada (CCD) e foram realizadas utilizando placas de alumínio com 0,2 mm de sílica gel 60 F-254 produzida pela Merck.

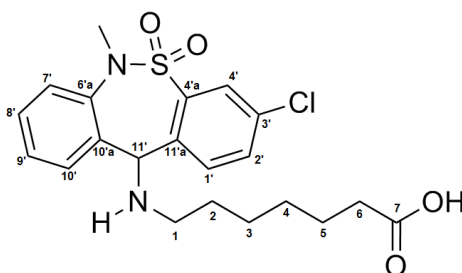
Todas as análises foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C (APT) foram obtidos em espectrômetros Varian VNMRs de 400 MHz e no Varian Inova de 300 MHz, utilizando CHCl₃-*d* como solvente das amostras. A nomenclatura dos compostos foi dada baseando-se no programa ChemDraw Ultra 12.0 da Cambridge Soft. Os dados dos espectros de RMN foram descritos da seguinte forma: deslocamento químico, relatado em δ (ppm) relativo ao tetrametilsilano (padrão interno), multiplicidade (s = singlete, sl = singlete largo, d = dubleto, t = tripleto, tt = tripleto de tripleto, q = quarteto, qt = quinteto e m = multiplete), constante de acoplamento (*J*) expressa em Hertz (Hz) e número de hidrogênios deduzido da integral relativa. Os espectros de Infravermelho foram obtidos em espectrômetro Varian 640-IR, em filme líquido sobre cristal de KBr. Os espectros de absorção de UV-visível foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2450PC. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos no espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC.

Para a realização das medidas de absorção na região do UV-vis e de emissão de fluorescência, foram preparadas duas soluções de trabalho. A primeira, uma solução tampão fosfato ou PBS (pH = 7,4), a qual serviu de solvente para não só para a preparação das soluções a serem medidas, mas também para a preparação da segunda solução de trabalho, uma solução concentrada de BSA (15 μ M). As demais soluções mãe contendo Tianeptina ou os derivados sintetizados foram preparadas utilizando dimetilformamida ou clorofórmio com concentração de 6×10^{-3} M.

As medidas de absorção na região do UV-vis foram realizadas à 20°C utilizando as soluções mãe dos derivados em clorofórmio. Já as medidas de emissão de fluorescência foram realizadas em meio aquoso, utilizando o tampão fosfato como solvente. A concentração de BSA foi mantida fixa (5 μ M) enquanto aumentava-se gradativamente a concentração dos derivados. As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas a 20°C, 30°C e 40°C e as medidas de fluorescência sincronizada foram realizadas apenas a 20°C, todas em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

As soluções contendo proteína e as moléculas estudadas foram preparadas imediatamente antes das medidas e deixadas atingir o equilíbrio durante uma hora. Para as temperaturas de 30°C e 40°C aguardou-se meia hora até que a temperatura das soluções e também da cubeta atingissem o equilíbrio em banho maria.

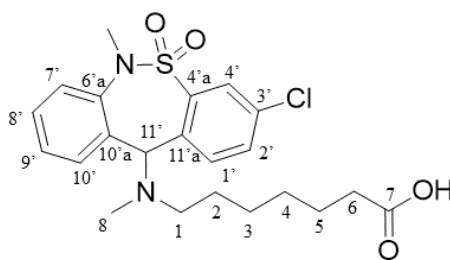
6.2. Obtenção do ácido - [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)amino]-7 heptanoíco (**1a**)



A Tianeptina utilizada neste trabalho foi extraída diretamente dos comprimidos macerados. A extração foi realizada utilizando THF, agitação e aquecimento à 50°C durante 20 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada em funil de Büchner e o solvente removido no rotaevaporador até sobrar uma pasta viscosa de cor amarelada. Essa pasta contendo Tianeptina e excipientes foi purificada por cromatografia em coluna utilizando

como eluente a mistura $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ na proporção inicial de 93:6,5:0,5 e depois modificada gradualmente até 85:14,5:0,5. Após a remoção do solvente das frações, foi obtido um sólido branco grumoso. Rendimento da coluna 50 - 82%. IV (KBr, cm^{-1}): 3260; 3070; 2930; 2850; 1680; 1585; 1480; 1335; 1160 e 575. RMN de ^1H (CDCl_3-d , 300MHz, TMS): δ (ppm) = 1,21 - 1,34 (m, 4H); 1,40 - 1,61 (m, 4H); 2,24 (t, 2H, $J = 15$ Hz); 2,37 - 2,53 (m, 2H); 3,32 (s, 3H); 5,17 (s, 1H); 6,57 - 6,59 (sl, 1H, NH); 7,30 - 7,34 (m, 1H); 7,35 - 7,45 (m, 3H); 7,46 - 7,49 (m, 2H); 7,96 (m, 1H). RMN de ^{13}C (APT) (CDCl_3-d , 75MHz, TMS): δ (ppm) = 178,9 (C=O); 140,4, 139,3, 136,1, 135,3 e 135,0 ($\text{C4}'_a$, $\text{C6}'_a$, $\text{C10}'_a$, $\text{C11}'_a$ e $\text{C3}'$); 132,8, 132,6, 131,4, 130,1, 128,7, 128,2 e 127,9 ($\text{C2}'$, $\text{C1}'$, $\text{C10}'$, $\text{C8}'$, $\text{C9}'$, $\text{C7}'$ e $\text{C4}'$); 66,3 ($\text{C11}'$); 47,7 (C1); 39,1 (CH_3); 34,9 (C6); 29,4 (C2); 29,2 (C4); 27,1 (C3) e 25,2 (C5). λ_{max} (CHCl_3) = 271 nm, $\epsilon = 1300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

6.3. Procedimento para a preparação do ácido [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il](metil)amino]-7 heptanóico (2)



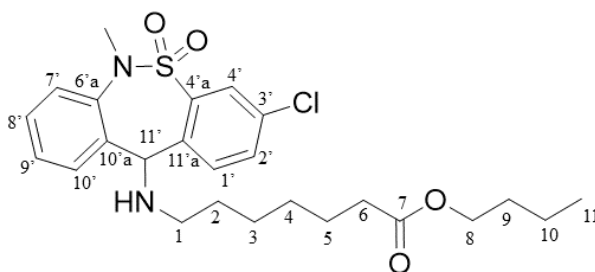
Em um balão foram colocados uma barra magnética, 100 mg de Tianeptina (0,23 mmol) os quais foram dissolvidos em 5 ml de acetonitrila. Em seguida, foram adicionados 2 equivalentes de MeI e 2 equivalentes de Na_2CO_3 . O balão reacional foi fechado com um septo de borracha e deixado sob agitação durante 24 horas, até que não se observassem mais mudanças na CCD. Após, o solvente foi removido e o produto bruto purificado por cromatografia em coluna, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila como eluentes na proporção inicial de 80:20 e aumentou-se a polaridade gradualmente até 40:60. Cera amarela. Rendimento, 19%. IV (KBr, cm^{-1}): 3070; 2930; 2850; 1715; 1580; 1335; 1160 e 570. RMN de ^1H (CDCl_3-d , 400 MHz, TMS): δ (ppm) = 1,08 - 1,29 (m, 4H); 1,33 - 1,47 (m, 2H); 1,51 - 1,60 (m, 2H); 2,02 (s, 3H); 2,08 - 2,26 (m, 2H); 2,30 (t, 2H, $J = 18,9$ Hz); 3,51 (s, 3H); 4,26 (s, 1H); 7,26 - 7,33 (m, 1H); 7,35 - 7,41 (m, 3H); 7,43 - 7,48 (m, 2H) e 7,94 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz). RMN de ^{13}C (CDCl_3-d , 100 MHz, TMS): δ (ppm) = 179,1 (C=O); 142,8, 140,7, 137,7, 135,4 e 135,0 ($\text{C4}'_a$, $\text{C6}'_a$, $\text{C10}'_a$, $\text{C11}'_a$ e

C3'); 133,4, 131,2, 130,7, 130,4, 130,0, 128,7 e 128,5 (C2', C1', C10', C8', C9', C7' e C4'); 76,4 (C8); 55,4 (C1); 40,5 (C11'); 39,5 (CH₃); 33,8 (C6); 28,8 (C2); 26,9 (C4); 26,4 (C3) e 24,5 (C5).

6.4. Procedimento geral para a preparação dos ésteres tianeptínicos (**3a - f**)

À uma solução de Tianeptina 211,46 mg (0,5 mmol) em MeCN (10 ml) foram adicionados 0,93 equivalentes do eletrófilo com um pipetador automático. Em seguida, sob agitação vigorosa foram adicionados 0,95 equivalentes de base (K₂CO₃ para a síntese do éster **3d** e Na₂CO₃ para os demais ésteres). O balão reacional foi acoplado com um condensador simples e a reação foi aquecida a 65°C até que não se observassem mais mudanças na CCD. Após a reação o solvente foi removido em rotaevaporador e o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como fase móvel foi utilizado um gradiente de hexano e acetato de etila, iniciando em 90:10 ou 80:20 e aumentou-se a polaridade gradualmente até 40:60.

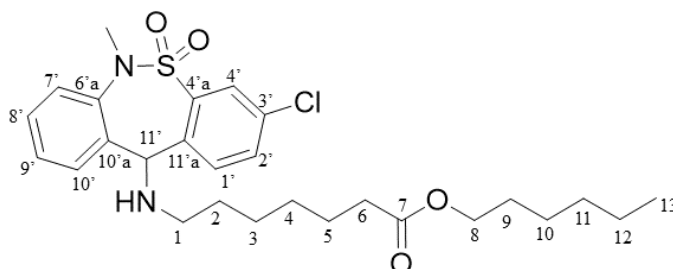
6.4.1. [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino]-7-heptanoato de butila (**3a**)



Óleo amarelo claro. Rendimento, 26%. IV (KBr, cm⁻¹): 3350; 3080; 2930; 2860; 1730; 1595; 1470; 1335; 1150 e 580. RMN de ¹H (CDCl₃-d, 300 MHz, TMS): δ (ppm) = 0,92 (t, 3H, J = 24,4 Hz); 1,19 – 1,66 (m, 12H); 1,89 (sl, NH); 2,27 (t, 2H, J = 25,4 Hz); 2,45 (t, 2H, J = 23,5 Hz); 3,37 (s, 3H); 4,06 (t, 2H, J = 22,5 Hz); 5,00 (s, 1H); 7,28 – 7,35 (m, 1H); 7,36 – 7,43 (m, 3H); 7,44 – 7,50 (m, 2H) e 7,96 (d, 1H, J = 5,8 Hz). RMN de ¹³C (CDCl₃-d, 75 MHz, TMS): δ (ppm) = 173,9 (C=O); 140,3, 138,7, 138,5, 136,9 e 134,2 (C4'a, C6'a, C10'a, C11'a e C3'); 132,2, 131,2, 130,0, 129,3, 128,4, 128,1 e 127,9 (C2', C1', C10', C8', C9', C7' e C4'); 66,1 (C11'); 64,1 (C8); 48,1 (C1); 38,7 (CH₃); 34,2 (C6); 30,7 (C9); 29,9 (C2); 28,9 (C4); 26,9 (C3); 24,8 (C5); 19,1 (C10) e 13,7 (C11).

λ_{\max} (CHCl₃) = 272 nm, ϵ = 1100 M⁻¹.cm⁻¹.

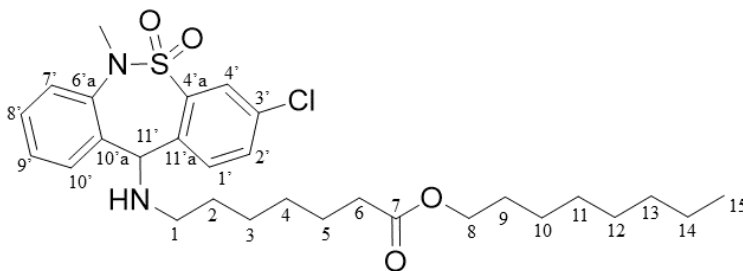
6.4.2. [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino]-7-heptanoato de hexila (**3b**)



Óleo amarelo claro. Rendimento, 18%. IV (KBr, cm⁻¹): 3350; 3070; 2930; 2860; 1730; 1560; 1470; 1350; 1150 e 583. RMN de ¹H (CDCl₃-d, 400 MHz, TMS): δ (ppm) = 0,89 (t, 3H, J = 14,1 Hz); 1,23 – 1,39 (m, 10H); 1,43 – 1,54 (m, 2H); 1,54 – 1,66 (m, 4H); 2,27 (t, 2H, J = 18,6 Hz); 2,40 – 2,55 (m, 2H); 3,35 (s, 3H); 4,04 (t, 2H, J = 16,6 Hz); 5,09 (s, 1H); 7,27 – 7,34 (m, 1H); 7,35 – 7,41 (m, 3H); 7,42 – 7,52 (m, 2H) e 7,97 (d, 1H, J = 4,9 Hz). RMN de ¹³C (CDCl₃-d, 100 MHz, TMS): δ (ppm) = 173,9 (C=O); 140,2 (C4'a); 138,7 (C6'a); 134,5 (C3'a); 132,3, 131,6, 130,4, 129,5, 128,4, 128,1, 127,8, (C2', C1', C10', C8', C9', C7' e C4'); 66,2 (C11'); 64,4 (C8); 47,9 (C1); 38,8 (CH₃); 34,2 (C6); 31,4 (C9); 28,9 (C2); 28,6 (C4); 26,8 (C10); 25,6 (C11); 24,8 (C3); 22,5 (C5) e 14,0 (C13).

λ_{\max} (CHCl₃) = 271 nm, ϵ = 2400 M⁻¹.cm⁻¹.

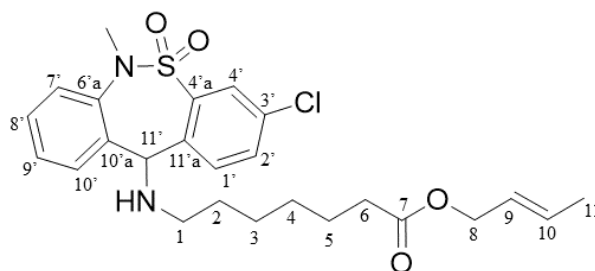
6.4.3. [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino]-7-heptanoato de octila (**3c**)



Óleo amarelo claro. Rendimento, 28%. IR (KBr, cm^{-1}): 3340; 3065; 2930; 2850; 1730; 1595; 1470; 1335; 1150 e 580. RMN de ^1H (CDCl_3 -*d*, 300 MHz, TMS): δ (ppm) = 0,88 (t, 3H, $J = 21,5$ Hz); 1,19 – 1,40 (m, 14H); 1,41 – 1,72 (m, 6H); 1,95 (sl, NH); 2,27 (t, 2H, $J = 25,4$ Hz); 2,46 (t, 2H, $J = 23,5$ Hz); 3,37 (s, 3H); 4,04 (t, 2H, $J = 22,5$ Hz); 5,00 (s, 1H); 7,27 – 7,33 (m, 1H); 7,34 – 7,42 (m, 3H); 7,43 – 7,49 (m, 2H) e 7,95 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz). RMN de ^{13}C (CDCl_3 -*d*, 75MHz, TMS): δ (ppm) = 173,9 (C=O); 140,3, 138,7, 138,5, 136,9 e 134,2 (C4'a, C6'a, C10'a, C11'a e C3'); 132,2; 131,2, 130,0, 129,3, 128,4, 128,1 e 127,9 (C2', C1', C10', C8', C9', C7' e C4'); 66, 1 (C11'); 64,5 (C8); 48,1 (C1); 38,7 (CH₃); 34,2 (C6); 31,8 (C9); 29,9 (C10); 29,2 (C2); 29,0 (C4); 28,9 (C11); 28,6 (C12); 26,9 (C3); 25,9 (C13); 24,8 (C5); 22,6 (C14) e 14,1 (C15).

λ_{max} (CHCl_3) = 273 nm, $\epsilon = 1500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

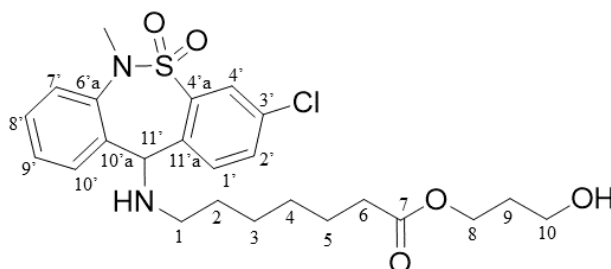
6.4.4. [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il-amino]-7-heptanoato de (*E*)-but-2-en-1-ila (**3d**)



Óleo amarelo claro. Rendimento, 29%. IR (KBr, cm^{-1}): 3340; 3070; 3020; 2930; 2840; 1730; 1560; 1480; 1330; 1150 e 585. RMN de ^1H (CDCl_3 -*d*, 500 MHz, TMS): δ (ppm) = 1,24 - 1,34 (m, 4H); 1,43 – 1,53 (m, 2H); 1,54 – 1,64 (m, 2H); 1,72 (d, 2H, $J = 12,7$ Hz); 2,01 (sl, NH); 2,28 (t, 2H, $J = 14,7$ Hz); 2,45 (t, 2H, $J = 14,1$ Hz); 3,37 (s, 3H); 4,48 - 4,62 (d, 2H, $J = 13,7$ Hz); 5,00 (s, 1H); 5,51 – 5,61 (m, 1H); 5,73 – 5,82 (m, 1H); 7,27 – 7,32 (m, 1H); 7,33 – 7,41 (m, 3H); 7,42 – 7,48 (m, 2H) e 7,95 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz). RMN de ^{13}C (CDCl_3 -*d*, 125 MHz, TMS): δ (ppm) = 173,5 (C=O); 140,3, 138,7, 138,5, 136,9 e 134,2 (C4'a, C6'a, C10'a, C11'a e C3'); 132,1, 131,3, 130,0; 129,3, 128,4, 128,1 e 127,9 (C2', C1', C10', C8', C9', C7' e C4'); 125,1 (C9); 124,3 (C10), 66,1 (C11'); 65,0 (C8); 48,1 (C1); 38,7 (CH₃); 34,2 (C6); 29,9 (C2); 28,9 (C4); 26,9 (C3); 24,8 (C5) e 17,8 (C11).

λ_{max} (CHCl_3) = 272 nm, $\epsilon = 1300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

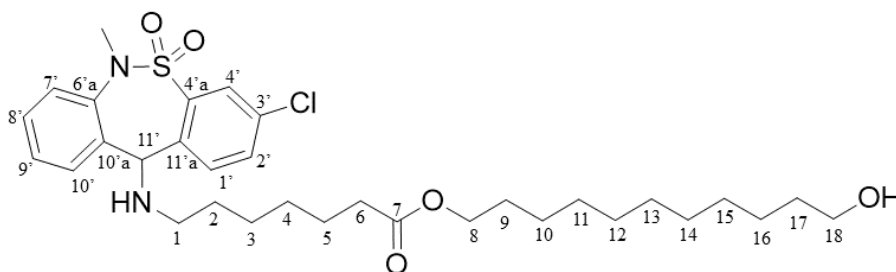
6.4.5. [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)-amino] -7-heptanoato de 3-hidroxiopropila (**3e**)



Óleo amarelo claro. Rendimento, 21%. IV (KBr, cm^{-1}): 3560 – 3300; 3340; 3070; 2930; 2850; 1730; 1595; 1475; 1325; 1150; 1060 e 590. RMN de ^1H (CDCl_3 -*d*, 300 MHz, TMS): δ (ppm) = 1,24 – 1,36 (m, 4H); 1,41 – 1,53 (m, 2H); 1,53 – 1,66 (m, 2H); 1,85 (tt, 2H, $J = 19,6$ e $21,5$ Hz); 2,01 (sl, NH); 2,28 (t, 2H, $J = 24,4$); 2,46 (t, 2H, $J = 24,4$ Hz); 3,36 (s, 3H); 3,67 (t, 2H, $J = 20,6$ Hz); 4,22 (t, 2H, $J = 20,6$ Hz); 5,00 (s, 1H); 7,27 – 7,34 (m, 1H); 7,35 – 7,42 (m, 3H); 7,42 – 7,50 (m, 2H) e 7,95 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz). RMN de ^{13}C (APT) (CDCl_3 -*d*, 75MHz, TMS): δ (ppm) = 174,1 (C=O); 140,3, 138,5, 138,4, 136,8 e 134,2 (C4'a, C6'a, C10'a, C11'a e C3'); 132,2, 131,2, 130,1, 129,3, 128,4, 128,1 e 127,9 (C2', C1', C10', C8', C9', C7' e C4'); 66,2 (C11'); 61,2 (C8); 59,1 (C10); 48,0 (C1); 38,7 (CH_3); 34,2 (C6); 31,7 (C9); 29,8 (C2); 28,9 (C4); 26,9 (C3) e 24,8 (C5).

λ_{max} (CHCl_3) = 271 nm, $\epsilon = 1500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

6.4.6. [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)(11-hidroxiundecil)amino]-7-heptanoato de 11-hidroxi-undecila (**3f**)

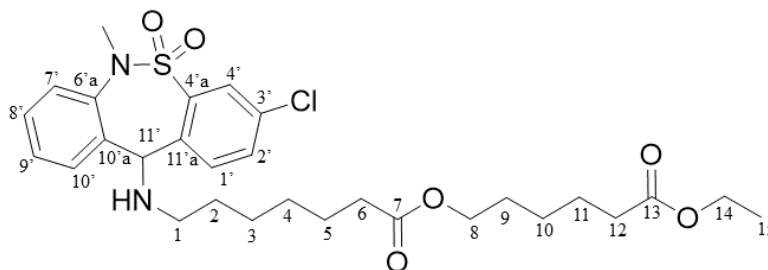


Óleo amarelo claro. Rendimento, 27%. IV (KBr, cm^{-1}): 3560 – 3280; 3350; 3065; 2930; 2850; 1730; 1590; 1470; 1325; 1150; 1065 e 585. RMN de ^1H (CDCl_3 -*d*, 300 MHz,

TMS): δ (ppm) = 1,20 – 1,40 (m, 20H); 1,41 – 1,66 (m, 6H); 1,72 (sl, NH); 2,27 (t, 2H, J = 24,9 Hz); 2,45 (t, 2H, J = 23,3 Hz); 3,37 (s, 3H); 3,63 (t, 2H, J = 22,0 Hz); 4,04 (t, 2H, J = 22,5 Hz); 5,00 (s, 1H); 7,27 – 7,35 (m, 1H); 7,36 – 7,42 (m, 3H); 7,43 – 7,50 (m, 2H) e 7,96 (d, 1H, J = 6,8 Hz). RMN de ^{13}C (APT) (CDCl_3-d , 75MHz, TMS): δ (ppm) = 173,9; 140,2; 138,6; 138,5; 136,8; 134,2; 132,2; 131,2; 130,0; 129,3; 128,4; 128,1; 127,9; 66,1; 64,4; 63,0; 48,1; 38,7; 34,2; 32,8; 29,9; 29,5; 29,4; 29,3; 29,2; 29,0; 28,6; 26,9; 25,9; 25,7 e 24,8.

λ_{max} (CHCl_3) = 272 nm, ϵ = 1800 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

6.5. Procedimento geral para a preparação do éster [3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-il)amino]-7-heptanoato-(6-hexanoato de etila) (**3g**)



Em um balão com uma barra magnética e um condensador simples, foram dissolvidos 300 mg do ácido-6-bromo-hexanóico em 10 ml de etanol. À esta solução foram adicionados 0,15 ml de H_2SO_4 concentrado como catalisador da reação. A reação foi deixada sob refluxo (78°C) e foi acompanhada via CCD. Após uma hora observou-se o consumo total do material de partida e foi realizada uma extração líquido-líquido. O bruto foi diluído 40 ml de acetato de etila, em seguida a fase orgânica foi lavada com 3 x 20 ml de água deionizada e 10 ml de uma solução 10% de Na_2CO_3 . As frações foram secas utilizando Na_2SO_4 e o solvente removido em rotaevaporador, 88% de rendimento. O óleo obtido foi caracterizado por RMN de ^1H (CDCl_3-d , 300 MHz, TMS): δ (ppm) = 1,27 (t, 3H, J = 23,9 Hz); 1,43 – 1,54 (m, 2H); 1,67 (tt, 2H, J = 23,4 e 26,4 Hz); 1,89 (qt, 2H, J = 23,7 Hz); 2,33 (t, 2H, J = 24,4 Hz); 3,42 (t, 2H, J = 22,5 Hz) e 4,14 (q, 2H, J = 23,8 Hz).

À uma solução de Tianeptina 211,46 mg (0,5 mmol) em MeCN (10 ml) foram adicionados 1,1 equivalentes do ácido derivatizado. Em seguida, sob agitação vigorosa

foram adicionados 1,5 equivalentes de Na_2CO_3 . O balão reacional foi acoplado com um condensador simples e a reação foi aquecida a 65°C até que não se observassem mais mudanças na CCD. Após 48 horas de reação o solvente foi removido em rotaevaporador e o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano e acetato de etila como fase móvel em um gradiente iniciado por uma mistura 80:20 dos solventes e aumentou-se a polaridade até 40:60. Óleo amarelo claro, 10% de rendimento. IV (KBr, cm^{-1}): 3330; 3070; 2930; 2860; 1730; 1585; 1470; 1335; 1150 e 580. RMN de ^1H (CDCl_3 -*d*, 500 MHz, TMS): δ (ppm) = 1,25 (t, 3H, $J = 14,2$ Hz); 1,27 – 1,33 (m, 4H); 1,35 – 1,41 (m, 2H); 1,44 – 1,52 (m, 2H); 1,55 – 1,69 (m, 6H); 1,91 (sl, NH); 2,26 (t, 2H, $J = 15,2$ Hz); 2,30 (t, 2H, $J = 15,2$ Hz); 2,46 (t, 2H, $J = 14,7$ Hz); 3,37 (s, 3H); 4,05 (t, 2H, $J = 13,2$ Hz); 4,12 (q, 2H, $J = 14,3$ Hz); 5,00 (s, 1H); 7,27 – 7,32 (m, 1H); 7,34 – 7,41 (m, 3H); 7,42 – 7,49 (m, 2H) e 7,96 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz). RMN de ^{13}C (APT) (CDCl_3 -*d*, 125MHz, TMS): δ (ppm) = 173,8 (C=O); 173,6 (C=O); 140,3, 138,6, 138,5, 136,8 e 134,2 (C4'a, C6'a, C10'a, C11'a e C3'); 132,2, 131,2, 130,1, 129,3, 128,4, 128,1 e 127,9 (C2', C1', C10', C8', C9', C7' e C4'); 66,1 (C11'); 64,1 (C14); 60,3 (C8); 48,1 (C1); 38,7 (CH_3); 34,2 (C6); 34,1 (C12); 29,9 (C9); 29,0 (C2); 28,3 (C4); 26,9 (C3); 25,5 (C11); 24,8 (C5); 24,6 (C10) e 14,2 (C15).

λ_{max} (CHCl_3) = 273 nm, $\epsilon = 2200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

7. REFERÊNCIAS

1. WORLD Health Organization: Depression. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>> Acesso em: 16/11/15.
2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PSIQUIATRIA: Depressão, o mal do século XXI – Disponível em: < <http://abp.org.br/portal/clippingsis/exibClipping/?clipping=3343> > – acesso em: 16/11/15.
3. PACHER, P.; KECSKEMETI, V.: **Trends in the Development of New Antidepressants. Is there a Light at the End of the Tunnel?** *Curr Med Chem*, 11, 7, 925-943, 2004.
4. MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. M.: **Psicofarmacologia de Antidepressivos.** *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 21, 24-40, 1999.
5. MALEN, C.; DANRÉE, B.; POIGNANT, J. C.; Grã-Bretanha. **Nouveaux Dérivés Tricycliques et Leur Procédé de Preparation.** FR2104728. 7 set 1971, 21 abr 1972. Science Union et Cie Societe Francaise de Recherche Medicale, França. 9p.
6. TIANEPTINE: Disponível em: < <http://www.tianeptine.com> > Acesso em: 23/09/2015.
7. WAGSTAFF, A. J.; ORMROD, D.; SPENCER, C. M.: **Tianeptine: a review of its use in depressive disorders.** *CNS Drugs*, 15, 3, 231-259, 2001.
8. MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S.; DIAMOND, D. M.; JAY, T. M.; REAGAN, L. P.; SVENNINGSSON, P.; FUCHS, E.: **The neurobiological properties of tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation.** *Molecular Psychiatry* 15, 237–249, 2010.
9. LACONDE, G., DEPREUX, P., BERTHELOT, P., POMMERY, N., HÉNICHART, JP.: **New antiproliferative benzoindolothiazepines derivatives.** *Eur J Med Chem*. 40, 167-172, 2005.
10. CHU, C. C., WANG, J. J., CHEN, K. T., SHIEH, J. P., WANG, L. K., SHUI, H.A., HO, S. T., **Neurotrophic Effects of Tianeptine on Hippocampal Neurons: A Proteomic Approach.** *Journal of Proteome Research*. 2, 937, 2010.
11. SCIENTIFIC American: Is Depression Just Bad Chemistry? Disponível em: < <http://www.scientificamerican.com/article/is-depression-just-bad-chemistry/> > Acesso em: 22/04/15.
12. FRAIZ, S. V. J.: Substâncias Psicotrópicas. Disponível em: < <http://web.ccead.puc-rio.br/condigital/mvsl/> > Acesso em: 25/02/15.
13. CORDIOLI, A. V.: Psicofármacos nos Transtornos Mentais. Disponível em: < <http://www.ufrgs.br/psiquiatria/psiq/textos.html> > Acesso em: 25/02/15.

14. PROZAC (Fluoxetina): Disponível em: <
http://www.medicinanet.com.br/bula/4347/prozac_fluoxetina.htm> Acesso em:
 27/11/15.
15. REYES, J. R.; CÁRDENAS, M.; MATSUMURA, D.; DOMÍNGUEZ, R. AYALA, M. E.: **Inhibition of serotonin reuptake in the prepubertal rat ovary by fluoxetine and effects on ovarian functions.** *Reproductive Toxicology*. In Press, 2016.
16. ANDRADE, S. E.; RAEBEL, M. A.; BROWN, J.; LANE, K.; LIVINGSTON, J.; ROBLIN, D.; SMITH, D. H.; WILLY, M. E.; STAFFA, J. A.; PLATT, R.: **Use of antidepressants medications during pregnancy: a multisite study.** *A. J. of Obstet. And Gynecol.* 198, 2, 194.e1 – 194.e5, 2008.
17. STAHL, S. M.: **Stahl's Essential Psychopharmacology: neuroscientific basis and practical application.** Fourth edition. United Kingdom. Cambridge University Press, 2013, 626p.
18. LABRID, C.; MOLYERE, J.; POIGNART, J. C.; MALEN, C.; MOCAER, E.; KAMOUN, A.: **Structure-activity relationships of tricyclic antidepressants, with special reference to tianeptine.** *Clin Neuropharmacol.* 11, 21-31, 1988.
19. OLUYOMI, A. O.; DALTA, K. P.; CURZON, G.: **Effects of the (+) and (-) Enantiomers of the Antidepressant Drug Tianeptine on 5-HTP-induced Behavior.** *Neuropharmacology.* 3, 383-387, 1997.
20. LEBEGUE, N.; FLOUQUET, N.; BERTHELOT, P.; PFEIFFER, B.; RENARD, P.: **Novel dibenzothiazepines without substitution on the sulfonamide group.** *Synthetic Communications.* 32, 18, 2877-2884, 2002.
21. CAMPO, L. F.; ROESLER, R.; KAPCZINSKI, F. P.; BLANK, M.; DE LIMA, M. N. M.: **Derivados de Tianeptina, composições farmacêuticas, uso, e processo para sua produção.** WO2013029136A1. 27 Ago 2012, 7 Mar 2013. Organização Mundial da Propriedade Intelectual – Secretaria Internacional. Brasil. 33p.
22. WOO, Y.S.; BAHK, W.M.; JEONG, J.H.; LEE, S. H.; SUNG, H.M.; PAE, C.U.: **Tianeptine combination for partial or non-response to selective serotonin re-uptake inhibitor monotherapy.** *Psychiatry Clin. Neurosci.* 67, 219–227, 2013.
23. GASSAWAY, M. M.; RIVES, M. L.; KRUEGEL, A. C.; JAVITCH, J. A.; SAMES, D.: **The atypical antidepressant and neurorestorative agent Tianeptina is a μ -opioid receptor agonist.** *Transl. Psychiatry.* e411, 1-5, 2014.
24. CARTER, D. C.; HO, J. X.: **Structure of Serum Albumin.** *Adv. Prot. Chem.* 45, 153-203, 1994.
25. PISONI, D. S.; ABREU, M. P.; PETZHOLD, C. L.; RODEMBUSCH, F. S.; CAMPO, L. F.: **Synthesis, photophysical study and BSA association of water-insoluble squaraine dyes.** *J Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* 252, 77-83, 2013.

26. LI, X.; JIANG, J. H.; XIAO, S. X.; GU, H. W.; LI, C. H.; YE, L. J.; LI, X.; HE, D. G.; YAO, F. H.; LI, Q. G.: **Synthesis, thermodynamic properties and BSA interaction of a new Valen Schiff base derived from *o*-vanillin and trimethoprim.** *Thermochimica Acta.* 575, 291-299, 2014.
27. ZHU, Y.; LI, B.; YIN, H.; GE, S.; YU, J.: **Analysis of the interaction of a new series of rhodamine derivatives with bovine serum albumin by fluorescence quenching.** *Monatsh Chem.* 145, 167-173, 2014.
28. ABDELHAMEED, A. S.; ALANAZI, A. M.; KADI, A. A.: **Spectrofluorimetric study of finasteride and bovine serum albumin interaction and its application for quantitative determination of finasteride in tablet dosage form.** *Anal. Methods.* 7, 50, 96-102, 2015.
29. SEETHARAMAPPA, J.; KAMAT, B. P.: **Spectroscopic Studies on the Mode of Interaction of an Anticancer Drug with Bovine Serum Albumin.** *Chem. Pharm. Bull.* 52, 9, 1053-1057, 2004.
30. LU, R.; LI, W. W.; KATZIR, A.; RAICHLIN, Y.; YU, H. Q.; MIZAIKOFF, B.: **probing the secondary structure of bovine serum albumin during heat-induced denaturation using mid-infrared fiberoptic sensors.** *Analyst.* 140, 765-770, 2015.
31. PATRA, S.; SANTHOSH, K.; PABBATHI, A.; SAMANTA, A.: **Diffusion of organic dyes in bovine serum albumin solution studied by fluorescence correlation spectroscopy.** *RSC Advances.* 2, 6079-6086, 2012.
32. PROTEIN Data Bank: Serum albumin. Disponível em: < <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4F5S> > Acesso em: 26/11/15.
33. ALANAZI, A. M.; ABDELHAMEED, A. S.: **A Spectroscopic Approach to Investigate the Molecular Interactions between the Newly Approved Irreversible ErbB Blocker “Afatinib” and Bovine Serum Albumin.** *PLOS ONE.* 11, 1-12, 2016.
34. TANG, M. GUO, Y.; GAO, Y.; TANG, C.; DANG, X.; ZHOU, Z.; SUN, Y.; WANG, K.: **Albumin’s Influence on Carprofen Enantiomers-Hymecromone Interaction.** *Chirality.* In Press, 2016.
35. FRAGOSO, V. M. S.; COURA, C. P. M.; HOPPE, L. Y.; SOARES, M. A.; SILVA, D.; CORTEZ, C. M.: **Binding to Sulpiride to Seric Albumins.** *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1, 59, 2016.
36. PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R., **Introduction to Spectroscopy.** 4^a ed. United States of America: CENGAGE Learning, 2008. 745p.
37. WARDLE, B.: **Principles and Applications of Photochemistry.** United Kingdom. John Wiley & Sons, Ltd, 2009, 250p.
38. LAKOWICZ, J. R.: **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** Third edition. United States of America, Springer, 2006, 961p.

39. PISONI, D. S.; TODESCHINI, L.; BORGES, A. C. A.; PETZHOLD, C. L.; RODEMBUSCH, F. S.; CAMPO, L. F.: **Symmetrical and asymmetrical cyanine dyes. Synthesis, spectral properties, and BSA association study.** *J Org Chem.* 79, 5511-5520, 2014.
40. XUE, J. J.; CHEN, Q. Y.: **The interaction between ionic liquids modified magnetic nanoparticles and bovine serum albumin and the cytotoxicity to HepG-2 cells.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Bimolecular Spectroscopy.* 120, 161-166, 2014.
41. LLOYD, J. B. F.; EVETT, I. W.: **Prediction of Peak Wavelengths and Intensities in Synchronously Excited Fluorescence Emission Spectra.** *Anal. Chem.* 49,12, 1710-1715, 1977.
42. MILLER, J. N.: **Recent Advances in Molecular Luminescence Analysis.** *Proc. Analyt. Div. Chem. Soc.* 16, 203-208, 1979.
43. ZHAO, X. F.; OUYANG, Y.; LIU, Y. Z.; SU, Q. J.; TIAN, H.; XIE, C. Z.; XU, J. Y.: **Two polypyridyl copper (ii) complexes: synthesis, crystal structure and interaction with DNA and serum protein *in vitro*.** *New J. Chem.* 38, 955-965, 2014.
44. OROLA, L.; VEIDIS, M. V.; SARCEVICA, I.; ACTINS, A.; BELYAKOV, S.; PLATONENKO, A.: **The effect of pH on polymorph formation of the pharmaceutically active compound tianeptine.** *Int. J. of Pharmaceutics.* 432, 50 – 56, 2012.
45. PLATZER, N.; BOUCHET, J. C.; MALEN, C.; LABRID, C.; MOCAER, E.: **¹H and ¹³C NMR Studies on the Antidepressant Drug Tianeptine.** *Magnetic Resonance in Chemistry.* 30, 1212-1219, 1992.
46. HENNIS, H. E.; THOMPSON, L. R.; LONG, J. P.: **Esters from reactions of alkyl halides and salts of carboxylic acids: comprehensive study of amine catalysis.** *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 7, 2, 96–101, 1968.
47. MERKER, R. L.; SCOTT, M. J.: **The Reaction of Alkyl Halides with Carboxylic Acids and Phenols in the Presence of Tertiary Amines.** *J. Org. Chem.* 26, 12, 5180–5182, 1961.
48. SHAW, J. E.; KUNERTH, D. C.: **Quantitative Conversion of Carboxylic Acids and Phenols to Esters and Ethers by Reaction of Their Salts with Alkyl Halides.** *J. Org. Chem.* 39, 13, 1968-1970, 1974.
49. WANG, Y. P.; WEI, Y. L.; DONG, C.: **Study on the interaction of 3,3-bis(4-hydroxy-1-naphthyl)-phthalide with bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* 177, 6–11, 2006.

8. ANEXOS

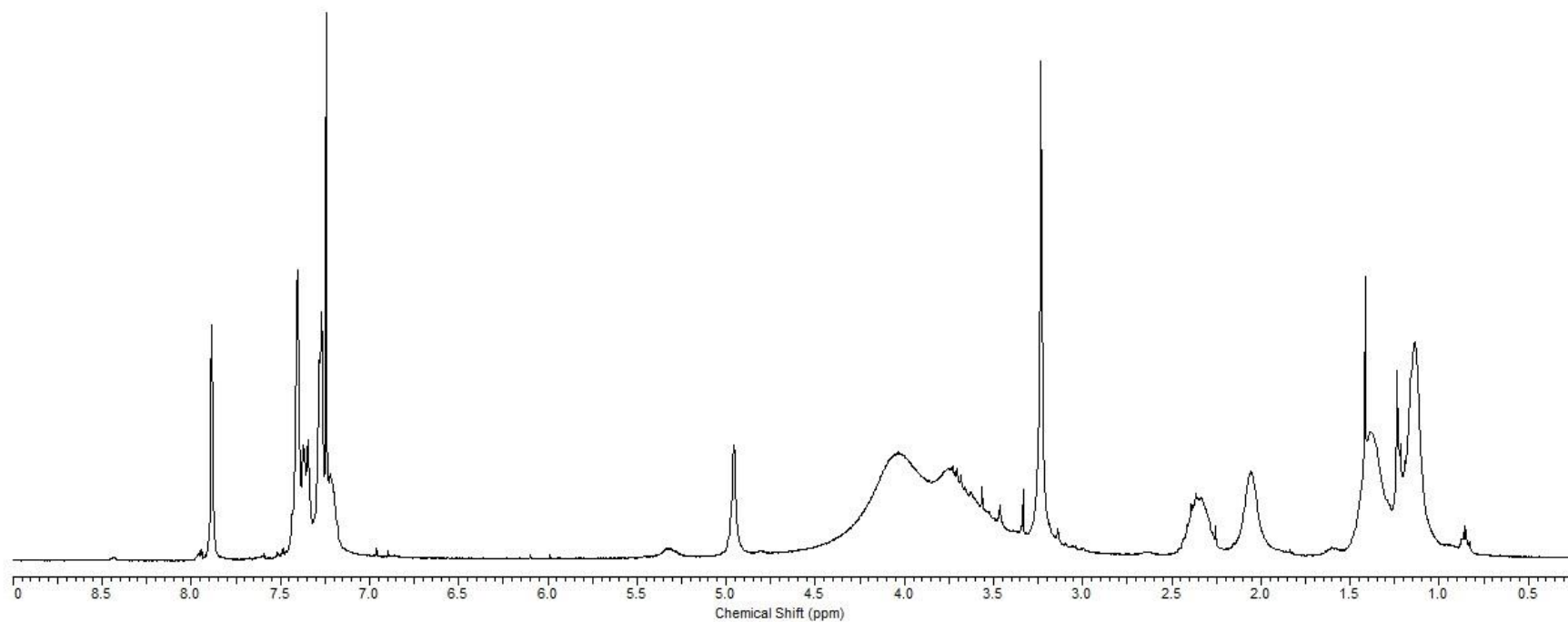


Figura 1A: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3-d) da Tianeptina comercial brutta.

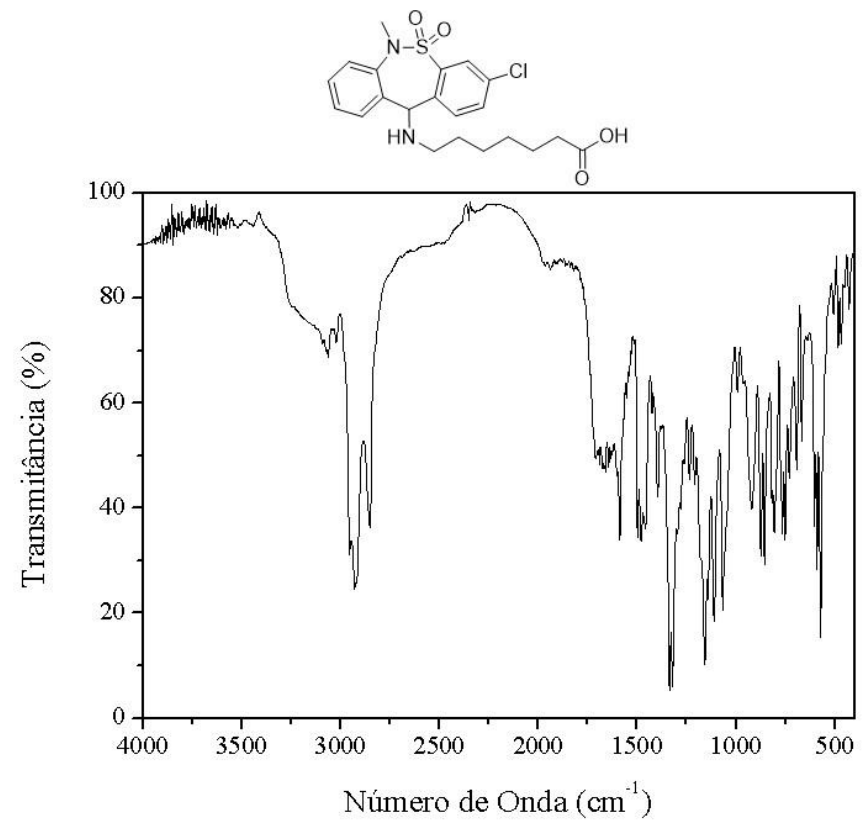


Figura 2A: Espectro de Infravermelho da Tianeptina purificada.

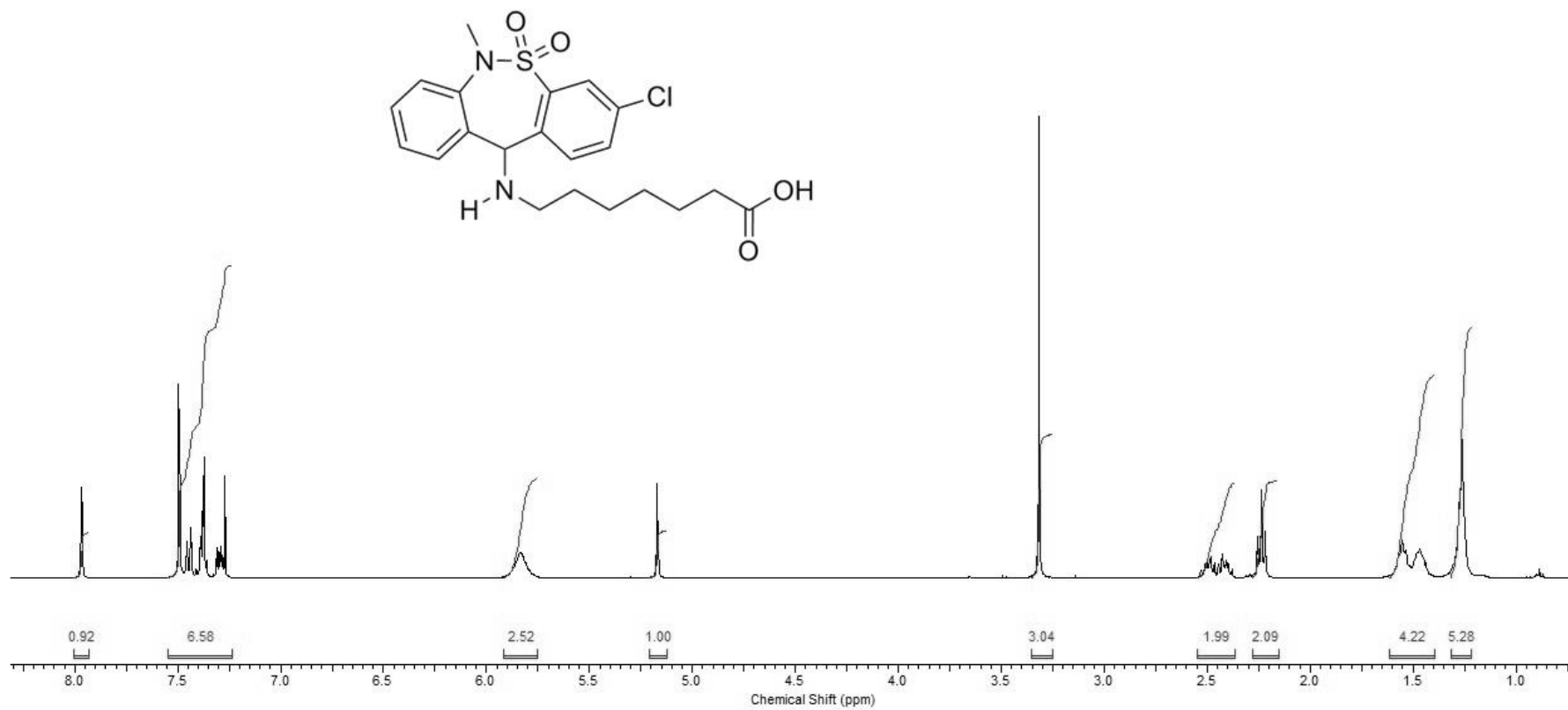


Figura 3A: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃-d) da Tianeptina após purificação.

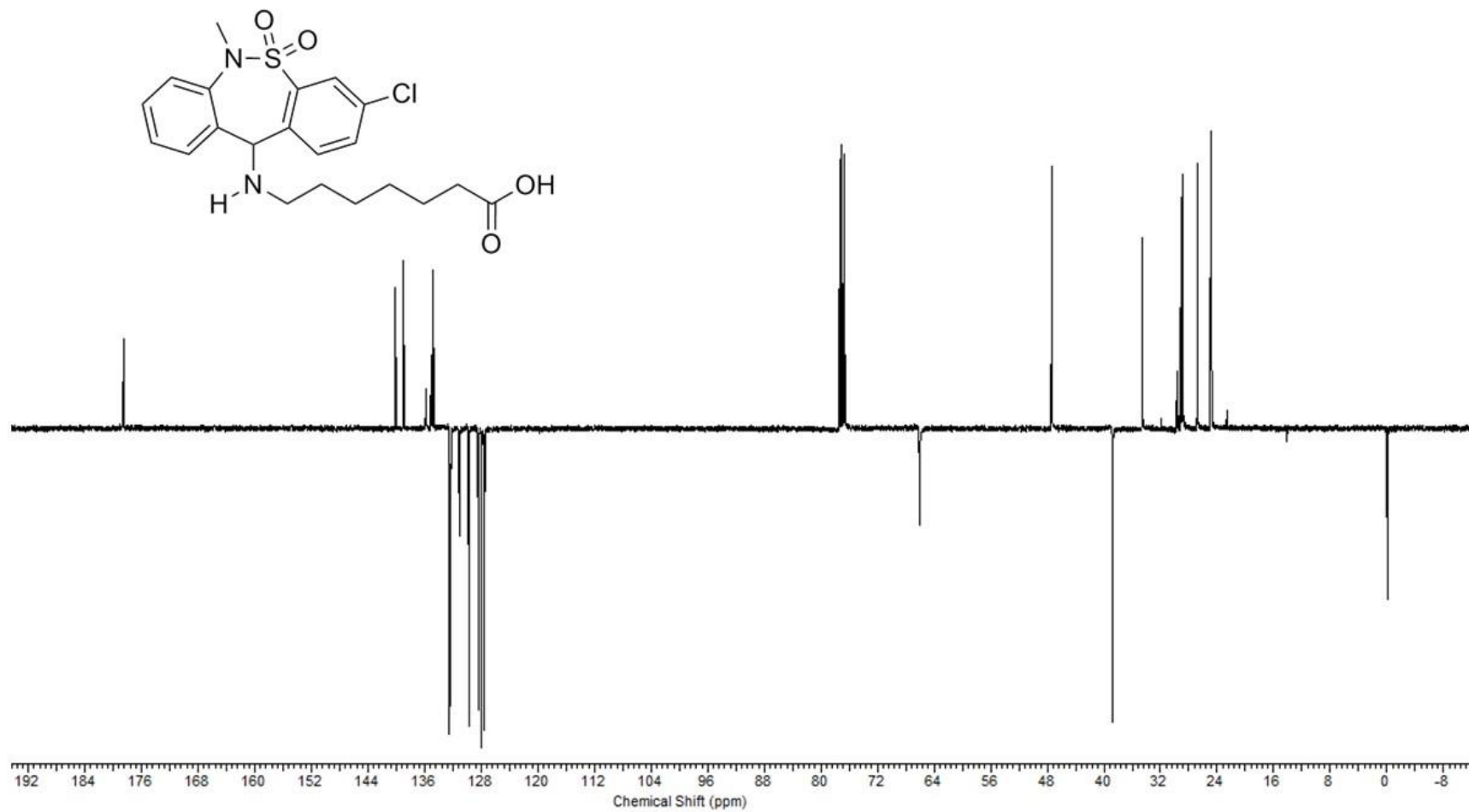


Figura 4A: Espectro de RMN de ¹³C - APT (75 MHz, CDCl₃-d) da Tianeptina após purificação.

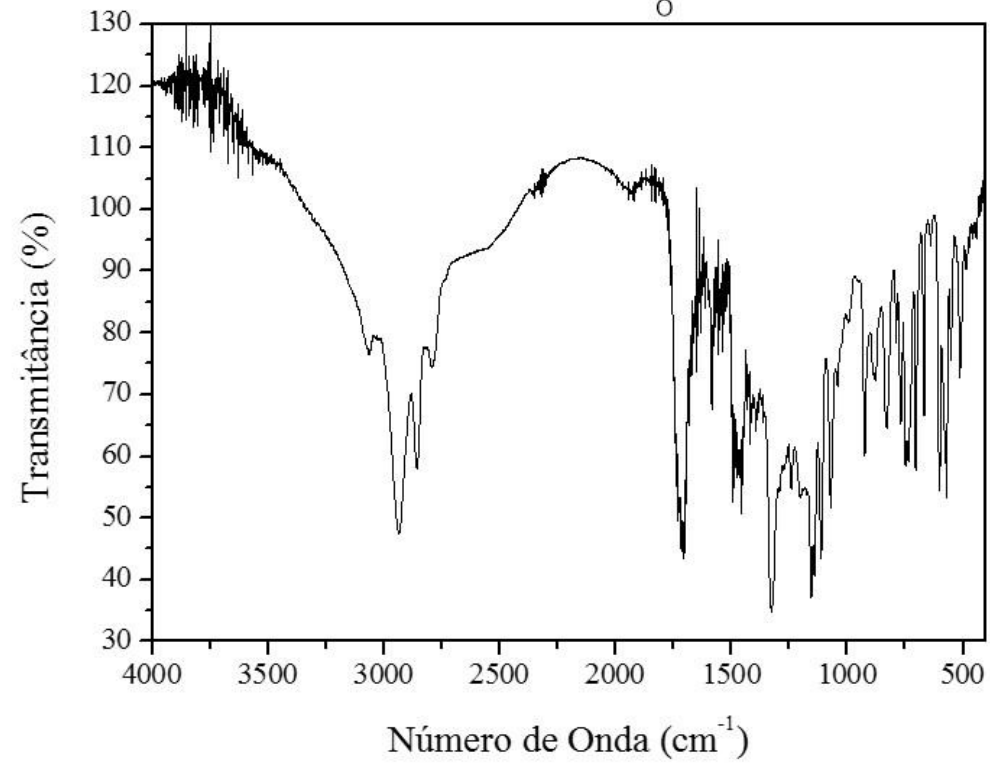
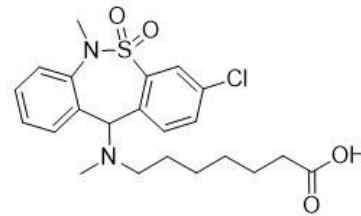


Figura 5A: Espectro de Infravermelho de **2** puro.

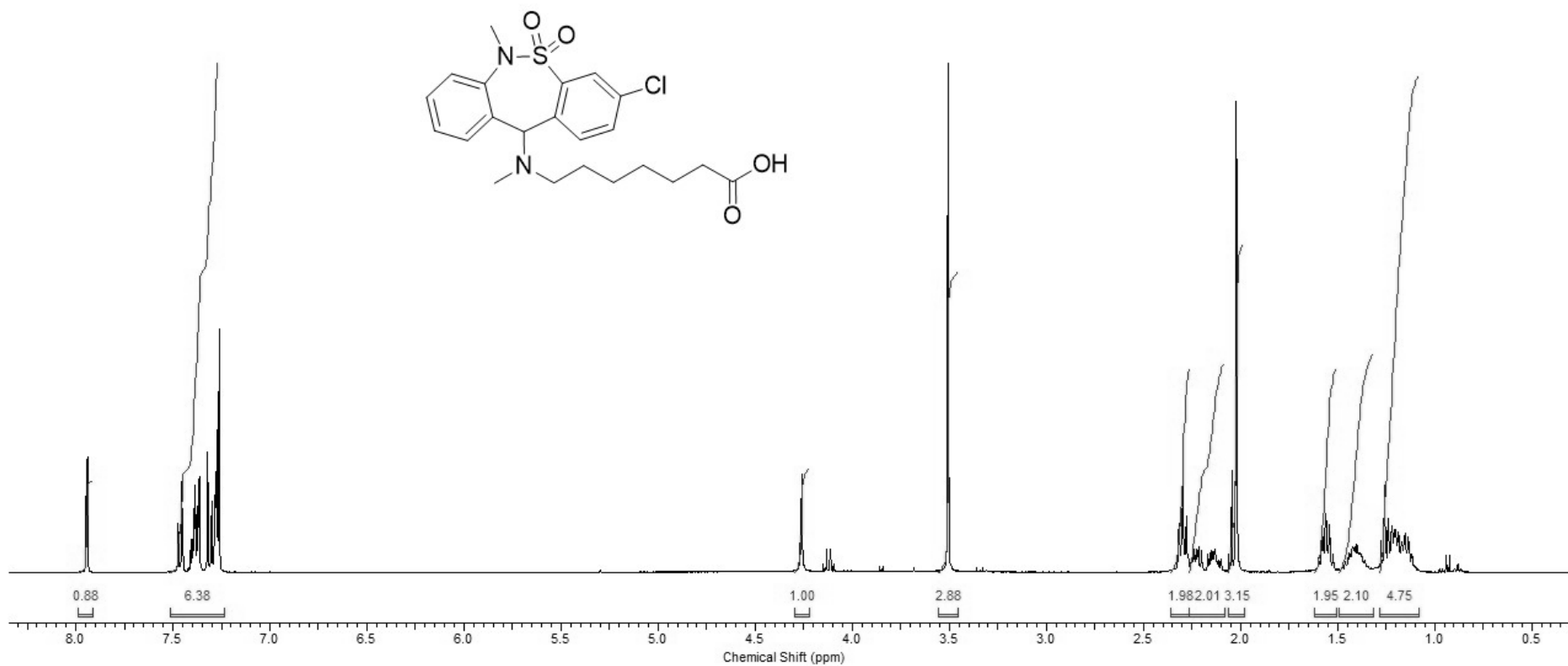


Figura 6A: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃-*d*) de **2**.

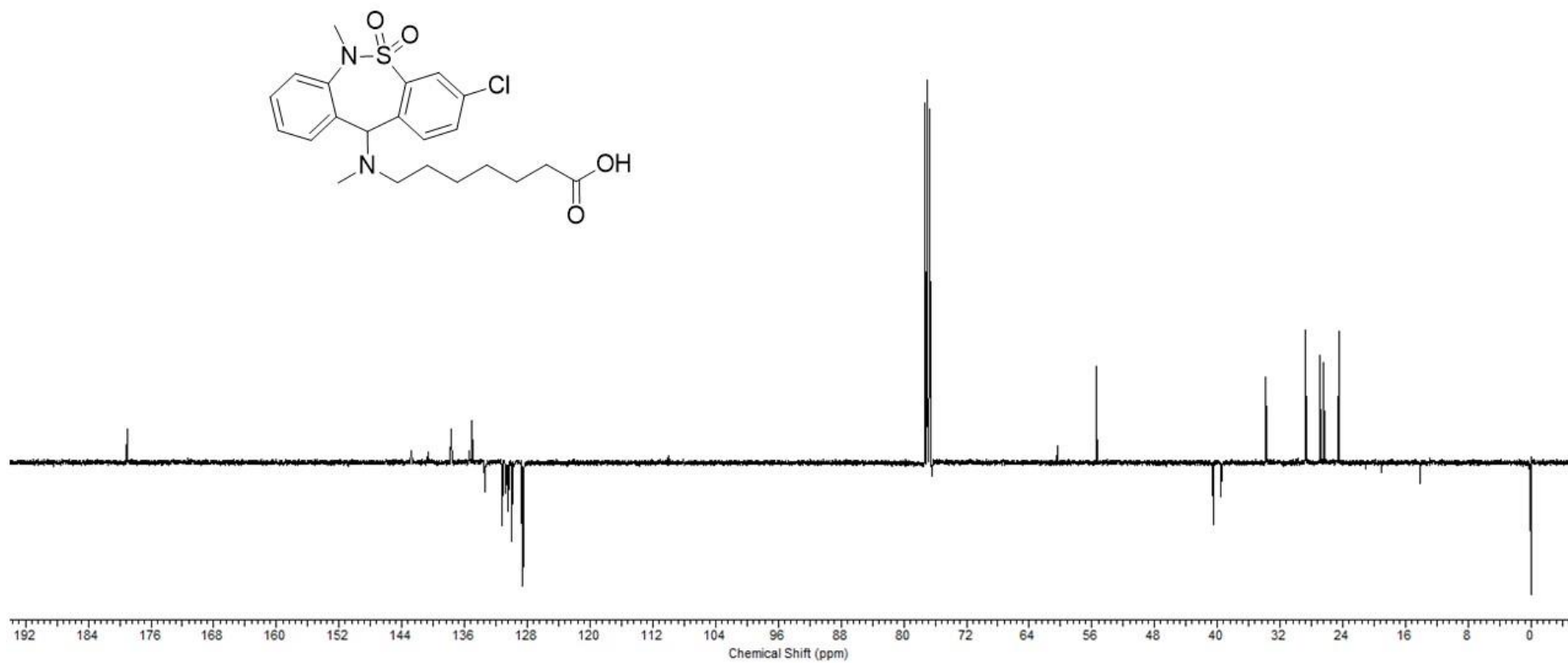


Figura 7A: Espectro de RMN de ^{13}C - APT (100 MHz, CDCl_3-d) de **2**.

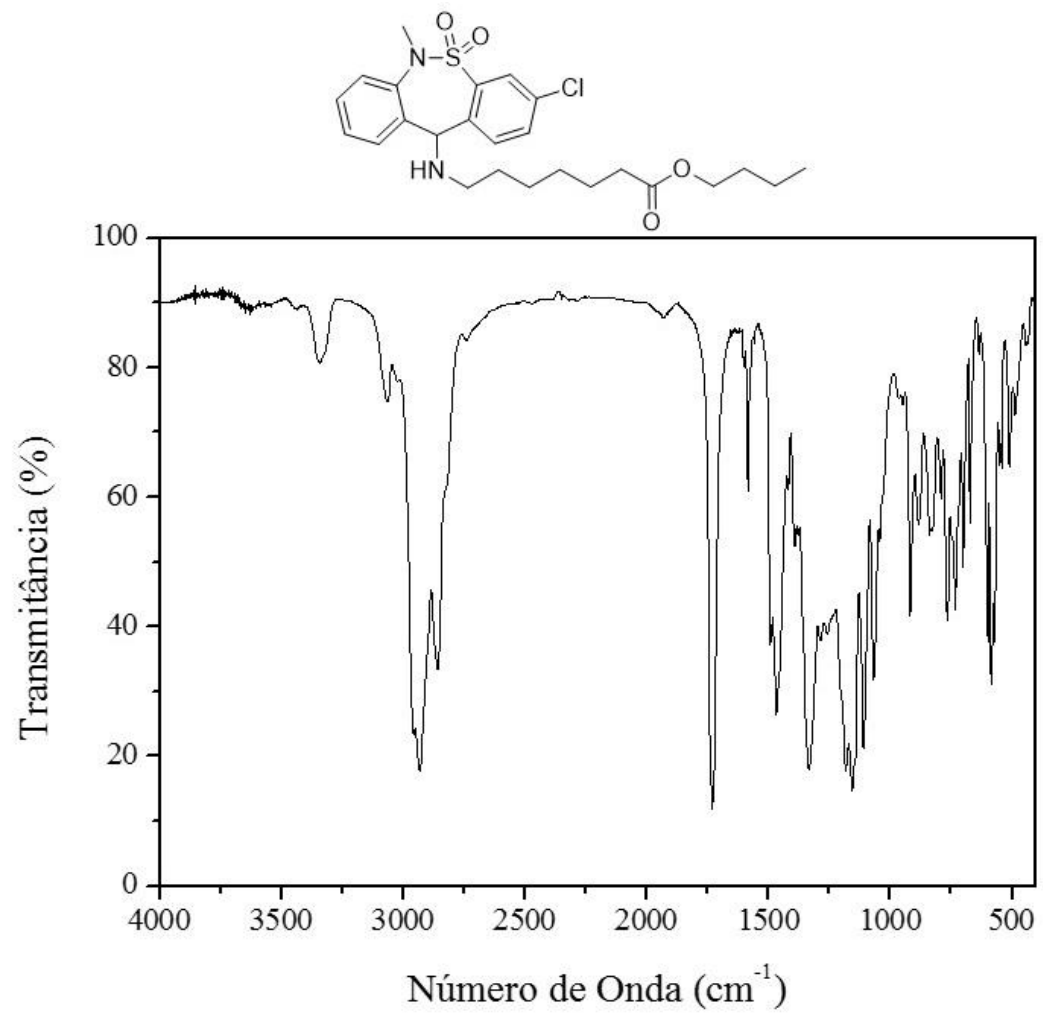


Figura 8A: Espectro de Infravermelho do éster **3a** puro.

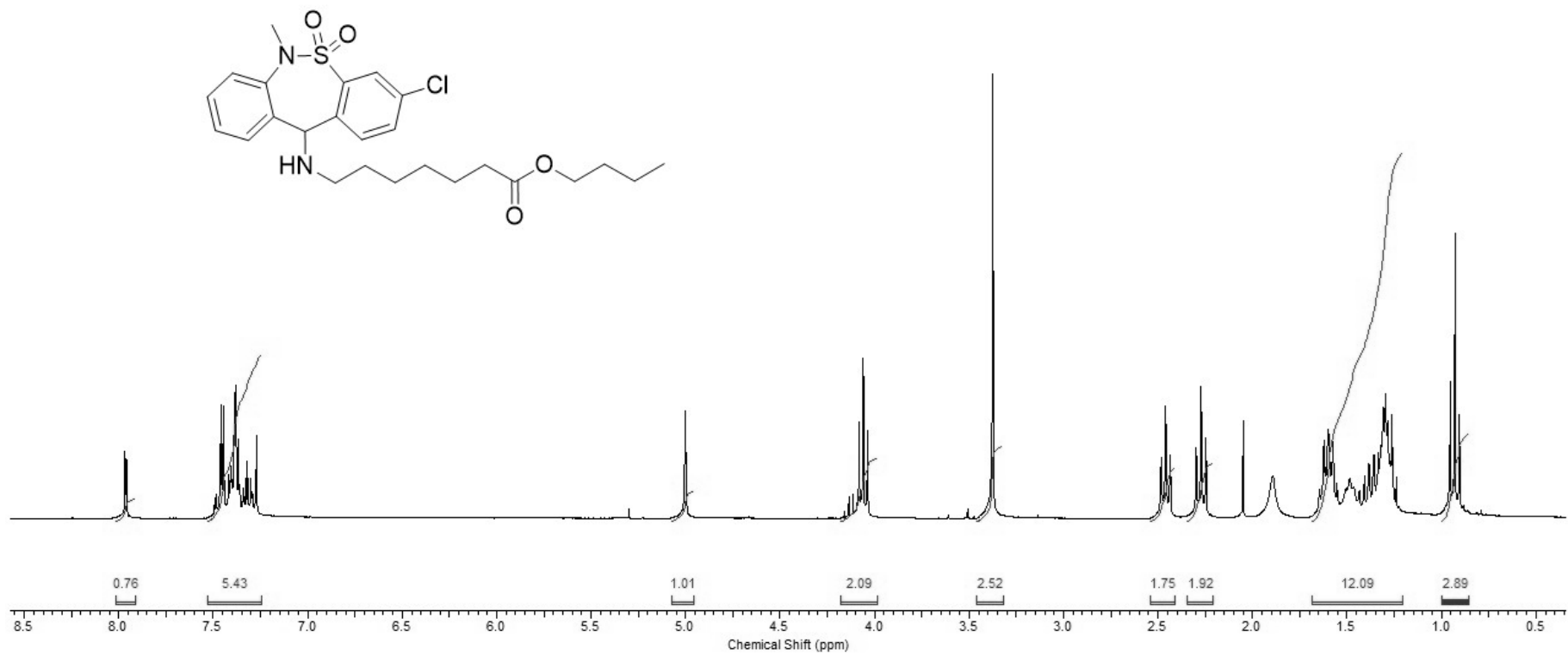


Figura 9A: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃-d) do éster **3a**.

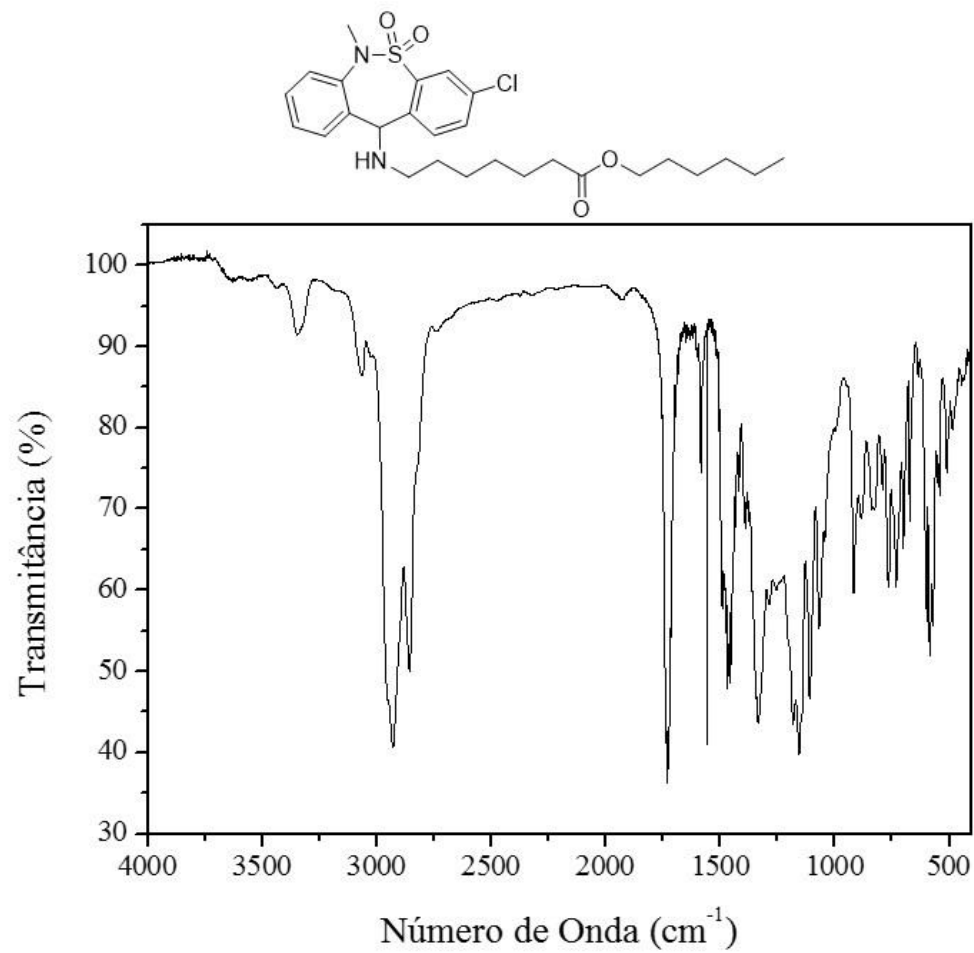


Figura 11A: Espectro de Infravermelho do éster **3b** puro.

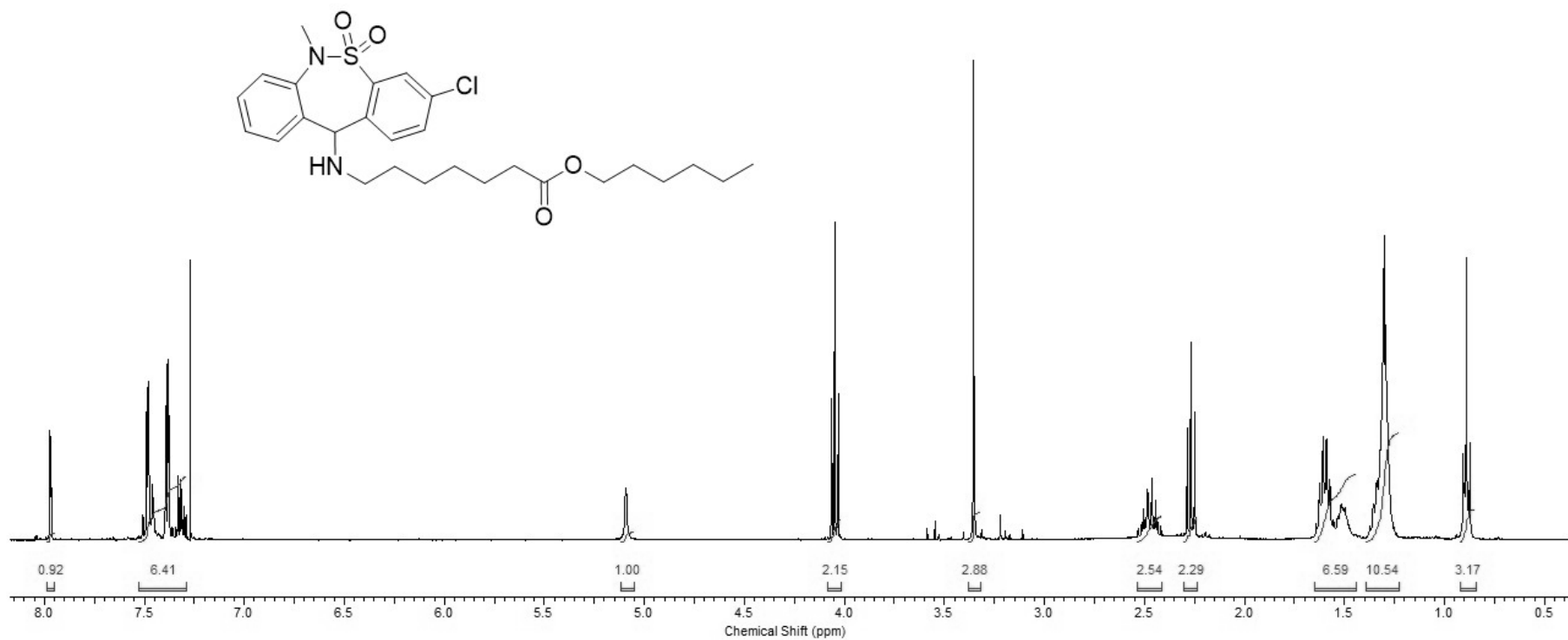


Figura 12A: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃-*d*) do éster **3b**.

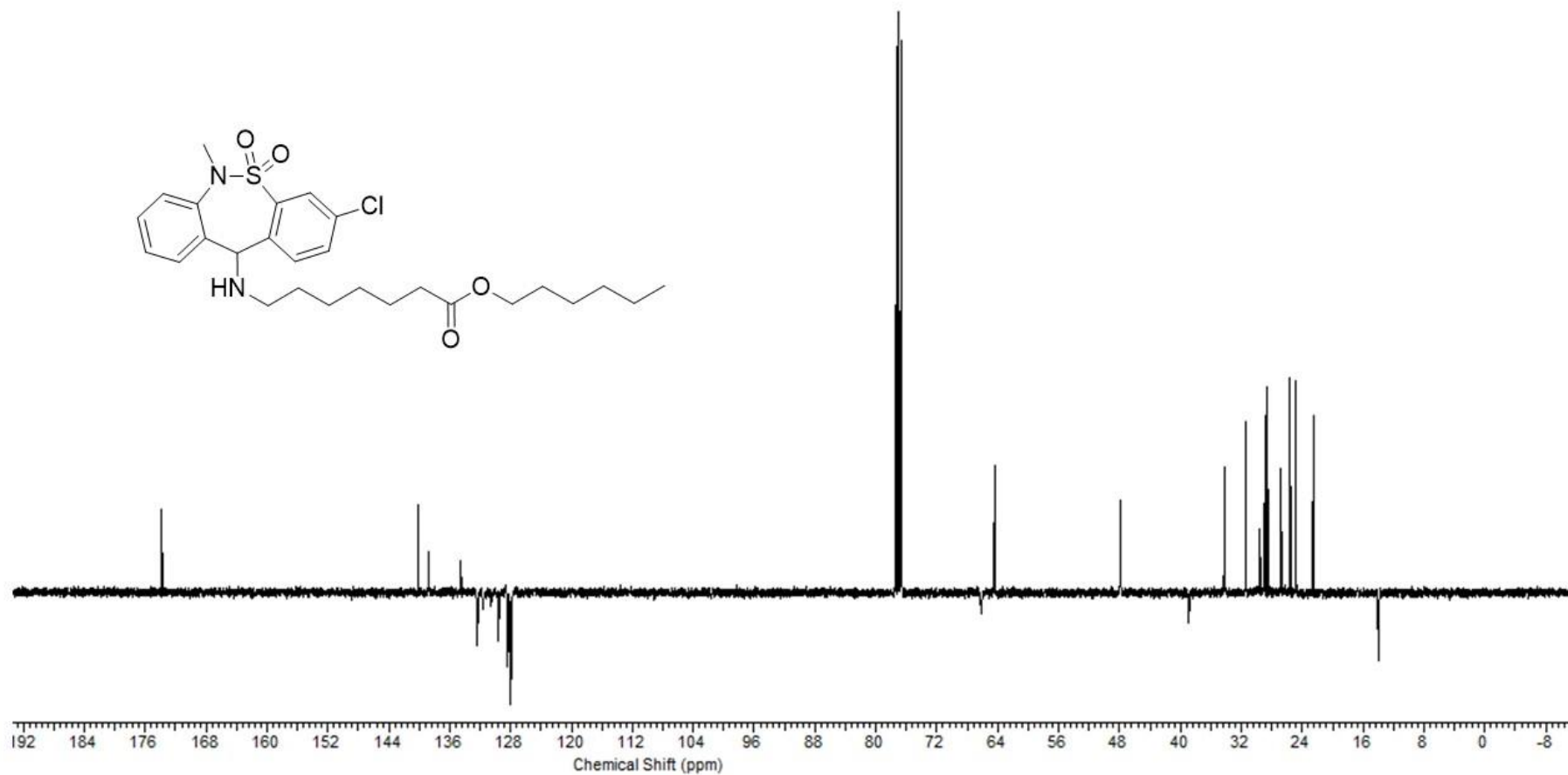


Figura 13A: Espectro de RMN de ¹³C - APT (100 MHz, CDCl₃-d) do éster **3b**.

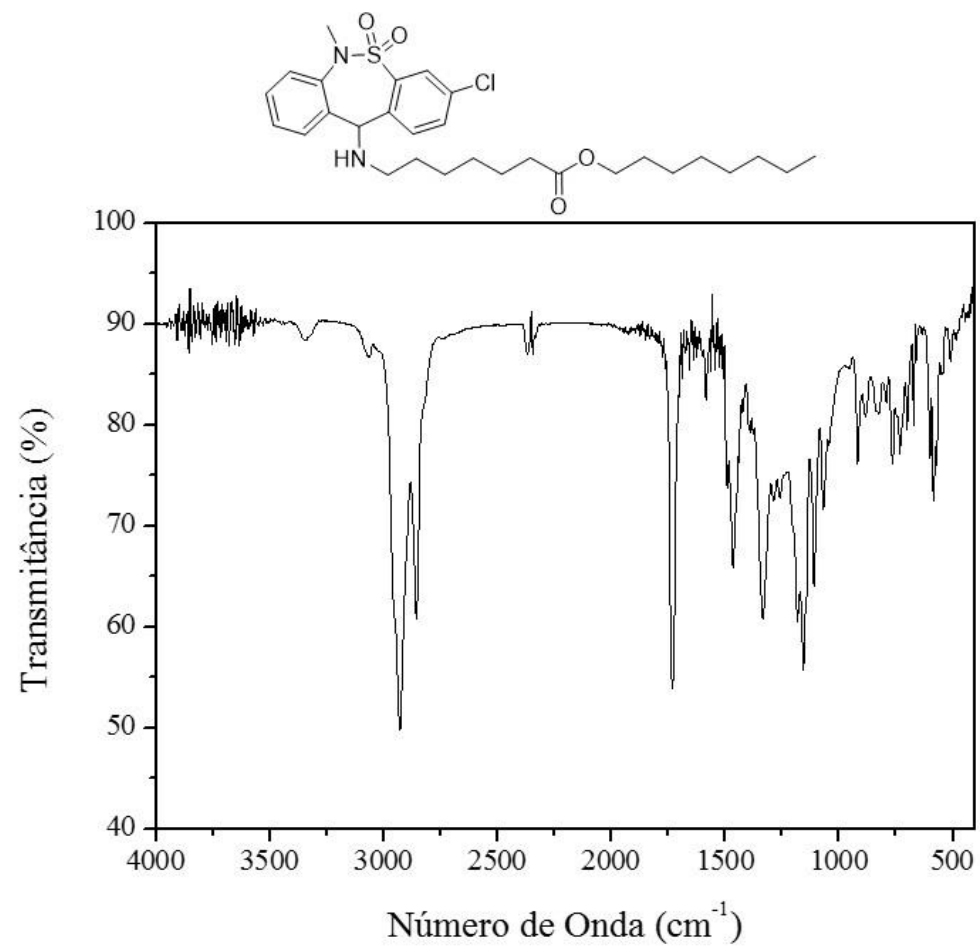


Figura 14A: Espectro de Infravermelho do éster **3c** puro.

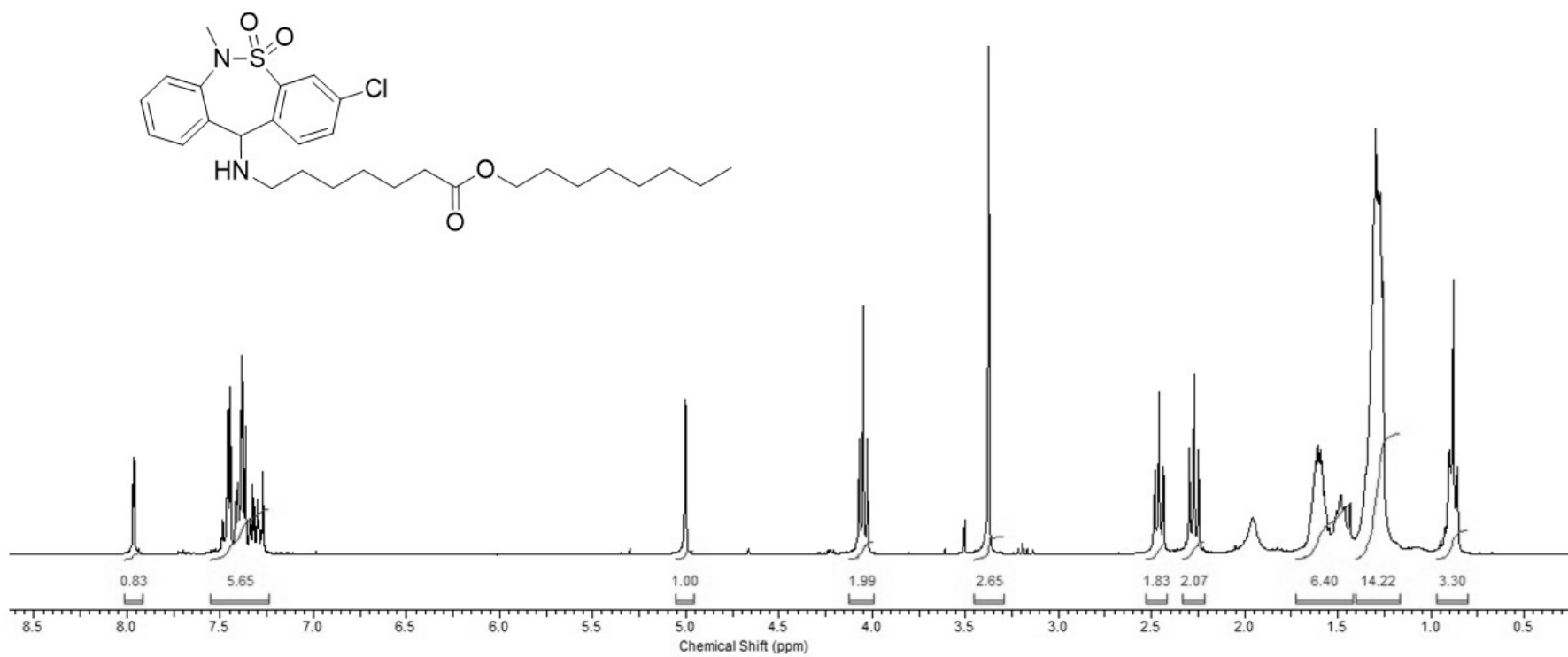


Figura 15A: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃-*d*) do éster 3c.

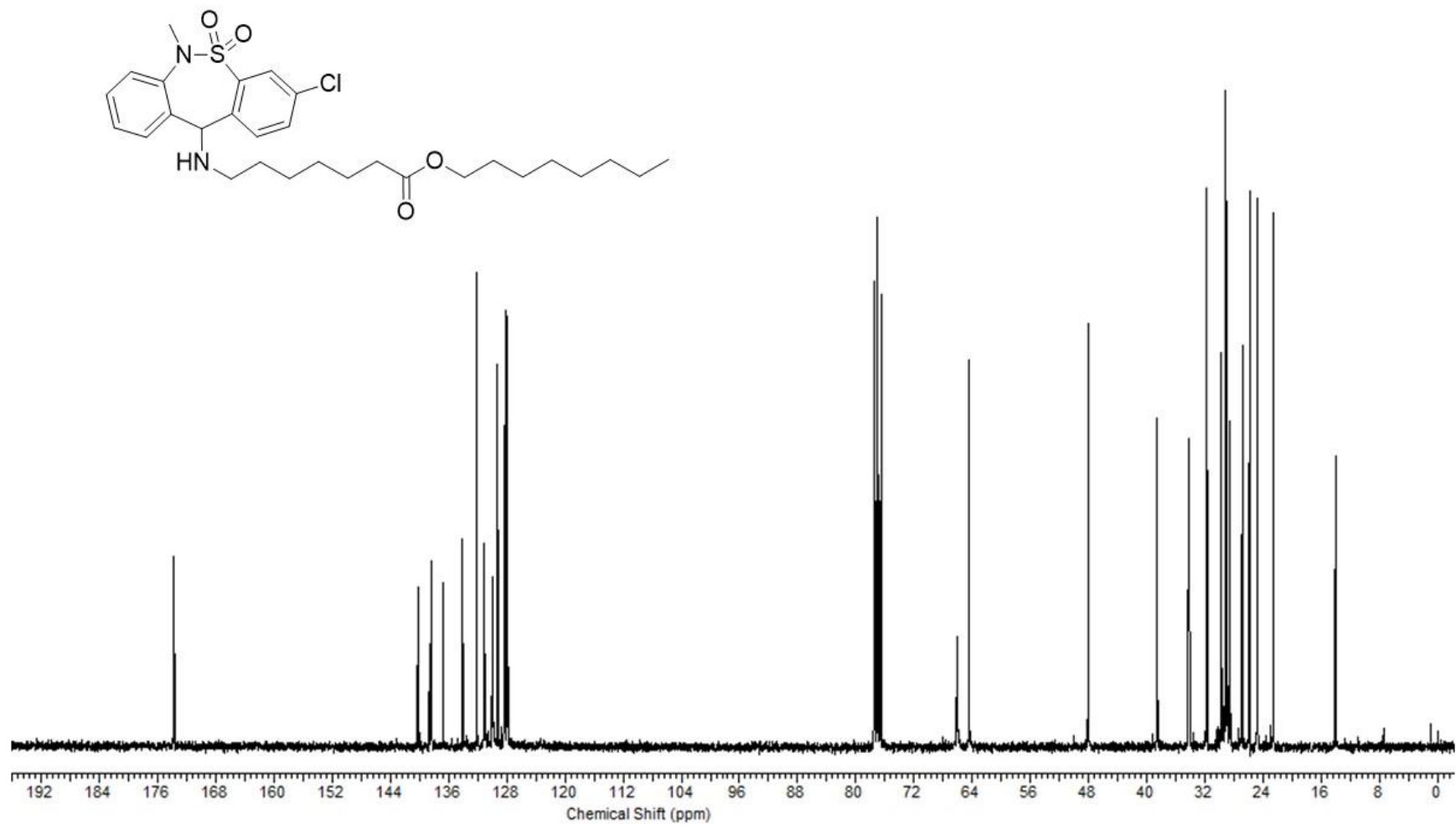


Figura 16A: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3-d) do éster **3c**.

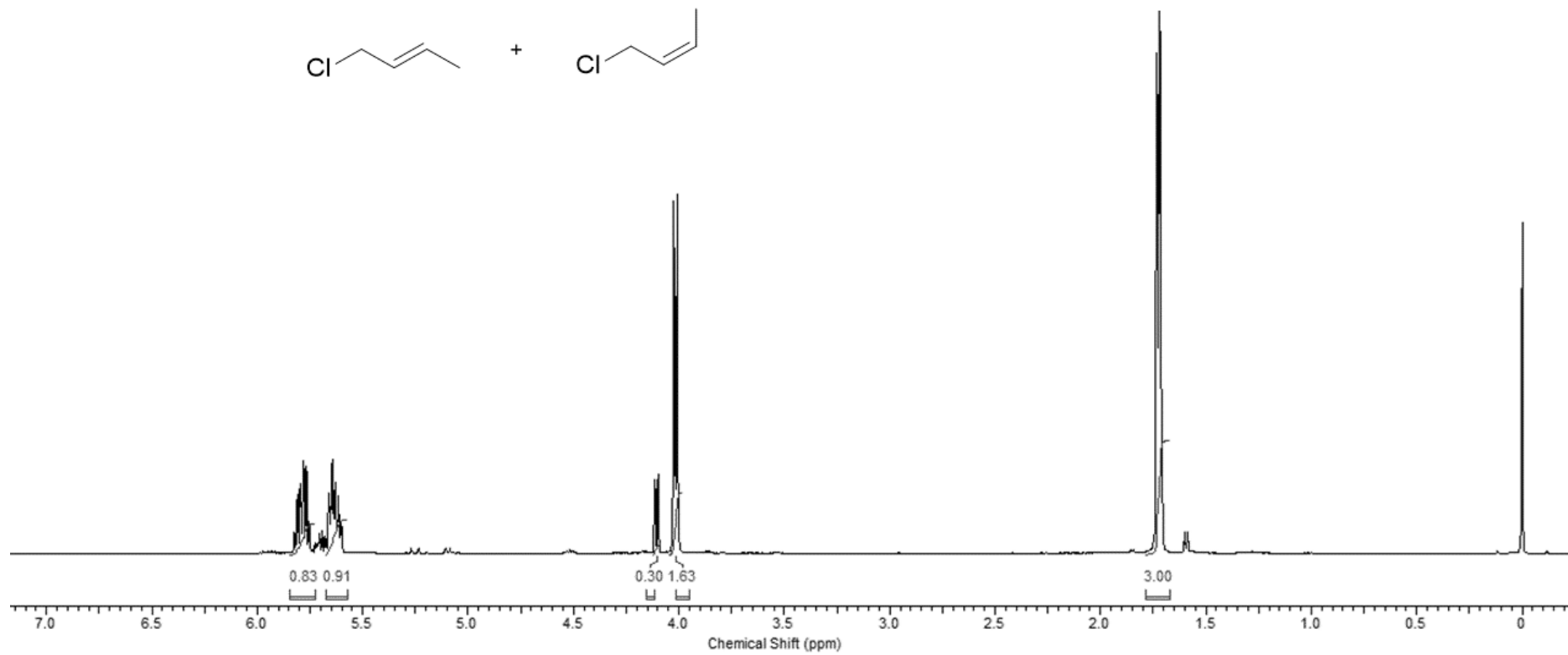


Figura 17A: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3-d) da mistura de isômeros *cis* e *trans* do 1-cloro-2-buteno.

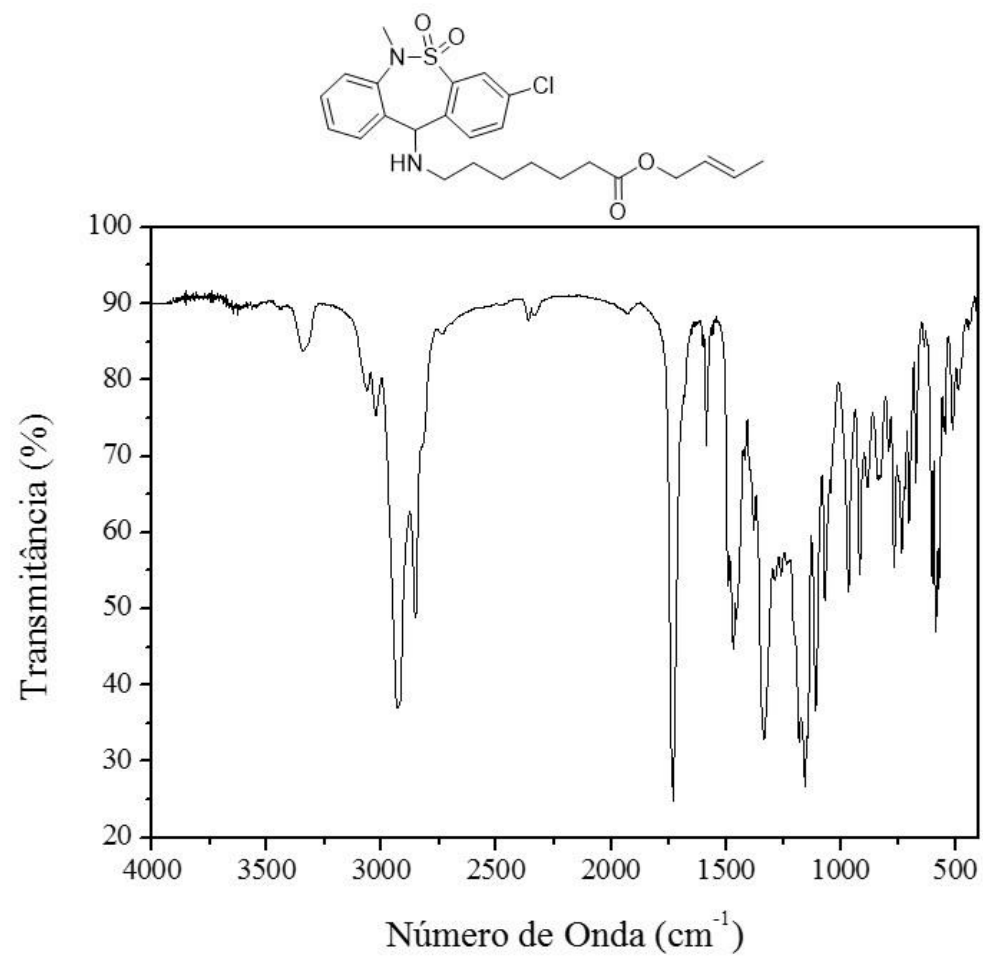


Figura 18A: Espectro de Infravermelho do éster **3d** puro.

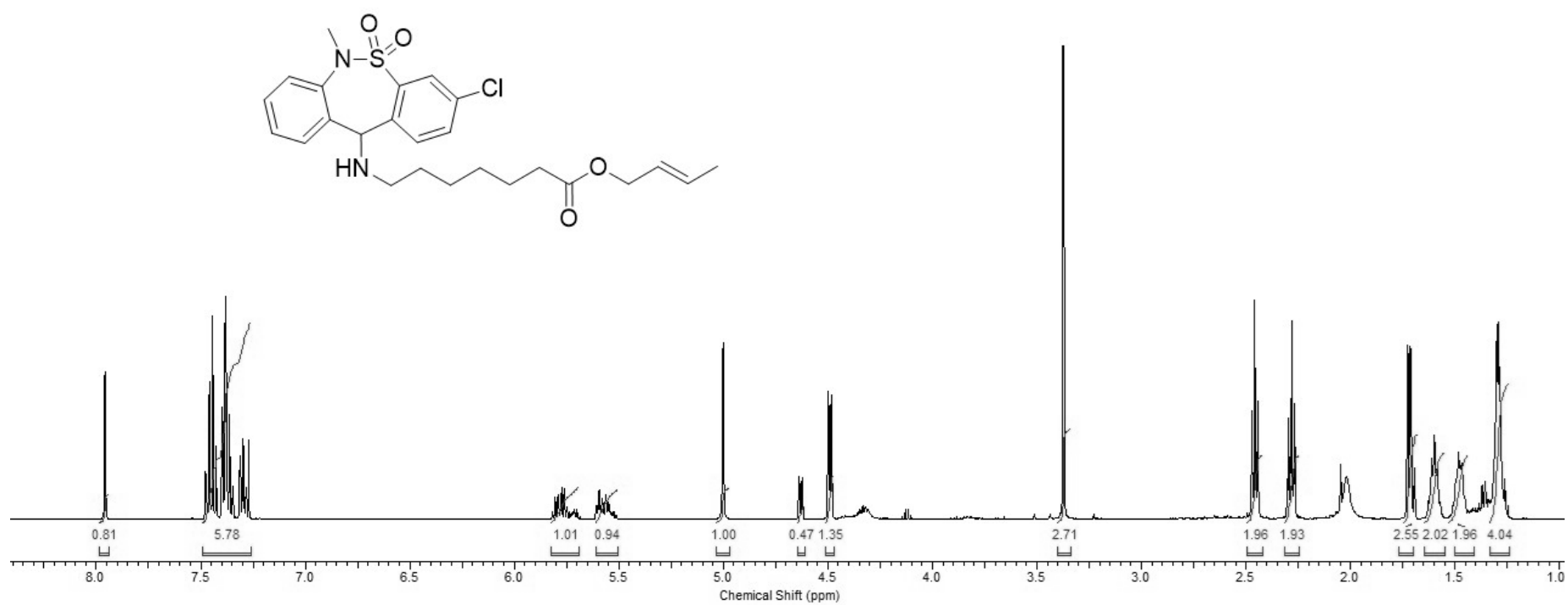


Figura 19A: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃-d) do éster **3d**.

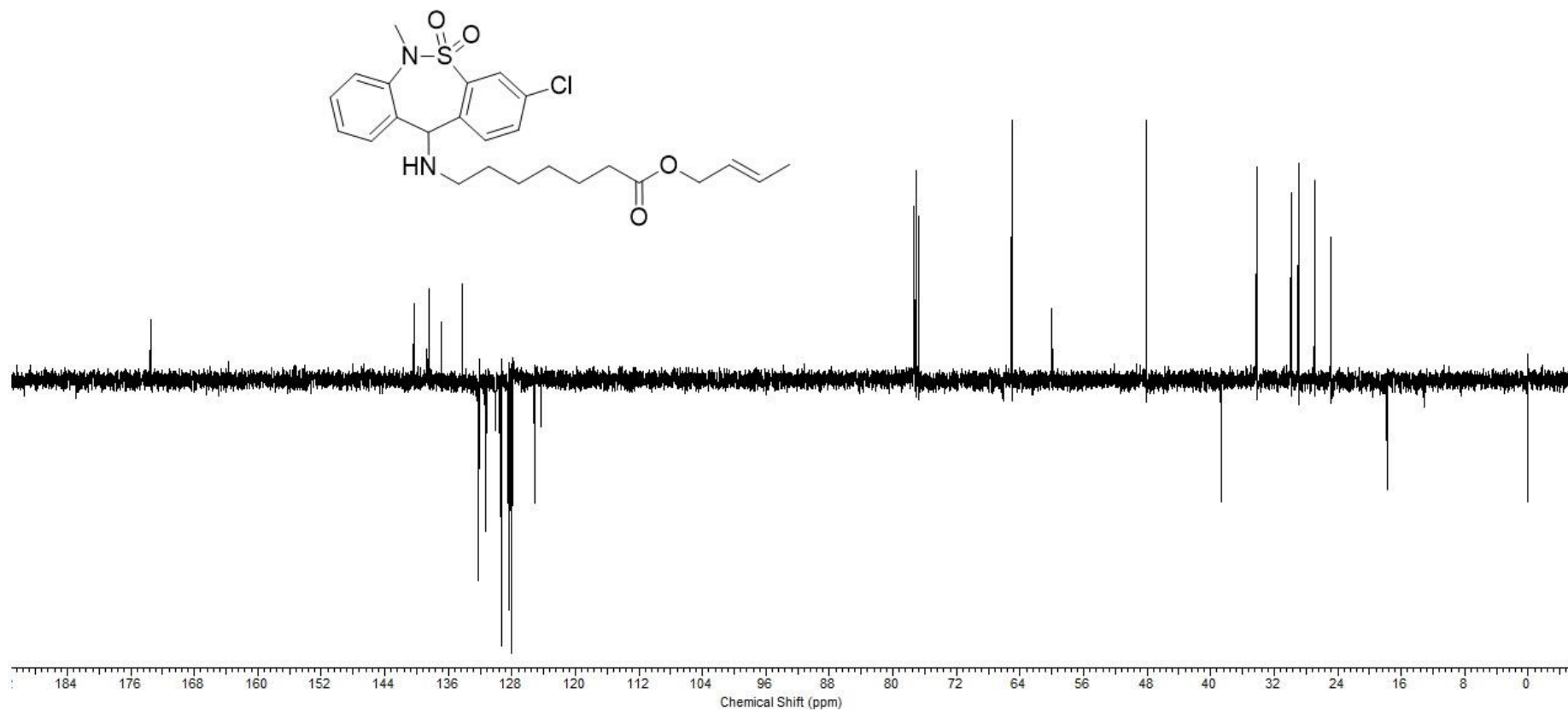


Figura 20A: Espectro de RMN de ¹³C - APT (125 MHz, CDCl₃-d) do éster **3d**.

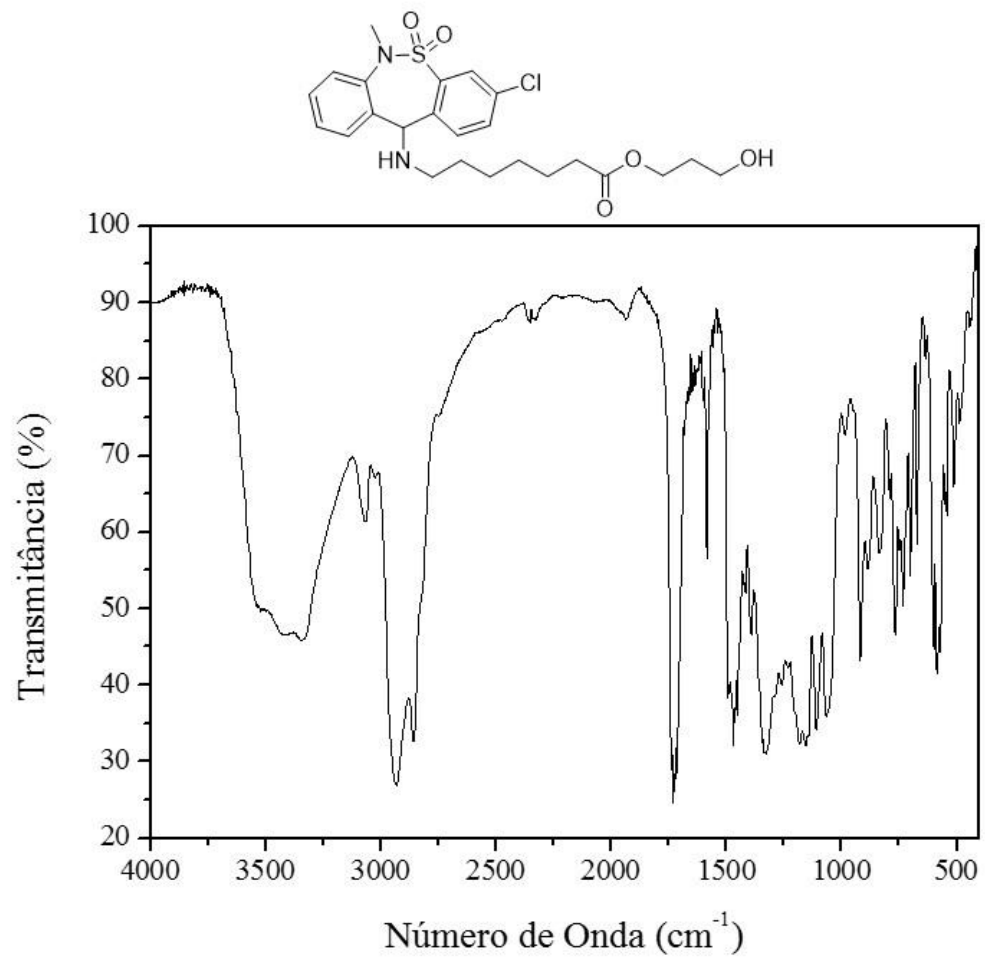


Figura 21A: Espectro de Infravermelho do éster **3e** puro.

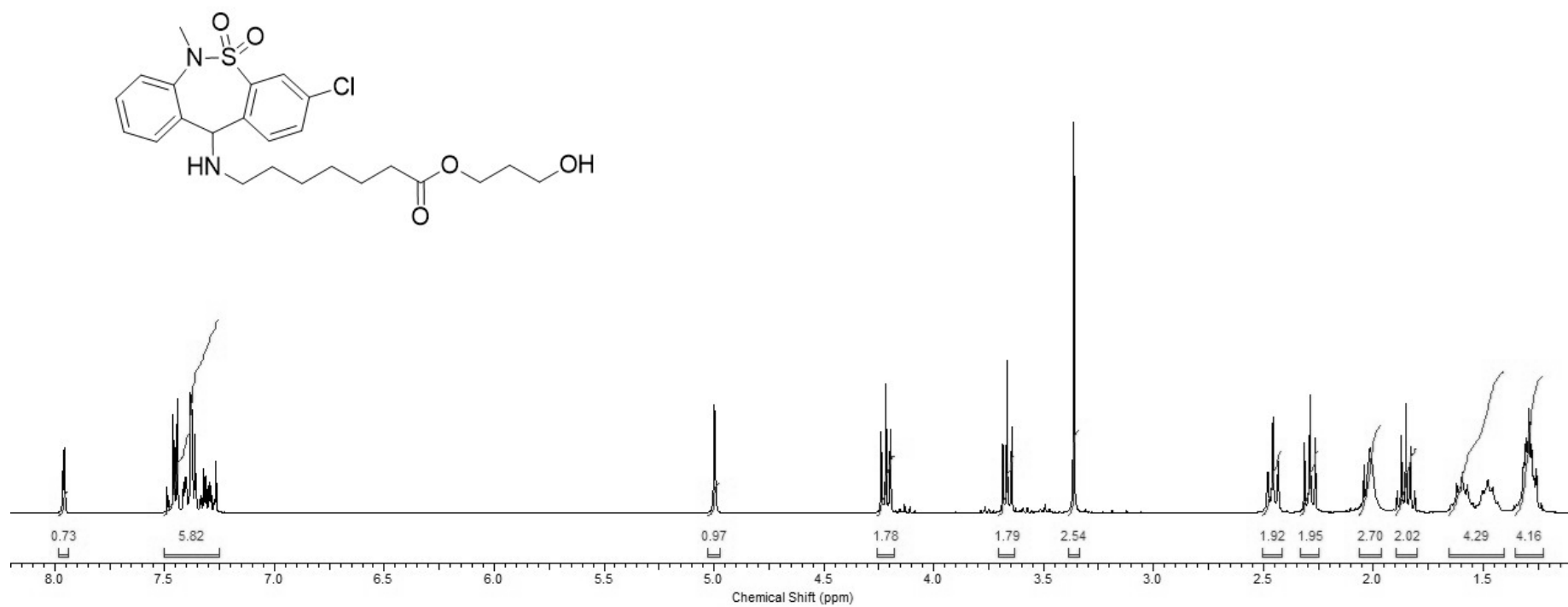


Figura 22A: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃-*d*) do éster **3e**.

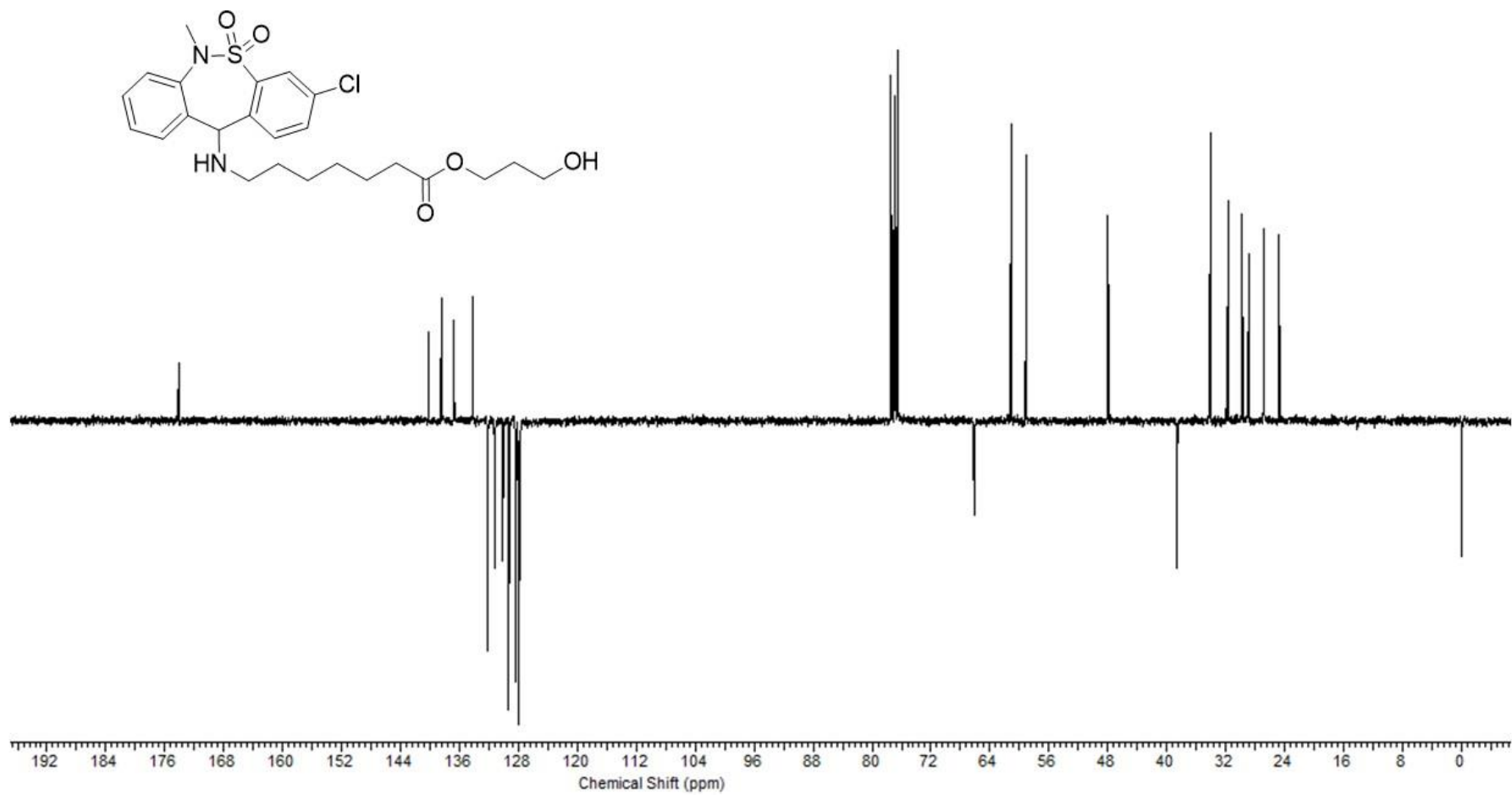


Figura 23A: Espectro de RMN de ¹³C - APT (75 MHz, CDCl₃-d) do éster **3e**.

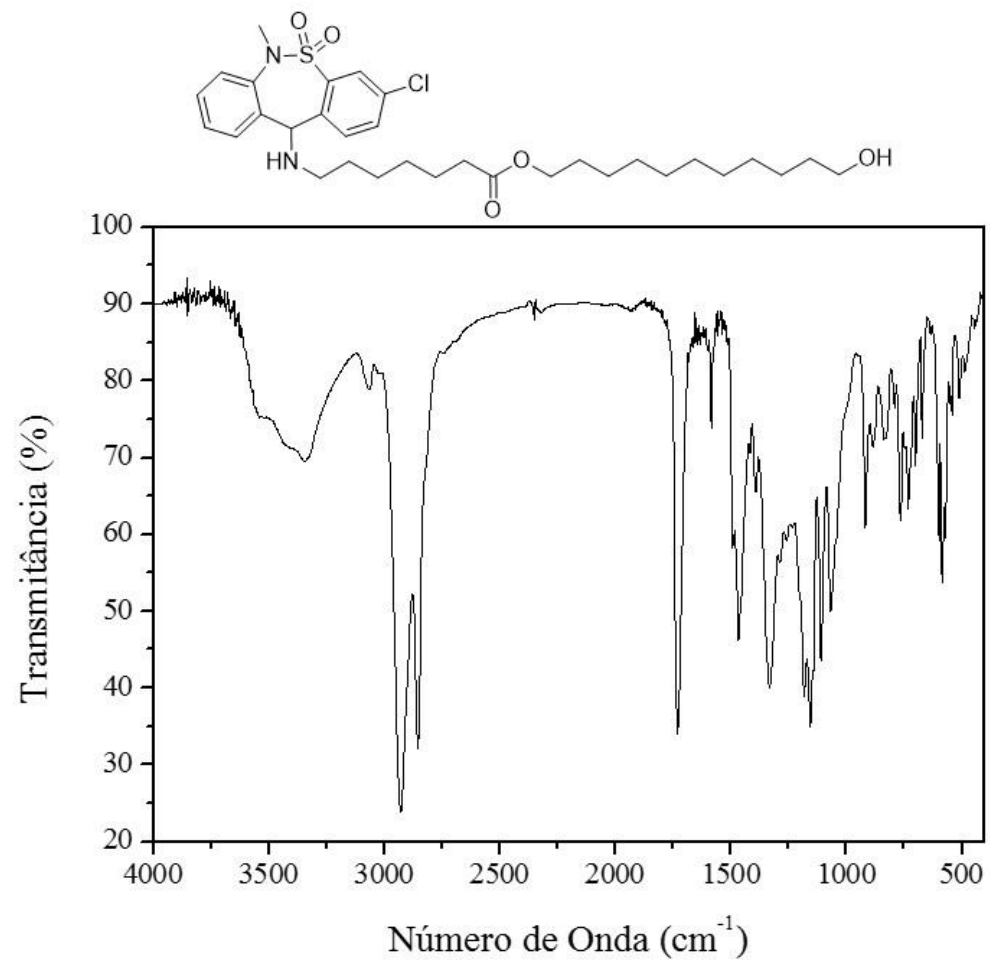


Figura 24A: Espectro de Infravermelho do éster **3f** puro.

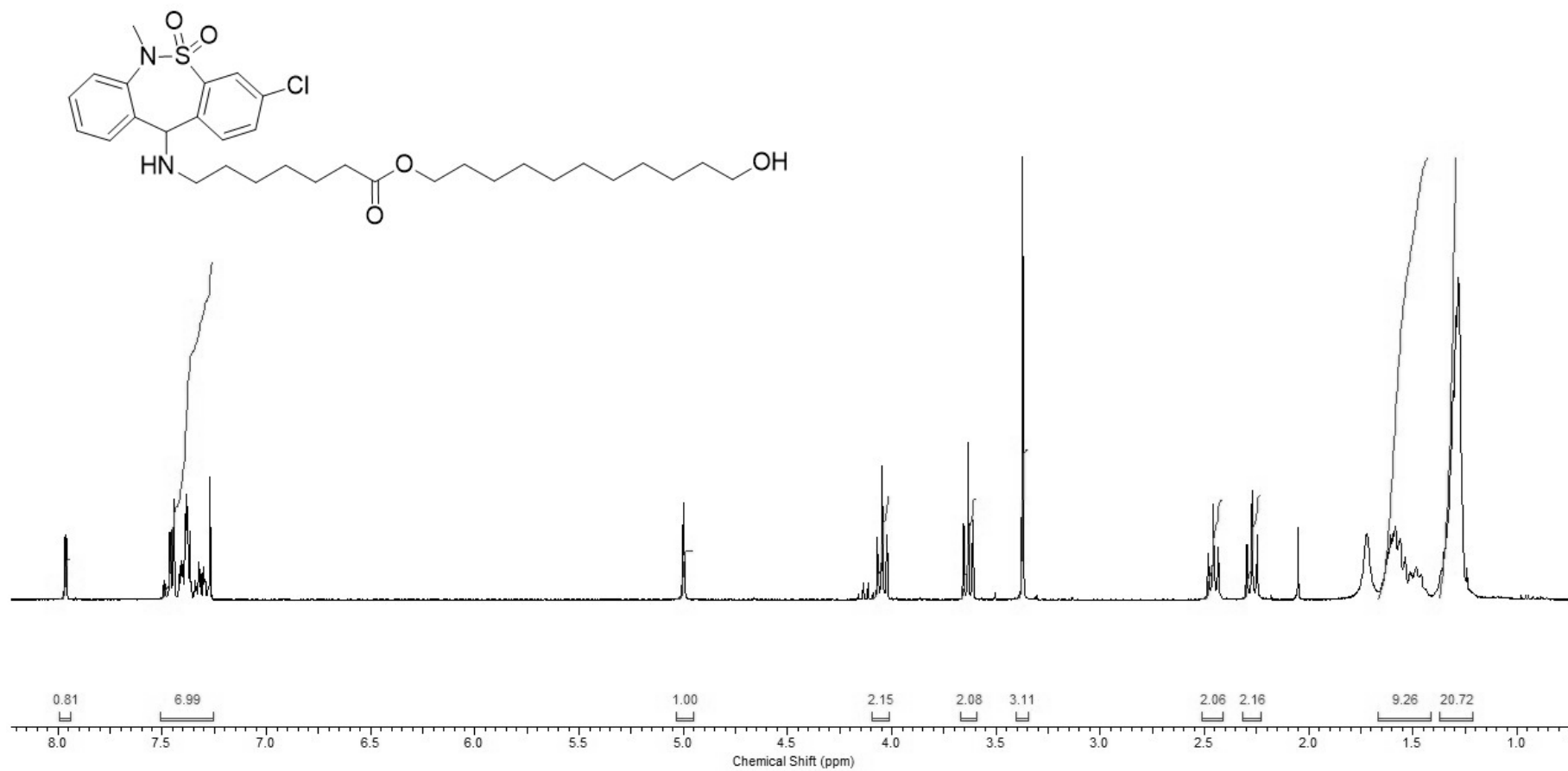


Figura 25A: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃-*d*) do éster **3f**.

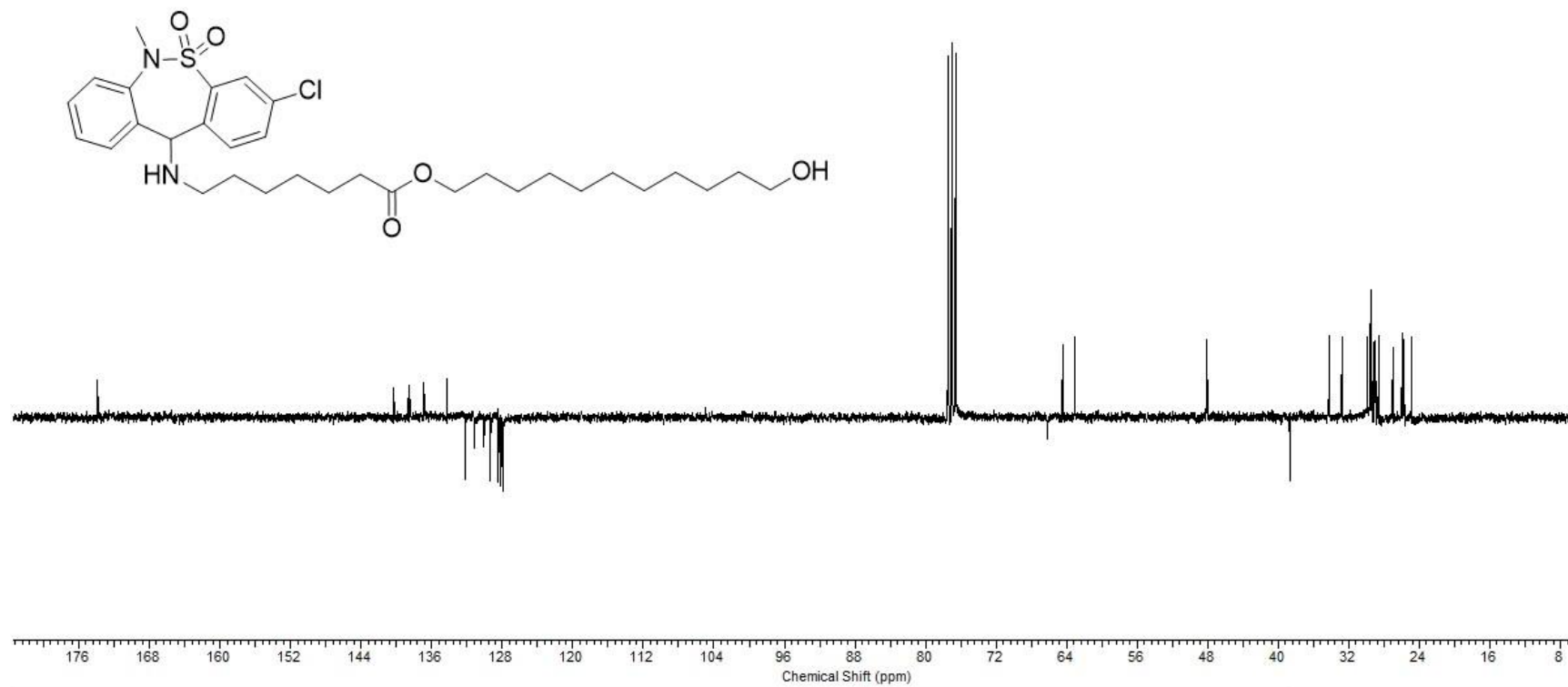


Figura 26A: Espectro de RMN de ¹³C - APT (75 MHz, CDCl₃-*d*) do éster **3f**.

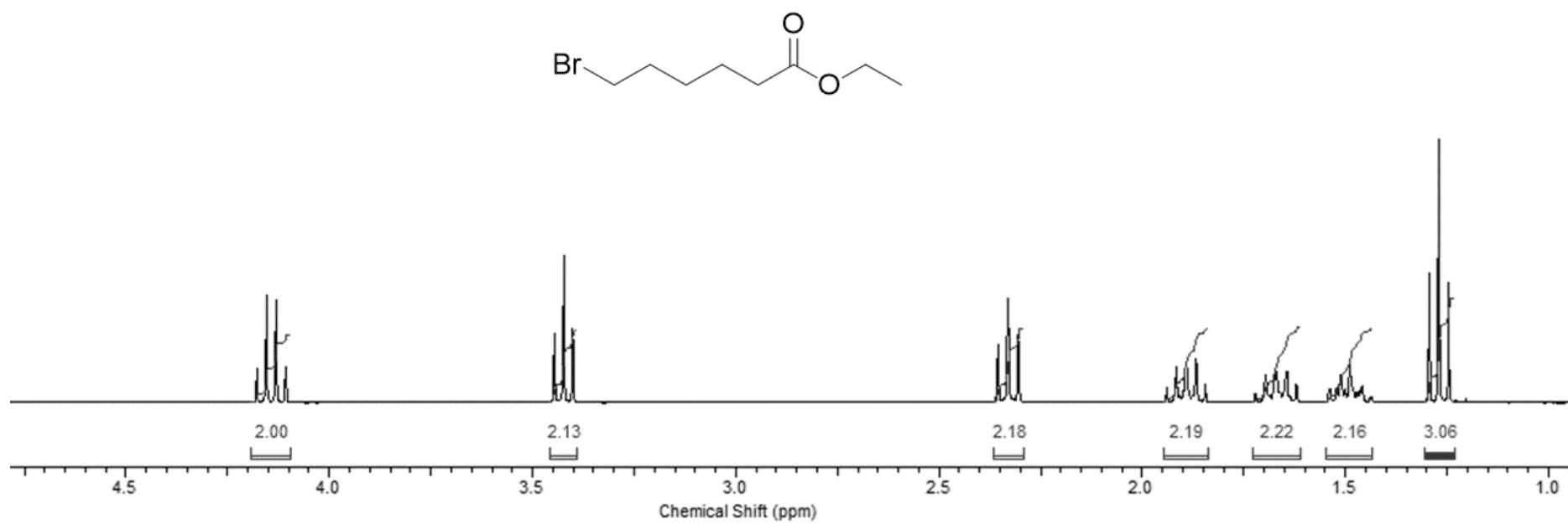


Figura 27A: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3-d) do 6-bromo-hexanoato de etila.

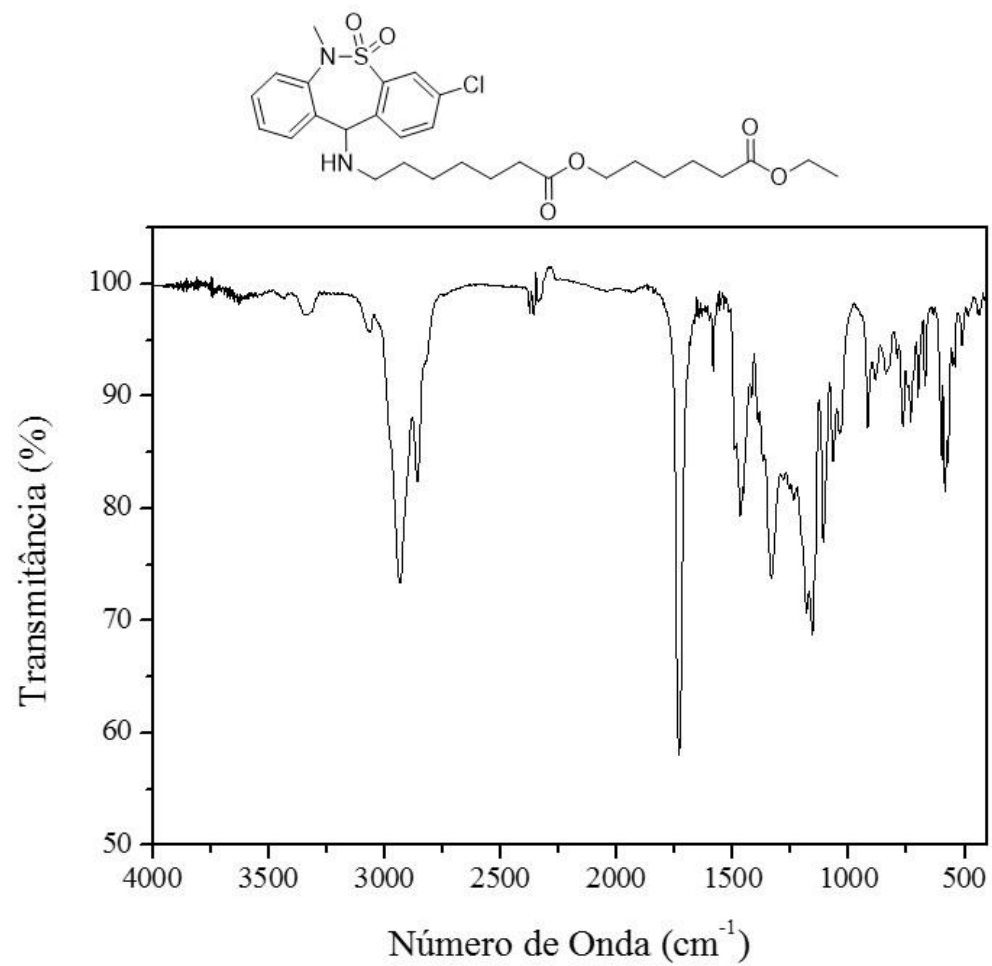


Figura 28A: Espectro de Infravermelho do éster **3g** puro.

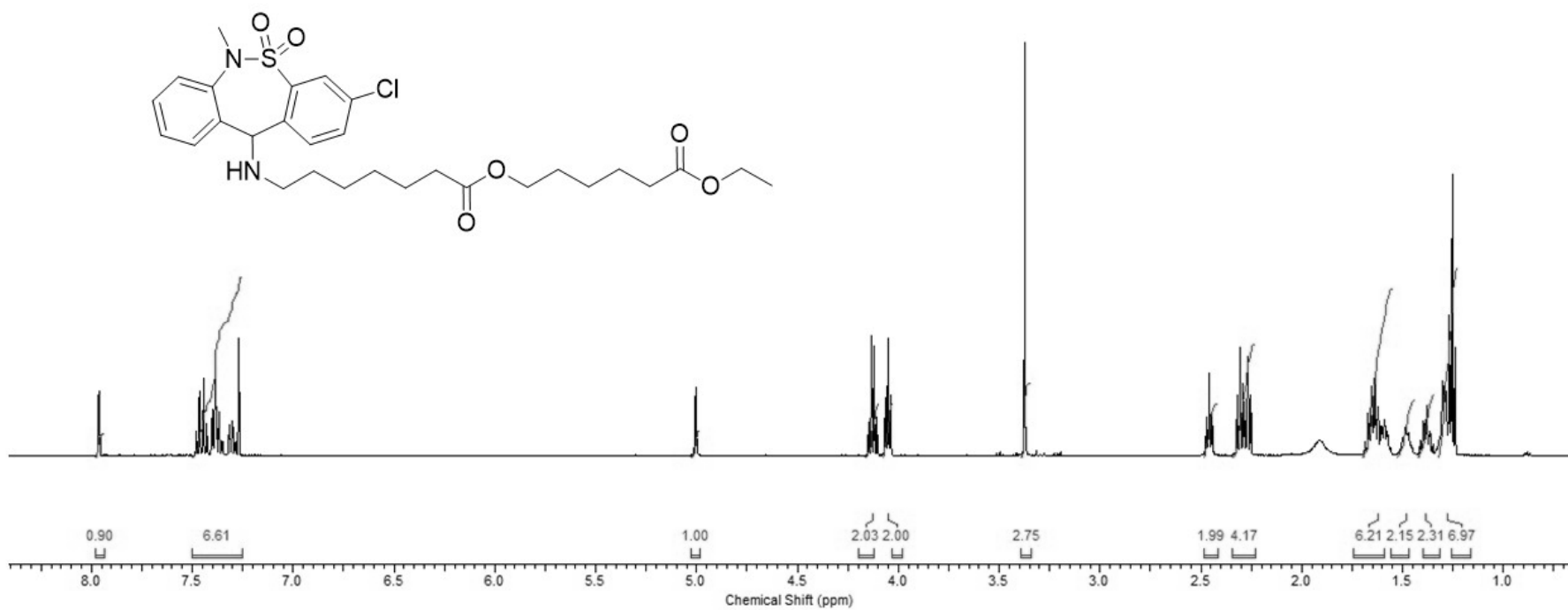


Figura 29A: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃-d) do éster **3g**.

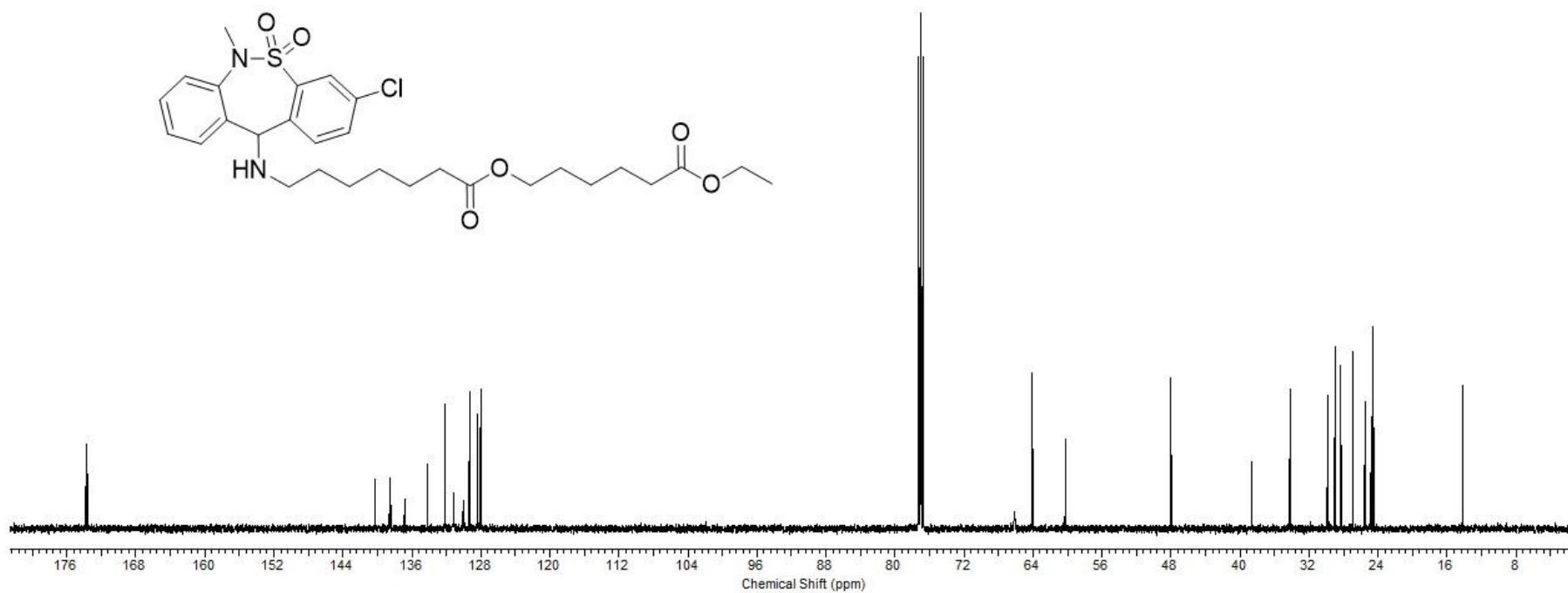


Figura 30A: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃-d) do éster **3g**.

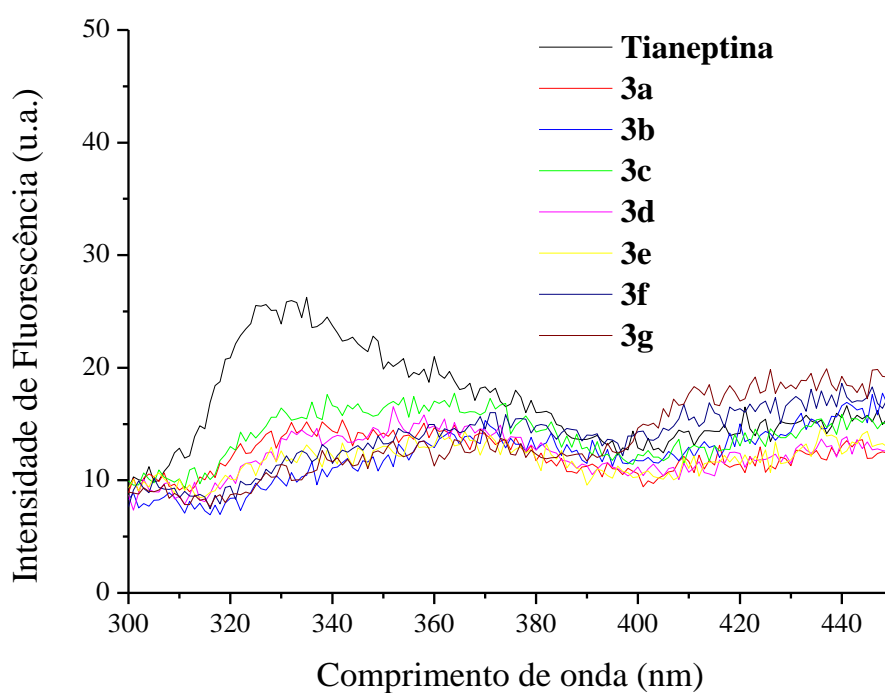


Figura 31A: Espectro de emissão de fluorescência da Tianeptina e derivados **3a-g** ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$) em CHCl_3 .

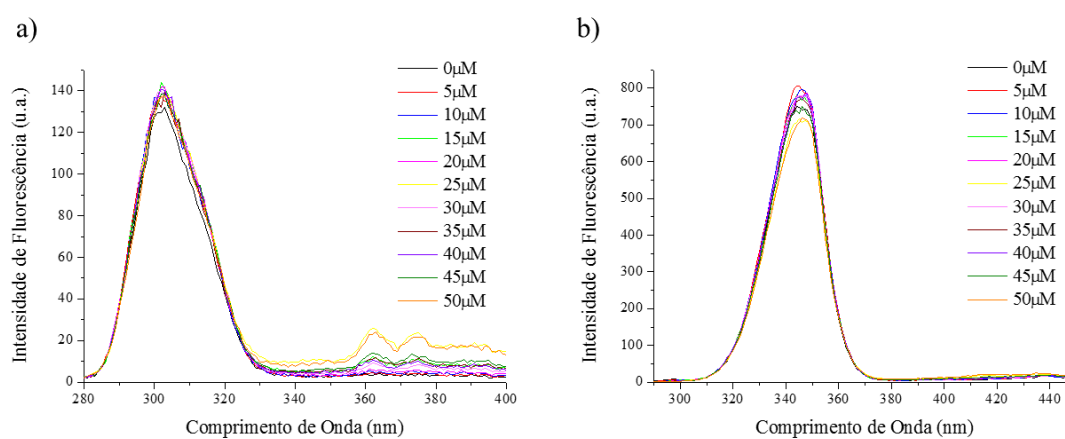


Figura 32A: Efeito do éster **3f** no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.

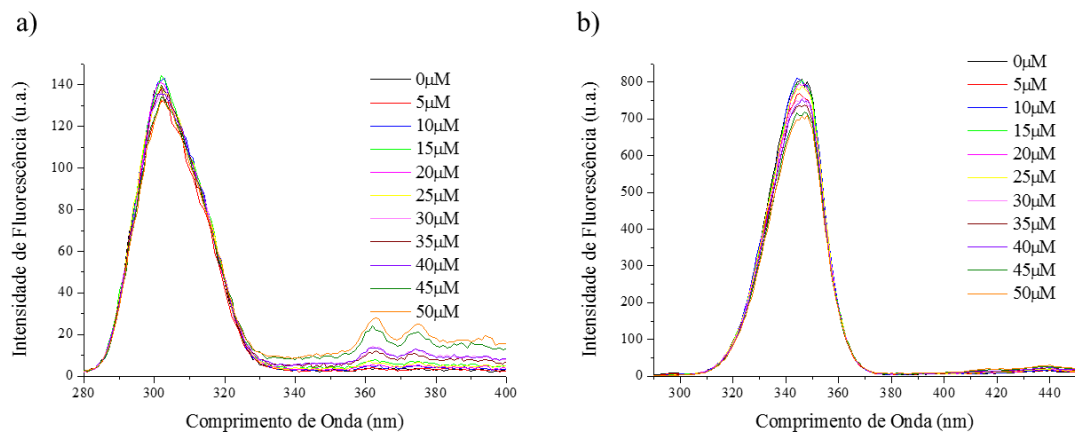


Figura 33A: Efeito do éster **3g** no espectro de fluorescência sincronizada da BSA. a) tirosina e b) triptofano.