



NOVA
NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO
DE QUÍMICA

RITA MARGARIDA BORGES ANASTÁCIO
Licenciada em ⟨Química Aplicada⟩

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS ANFIFÍLICOS MULTI-RESPONSIVOS

MESTRADO EM QUÍMICA BIOORGÂNICA

Universidade NOVA de Lisboa
⟨Novembro⟩, ⟨2021⟩



SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS ANFIFÍLICOS MULTI-RESPONSIVOS

RITA MARGARIDA BORGES ANASTÁCIO

Licenciada em ⟨Química Aplicada⟩

Orientador: Doutor Nuno Miguel Jesuino Basílio
Investigador Auxiliar, NOVA University Lisbon

Coorientador: Doutor Pedro Miguel Veríssimo Mateus
Investigador, NOVA University Lisbon

Júri:

Presidente: Professora Doutora Paula Cristina de Sério Branco
Professora Associada com Agregação, NOVA University Lisbon

Arguente: Professor Doutor Uwe Pischel
Professor Catedrático, University of Huelva

Orientador: Doutor Nuno Miguel Jesuino Basílio
Investigador Auxiliar, NOVA University Lisbon

MESTRADO EM QUÍMICA BIOORGÂNICA

Universidade NOVA de Lisboa
⟨Novembro⟩, ⟨2021⟩

Síntese e Caracterização de Sistemas Anfílicos Multi-Responsivos

Copyright © Rita Margarida Borges Anastácio, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Embora este Capítulo não influencie as conclusões científicas que retiro desta dissertação, é para mim um dos mais importantes e no qual não me vou esforçar para ser concisa, pois quero deixar o meu agradecimento a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para que tenha (quase) o título de Mestre.

O meu primeiro agradecimento é para todos os professores e pessoal não docente que se cruzaram no meu caminho, em especial à Prof.^a (e amiga) Cristina Ferreira. A vossa dedicação ao ensino foi uma das grandes motivações para ter prosseguido estudos até aqui e valorizar tanto o processo de aprendizagem.

Aos fotoquímicos CHARMosos, com quem lidei quase todos os dias do último ano, pela simpatia com que me receberam, desde os tempos em que andava por lá infiltrada, em especial aos professores Jorge Parola e Fernando Pina pelas discussões frutíferas que tivemos neste período. Não fiquem com ciúmes os restantes, mas o maior agradecimento é para aqueles que mais acompanharam este trabalho, fazendo parecer que foi de grupo em vez de individual.

- Doutor Nuno Basílio, em primeiro lugar, por me ter aceite no laboratório antes do tempo, o que me permitiu já estar integrada no grupo no início da tese. Quero também agradecer pelo entusiasmo com que sempre discutiu resultados comigo, demonstrando constantemente a paixão que tem por Ciência, pois, apesar de me deixar ligeiramente ansiosa saber que tínhamos uma reunião marcada, acabava sempre bastante esclarecida, o que me deu uma grande motivação para continuar.
- Doutor Pedro Mateus, por me ter ensinado a estar num laboratório de síntese, pela preciosa ajuda na revisão deste documento e também pelo seu trabalho na síntese do composto que originou a minha primeira participação num artigo científico.
- Mestre André Seco, que antes deste ano já muito tinha participado e contribuído para o meu percurso académico e a quem, por muito que me esforce, nunca conseguirei deixar registados todos os agradecimentos que lhe devo. Deixo, por isso, sublinhada a enorme dedicação com que me transmitiu conhecimentos e me apoiou ao longo do desenvolvimento desta tese.

Quero agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia, que permitiu que esta tese fosse desenvolvida no âmbito do projeto PTDC/QUI-COL/32351/2017. Agradeço também à Direção-Geral do Ensino Superior e à Fundação para a Ciência e Tecnologia, pelo suporte financeiro através de uma bolsa "Verão com Ciência".

Importa ainda agradecer à Ana Teresa, pela disponibilidade e simpatia com que sempre me ajudou nas análises de RMN e à Paula Nabais, por me ter ensinado a trabalhar com o liofilizador.

Passando para um campo mais pessoal, mas ainda na FCT, a tudo o que foi extra-curricular, em particular ao NQA e à AEFCT, por todos os momentos, conhecimentos e oportunidades que me proporcionaram, apesar das (muitas) horas de sono perdidas e do trabalho que me deram além da tese.

Aos Velhotes e aos outros amigos todos por, muitas vezes contra a minha vontade, me terem arrastado para momentos de convívio e cusquice, que só me fizeram bem. Particularizando para os que levo da FCT: ao António Esteves e à Catarina Cardoso que, não tendo estado tão presentes neste ano, muito me apoiaram no resto da minha vida académica; ao Hugo da Paz, pelos esquemas de cores e ensinamentos políticos; à minha Liliana (dos) Gomes por ter decidido ir-me fazer companhia para o 4º piso, permitindo que partilhássemos diariamente as melhores músicas que alguém pode ouvir durante uma tese; ao mano Micael Paulino por me fazer descer à Terra com o "gurl" e por me curar a alma com os seus cozinhados divinais; ao Nuno Viduedo, por ter sido um grande parceiro durante estes anos e por ser um doce de pessoa; ao João Sarrato, por não deixar que eu seja o membro mais alentejano do grupo, lembrando assim o que é estar em casa; e, por fim, à Excelentíssima Veterana que se tornou amiga do coração, Maria Viana, pelo muito que me ensinou e inspirou em inúmeros campos, e pelo apoio que me deu, em especial no NQA e nesta reta final. Vou ter muitas saudades vossas.

Um agradecimento muito especial é para a família, pela confiança que sempre depositaram em mim, destacando os pais, Pedro e Paula, que são o exemplo de resiliência que tento seguir e, exceto quando me “raptam” para trabalhar, são os melhores do mundo. Ao maninho Miguel, a quem eu suguei todo o juízo que havia para partilhar entre os dois, mas que teve sempre histórias “divertidas” e surpreendentes para contar. Ao tio André que é quase outro mano. Às tias Carla e Marina que partilharam sempre as suas experiências académicas comigo. E às avós e ao avô, por me fazerem as vontades todas.

Por último, ao meu miúdo, Diogo Alves, um agradecimento pela enorme paciência que teve para aturar todos os meus dramas, por me ensinar a minimizar o que quer que seja que me atormente e por me educar a deixar o trabalho no sítio dele, embora na maioria das vezes sem grande sucesso.

Resumo

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novos sistemas para entrega controlada de fármacos tem sido intensamente investigado pela comunidade científica. Uma das estratégias consiste na utilização de agregados supramoleculares com a capacidade de encapsular e libertar as moléculas de interesse. Pretende-se desta forma melhorar a biodisponibilidade de fármacos, bem como a sua solubilidade e capacidade de penetração de membranas e, por outro, controlar a sua atuação *in loco* através da ação de estímulos externos ou endógenos (pH, luz, temperatura, etc). Este tipo de agregados pode ser construído tirando partido do efeito hidrofóbico e das interações não covalentes que se estabelecem entre compostos anfifílicos responsivos. A resposta combinada a estímulos de luz e pH apresenta vantagens do ponto de vista terapêutico, já que possibilita uma maior seletividade para células tumorais, cujo pH extracelular é mais ácido que nas células normais correspondentes. A família das antocianinas, moléculas abundantes na natureza, apresenta um sistema multiestado capaz de operar como um fotocomutador sensível ao pH (catião flavílio-chalcona *trans*), o que o torna interessante para as aplicações acima descritas.

No decorrer deste trabalho sintetizaram-se 2-hidroxicalconas de natureza anfifílica funcionalizadas com um grupo polar carregado positiva ou negativamente. Para isso foram usados os grupos tetrametiletilenodiamónio ou sulfonato, respetivamente, tendo-se conseguido obter estes compostos com bons rendimentos, na ordem dos 60-90 %. Todos os compostos foram caracterizados na forma monomérica por técnicas espectroscópicas, a vários valores de pH, tanto no equilíbrio térmico como no estado fotoestacionário. A capacidade de agregação foi investigada por tensiometria e ressonância magnética nuclear e, no caso do composto contendo um centro quiral, por dicroísmo circular.

No caso dos compostos funcionalizados com o grupo substituinte aniónico, sintetizaram-se vários análogos com diferentes tamanhos de cadeia hidrofóbica, verificando-se um aumento da capacidade de agregação com o aumento do carácter hidrofóbico. Os compostos funcionalizados com o grupo substituinte catiónico incluem um tensioativo do tipo gemini e o respetivo análogo de cauda única, que serviu de composto modelo para o estudo das interações do primeiro. As interações recetor-substrato com um recetor macrocíclico solúvel em água (cucurbit[7]urilo) foram exploradas como estímulo adicional para controlar a agregação dos compostos sintetizados, bem como para modular as propriedades cinéticas e termodinâmicas dos sistemas multiestado.

Palavras-chave: Química Supramolecular, Compostos anfifílicos responsivos, Agregação, Fotoquímica, 2-hidroxicalconas, Cucurbiturilos

Abstract

In the last few decades, the design of new systems for drug delivery applications has been intensively investigated by the scientific community. The encapsulation of a drug and its controlled release as a response to an external stimuli (pH, light, temperature, etc) is an approach that increases the bioavailability of the drug and simplifies its targeted delivery. It is well established that amphiphilic compounds can self-assemble, through hydrophobic effect and other non-covalent interactions, giving rise to supramolecular aggregates that may encapsulate hydrophobic drugs in aqueous media. The combined response to light and pH stimuli can provide novel therapeutical applications, as it allows for greater selectivity for tumor cells, which exhibit a more acidic character. Anthocyanins are abundant molecules in nature that comprise a multistate system capable of operating as a pH-sensitive photoswitch (flavylium cation - *trans*-chalcone), which makes it interesting for the previously described applications.

In this work, amphiphilic 2-hydroxychalcones were functionalized with a positively or negatively charged polar group (tetramethylethylenediammonium or sulfonate group, respectively) with good synthetic yields (60-90 %). All compounds were characterized in the monomeric form by spectroscopic techniques, at various pH values, both in thermal equilibrium and in photostationary state. The self-assembly was investigated by tensiometry and nuclear magnetic resonance and, in the case of the compound containing a chiral center, by electronic circular dichroism.

Regarding the compounds functionalized with the anionic substituent group, several similar compounds with different hydrophobic chain sizes were synthesized, showing an increase in the self-assembly behaviour with the increase of the hydrophobic character. Compounds functionalized with the cationic substituent group include a gemini surfactant and its single tail analogue, which served as a model compound for the study of the former. Host-guest interactions with a water-soluble macrocyclic receptor (cucurbit[7]uril) were explored as an additional stimulus to control the aggregation of the synthesized compounds, as well as to modulate the kinetic and thermodynamic properties of the multistate systems.

Keywords: Supramolecular Chemistry, Responsive Amphiphilic Compounds, Self-assembly, Photochemistry, 2-hydroxychalcones, Cucurbiturils

Índice

Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xxi
Siglas	xxii
Símbolos	xxiii
1 Introdução	1
1.1 A Ciência e a Natureza	1
1.2 Compostos Anfífilos Responsivos	3
1.2.1 Definição e Classificação de Compostos Anfífilos	3
1.2.2 Formação de Agregados	3
1.2.3 Resposta a Estímulos Externos	5
1.3 O Sistema Multiestado das Antocianinas como Unidade Responsiva	13
1.3.1 Funcionamento do Sistema Multiestado	13
1.3.2 Estratégias Sintéticas	14
1.3.3 Interações Supramoleculares com Cucurbiturilos	15
1.4 Objetivos	17
1.5 Organização do Documento	18
2 Parte Experimental	19
2.1 Reagentes e Solventes	19
2.2 Materiais e Equipamentos	19
2.2.1 Pesagem e Pipetagem	19
2.2.2 Aquecimento e Agitação	19
2.2.3 Procedimentos Cromatográficos	20
2.2.4 Análise e Caracterização	20
2.3 Síntese	20
2.3.1 Materiais de Partida	22
2.3.2 Flavílios e Chalconas	25
2.4 Métodos	32
2.4.1 HPLC-DAD	32
2.4.2 Saltos de pH	33

2.4.3	Comportamento Fotoquímico	33
2.4.4	Tensiometria	34
2.4.5	Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear por Difusão Ordenada	34
2.4.6	Cálculos Teóricos	35
2.4.7	Estudos de Solubilização de Compostos Hidrofóbicos	35
2.4.8	Titulações com macrociclos	35
3	Apresentação e Discussão de Resultados	37
3.1	Síntese	37
3.2	Caracterização dos Compostos Funcionalizados com Substituintes Aniónicos .	38
3.2.1	Caracterização dos Compostos 1 a 3	38
3.2.2	Caracterização do Composto 5	53
3.3	Caracterização dos Compostos Funcionalizados com Substituintes Catiónicos .	56
3.3.1	Caracterização Espetrocópica dos Monómeros	56
3.3.2	Interações Recetor-Substrato	62
4	Conclusões e Perspetivas Futuras	70
	Bibliografia	72
	Apêndices	
A	Espectros de RMN e Cromatogramas	79
B	O Sistema Multiestado	91
B.o.1	Determinação de pK'_a	91
B.o.2	O Pseudo-Equilíbrio	93
B.o.3	O Sistema Bis	93
B.o.4	Ajuste dos Dados Experimentais	94
C	Modelos Recetor-Substrato	95
C.1	Complexos 1:1	95
C.2	Complexos 1:2	96
C.3	Complexos 2:1	97
C.4	Titulações por Competição	98
C.4.1	Complexos 2:1	99
C.5	Ajuste dos Dados Experimentais	99
D	Informação Suplementar	101
D.1	Caracterização dos Compostos Funcionalizados com Substituintes Aniónicos .	101
D.1.1	Caracterização dos Compostos 1 a 3	101
D.1.2	Caracterização do Composto 5	113
D.2	Caracterização dos Compostos Funcionalizados com Substituintes Catiónicos .	114

D.2.1	Caracterização Espectroscópia dos Monómeros	114
D.2.2	Interações Recetor-Substrato	117
E	Comunicação de Resultados	123
E.1	Comunicações Orais	123
E.2	Comunicações em Painel	123
E.3	Artigos Científicos	124

Índice de Figuras

1.1	Estrutura química do ADN, representando-se a tracejado as interações não covalentes estabelecidas entre as bases azotadas complementares, que permitem a formação da dupla hélice (representação em <i>cartoon</i>).	1
1.2	Estrutura química exemplificativa de um fosfolípido e representação esquemática da bicamada que se forma devido ao efeito hidrofóbico e às interações não covalentes.	2
1.3	Classificação dos compostos anfífilicos consoante a natureza da componente hidrofílica (à esquerda) e o número e modo de ligação das componentes hidrofóbica e hidrofílica (à direita), com estruturas/modelos exemplificativos. [5, 7, 9, 11–14] . . .	3
1.4	Definição de concentração de agregação crítica, com base na concentração de monómeros de composto anfífilico (linha a cheio) e de agregados formados (linha a tracejado).[16]	5
1.5	a) Estruturas químicas dos compostos estudados por Hao e seus colaboradores: alquil-dimetilamina (C_n DMAO) e ácido litocólico (LCA). b) Esquema do sistema construído, sensível a alterações de temperatura.[20]	6
1.6	a) Estrutura química do tensioativo derivado de um aminoácido utilizado por Huang e seus colaboradores. b) Estrutura dos agregados formados, em função do pH.[22]	6
1.7	Transformações estruturais de fotocmutadores, após aplicação de um estímulo de luz: a) azobenzeno [23]; b) spiropirano [25]; c) alceno superlotado [5]; d) ditieniletano [26]; e) índigo [27] e f) 2-hidroxichalcona [28–37].	7
1.8	Estrutura química do líquido iónico anfífilico contendo uma unidade de azobenzeno (C_{14} mimAzoBr) sintetizado por Zheng e seus colaboradores. Esquema em <i>cartoon</i> da interconversão entre micelas e vesículas, desencadeada por variações de concentração ou irradiação.[39]	8
1.9	Estruturas químicas dos isómeros <i>trans</i> e <i>cis</i> do composto anfífilico foto-responsivo caracterizado por Tian e seus colaboradores, destacando-se a unidade foto-responsiva a cor de laranja, bem como da calceína, com representação esquemática das vesículas formadas.[9]	9
1.10	Exemplo ilustrativo da ligação de um recetor a um substrato para formar uma associação supramolecular.	9
1.11	Estrutura química de compostos macrocíclicos: a) Primeiro éter de coroa [43], b) Cucurbit[n]urilo (CB_n) [44], c) Pilar[n]areno [45], d) Ciclodextrina [3] e e) Calix[n]areno [3].	10

1.12	a) Estruturas químicas dos compostos sintetizados por Zhang e seus colaboradores: <i>trans</i> -AzoC10 e <i>cis</i> -AzoC10. b) Esquema ilustrativo do controlo de agregação do composto anfifílico na presença de α -CD, utilizando simultaneamente estímulos de luz.[49]	11
1.13	a) Estruturas químicas dos compostos investigados por Xue e seus colaboradores: 36 e WP6I. b) Esquema ilustrativo do controlo de agregação do composto anfifílico na presença do macrociclo, considerando variações nas condições de pH.[50]	12
1.14	a) Exemplo de antocianina - mirtilina - com o núcleo de 2-fenilbenzopirílio (catião flavílio) destacado a vermelho, e exemplos de frutos e folhas onde está presente. b) Espécies e reações químicas do sistema multiestado inerente às antocianinas, incluindo a numeração das estruturas do catião flavílio e da chalcona <i>trans</i> que se utilizarão ao longo do documento.[29–31, 36, 37, 51]	13
1.15	Esquema simplificado do fotocomutador do sistema multiestado presente nas antocianinas.	14
1.16	a) Síntese de núcleos de 2-fenilbenzopirílio através de uma Condensação de Claisen-Schmidt em meio ácido.	14
1.17	Síntese de 2-hidroxichalconas através de uma Condensação de Claisen-Schmidt em meio básico ou por conversão do catião flavílio, beneficiando das propriedades do sistema multiestado.	14
1.18	Libertação foto-induzida de memantina, por interação do CB7 com um fotocomutador da família das antocianinas. As percentagens indicam a quantidade de memantina livre e em associação com o macrociclo.	15
1.19	Esquema ilustrativo da alteração das propriedades de agregação de um composto anfifílico contendo um fotocomutador da família das antocianinas, com recurso a interações recetor-substrato com um cucurbiturilo, seguidas de irradiação.	16
2.1	Estratégias sintéticas adotadas para obtenção dos núcleos de 2-fenilbenzopirílio e respetivas 2-hidroxichalconas com os padrões de substituição desejados.	21
2.2	Estruturas químicas das 2-hidroxichalconas aniónicas sintetizadas.	21
2.3	Estruturas químicas das 2-hidroxichalconas catiónicas sintetizadas: à esquerda a bis-chalcona e à direita a respetiva monochalcona, destacando-se a posição 4, não substituída, de ambas.	21
2.4	Estrutura química do 4-butoxi-2-hidroxibenzaldeído.	22
2.5	Estrutura química do 4-hexiloxi-2-hidroxibenzaldeído.	22
2.6	Estrutura química do (S)-4-(2'-metilbutoxi)-2-hidroxibenzaldeído.	23
2.7	Estrutura química da 4-hexiloxi-1-acetofenona.	24
2.8	Estrutura química da (S)-4-(2'-metilbutoxi)-1-acetofenona.	24
2.9	Estrutura química do 7-butoxi-4'-(butoxi-4*-sulfonato de sódio)-flavílio.	25
2.10	Estrutura química da (E)-(2-hidroxi-4-butoxi-4'-(butoxi-4*-sulfonato de sódio))-chalcona.	25
2.11	Estrutura química do 7-hexiloxi-4'-(butoxi-4*-sulfonato de sódio)-flavílio.	26
2.12	Estrutura química da (E)-(2-hidroxi-4-hexiloxi-4'-(butoxi-4*-sulfonato de sódio))-chalcona	27

2.13	Estrutura química do 7-octanoxi-4'-(butoxi-4*-sulfonato de sódio)-flavílio.	27
2.14	Estrutura química da (E)-(2-hidroxi-4-octanoxi-4'-(butoxi-4*-sulfonato de sódio))- chalcona	28
2.15	Estrutura química do 7-(propanoxi-9*-sulfonato de sódio)-4'-hexiloxi-flavílio.	28
2.16	Estrutura química da (E)-(2-hidroxi-4-(propanoxi-9*-sulfonato de sódio)-4'-hexiloxi)- chalcona.	29
2.17	Estrutura química do 7-(propanoxi-8*-sulfonato de sódio)-4'-((S)-2*-metilbutano)- flavílio.	30
2.18	Estrutura química da (E)-(2-hidroxi-4-(propanoxi-8*-sulfonato de sódio)-4'-((S)-2*- metilbutano))-chalcona	30
2.19	Estrutura química do bis-(4'-(N ¹ ,N ² -bis(3-hidroxipropil)-N ¹ ,N ¹ ,N ² ,N ² -tetrametiletano- 1,2-diamónio))-flavílio.	31
2.20	Estrutura química da bis-(E)-(2-hidroxi-4'-(N ¹ ,N ² -bis(3-hidroxipropil)-N ¹ ,N ¹ ,N ² ,N ² - tetrametiletano-1,2-diamónio))-chalcona.	32
2.21	Sequência <i>ledbpgpzs</i> , utilizada nas experiências de ¹ H DOSY RMN.	34
2.22	Estrutura química do Sudan I, corante utilizado nos estudos de solubilização de com- postos hidrofóbicos.	35
2.23	Estruturas químicas dos competidores utilizados no âmbito deste trabalho: a) cloreto de 7, 3', 4'-trihidroxi-flavílio e b) dicloreto de metil-viologénio (MV ²⁺).	36
3.1	Estruturas químicas das chalconas <i>trans</i> (cor de laranja) aniónicas em estudo e dos respetivos catiões flavílio (vermelho).	38
3.2	a) Esquema das reações a decorrer nas experiências apresentadas nos gráficos b) e c). Espetros de absorção do composto 2 , a diferentes valores de pH ([citrato de sódio] = 10 mM), no estado b) fundamental (20 μM, T = 37 °C) e c) fotoestacionário (20 μM, λ _{irr} = 365 nm, T = 25 °C).	39
3.3	a) Representação esquemática do fotocomutador aparente 2AH ⁺ - 2Ct . b) Distribuição das frações molares de catião flavílio (vermelho) e base conjugada (verde), nos estados fundamental (linha a cheio) e fotoestacionário (linha tracejada) do composto 2 , em função do pH. c) Irradiação a pH = 4,3 e a 37 °C da 2Ct (20 μM; [citrato de sódio] = 10 mM; λ _{irr} = 365 nm).	40
3.4	Tensão superficial de soluções aquosas de 1Ct (▲), 2Ct (●) e 3Ct (■), a 37 °C, em função da concentração. Em <i>inset</i> apresenta-se a relação entre o logaritmo neperiano da CAC e o tamanho da cadeia hidrofóbica.	41
3.5	a) Espetros de ¹ H RMN do composto 2Ct em D ₂ O a adquiridos 37 °C, com concentra- ções variáveis. De baixo para cima: 0,06 mM; 0,22 mM; 0,50 mM; 1,26 mM e 12 mM. b) Representação da média dos desvios químicos de alguns sinais representativos do composto 2Ct , em função da concentração de composto, destacando-se o valor de CAC determinado por tensiometria a tracejado e a gama na qual deverá constar o valor de CAC indicado por ¹ H RMN.	42

3.6	a) Espetros de ^1H DOSY RMN do composto 2Ct (13 mM, D_2O), adquiridos a 37 °C. b) Determinação do coeficiente de difusão, com recurso à equação de Stejskal-Tanner.	43
3.7	Estruturas otimizadas dos compostos 1Ct , 2Ct e 3Ct (HF/6-311G*; PCM; H_2O) e respectivas distâncias entre o átomo de enxofre e o átomo de carbono assinalados.	44
3.8	Absorvâncias do Sudan I a 486 nm, em soluções de 2Ct com concentração variável, mantendo a temperatura de 37 °C. Da esquerda para a direita destaca-se, respetivamente, a zona onde a solubilização da sonda hidrofóbica é: 1) inexistente; 2) crescente e 3) máxima e constante.	45
3.9	Irradiação a pH = 4,1 e a 37 °C da 2Ct (1,0 mM; [citrato de sódio] = 10 mM; b = 0,1 cm; λ_{irr} = 365 nm). Os espetros de absorção adquiridos antes da irradiação e após 10 min e 2,5 h apresentam-se a cor de laranja, cinzento e vermelho, respetivamente.	45
3.10	Esquema da estratégia adotada para dissociação das micelas formadas.	46
3.11	a) Representação esquemática da formação da associação 1Ct@CB7 . Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 1Ct (45 μM), a pH neutro, a uma temperatura de b) 25 °C e de c) 37 °C. Em <i>inset</i> apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1 descrito no Apêndice C. Na fotografia destaca-se o desvio para o vermelho induzido pela associação.	47
3.12	a) Representação esquemática da formação da associação 1AH⁺@CB7 . Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 1AH⁺ (34 μM), a pH = 1, a uma temperatura de b) 37 °C, monitorizando-se por espectroscopia de absorção e de c) 25 °C, monitorizando-se por espectroscopia de emissão (λ_{exc} = 400 nm). Em <i>inset</i> apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1 descrito no Apêndice C.	48
3.13	Espetros de ^1H RMN do composto 1AH⁺ livre (em baixo), com 1 equivalente de CB7 (ao centro) e com 2 equivalentes de CB7 (em cima), a pD = 1, em D_2O , 500 MHz ([1AH⁺] = 0,5 mM). A cor de laranja destacam-se os prótons que se deslocam para campo alto após a associação, significando que se encontram no interior da cavidade do macrociclo, conforme esquematizado na estrutura química.	49
3.14	Espetros de ^1H RMN do composto 1Ct livre (em baixo) e na presença de CB7 em quantidade variável, a pD neutro, em D_2O , 500 MHz ([1Ct] = 0,5 mM). A cor de laranja destacam-se os prótons que se deslocam para campo alto após a associação, significando que se encontram no interior da cavidade do macrociclo, conforme esquematizado na estrutura química.	49
3.15	a) Representação esquemática do fotocomutador aparente 1AH⁺@CB7 - 1Ct@CB7 . b) Espetros de absorção a diferentes valores de pH, mantendo a temperatura a 37 °C e [citrato de sódio] = 10 mM, do composto 1 (23 μM), na presença de CB7 (5 eq.). Em <i>inset</i> apresentam-se os ajustes dos dados experimentais que permitiram obter o valor de pK'_a . c) Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e a 37 °C do composto 1Ct (19 μM), na presença de CB7 (5 eq.), mantendo o pH = 5 e [citrato de sódio] = 10 mM. Em <i>inset</i> apresentam-se as absorvâncias máximas da Ct e AH ⁺ em função do tempo de irradiação.	51

3.16	Estruturas químicas dos compostos 3Al , 2Ac e 5AH⁺	53
3.17	Variações espectrais observadas após adição de CB8 a uma solução de 5AH⁺ ($2 \mu\text{M}$), a pH = 1, a uma temperatura de 25 °C, monitorizando-se por espectroscopia de emissão ($\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$). Em <i>inset</i> apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 1:2 descrito no Apêndice C. Na fotografia, apresentam-se duas células contendo igual concentração de substrato, antes (esquerda) e após (direita) adição de CB8, sendo evidenciado o desvio batocrômico induzido pela associação supramolecular.	54
3.18	Espetro de a) dicroísmo circular eletrônico e b) absorção do composto 5AH⁺ (HCl 0,1 M, pH = 1, 25 °C) numa solução diluída (0,05 mM, linha preta), concentrada (0,50 mM, b = 0,1 cm, linha cor de tijolo) e na presença de CB8 (0,02 mM, 1,2 eq. CB8, linha azul clara).	54
3.19	Variações no espectro de a) dicroísmo circular eletrônico e b) absorção do composto 5AH⁺ (0,50 mM, HCl 0,1 M, pH = 1), em função da temperatura no aquecimento de 25 °C a 60 °C.	55
3.20	Estruturas químicas dos compostos catiónicos em estudo, destacando-se as unidades de catião flavílio (vermelho) e de chalcona <i>trans</i> (cor de laranja).	56
3.21	Estruturas de ressonância de uma chalcona <i>cis</i> (Cc) substituída na posição 4 por um substituinte eletrodoador, destacando-se a cor de laranja a ligação dupla que isomeriza para formar a chalcona <i>trans</i> (Ct).	57
3.22	a) Representação esquemática das transformações decorrentes dos saltos de pH dos compostos 6 e 7 , à temperatura ambiente, desde pH = 1 até valores de pH mais elevados. Espectros de absorção a diferentes valores de pH, mantendo a temperatura de 25 °C e [citrato de sódio] = 10 mM, do composto: b) 6 ($25 \mu\text{M}$) e c) 7 ($23 \mu\text{M}$). Em <i>inset</i> apresentam-se os ajustes dos dados experimentais que permitiram obter os valores de pK_a^\wedge	57
3.23	Espectros de absorção do composto 6 a pH = 1 (linha preta cheia) e a pH = 6 (linha preta tracejada). A cor de laranja, apresenta-se o espectro normalizado do flavílio obtido por decomposição do espectro registado a pH = 6, com o objetivo de destacar a diferença na forma da banda do catião flavílio, em função do pH (linha laranja); o espectro do composto 6 a pH = 1 numa solução contendo 90 % de metanol (linha verde) e o espectro do composto 7 a pH = 1 (linha azul clara).	58
3.24	Esquema de reações existentes no sistema 6AH⁺-Ct , com as respetivas constantes de acidez ($K_a^\wedge(\text{livre})$ e $K_a^\wedge(\text{dímero})$) e de dimerização ($Kd(AH^+)$ e $Kd(BC^\wedge)$).	59
3.25	a) Representação esquemática das transformações decorrentes da irradiação das chalconas <i>trans</i> em condições de pH ácido. Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e à temperatura ambiente do composto: b) 6Ct ($10 \mu\text{M}$, pH = 2, [citrato de sódio] = 10 mM) e c) 7Ct ($21 \mu\text{M}$, pH = 2, [citrato de sódio] = 10 mM). Em <i>inset</i> apresentam-se as absorvâncias ao comprimento de onda de absorção máximo dos catiões flavílio e chalconas <i>trans</i> em função do tempo de irradiação.	60

3.26	a) Representação esquemática das transformações decorrentes da irradiação das chalconas <i>trans</i> em condições de pH neutro. Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e à temperatura ambiente do composto: b) 6Ct (14 μ M, pH = 6, [citrato de sódio] = 10 mM) e c) 7Ct (21 μ M, pH = 6,06, [citrato de sódio] = 10 mM). Em <i>inset</i> apresentam-se as absorvâncias ao comprimento de onda de absorção máximo dos catiões flavílio e chalconas <i>trans</i> em função do tempo de irradiação.	61
3.27	Espectro de absorção do composto 6, obtido após o salto de pH a 25 °C desde pH = 1 até pH = 7 (linha preta tracejada) e espectro de absorção do mesmo composto no estado fotoestacionário, a pH = 2 (linha vermelha).	61
3.28	Estrutura química do produto de cicloadição [2+2] intramolecular da 6Ct.	62
3.29	a) Representação esquemática da formação da associação supramolecular 6AH ⁺ @CB7. Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de b) 6AH ⁺ (18 μ M), a pH = 1 e c) 6Ct (25 μ M), a pH neutro. Em <i>inset</i> apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 2:1 descrito no Apêndice C.	63
3.30	Espectros de ¹ H RMN do composto 6AH ⁺ (1 mM) livre (em baixo) e com 2,5 equivalentes de CB7 (em cima), a pD = 1, em D ₂ O, 400 MHz. A cor de laranja destacam-se os prótons que se deslocam para campo alto após a associação, significando que se encontram no interior da cavidade do macrociclo, conforme esquematizado na estrutura química.	64
3.31	Espectros de absorção a diferentes valores de pH, mantendo a temperatura de 25 °C e [citrato de sódio] = 10 mM, do composto 6 (22 μ M), na presença de 2 eq. de CB7, cerca de 10 minutos após saltos de pH desde pH = 1 até valores superiores.	65
3.32	Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e à temperatura ambiente do composto 6Ct associado com CB7 (9 μ M, pH = 6, [citrato de sódio] = 10 mM, 2 eq. CB7). Em <i>inset</i> apresentam-se as absorvâncias ao comprimento de onda de absorção máximo dos catiões flavílio e chalconas <i>trans</i> em função do tempo de irradiação.	65
3.33	Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de a) 7AH ⁺ (23 μ M, a pH = 1) e b) 7Ct (38 μ M, pH neutro), apresentando-se representações esquemáticas da formação das associações supramoleculares 7AH ⁺ @CB7 e 7Ct@CB7. Em <i>inset</i> apresentam-se os ajustes dos dados experimentais aos modelos teóricos 2:1 e 1:1 descritos no Apêndice C, respetivamente.	66
3.34	Espectros de ¹ H RMN do composto 7AH ⁺ (0,55 mM) livre (em baixo) e com 1 eq. de CB7 (em cima), a pD = 1, em D ₂ O, 400 MHz. A cor de laranja destacam-se os prótons que se deslocam para campo alto após a associação, significando que se encontram no interior da cavidade do macrociclo, conforme esquematizado na estrutura química.	67
3.35	Espectros de ¹ H RMN do composto 7Ct (0,80 mM) livre (em baixo) e com 1 eq. de CB7 (em cima), em D ₂ O, 400 MHz. A cor de laranja destacam-se os prótons que se deslocam para campo alto após a associação, significando que se encontram no interior da cavidade do macrociclo, conforme esquematizado na estrutura química.	67

3.36	Espetros de absorção a diferentes valores de pH, mantendo a temperatura de 25 °C e [citrato de sódio] = 10 mM, do composto 7 (17 μ M), na presença de 1 eq. de CB7, cerca de 10 minutos após saltos de pH desde pH = 1 até valores superiores.	68
3.37	Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e à temperatura ambiente da associação supramolecular 7Ct@CB7 ([7Ct] = 25 μ M, pH = 6 [citrato de sódio] = 10 mM, 1 eq. CB7). Em <i>inset</i> apresentam-se as absorvâncias ao comprimento de onda de absorção máximo do catião flavílio e chalcona <i>trans</i> em função do tempo de irradiação.	69
A.1	Espetro de ^1H RMN do composto 1Al em CDCl_3	79
A.2	Espetro de ^1H RMN do composto 2Al em CDCl_3	80
A.3	Espetro de ^1H RMN do composto 1Ac em CDCl_3	80
A.4	Espetro de ^1H RMN do composto 2Ac em CDCl_3	81
A.5	Espetro de ^1H RMN do composto 1AH⁺ em CD_3OD	81
A.6	Espetro de ^1H RMN do composto 1Ct em CD_3OD	82
A.7	Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD do composto 1AH⁺ (à esquerda) e 1Ct (à direita). Em <i>inset</i> apresentam-se os espectros de absorção correspondentes aos picos cromatográficos detetados.	82
A.8	Espetro de ^1H RMN do composto 2AH⁺ em CD_3OD	83
A.9	Espetro de ^1H RMN do composto 2Ct em CD_3OD	83
A.10	Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD do composto 2AH⁺ (à esquerda) e 2Ct (à direita). Em <i>inset</i> apresentam-se os espectros de absorção correspondentes aos picos cromatográficos detetados.	84
A.11	Espetro de ^1H RMN do composto 3AH⁺ em CD_3OD	84
A.12	Espetro de ^1H RMN do composto 3Ct em CD_3OD	85
A.13	Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD do composto 3AH⁺ (à esquerda) e 3Ct (à direita). Em <i>inset</i> apresentam-se os espectros de absorção correspondentes aos picos cromatográficos detetados.	85
A.14	Espetro de ^1H RMN do composto 4AH⁺ em CD_3OD	86
A.15	Espetro de ^1H RMN do composto 4Ct em CD_3OD	86
A.16	Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD do composto 4AH⁺ (à esquerda) e 4Ct (à direita). Em <i>inset</i> apresentam-se os espectros de absorção correspondentes aos picos cromatográficos detetados.	87
A.17	Espetro de ^1H RMN do composto 5AH⁺ em CD_3OD	87
A.18	Espetro de ^1H RMN do composto 5Ct em CD_3OD	88
A.19	Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD do composto 5AH⁺ (à esquerda) e 5Ct (à direita). Em <i>inset</i> apresentam-se os espectros de absorção correspondentes aos picos cromatográficos detetados.	88
A.20	Espetro de ^1H RMN do composto 6AH⁺ em CD_3OD	89
A.21	Espetro de ^1H RMN do composto 6Ct em CD_3OD	90

A.22	Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD do composto 6AH⁺ (à esquerda) e 6Ct (à direita). Em <i>inset</i> apresentam-se os espectros de absorção correspondentes aos picos cromatográficos detetados.	90
B.1	Cascata de reações associadas ao sistema multiestado.	91
C.1	Esquema ilustrativo do substrato (cor de laranja) associado ao recetor (azul escuro) em associações com estequiometria a) 1:1, b) 1:2 e c) 2:1.	95
D.1	Espectros de absorção do composto 1 , a diferentes valores de pH ([citrato de sódio] = 10 mM), no estado a) fundamental (31 μ M, T=37 °C) e b) fotoestacionário (25 μ M, λ_{irr} = 365 nm).	101
D.2	Espectros de absorção do composto 3 , a diferentes valores de pH ([citrato de sódio] = 10 mM), no estado a) fundamental (4 μ M, T=37 °C) e b) fotoestacionário (5 μ M, λ_{irr} = 365 nm).	102
D.3	Irradiação a pH = 1,0 e a 37 °C da a) 1Ct (22 μ M) e b) 3Ct (9 μ M) , mantendo [citrato de sódio] = 10 mM e λ_{irr} = 365 nm.	102
D.4	a) Espectros de ¹ H RMN do composto 1Ct em D ₂ O adquiridos a 37 °C (0,20 mM em baixo e 20 mM em cima). b) Representação da média dos desvios químicos de alguns sinais representativos do composto 1Ct , em função da concentração de composto, destacando-se o valor de CAC determinado por tensiometria a tracejado e a gama na qual deverá constar o valor de CAC indicado por ¹ H RMN.	106
D.5	a) Espectros de ¹ H RMN do composto 3Ct em D ₂ O adquiridos a 37 °C (0,05 mM em baixo e 0,64 mM em cima). b) Representação da média dos desvios químicos de alguns sinais representativos do composto 3Ct , em função da concentração de composto, destacando-se o valor de CAC determinado por tensiometria a tracejado e a gama na qual deverá constar o valor de CAC indicado por ¹ H RMN.	107
D.6	a) Espectros de ¹ H DOSY RMN do composto 1Ct (20 mM, D ₂ O), adquiridos a 37 °C. b) Determinação do coeficiente de difusão, com recurso à equação de Stejskal-Tanner.	107
D.7	a) Espectros de ¹ H DOSY RMN do composto 3Ct (5 mM, D ₂ O), adquiridos a 37 °C. b) Determinação do coeficiente de difusão, com recurso à equação de Stejskal-Tanner.	108
D.8	Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 1AH⁺ (20 μ M), a pH = 1, a uma temperatura de 25 °C, monitorizando-se por espectroscopia de absorção. Em <i>inset</i> apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1 descrito no Apêndice C.	109
D.9	Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 2Ct (56 μ M), a pH neutro, a uma temperatura de 37 °C, monitorizando-se por espectroscopia de absorção. Em <i>inset</i> apresenta-se o ajuste dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1 descrito no Apêndice C.	109

D.10	Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 2AH^+ ($32 \mu\text{M}$), a $\text{pH} = 1$, a uma temperatura de a) 37°C , monitorizando-se por espectroscopia de absorção e de b) 25°C , monitorizando-se por espectroscopia de emissão ($\lambda_{exc} = 415 \text{ nm}$). Em inset apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1 descrito no Apêndice C.	110
D.11	Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 3Ct , a pH neutro, a uma temperatura de 37°C , monitorizando-se por espectroscopia de absorção. Durante a experiência a concentração de substrato variou, pois adicionou-se diretamente macrociclo para prevenir a formação do catião flavílio, o que se verificou numa experiência anterior. Em inset apresenta-se o ajuste dos dados experimentais ao modelo teórico 2:1 descrito no Apêndice C.	110
D.12	Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 3AH^+ ($3 \mu\text{M}$), a $\text{pH} = 1$, a uma temperatura de 25°C , monitorizando-se por espectroscopia de emissão ($\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$). Em inset apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 2:1 descrito no Apêndice C.	111
D.13	a) Espectros de absorção a diferentes valores de pH , mantendo a temperatura a 37°C e $[\text{citrato de sódio}] = 10 \text{ mM}$, do composto 2 ($30 \mu\text{M}$), na presença de CB7 (5 eq.). Em <i>inset</i> apresentam-se os ajustes dos dados experimentais que permitiram obter o valor de pK'_a . b) Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e a 37°C do composto 2Ct ($13 \mu\text{M}$), na presença de CB7 (5 eq.), mantendo o $\text{pH} = 5$ e $[\text{citrato de sódio}] = 10 \text{ mM}$. Em <i>inset</i> apresentam-se as absorvâncias ao comprimento de onda de absorção máximo do catião flavílio e chalcona <i>trans</i> em função do tempo de irradiação.	111
D.14	a) Espectros de absorção a diferentes valores de pH , mantendo a temperatura a 37°C e $[\text{citrato de sódio}] = 10 \text{ mM}$, do composto 3 ($4 \mu\text{M}$), na presença de CB7 (5 eq.). Em <i>inset</i> apresentam-se os ajustes dos dados experimentais que permitiram obter o valor de pK'_a . b) Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e a 37°C do composto 3Ct ($8 \mu\text{M}$), na presença de CB7 (5 eq.), mantendo o $\text{pH} = 4$ e $[\text{citrato de sódio}] = 10 \text{ mM}$. Em <i>inset</i> apresentam-se as absorvâncias ao comprimento de onda de absorção máximo do catião flavílio e chalcona <i>trans</i> em função do tempo de irradiação.	112
D.15	Variações no espectro de dicroísmo circular eletrônico do composto 5AH^+ ($\text{HCl } 0,1\text{M}$), em função da temperatura no arrefecimento.	113
D.16	a) Espectros de ^1H RMN do composto 6AH^+ , adquiridos em condições de gradiente variável, com a sequência <i>ledbpgp2s</i> (6 mM , D_2O , $\text{pD} = 0$). b) Ajuste dos dados experimentais de acordo com a equação de Stejskal-Tanner que permitiu a determinação do coeficiente de difusão: $D = 2,92 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	114
D.17	Esquema ilustrativo da desprotonação de um composto contendo duas unidades ácidas ligadas covalentemente.	114
D.18	Irradiação da 6Ct a pH neutro e à temperatura ambiente ($[\text{citrato de sódio}] = 10 \text{ mM}$; $\lambda_{irr} = 365 \text{ nm}$), seguida de a) irradiação a 280 nm ($[6\text{Ct}] = 10 \mu\text{M}$) ou b) recuperação térmica a 50°C ($[6\text{Ct}] = 9 \mu\text{M}$), apresentando-se a tracejado o espectro de absorção adquirido após 24 h de incubação.	116

D.19	Espetro de absorção do composto 6 (17 μM) antes (linha a cheio) e após (linha a tracejado) irradiação a 365 nm, a pH neutro, na presença de 80% de metanol.	116
D.20	a) Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 7,3',4'-trihidroxiflavílio (21 μM), a pH = 1. Em <i>inset</i> apresenta-se o ajuste dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1, descrito no Apêndice C. b) Variações espectrais observadas após adição de competidor (MV^{2+}) a uma solução de 7,3',4'-trihidroxiflavílio (21 μM), na presença de CB7 (299 μM), a pH = 1. [36] Em inset apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1 apresentado no Apêndice C.	117
D.21	Variações espectrais observadas após adição de competidor (MV^{2+}) a uma solução de 6AH⁺ (19 μM), na presença de CB7 (34 μM), a pH = 1. Em <i>inset</i> apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 2:1, na presença de competidor, conforme descrito no Apêndice C.	117
D.22	Espetro COSY do composto 6AH⁺ (1 mM, D_2O , pD = 1 ajustado com DCl), adquirido na presença de 2,5 eq. de CB7.	118
D.23	Espetro ROESY do composto 6AH⁺ (1 mM, D_2O , pD = 1 ajustado com DCl), adquirido na presença de 2,5 eq. de CB7.	118
D.24	Variações espectrais observadas após adição de competidor (MV^{2+}) a uma solução de 7AH⁺ (28 μM), na presença de CB7 (113 μM), a pH = 1.	119
D.25	Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 7Ct (38 μM), a pH neutro, contendo tampão citrato de sódio (10 mM).	119
D.26	Espetro COSY do composto 7AH⁺ (0,55 mM, D_2O , pD = 1 ajustado com DCl), adquirido na presença de 1 eq. de CB7.	120
D.27	Espetro ROESY composto 7AH⁺ (0,55 mM, D_2O , pD = 1 ajustado com DCl), adquirido na presença de 1 eq. de CB7.	121
D.28	Espetro COSY do composto 7Ct (0,80 mM, D_2O), adquirido na presença de 1 eq. de CB7.	121
D.29	Espetro ROESY do composto 7Ct (0,80 mM, D_2O), adquirido na presença de 1 eq. de CB7.	122
D.30	a) Espetros de absorção a diferentes valores de pH, mantendo a temperatura a 25 °C e [citrato de sódio] = 10 mM, do composto 7 (18 μM), na presença de 25 eq. de CB7, cerca de 10 minutos após saltos de pH desde pH = 1 até valores superiores. b) Distribuição molar em função do pH da espécie 7AH⁺ (vermelho) e das espécies básicas do sistema 7 (verde), livre (linhas a cheio) e na presença de 25 eq. de CB7 (linhas a tracejado).	122

Índice de Tabelas

1.1	Relação entre o valor do parâmetro de empacotamento (P) e a morfologia dos agregados formados para um composto anfílico de cauda única.[6, 7]	4
2.1	Composição do eluente (%v/v) ao longo do tempo de eluição, na análise por HPLC-DAD.	33
3.1	Valores de pK'_a , $pK'_a@PSS$ e $\Delta pK'_a$ para os compostos 1, 2 e 3.	39
3.2	Valores de CAC dos compostos 1Ct, 2Ct e 3Ct, determinados por tensiometria e 1H RMN.	42
3.3	Valores de coeficiente de difusão e raio hidrodinâmico dos agregados dos compostos 1Ct, 2Ct e 3Ct, determinados por 1H DOSY RMN.	43
3.4	Constantes de associação dos compostos 1Ct, 1AH ⁺ , 2Ct, 2AH ⁺ , 3Ct e 3AH ⁺ com CB7, determinadas à temperatura ambiente ou a 37 °C, por espectroscopia de absorção ou de emissão.	50
3.5	Valores de pK'_a e Φ das associações 1@CB7, 2@CB7 e 3@CB7, incluindo-se os valores de pK'_a dos substratos livres para comparação.	52
3.6	Constantes de equilíbrio e rendimentos quânticos de reação para os compostos 6 e 7, na presença e ausência de CB7.	69
D.1	Matrizes de coordenadas atômicas do composto 1Ct, após otimização pelo <i>Gaussian 09</i> (HF/6-311G*; PCM; H ₂ O).	103
D.2	Matrizes de coordenadas atômicas do composto 2Ct, após otimização pelo <i>Gaussian 09</i> (HF/6-311G*; PCM; H ₂ O).	104
D.3	Matrizes de coordenadas atômicas do composto 3Ct, após otimização pelo <i>Gaussian 09</i> (HF/6-311G*; PCM; H ₂ O).	105

Siglas

Abs	Absorvância
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AH ⁺	Catião Flavílio
B	Hemicetal
CAC	Concentração de Agregação Crítica
CBn	Cucurbit[n]urilo
Cc	Chalcona <i>Cis</i>
CCF	Cromatografia de Camada Fina
Ct	Chalcona <i>Trans</i>
DLS	Dispersão de Luz Dinâmica
DOSY RMN	Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear por Difusão Ordenada
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detetor de Fotodíodos
I	Intensidade de Fluorescência
MV ²⁺	Metil-Viologénio
PCM	Modelo Contínuo Polarizável
Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TD-DFT	Teoria de Funcionais da Densidade Dependente do Tempo
Tr	Tempo de Retenção
u.a.	Unidades Arbitrárias
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

| Símbolos

- b** Percurso Ótico
- $\Delta\epsilon$ Dicroísmo Circular Molar
- ϵ Coeficiente de Extinção Molar
- λ Comprimento de Onda
- ϕ Rendimento Quântico de Reação Fotoquímica
- σ Tensão Superficial
- t** Tempo

1 | Introdução

"However, chemistry is not limited to systems similar to those found in biology, but is free to create unknown species and to invent novel processes."
Jean-Marie Lehn [1]

1.1 A Ciência e a Natureza

Desde o início da sua existência que o ser humano procura inspiração na natureza e tenta mimetizar o seu funcionamento em busca de uma melhor qualidade de vida. Já na era Neolítica, o Homem observava os pássaros e, com a ambição de voar, construía asas gigantes e cobria-se de penas.[2] Apesar de esta estratégia não ter permitido concretizar o voo, os avanços científicos e tecnológicos nos anos seguintes possibilitaram a construção de meios de transporte aéreos mais rápidos do que qualquer ser vivo, tendo a criação humana superado a própria natureza.

A comunidade científica esforçou-se também pelo conhecimento e mimetização dos processos ao nível celular. James Watson e Francis Crick, laureados com o Prémio Nobel da Medicina em 1962, determinaram a estrutura molecular do ácido desoxirribonucleico (ADN), o que possibilitou por um lado conhecer o modo como a informação genética é armazenada e transmitida e por outro verificar a importância das interações não covalentes para formar estruturas mais complexas e organizadas, num processo conhecido como auto-montagem.

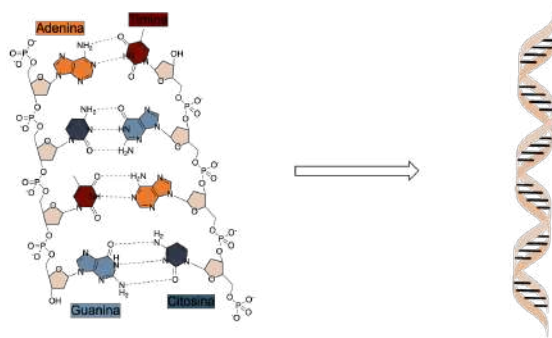


Figura 1.1: Estrutura química do ADN, representando-se a tracejado as interações não covalentes estabelecidas entre as bases azotadas complementares, que permitem a formação da dupla hélice (representação em *cartoon*).

As interações não covalentes e os processos de auto-montagem/agregação têm um papel fundamental em todos os sistemas vivos, desempenhando nomeadamente funções estruturais, de transporte, reconhecimento e armazenamento.[3-5] Para além do exemplo anterior, pode destacar-se a participação no *folding* proteico, na compartimentalização dos organelos celulares, e na composição das membranas celulares.[3, 4] Neste último caso, os fosfolípidos organizam-se por meio de interações não covalentes para formar uma bicamada (Figura 1.2). Os grupos fosfato, de natureza polar, ficam em contacto com o meio aquoso, enquanto as cadeias de ácidos gordos, de natureza apolar, se orientam para o interior da bicamada, definindo uma zona hidrofóbica protegida pelos grupos polares.[3-7]

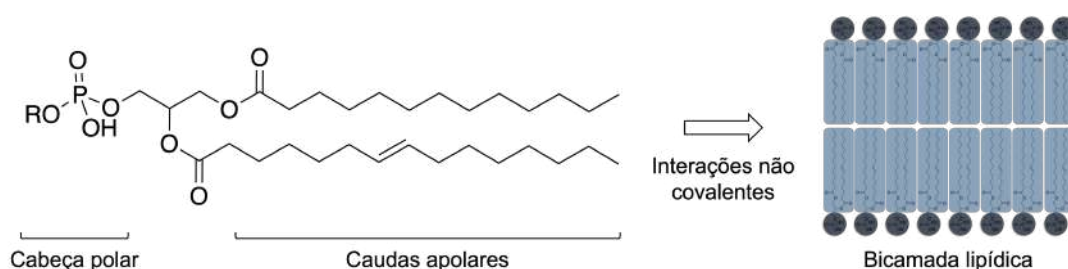


Figura 1.2: Estrutura química exemplificativa de um fosfolípido e representação esquemática da bicamada que se forma devido ao efeito hidrofóbico e às interações não covalentes.

A Química Supramolecular tem como foco o estudo das "super-moléculas", isto é, associações que se formam entre várias moléculas ligadas entre si através de interações não covalentes. Contudo, este tipo de interações, por exemplo as ligações de hidrogénio, tendem a ser enfraquecidas em meio aquoso, sendo o efeito hidrofóbico uma estratégia mais eficiente, muitas vezes combinada com outras interações, que possibilita a formação de estruturas supramoleculares nestas condições. Nos últimos anos, tem sido explorado este efeito para desenvolver sistemas artificiais com capacidade de agregação e que apresentem resposta reversível a estímulos externos como a temperatura, pH, luz, CO₂, campo magnético, entre outros. Esta particularidade permite controlar não só a capacidade de agregação, como a morfologia dos agregados formados.[3-7] As aplicações destes sistemas são vastas, destacando-se o contributo na encapsulação e entrega controlada de fármacos. Esta estratégia apresenta vantagens quando comparada com os métodos convencionais, por permitir aumentar a biodisponibilidade das moléculas de interesse, a solubilidade e capacidade de penetração de membranas, bem como possibilitar a libertação controlada das mesmas.[8-10]

1.2 Compostos Anfílicos Responsivos

1.2.1 Definição e Classificação de Compostos Anfílicos

De acordo com a etimologia grega, $\alpha\mu\phi\iota\varsigma$, *amphi*, significa "ambos" e $\phi\iota\lambda\acute{\iota}\alpha$, *philia*, significa "amor". Um composto anfílico é então constituído por uma componente hidrofílica (polar, "gosta de meios aquosos") e outra hidrofóbica (apolar, "gosta de meios não aquosos"). [3, 4, 6–8]

A classificação destes compostos pode ser feita consoante a natureza iónica da componente hidrofílica em iónicos, zwitteriónicos ou não iónicos. Por outro lado, considerando o número e modo de ligação das cadeias hidrofóbicas e cabeças hidrofílicas, podem classificar-se em anfílicos de cauda única, cauda dupla, bolaform ou gemini, conforme esquematizado na Figura 1.3. [5, 7, 9, 11–14]

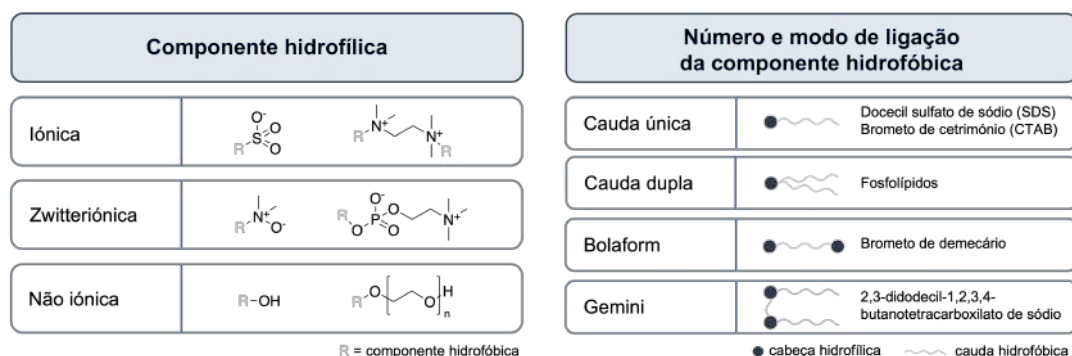


Figura 1.3: Classificação dos compostos anfílicos consoante a natureza da componente hidrofílica (à esquerda) e o número e modo de ligação das componentes hidrofóbica e hidrofílica (à direita), com estruturas/modelos exemplificativos. [5, 7, 9, 11–14]

1.2.2 Formação de Agregados












A capacidade dos compostos anfílicos de, em solução, originar estruturas mais complexas através de um processo de auto-montagem/agregação é conhecida, baseando-se no efeito hidrofóbico e em interações não covalentes como ligações de hidrogénio, interações de Van der Waals ou eletrostáticas, entre outras. Enquanto a componente hidrofílica interage com a fase polar, a componente hidrofóbica tem preferência por ambientes apolares, possibilitando a formação de diversas estruturas em solução ou na interface solução-ar. [4, 6, 7]

A morfologia e o tamanho dos agregados formados dependem de diversos fatores, como a estrutura do composto anfílico, a concentração, as propriedades do solvente e a temperatura. O parâmetro de empacotamento (P) permite prever estas propriedades dos agregados através de parâmetros geométricos como o volume (v) e comprimento (l_0) da componente hidrofóbica e a área da componente hidrofílica no agregado (a_0) - Equação 1.1. [6, 7]

$$P = \frac{v}{a_0 l_0} \quad (1.1)$$

Na Tabela 1.1, apresenta-se a relação entre o parâmetro de empacotamento e a morfologia dos agregados formados, para um composto anfifílico de cauda única.

Tabela 1.1: Relação entre o valor do parâmetro de empacotamento (P) e a morfologia dos agregados formados para um composto anfifílico de cauda única.[6, 7]

P	$P \leq 1/3$	$1/3 < P \leq 1/2$	$1/2 < P < 1$	$P = 1$	$P > 1$	
Estrutura dos Anfílicos						
Tipo de Agregados	Micelas esféricas	Micelas alongadas	Vesículas	Túbulos	Bicamadas	Micelas invertidas
Modelo dos Agregados						

Quando o parâmetro de empacotamento é inferior a $1/3$, a geometria do composto anfifílico é equivalente a um cone e observa-se a formação de micelas esféricas. Caso a componente hidrofóbica ocupe um volume ligeiramente superior, mantendo a área da componente hidrofílica, as micelas passam a ser alongadas ($1/3 < P \leq 1/2$). Para um valor de P entre $1/2$ e 1 , pode observar-se a formação de vesículas ou túbulos. Quando $P = 1$, a geometria do composto anfifílico é cilíndrica, formando-se bicamadas planares. Por último, para valores de P superiores a 1 , verifica-se a formação de micelas invertidas, em solventes orgânicos.

Para além da caracterização de um composto anfifílico quanto à morfologia e tamanho dos agregados que origina, é ainda importante considerar a concentração de agregação crítica (CAC). Este parâmetro é o principal fator físico-químico a considerar na caracterização destes compostos e é definido pela IUPAC como a gama de concentrações abaixo da qual não se detetam agregados e acima da qual todas as moléculas adicionais de tensoativo formam agregados (Figura 1.4).[15] Em condições acima da CAC, as moléculas de composto anfifílico livres e presentes nos agregados existem em equilíbrio dinâmico.[16]

Existem várias técnicas experimentais que permitem determinar a CAC, tendo todas a capacidade de detetar variações de propriedades físicas que dependam da concentração de composto anfifílico.[16–19] Por exemplo, tanto a tensiometria como a condutimetria são técnicas que permitem a determinação direta da CAC, detetando variações na tensão superficial (σ) e na condutividade da solução, respetivamente.[16] Por outro lado, pode efetuar-se uma determinação indireta, monitorizando as alterações de uma propriedade num composto que funcione como sonda, à medida que a concentração de composto anfifílico aumenta. Para este tipo de determinação da CAC utilizam-se tipicamente métodos espetroscópicos.[17, 19]

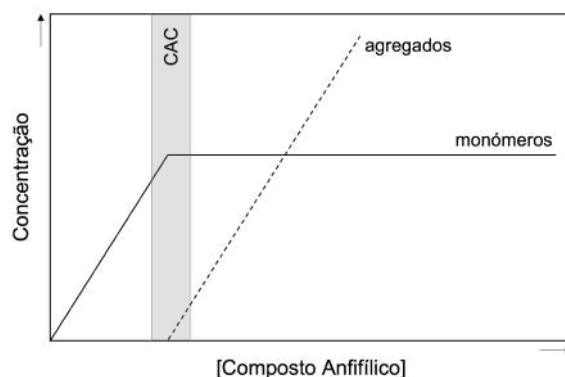


Figura 1.4: Definição de concentração de agregação crítica, com base na concentração de monómeros de composto anfifílico (linha a cheio) e de agregados formados (linha a tracejado).[16]

1.2.3 Resposta a Estímulos Externos

A introdução de unidades sensíveis a estímulos externos nos compostos anfifílicos é uma das estratégias para controlar a capacidade de agregação que lhes é intrínseca, bem como a morfologia dos agregados resultantes. Na literatura, encontram-se diversos exemplos de unidades que respondem a alterações de pH, temperatura, luz, campo magnético, redox, entre outros, contribuindo todos eles para a obtenção de nanoestruturas responsivas.[3, 6, 7, 9, 12] Nas secções seguintes apresentam-se alguns trabalhos previamente desenvolvidos, considerando diferentes estímulos externos.

1.2.3.1 Temperatura

O uso da temperatura como estímulo externo permite um controlo acessível do sistema, sem o uso de aditivos.[6] Sabe-se que o aumento de temperatura promove a agitação das moléculas, diminuindo as interações não covalentes, nomeadamente as ligações de hidrogénio, o que se espera que promova alterações na estrutura dos agregados.

Em 2013, Hao e seus colaboradores reportaram a transição entre estruturas helicoidais e vesículas, promovida pela variação de temperatura, em misturas de alquil-dimetilamina (C_n DMAO) e ácido litocólico (LCA) - Figura 1.5.[20]

O ácido litocólico apresenta uma capacidade de agregação interessante, devido à presença de vários centros quirais na sua estrutura, bem como de um grupo hidroxilo ligado a um esqueleto carbonado rígido. Os autores verificaram que a interação deste composto com aminas diméricas ou oligoméricas possibilita a obtenção de hidrogéis devido ao efeito estérico do LCA e ao balanço das várias interações que promovem a formação de agregados, como o efeito hidrofóbico, ligações de hidrogénio, interações eletrostáticas ou de Van der Waals. O aquecimento das misturas em estudo promove a quebra das ligações de hidrogénio, conduzindo a uma redistribuição das interações não covalentes existentes no sistema e conseqüente transição da estrutura do agregado de helicoidal para vesículas.[20]

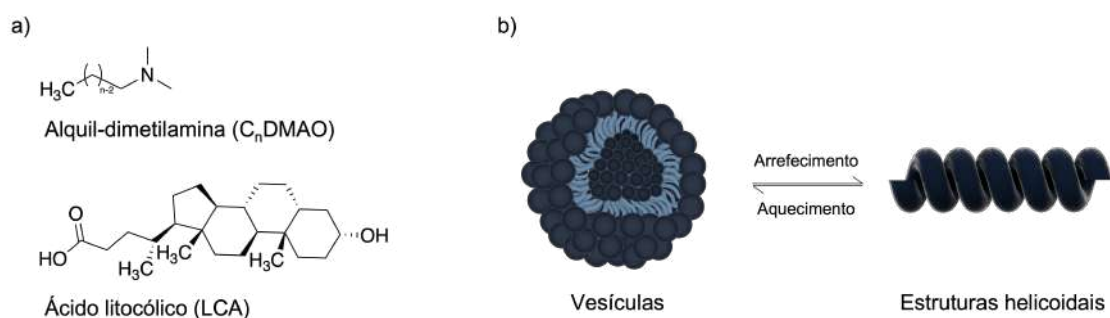


Figura 1.5: a) Estruturas químicas dos compostos estudados por Hao e seus colaboradores: alquil-dimetilamina (C_n DMAO) e ácido litocólico (LCA). b) Esquema do sistema construído, sensível a alterações de temperatura.[20]

1.2.3.2 pH

A variação do pH pode originar diversas alterações na estrutura dos compostos em estudo, não só através de mecanismos de protonação e desprotonação, como também por favorecer reações, por exemplo de hidratação ou hidrólise. Deste modo, a solubilidade dos compostos pode ser alterada, assim como a respetiva capacidade de agregação.[6, 21, 22]

Os aminoácidos são um exemplo típico de sistema sensível ao pH, devido à possível protonação/desprotonação dos grupos carboxilo e amina terminais. Considerando um composto anfifílico contendo na sua estrutura aminoácidos, dependendo do pH do meio, será um composto aniônico, catiónico ou zwitteriônico, o que originará diferentes agregados.[6] Huang e seus colaboradores reportaram, em 2016, a variação em função do pH da estrutura dos agregados formados a partir de um tensoativo do tipo gemini, derivado de um aminoácido (Figura 1.6).[6, 22] Os autores verificaram que o aumento do caráter básico favorece a formação de micelas alongadas, substituindo as micelas esféricas, existentes em condições de pH ácido.

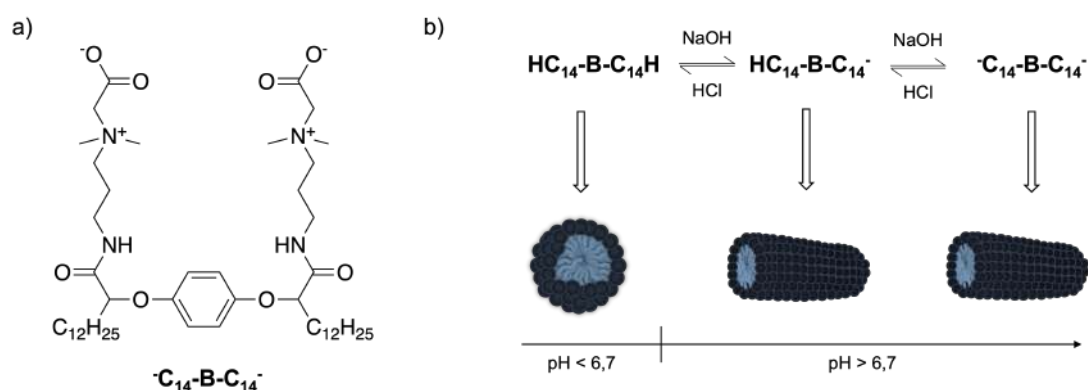


Figura 1.6: a) Estrutura química do tensoativo derivado de um aminoácido utilizado por Huang e seus colaboradores. b) Estrutura dos agregados formados, em função do pH.[22]

1.2.3.3 Luz

A luz é um dos estímulos externos mais promissores, já que permite o controlo remoto e imediato do sistema, apresenta seletividade através da manipulação do comprimento de onda (λ) e pode ser um método biocompatível e limpo.[5–9, 12, 23] As famílias de fotocomutadores, isto é, espécies cuja estrutura tridimensional é alterada reversivelmente por ação da luz, que se podem incluir na estrutura química de compostos anfifílicos são diversas.[24] Na Figura 1.7, apresentam-se alguns exemplos, nos quais a conversão de uma forma do fotocomutador na outra inclui reações de isomerização de duplas ligações, de ciclização ou a combinação de vários tipos de reações.

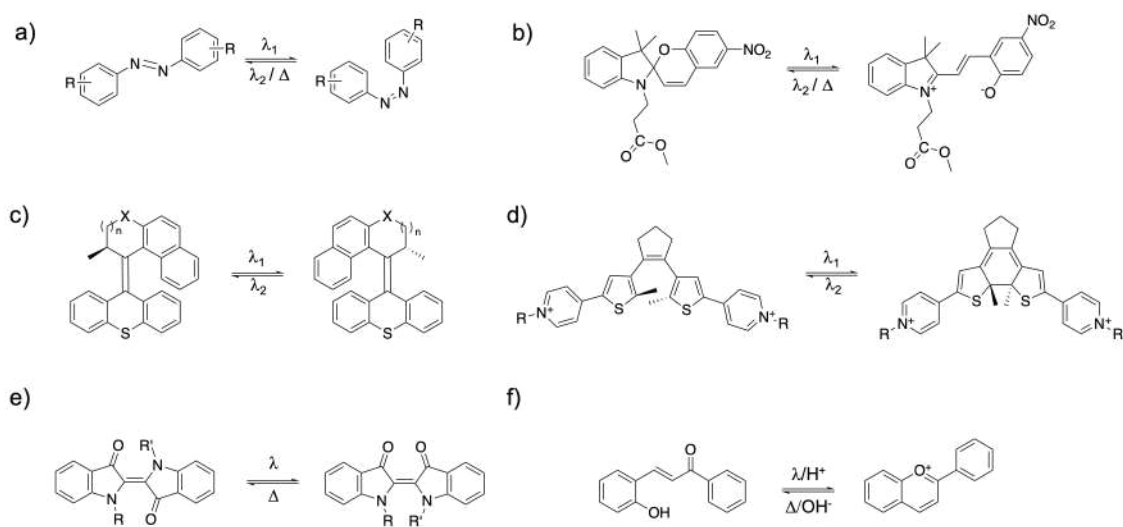


Figura 1.7: Transformações estruturais de fotocomutadores, após aplicação de um estímulo de luz: a) azobenzeno [23]; b) spiropirano [25]; c) alceno superlotado [5]; d) ditieniletano [26]; e) índigo [27] e f) 2-hidroxichalcona [28–37].

Os azobenzenos alternam entre a espécie *trans* e *cis*; os spiropiranos entre uma forma fechada neutra e outra aberta zwitteriônica; os alcenos superlotados constituem um exemplo de motor molecular, verificando-se a rotação unidirecional em torno da dupla ligação central; os ditieniletanos alternam entre uma forma aberta e outra fechada conjugada; o índigo N,N-substituído alterna entre o isómero *E* e *Z* e, por fim, as 2-hidroxichalconas são convertidas no catião flavílio, após uma cascata de reações desencadeada por irradiação e acidificação. [5, 8, 23, 25–37]

Os exemplos de fotocomutadores apresentados absorvem na gama do ultravioleta-visível (UV-Vis). Este tipo de radiação apresenta como desvantagem a baixa profundidade de penetração nos tecidos biológicos, estando a sua aplicação biomédica limitada a zonas mais acessíveis como a pele ou os olhos.[4] Existem, no entanto, nanopartículas que permitem a conversão da luz na gama do infravermelho próximo (NIR) em UV-Vis, conforme reportado por Zhao e seus colaboradores em 2011. Os autores verificaram a dissociação de estruturas micelares com recurso a esta abordagem.[4, 38]

Na literatura, encontram-se reportados diversos sistemas anfífilos foto-responsivos, com diferentes graus de complexidade e que originam tipos de agregados distintos.[4–7, 9, 39, 40] Por exemplo, Zheng e seus colaboradores sintetizaram um líquido iônico com caráter anfílico, que contém na sua estrutura uma unidade de azobenzeno ($C_{14}mimAzoBr$) - Figura 1.8.[39, 40] Enquanto o isômero *trans* se organiza para formar micelas e, a uma concentração superior, vesículas, o isômero *cis* (obtido por irradiação do anterior com luz UV) origina estruturas micelares.

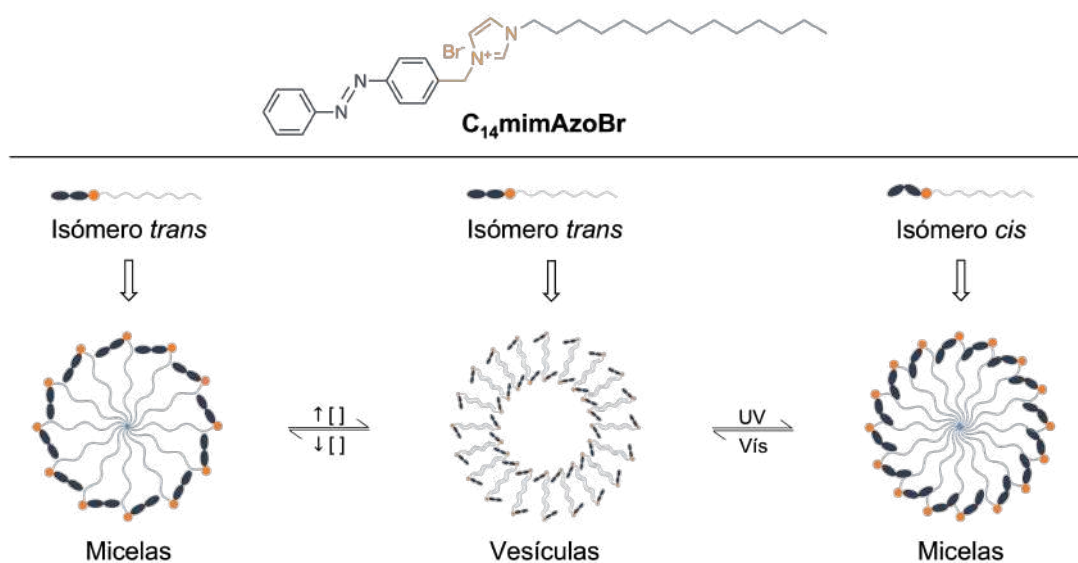


Figura 1.8: Estrutura química do líquido iônico anfílico contendo uma unidade de azobenzeno ($C_{14}mimAzoBr$) sintetizado por Zheng e seus colaboradores. Esquema em *cartoon* da interconversão entre micelas e vesículas, desencadeada por variações de concentração ou irradiação.[39]

Em 2016, Tian e seus colaboradores divulgaram a funcionalização de um alceno superlotado com cadeias de tetraetilenoglicol, tendo obtido um composto anfílico foto-responsivo que agrega em meio aquoso para formar vesículas, cujo tamanho é alterado após irradiação (Figura 1.9). A capacidade de encapsulação de calceína, molécula solúvel em água e com elevada fluorescência, foi testada. Os autores verificaram que, após irradiação, o tamanho das vesículas diminuía, havendo liberação da calceína e, por recuperação térmica, o tamanho inicial das vesículas era retomado, comprovando assim a resposta dos agregados à luz, bem como a reversibilidade do sistema.[9]

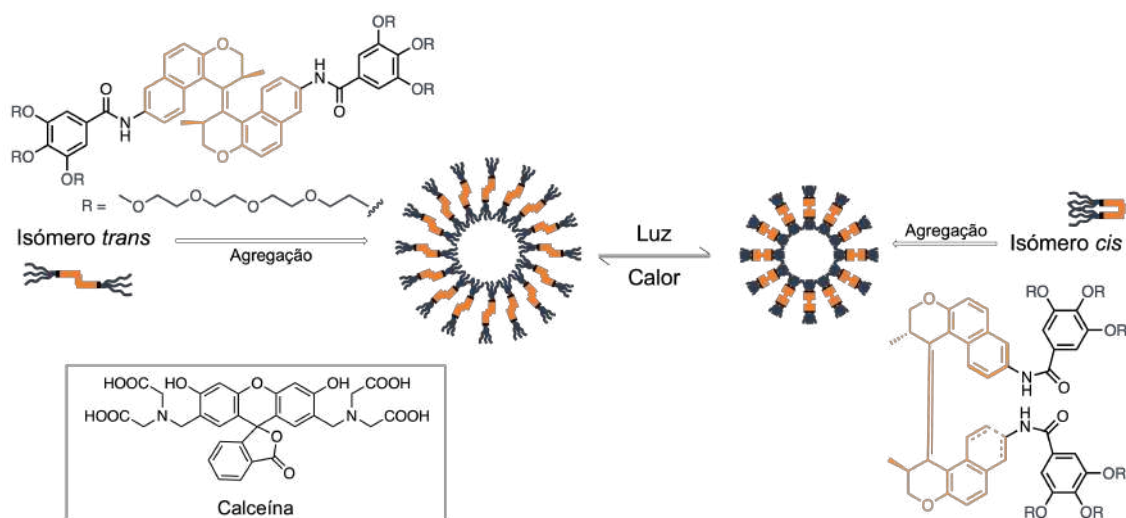


Figura 1.9: Estruturas químicas dos isômeros *trans* e *cis* do composto anfifílico foto-responsivo caracterizado por Tian e seus colaboradores, destacando-se a unidade foto-responsiva a cor de laranja, bem como da calceína, com representação esquemática das vesículas formadas.[9]

1.2.3.4 Interações Recetor-Substrato e Formação de Agregados Supra-Anfifílicos

As interações recetor-substrato envolvem o reconhecimento molecular entre duas ou mais entidades químicas, estabelecendo-se interações não covalentes que originam a formação de uma associação supramolecular. Este mecanismo é semelhante ao que se observa por exemplo nos sistemas enzimáticos (Figura 1.10).[1, 3, 41]

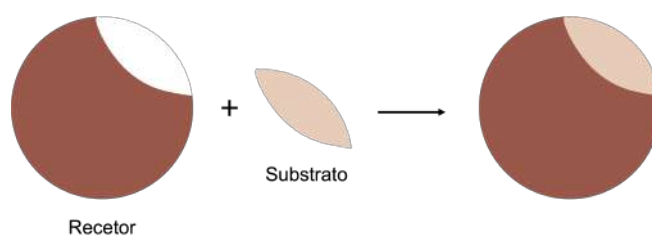


Figura 1.10: Exemplo ilustrativo da ligação de um recetor a um substrato para formar uma associação supramolecular.

Em 1987, o Prémio Nobel da Química foi atribuído a Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn e Charles J. Pedersen pelo seu contributo para o desenvolvimento de moléculas macrocíclicas, cujas cavidades apresentam seletividade para determinados iões ou moléculas de baixo peso molecular.[1, 3, 41, 42] Desde então, o interesse pela Química do reconhecimento molecular cresceu e têm sido desenvolvidos novos compostos que atuam como recetores para diferentes substratos.[3] Na Figura 1.11), reúnem-se alguns exemplos.

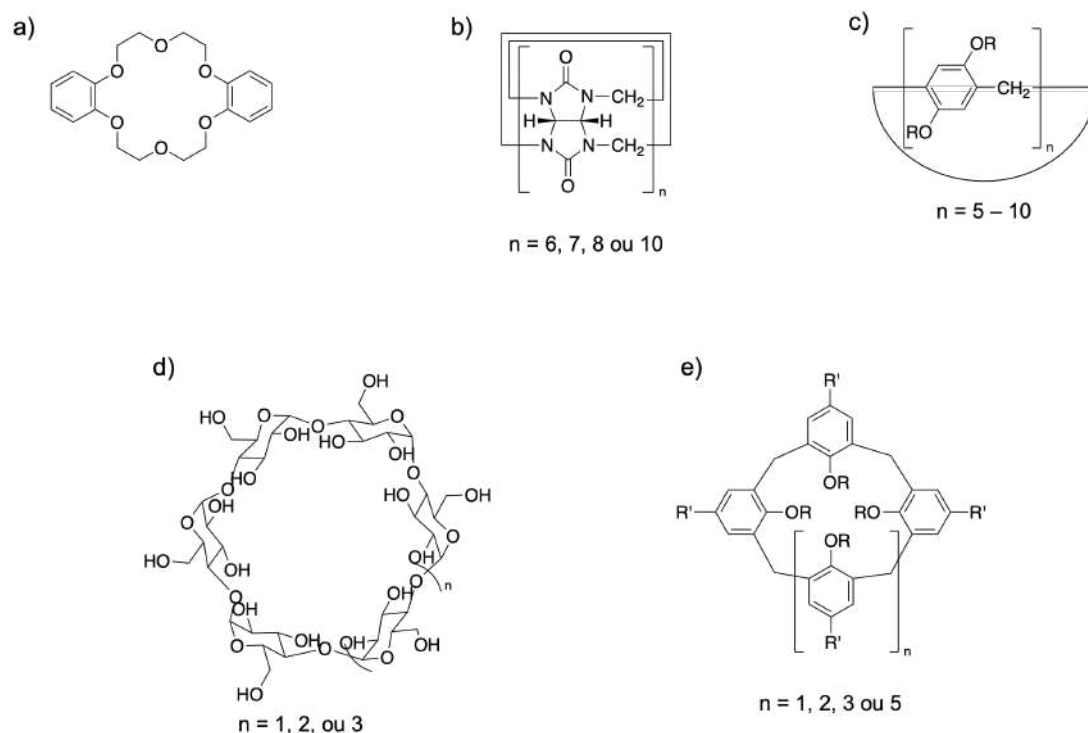


Figura 1.11: Estrutura química de compostos macrocíclicos: a) Primeiro éter de coroa [43], b) Cucurbit[n]urilo (CB_n) [44], c) Pilar[n]areno [45], d) Ciclodextrina [3] e e) Calix[n]areno [3].

Na literatura, encontram-se diversos exemplos que mostram que os fenômenos de agregação podem ser controlados através de interações com recetores macrocíclicos, associados ou não a outros estímulos externos.[3, 46–48] Considerando moléculas de substrato com caráter anfílico pode verificar-se, por um lado, a destruição dos respetivos agregados e, por outro, o aumento da CAC e formação de agregados supra-anfílicos.[3, 47, 48] Neste último caso, as interações recetor-substrato permitem obter compostos (e conseqüentemente agregados) com um grau de complexidade estrutural e tamanho superiores relativamente aos anfílicos respetivos. Ao mesmo tempo atinge-se uma capacidade de encapsulação semelhante à que se verifica nos sistemas construídos a partir de compostos anfílicos poliméricos, apresentando a vantagem de os procedimentos sintéticos para a sua obtenção serem mais simples. Para além disso, a natureza reversível e dinâmica das interações que mantêm as associações supramoleculares adicionam maior capacidade de resposta a estes sistemas, constituindo uma abordagem interessante para aplicações em entrega controlada de fármacos, por exemplo.[3]

Zhang e seus colaboradores desenharam um composto supra-anfílico foto-responsivo, ao incluir uma unidade de azobenzeno num composto anfílico (**AzoC10**) e usando como recetor a α -ciclodextrina (α -CD, $n = 1$). A caracterização por microscopia eletrônica de transmissão permitiu determinar a morfologia dos agregados formados. O composto anfílico *trans*-**AzoC10** livre agrega formando vesículas. Após a adição de um equivalente de α -CD, estas são destruídas, já que o macrociclo se associa à unidade de azobenzeno (hidrofóbica), retirando o caráter

anfílico ao composto. A irradiação a 365 nm permite obter o isómero *cis-AzoC10* que, por ter um volume superior ao da cavidade do macrociclo, permite que o caráter anfílico seja recuperado, verificando-se a recuperação de agregados vesiculares (Figura 1.12). O sistema mostrou ter reversibilidade, através de irradiação a 450 nm.[3, 49]

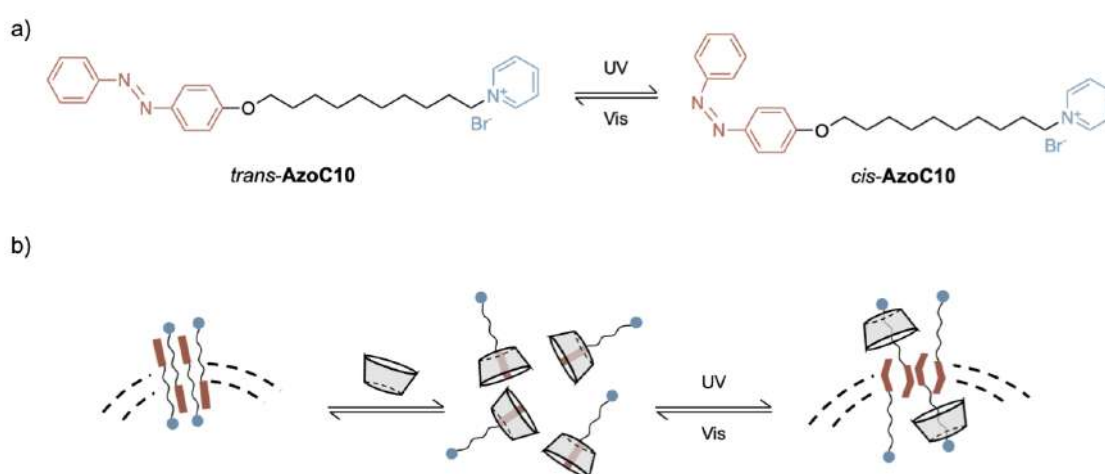


Figura 1.12: a) Estruturas químicas dos compostos sintetizados por Zhang e seus colaboradores: *trans-AzoC10* e *cis-AzoC10*. b) Esquema ilustrativo do controlo de agregação do composto anfílico na presença de α -CD, utilizando simultaneamente estímulos de luz.[49]

Numa outra abordagem, Xue e seus colaboradores reportaram uma associação supramolecular entre *p*-hidroxibenzoato de sódio (36) e um macrociclo da família dos pilar[6]arenos (WP6I), que inclui na sua estrutura 12 unidades catiónicas de imidazólio (Figura 1.13). O composto supraanfílico forma vesículas, em contraste com o composto anfílico livre que forma estruturas micelares. Os autores verificaram ainda a resposta do sistema ao pH, pois a protonação/desprotonação do composto 36 altera a capacidade de interação com o pilar[6]areno. Nos ensaios de encapsulação de calceína, verificou-se que as vesículas atuam como transportadoras em condições de pH neutras a moderadamente básicas, e a descida do pH diminui as interações recetor-substrato, ocorrendo a transição das vesículas a micelas e consequente libertação da calceína.[3, 50]

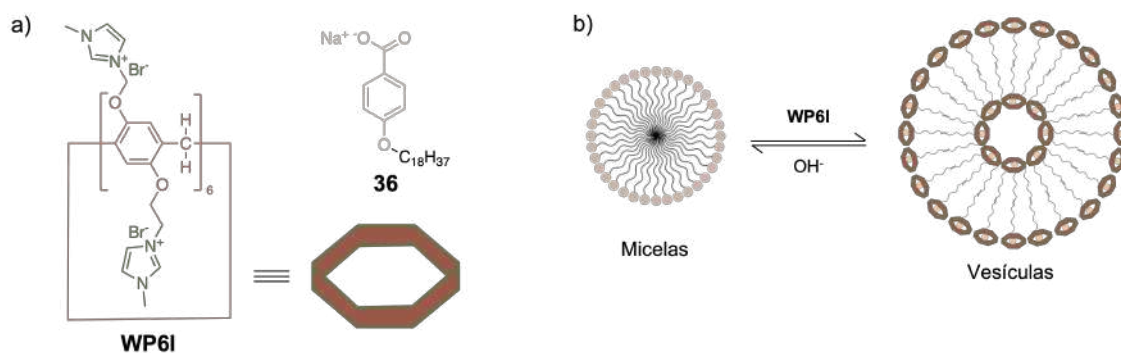


Figura 1.13: a) Estruturas químicas dos compostos investigados por Xue e seus colaboradores: **36** e **WP6I**. b) Esquema ilustrativo do controlo de agregação do composto anfílico na presença do macrociclo, considerando variações nas condições de pH.[50]

1.3 O Sistema Multiestado das Antocianinas como Unidade Responsiva

No âmbito deste trabalho, a unidade responsiva selecionada foi o sistema multiestado presente nas antocianinas, compostos naturais que conferem a ampla gama de cores às flores, frutos e folhas (Figura 1.14). Este sistema tem a vantagem de responder de forma combinada a estímulos de luz e pH, o que possibilita uma maior seletividade para células tumorais, tornando-o interessante para aplicações de entrega controlada de fármacos. Para além disso, este sistema inclui a existência de várias espécies (multiestado), sendo que uma delas (catião flavílio) pode apresentar fluorescência, o que permite a sua deteção em meios biológicos de um modo direto. [28–37]

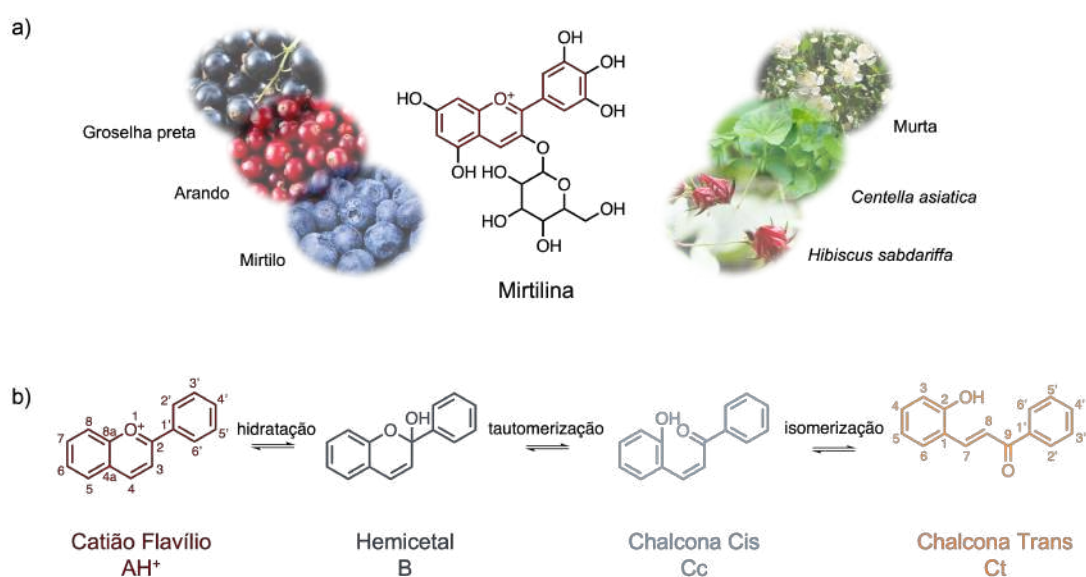


Figura 1.14: a) Exemplo de antocianina - mirtilina - com o núcleo de 2-fenilbenzopirílio (catião flavílio) destacado a vermelho, e exemplos de frutos e folhas onde está presente. b) Espécies e reações químicas do sistema multiestado inerente às antocianinas, incluindo a numeração das estruturas do cation flavílio e da chalcona *trans* que se utilizarão ao longo do documento. [29–31, 36, 37, 51]

As secções seguintes incluem o funcionamento do sistema multiestado, a descrição de estratégias sintéticas possíveis para a obtenção destes compostos e, por fim, as interações recetor-substrato com cucurbiturilos como estratégia adicional para controlar a agregação.

1.3.1 Funcionamento do Sistema Multiestado

O cation flavílio (AH^+) apenas é estável em meios bastante ácidos ($pH < 2$), dado que a subida do pH origina a hidratação da posição 2 (eletrofílica) e conseqüente formação do hemicetal (B). Como esta espécie não é muito estável, rapidamente tautomeriza, havendo formação da chalcona *cis* (Cc). Por fim, ocorre isomerização da dupla ligação, obtendo-se o produto termodinâmico: a chalcona *trans* (Ct), numa escala de tempo (t) dependente do padrão de substituição do composto.

Em alguns sistemas, observa-se ainda a hidratação do catião flavílio na posição 4, formando o produto cinético B4. [28–37, 52, 53]

Embora seja possível controlar este sistema apenas consoante o pH do meio, importa destacar a natureza foto-responsiva da chalcona *trans* que, quando irradiada a um comprimento de onda adequado, isomeriza para originar a chalcona *cis*. Esta, após passar pelo hemiacetal, e dependendo das condições de pH, pode originar novamente o catião flavílio, num estado meta-estável. Após algum tempo, a cascata de reações repete-se no sentido inverso, por recuperação térmica. Assim, é comum abreviar este sistema ao equilíbrio entre o catião flavílio e a chalcona *trans*, como já tinha sido mostrado na Figura 1.7, visto serem as espécies mais estáveis, e obter um fotocomutador aparente. Na Figura 1.15, apresentam-se esquematicamente os estímulos que permitem obter uma espécie ou outra. [28–37]

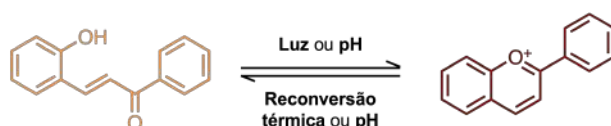


Figura 1.15: Esquema simplificado do fotocomutador do sistema multiestado presente nas antocianinas.

1.3.2 Estratégias Sintéticas

Na literatura, estão descritas várias metodologias para a síntese de núcleos de 2-fenilbenzopirílio. Porém, a mais popular é a Condensação de Claisen-Schmidt em meio ácido, que ocorre entre 2-hidroxibenzaldeídos e acetofenonas, com os padrões de substituição desejados (Figura 1.16). [54]

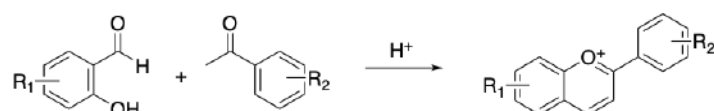


Figura 1.16: a) Síntese de núcleos de 2-fenilbenzopirílio através de uma Condensação de Claisen-Schmidt em meio ácido.

Já as 2-hidroxicalconas, como são moléculas com grande interesse farmacológico, podem ser obtidas por várias vias sintéticas. Contudo, os métodos mais comuns são a Condensação de Claisen-Schmidt em meio básico e a conversão partindo do catião flavílio, dando uso às propriedades do sistema multiestado (Figura 1.17). [55, 56]

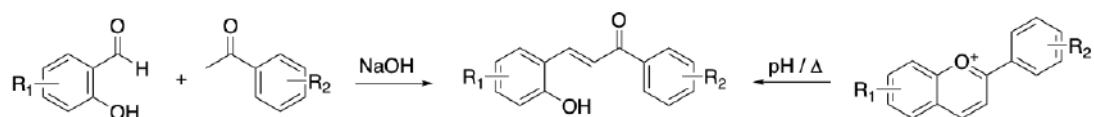


Figura 1.17: Síntese de 2-hidroxicalconas através de uma Condensação de Claisen-Schmidt em meio básico ou por conversão do catião flavílio, beneficiando das propriedades do sistema multiestado.

1.3.3 Interações Supramoleculares com Cucurbiturilos

Dadas as diferenças estruturais entre a chalcona *trans* e o catião flavílio, é esperado que a primeira espécie tenha maior predisposição para formar agregados, visto ter caráter neutro; enquanto a segunda apresenta uma carga formal positiva, o que originaria repulsões eletrostáticas, desestabilizando um possível agregado. Desta forma, teoricamente, a formação ou rutura das estruturas supramoleculares formadas poderá ser controlada através de estímulos de luz, pH ou temperatura. Ainda assim, o uso adicional de interações recetor-substrato como estímulo externo pode ser vantajoso, nomeadamente porque as propriedades cinéticas e termodinâmicas, bem como a resposta fotoquímica da associação supramolecular deverão ser distintas das do composto livre.

Os cucurbiturilos são macrociclos compostos por um número variável de unidades de glicolurilo, conforme exposto anteriormente na Figura 1.11. Devido à sua cavidade hidrofóbica e à natureza eletronegativa dos seus portais, têm uma grande afinidade para se associar a catiões ou moléculas neutras, nomeadamente o catião flavílio, motivo pelo qual se encontram na literatura diversos trabalhos envolvendo o estudo das interações recetor-substrato entre estes compostos.[52, 53] Habitualmente, a afinidade para se associar à chalcona *trans* é bastante menor ou inexistente, o que resulta numa estabilização do catião flavílio até valores de pH mais elevados, ou seja, o aumento do pK'_a do sistema multiestado.

No grupo de investigação, foi feito um estudo prévio das interações recetor-substrato entre o cucurbit[7]urilo e um catião flavílio contendo um grupo sulfonato (e respetiva Ct), como estratégia para controlar a libertação de um fármaco tipicamente prescrito para o tratamento da doença de Alzheimer, a memantina. Verificou-se uma diferença de quase quatro ordens de grandeza nas constantes de associação do catião flavílio e respetiva chalcona *trans* com o CB7 ($K_{1:1}(Ct) = 3,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$; $K_{1:1}(AH^+) = 9,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) (Figura 1.18), o que possibilitou a libertação foto-induzida da memantina, por ter uma constante de associação com o macrociclo inferior à da espécie catiónica do sistema multiestado.[57]

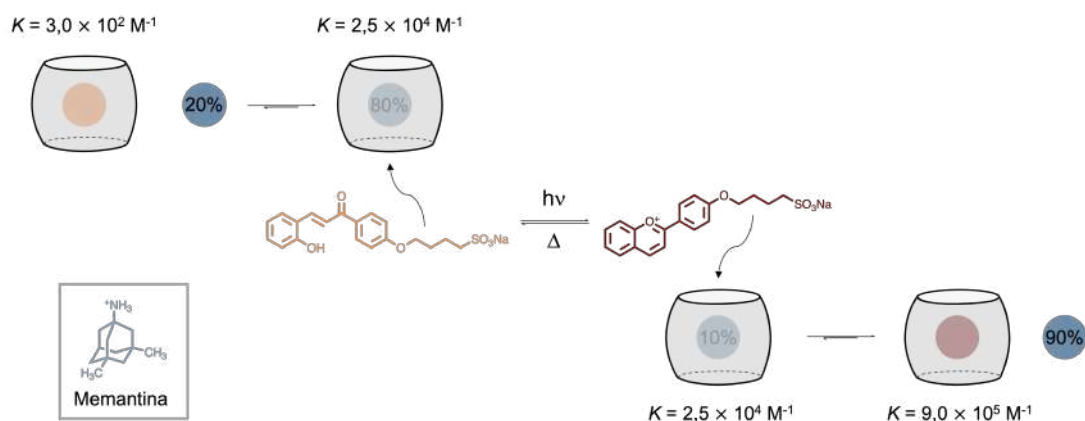


Figura 1.18: Libertação foto-induzida de memantina, por interação do CB7 com um fotocmutador da família das antocianinas. As percentagens indicam a quantidade de memantina livre e em associação com o macrociclo.

Com base nestes resultados, espera-se que esta preferência pela espécie zwitteriônica possibilite, para além da alteração das propriedades cinéticas e termodinâmicas do sistema multiestado, o controlo da agregação, à semelhança dos exemplos apresentados na Secção 1.2.3.4 (Figura 1.19).

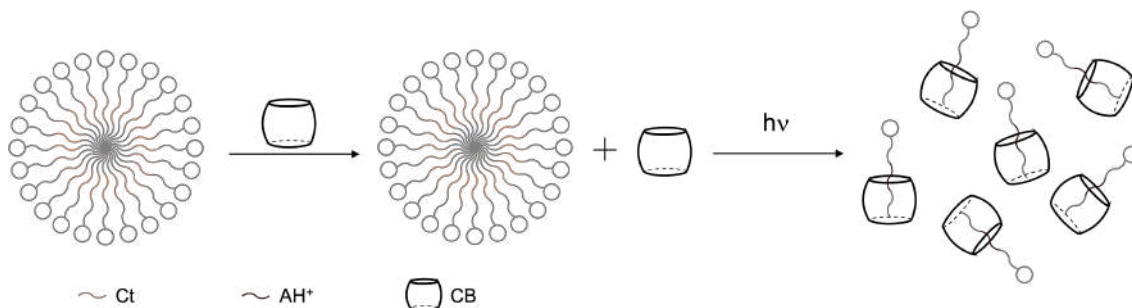


Figura 1.19: Esquema ilustrativo da alteração das propriedades de agregação de um composto anfílico contendo um fotocomutador da família das antocianinas, com recurso a interações recetor-substrato com um cucurbiturilo, seguidas de irradiação.

1.4 Objetivos

No âmbito deste trabalho, o principal objetivo foi sintetizar e caracterizar compostos anfílicos contendo unidades responsivas à luz e ao pH, com potenciais aplicações em sistemas para entrega controlada de fármacos.

Para tal, optou-se pela síntese de derivados anfílicos de 2-hidroxicalconas com componentes hidrofílicas de natureza aniônica (sulfonato) e catiônica (tetrametiletilenodiamónio). No caso dos compostos contendo um grupo sulfonato ambicionou-se estudar o efeito do tamanho da cadeia hidrofóbica, introdução de um centro quiral e variação do padrão de substituição da unidade multi-responsiva. Quanto aos compostos contendo a componente hidrofílica de natureza catiônica, pretendeu-se sintetizar um composto do tipo gemini e comparar os resultados obtidos com o anfilo análogo de cauda única.

A síntese dos compostos de interesse compreendeu, em primeiro lugar, a obtenção de acetofenonas e aldeídos com os padrões de substituição pretendidos, tendo-se efetuado reações de condensação em meio ácido para originar os compostos na forma de catião flavílio. Dando uso às propriedades do sistema multiestado, as respetivas chalconas *trans* foram obtidas por conversão em condições de pH neutro. A pureza dos compostos foi confirmada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida de alta eficiência, com detetor de fotodíodos (HPLC-DAD).

Em todos os casos, esperava-se que as chalconas interagissem para formar micelas ou outro tipo de agregados que, após um estímulo de luz, se dissociariam devido à formação do catião flavílio. Assim, pretendeu-se determinar a concentração de agregação crítica com recurso a tensiometria e a ^1H RMN e a morfologia e tamanho dos agregados por dispersão de luz dinâmica (DLS) e espectroscopia de ^1H RMN por difusão ordenada (^1H DOSY RMN). No caso do composto contendo um centro quiral, pretendeu-se realizar estudos recorrendo à técnica de dicroísmo circular. As propriedades fotoquímicas foram estudadas com recurso a espectroscopia de absorção ultravioleta-visível (UV-Vis), a concentrações abaixo e acima da CAC.

Pretendeu-se ainda avaliar a capacidade dos agregados formados para encapsularem compostos hidrofóbicos, recorrendo a espectroscopia de absorção UV-Vis.

1.5 Organização do Documento

O presente documento está organizado em quatro Capítulos: Introdução (1), Parte Experimental (2), Apresentação e Discussão de Resultados (3) e Conclusões e Perspetivas Futuras (4); e em quatro Apêndices.

Neste Capítulo introduzem-se vários conceitos relevantes para a compreensão do trabalho realizado no âmbito desta dissertação e apresenta-se uma revisão da literatura relacionada com o desenvolvimento e caracterização de compostos anfifílicos (e supra-anfifílicos) responsivos. Para além disso, descrevem-se os objetivos delineados no início do trabalho.

No Capítulo 2, encontra-se a descrição dos reagentes e equipamentos utilizados ao longo do trabalho experimental, assim como dos procedimentos sintéticos, de purificação e caracterização adotados.

No Capítulo 3, apresentam-se os resultados obtidos, bem como a respetiva interpretação e discussão, dividindo-se em duas secções: em primeiro lugar, encontram-se os dados relativos aos compostos funcionalizados com grupos sulfonato (3.2) e depois a comparação dos resultados referentes aos compostos funcionalizados com o grupo tetrametiletilenodiamónio (3.3).

No Capítulo 4, incluem-se as principais conclusões decorrentes do trabalho realizado, juntamente com perspetivas futuras que visem cumprir os objetivos delineados.

Os Apêndices A e D servem de apoio aos Capítulos 2 e 3, respetivamente. Nos Apêndices B e C encontram-se as deduções matemáticas dos modelos teóricos utilizados no ajuste dos dados experimentais. Por fim, no Apêndice E indicam-se as comunicações realizadas durante o período de desenvolvimento desta tese.

2 | Parte Experimental

2.1 Reagentes e Solventes

Os reagentes disponíveis comercialmente foram adquiridos às marcas *Alfa Aesar*, *Sigma Aldrich*, *PanReac*, *LabChem*, *Merck* e *Honeywell* com um grau de pureza superior a 98 %. Os restantes reagentes, como alguns precursores (acetofenonas e aldeídos) ou macrociclos (CB7 e CB8), já tinham sido previamente sintetizados no laboratório, assim como o flavílio 7AH⁺ e a respetiva Ct.[53, 57–59]

Tanto para os passos de purificação como para os estudos foi utilizada água Milipore Ultrapura com condutividade $\leq 10 \mu\Omega$. Os restantes solventes foram adquiridos às marcas *LabChem*, *Honeywell*, *Sigma Aldrich* e *Carlo Erba*, tendo sido usados conforme recebidos, sem qualquer passo de secagem, exceto quando indicado, tendo-se nesse caso adotado procedimentos descritos na literatura.[60] Nos passos de purificação, utilizaram-se solventes de elevado grau de pureza.

2.2 Materiais e Equipamentos

2.2.1 Pesagem e Pipetagem

Para efetuar pesagens, foram utilizadas balanças da marca *Sartorius*, modelos *Research R200D Analytic A100S* e *Basic B610*, por ordem decrescente de sensibilidade. A medição de pequenos volumes foi realizada com recurso a pipetas de vidro graduadas/volumétricas ou a micropipetas (*Eppendorf*, modelo *Research Plus*), de acordo com a precisão requerida.

2.2.2 Aquecimento e Agitação

O aquecimento e agitação de soluções/reações foi efetuado recorrendo a placas de aquecimento com agitação magnética da marca *VWR*, modelo *VMS-C4-Advanced*. Para agitação de pequenos volumes, nomeadamente durante as experiências de irradiação, utilizou-se uma placa de agitação da marca *IKA*, modelo *LabDisk* ou uma fita magnética da marca *Variomag*. A agitação por ultrassons foi realizada num banho termostaticável da marca *Elma*, modelo *Elmasonic S-100H*. Por fim, sempre que foi necessário recorrer a centrifugação, utilizou-se uma centrífuga *Centric 150*.

2.2.3 Procedimentos Cromatográficos

Quando possível, as reações foram monitorizadas por cromatografia de camada fina (CCF), em placas de sílica-gel, tendo-se usado como revelador a luz ultravioleta de 254 nm. Nas purificações por coluna *flash*, foi utilizada sílica Carlo Erba, de granulometria (40-60) μm . [61] No caso das colunas de fase reversa, utilizou-se sílica LiChroprep, de granulometria (40-60) μm .

2.2.4 Análise e Caracterização

As experiências de RMN foram realizadas num espectrómetro *Bruker Avance III* operando a 400 MHz (^1H) ou a 101 MHz (^{13}C), ou num *Bruker Avance NEO* operando a 500 MHz (^1H) ou a 125 MHz (^{13}C).

As análises por HPLC foram realizadas num aparelho *Merck*, modelo *L6200A*, com detetor UV-Vís *Merck L-4500 DAD*. As soluções foram injetadas com uma microseringa *Exmire MS-R100* de 100 μL . Os solventes foram filtrados usando uma membrana de Nylon com porosidade de 0,22 μm . A fase estacionária utilizada foi uma coluna de fase reversa (RP18) *Purospher Star RP18e* 250x4 mm (5 μm).

Os valores de pH das várias soluções foram medidos num aparelho *Crison pH-Meter Basic 20+* ou *Radiometer Copenhagen PHM240*.

Nos estudos de caracterização espectrofotométrica, foram utilizadas células de plástico descartáveis *Plastibrand* ou de quartzo *InnovativeLab Supply QS-214*, tendo em ambos os casos 1 cm de percurso ótico (b) e 4 mL de capacidade. Em algumas experiências, utilizaram-se também células de plástico com 2 mm ou 4,5 mm de percurso ótico. Os espectros de absorção foram adquiridos num espectrofotómetro *Varian Cary 100bio*, *Varian Cary 5000* ou *Shimadzu UV-1603*, consoante a experiência a executar. Os espectros de emissão foram obtidos num espectrofluorímetro *SPEX Fluorolog 3-22* ou *SPEX Fluorolog 1681*. As irradiações realizaram-se com recurso a uma lâmpada de Xe-Hg *Lamag* de 200W ou no espectrofluorímetro *SPEX Fluorolog 1681* com a largura máxima de fenda.

As medições de tensão superficial foram efetuadas num tensiómetro da marca *KSV Instruments*, modelo *Sigma 702*, com um banho termostaticável *Lab. Companion, RW-0525G*.

As experiências de DLS foram realizadas num aparelho da marca *Horiba Scientific*, modelo *nanoPartica SZ-100V2*.

As experiências de dicroísmo circular foram realizadas num espectrómetro *Applied Photophysics Chirascan qCD*.

2.3 Síntese

No decorrer deste trabalho utilizaram-se acetofenonas e aldeídos para obter unidades de 2-fenilbenzopirílio (catião flavílio) com o padrão de substituição pretendido, por meio de uma condensação de Claisen-Schmidt em meio ácido.[54] As respetivas 2-hidroxichalconas foram obtidas posteriormente por conversão em meio básico (Figura 2.1).

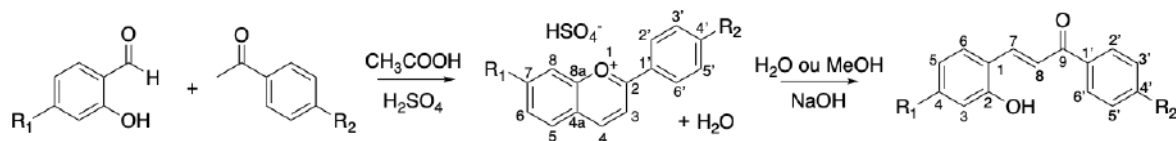


Figura 2.1: Estratégias sintéticas adotadas para obtenção dos núcleos de 2-fenilbenzopirílio e respectivas 2-hidroxichalconas com os padrões de substituição desejados.

Os vários sistemas multiestado sintetizados podem ser divididos em duas classes, dependendo do grupo carregado que incluem na sua estrutura: sulfonato ou tetrametiletenodiamônio, respectivamente. No caso dos compostos contendo o grupo sulfonato, foram sintetizados três compostos cuja diferença estrutural entre si é o tamanho da cadeia hidrofóbica na posição 4 e, não tendo sido possível obter um aldeído salicílico contendo uma cadeia quiral, sintetizaram-se dois outros compostos que apresentam um padrão de substituição inverso face aos anteriores (Figura 2.2).

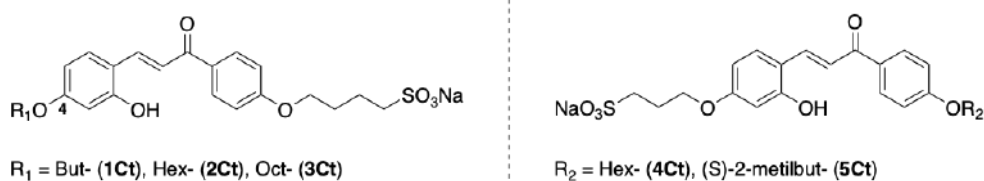


Figura 2.2: Estruturas químicas das 2-hidroxichalconas aniônicas sintetizadas.

Relativamente aos compostos contendo o grupo tetrametiletenodiamônio, com o objetivo de mimetizar um tensoativo do tipo gemini, sintetizou-se uma bischalcona, tendo sido feitos estudos comparativos com a respetiva monochalcona.[53] Como nenhum destes compostos é substituído por um grupo eletrodoador na posição 4, a barreira de ativação da reação de isomerização é relativamente elevada e isso terá consequências nas propriedades cinéticas e termodinâmicas do sistema multiestado.

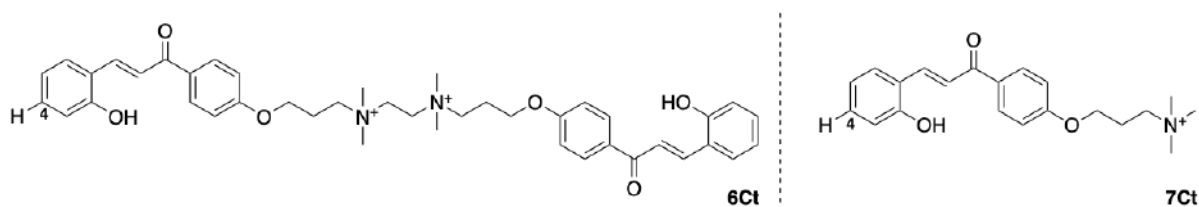


Figura 2.3: Estruturas químicas das 2-hidroxichalconas catiônicas sintetizadas: à esquerda a bischalcona e à direita a respetiva monochalcona, destacando-se a posição 4, não substituída, de ambas.

De seguida, apresentam-se os procedimentos sintéticos adotados para cada composto.

2.3.1 Materiais de Partida

Para obter os materiais de partida desejados, adaptaram-se procedimentos sintéticos descritos na literatura.[58, 62–66] No caso dos 4-n-alcoxi-2-hidroxibenzaldeídos, para prevenir a substituição no grupo hidroxilo localizado na posição 2, está reportado o uso de uma base fraca como bicarbonato de potássio ou sódio, do bromo-alcano (ou iodo-alcano) respectivo e de uma quantidade catalítica de iodeto de potássio, realizando-se a reação em acetona seca.[58, 62–65] Já no caso das acetofenonas, como só contêm inicialmente um grupo hidroxilo, está reportado o uso de uma base mais forte (carbonato de potássio), sendo a reação realizada em etanol.[66] Os procedimentos adotados para cada composto apresentam-se de seguida.

Composto 1A[62–64]

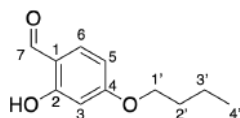


Figura 2.4: Estrutura química do 4-butoxi-2-hidroxibenzaldeído.

Dissolveram-se 3,52 g (25,51 mmol) de 2,4-dihidroxibenzaldeído, 2,15 g (25,62 mmol) de bicarbonato de sódio e uma quantidade catalítica de iodeto de potássio em acetona (70 mL). Juntaram-se 3 mL (27,81 mmol, 1,09 eq.) de 1-bromobutano e colocou-se a reação em refluxo, sob atmosfera inerte. Ao fim de três dias, monitorizou-se a evolução da reação por CCF (sílica; eluente: clorofórmio/hexano 2:1; revelação: 254 nm; Rf = 0,79) e não se verificou progressão, pelo que se adicionou mais 1 equivalente de 1-bromobutano e, consecutivamente, de base, e aumentou-se a temperatura para 80°C. Filtrou-se a mistura reacional, neutralizando-se o filtrado com HCl 1 M. De seguida, extraiu-se quatro vezes com clorofórmio, combinaram-se as fases orgânicas e evaporou-se à secura. Após purificação por coluna cromatográfica *flash* (eluente: clorofórmio/hexano 1:1; Rf = 0,50), obtiveram-se 709 mg (3,65 mmol) de um óleo amarelo claro, o que equivale a um rendimento de 14 %.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 11,47 (s, 1H, OH), 9,69 (s, 1H, 7), 7,40 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 6), 6,52 (dd, $J = 8,7, 2,3$ Hz, 1H, 5), 6,40 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 3), 4,00 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, 1'), 1,85 – 1,70 (m, 2H, 2'), 1,48 (h, $J = 7,5$ Hz, 2H, 3'), 0,97 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, 4').

Composto 2A[65]

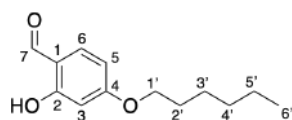


Figura 2.5: Estrutura química do 4-hexyloxi-2-hidroxibenzaldeído.

Num balão de fundo redondo, dissolveram-se 2,92 g (21,15 mmol) de 2,4-dihidroxibenzaldeído, 3,25 mL (22,03 mmol) de 1-iodohexano e 1,85 g (22,03 mmol) de bicarbonato de sódio em 70 mL

de acetona seca. A mistura foi colocada em refluxo, sob atmosfera de azoto, durante uma semana. A monitorização foi efetuada por CCF (sílica; eluente: hexano:clorofórmio 1:1; revelação: 254 nm; $R_f = 0,67$). Findo o tempo de reação, filtrou-se a mistura reacional e lavou-se com acetona. Concentrou-se o filtrado no evaporador rotativo e verificou-se que o pH estava neutro, pelo que se efetuou uma extração com clorofórmio e se adicionou água destilada. Quando o pH ficou básico, adicionaram-se algumas gotas de HCl 1 M e efetuaram-se três extrações com 30 mL de clorofórmio. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e levou-se à secura. Purificou-se por cromatografia-*flash* em sílica gel, utilizando como eluente hexano/clorofórmio em gradiente desde 1:0 até 1:1. Obtiveram-se 2,14 g (9,63 mmol) de produto, o que equivale a um rendimento de 46 %.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 11,48 (s, 1H, OH), 9,70 (s, 1H, 7), 7,41 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 6), 6,53 (dd, $J = 8,7, 2,3$ Hz, 1H, 5), 6,41 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, 3), 4,01 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, 1'), 1,85 – 1,74 (m, 2H, 2'), 1,51 – 1,41 (m, 2H, 3'), 1,39 – 1,28 (m, 4H, 4'/5'), 0,97 – 0,85 (m, 3H, 6').

Composto 3Al[62–64]

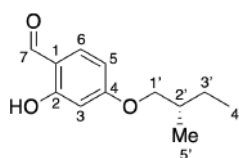


Figura 2.6: Estrutura química do (S)-4-(2'-metilbutoxi)-2-hidroxibenzaldeído.

Dissolveram-se 201 mg (1,46 mmol) de 2,4-dihidroxibenzaldeído, 120 mg (1,43 mmol) de bicarbonato de sódio e uma quantidade catalítica de iodeto de potássio em 5 mL de acetona seca. De seguida, adicionaram-se lentamente 180 μL (1,46 mmol, 1,00 eq.) de (S)-1-bromo-2-metilbutano. Colocou-se a reação em refluxo, sob atmosfera inerte, durante uma semana. Monitorizou-se a evolução da reação por CCF (sílica; eluente: clorofórmio/hexano 2:1; revelação: 254 nm) e, não tendo sido possível retirar um resultado conclusivo, efetuou-se o *workup* para verificar por RMN a progressão da reação. Filtrou-se a mistura reacional a quente e, de seguida, neutralizou-se o filtrado com HCl 1 M, extraiu-se com clorofórmio e evaporaram-se as fases orgânicas à secura. A análise por RMN permitiu concluir que a reação não progrediu, já que se observou a presença de apenas material de partida.

Composto 1Ac[66]

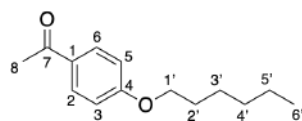


Figura 2.7: Estrutura química da 4-hexiloxi-1-acetofenona.

Num balão de fundo redondo, colocaram-se 6,81 g (49,98 mmol) de 4-hidroxi-1-acetofenona, 7,26 g (52,48 mmol; 1,05 eq.) de carbonato de potássio, 8,33 mL (56,44 mmol; 1,13 eq.) de 1-iodohexano e, por fim, 10 mL de etanol. A mistura foi colocada em refluxo durante 48 h. A reação foi monitorizada por CCF (sílica; eluente: clorofórmio/hexano 1:1; revelação: 254 nm; $R_f = 0,34$) e, após se verificar o consumo total da acetofenona de partida, filtrou-se a mistura reacional e dissolveu-se a solução em água. O composto foi depois extraído dessa solução usando éter etílico, tendo a fase éterea sido lavada com água e posteriormente seca com sulfato de sódio anidro. Após remoção do solvente por evaporação, analisou-se por ^1H RMN e, tendo-se confirmado a pureza do mesmo, não se revelou necessário efetuar mais processos de purificação. Obtiveram-se assim 6,30 g (28,61 mmol) do produto puro, na forma de um óleo amarelo, o que equivale a um rendimento de 57 %.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 7,92 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, 2/6), 6,91 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, 3/5), 4,01 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, 1'), 2,55 (s, 3H, 8), 1,81 (p, $J = 8,2$; 7,5 Hz, 2H, 2'), 1,46 (p, $J = 7,4$; 7,0 Hz, 2H, 3'), 1,40 – 1,27 (m, 4H, 4'/5'), 0,91 (d, $J = 5,6$ Hz, 3H, 6').

Composto 2Ac[66]

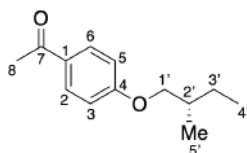


Figura 2.8: Estrutura química da (S)-4-(2'-metilbutoxi)-1-acetofenona.

Dissolveram-se 200 mg (1,47 mmol) de 4-hidroxi-1-acetofenona em 10 mL de etanol. De seguida, adicionaram-se 225 mg (1,63 mmol) de carbonato de potássio e uma quantidade catalítica de iodeto de potássio. Desarejou-se a mistura reacional e colocou-se em atmosfera inerte. Por fim, adicionaram-se 200 μL (1,62 mmol) de (S)-1-bromo-2-metilbutano e colocou-se a reação sob refluxo. Monitorizou-se a evolução da reação por CCF (sílica; eluente: clorofórmio/hexano 2:1; revelação: 254 nm; $R_f = 0,28$), tendo-se iniciado o *workup* após 3 dias. Filtrou-se a mistura reacional a quente e dissolveu-se a água-mãe em água. Extraíu-se com éter etílico e acetato de etilo, combinaram-se as fases orgânicas e lavou-se com água. Após secagem com sulfato de sódio anidro, evaporou-se à secura. O composto foi purificado por coluna cromatográfica *flash* (eluente: hexano/acetato de etilo 9:1; $R_f = 0,25$), tendo-se obtido 88 mg (0,43 mmol) de um óleo rosa pálido,

o que equivale a um rendimento de 29 %.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 7,92 (dd, $J = 8,9$, 2,0 Hz, 2H, 2/6), 6,92 (dt, $J = 8,8$, 1,9 Hz, 2H, 3/5), 3,88 (dd, $J = 9,0$, 6,0 Hz, 1H, 1'a), 3,80 (dd, $J = 9,0$, 6,6 Hz, 1H, 1'b), 2,55 (s, 3H, 8), 1,94 – 1,83 (m, 1H, 2'), 1,58 – 1,53 (m, 1H, 3'a), 1,34 – 1,28 (m, 1H, 3'b), 1,02 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, 5'), 0,99 – 0,93 (m, 3H, 4').

2.3.2 Flavílios e Chalconas

Composto 1AH⁺

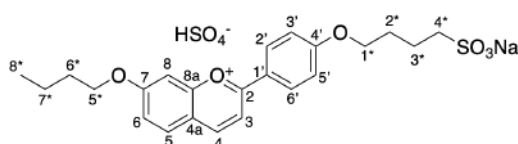


Figura 2.9: Estrutura química do 7-butoxi-4'-(butoxi-4'-sulfonato de sódio)-flavílio.

Num balão de fundo redondo, colocaram-se 304 mg (1,03 mmol) de 4'-(4-acetilfenoxi)butano-1'-sulfonato de sódio [57] e 217 mg (1,12 mmol) de 1AI. De seguida, adicionaram-se 5 mL de ácido acético e 1 mL de ácido sulfúrico. Colocou-se a reação sob agitação, à temperatura ambiente, durante quatro dias. Precipitou-se a mistura reacional numa mistura de éter etílico e acetato de etilo 1:1 e filtrou-se sob vácuo. De seguida, redissolveu-se em metanol, precipitou-se em éter etílico e filtrou-se novamente sob vácuo. Obtiveram-se 497 mg (0,90 mmol) de um pó laranja, o que equivale a um rendimento de 87 %. A pureza do composto foi confirmada por ^1H RMN e HPLC-DAD ($\text{Tr} = 27,15$ min; $\lambda_{\text{máx}} = 474$ nm).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 9,20 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, 4), 8,57 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, 2'/6'), 8,48 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, 3), 8,22 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, 5), 7,88 (s, 1H, 8), 7,52 (dt, $J = 9,0$, 1,6 Hz, 1H, 6), 7,30 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, 3'/5'), 4,39 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, 5*), 4,27 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, 1*), 2,93 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, 4*), 2,08 – 1,98 (m, 4H, 2*/3*), 1,92 (p, $J = 6,7$ Hz, 2H, 6*), 1,59 (h, $J = 7,4$ Hz, 2H, 7*), 1,04 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, 8*). ^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 174,0, 170,2, 168,2, 160,6, 155,1, 133,9, 133,2, 122,9, 122,5, 120,9, 117,6, 114,6, 102,1, 71,5, 69,9, 52,1, 31,9, 29,0, 22,7, 20,2, 14,1.

Composto 1Ct

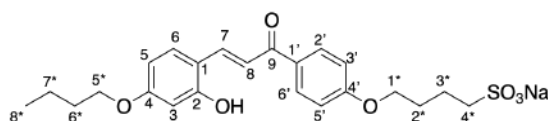


Figura 2.10: Estrutura química da (E)-(2-hidroxi-4-butoxi-4'-(butoxi-4'-sulfonato de sódio))-chalcona.

Dissolveram-se 291 mg (0,53 mmol) de **1AH**⁺ em 50 mL de metanol e neutralizou-se a solução com NaOH 1 M. Colocou-se a mistura sob agitação, protegida da luz, durante a noite. A reação foi monitorizada por espectroscopia de absorção UV-Visível e, quando terminada, evaporou-se o solvente à securo. Após purificação por coluna cromatográfica de fase reversa (RP18; eluente: desde 100 % H₂O até 100 % MeOH) e secagem do produto na linha de vácuo, obtiveram-se 189 mg (0,40 mmol) de um sólido castanho escuro, o que equivale a um rendimento de 76 %. A pureza do composto foi confirmada por ¹H RMN e HPLC-DAD (Tr = 31,56 min; λ_{máx} = 378 nm).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 8,08 – 8,00 (m, 3H, 2'/6'/7), 7,70 (d, J = 15,6 Hz, 1H, 8), 7,59 (d, J = 9,0 Hz, 1H, 6), 7,05 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 3'/5'), 6,48 (dd, J = 8,8, 2,3 Hz, 1H, 5), 6,42 (s, 1H, 3), 4,13 (t, J = 5,6 Hz, 2H, 1*), 3,99 (t, J = 6,5 Hz, 2H, 5*), 2,90 (t, J = 7,1 Hz, 2H, 4*), 1,98 (q, J = 5,9 Hz, 4H, 2*/3*), 1,76 (p, J = 7,8, 7,3 Hz, 2H, 6*), 1,51 (h, J = 7,5 Hz, 2H, 7*), 1,00 (t, J = 7,6 Hz, 3H, 8*).
¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 191,8, 164,5, 164,1, 160,5, 142,1, 132,5, 132,0, 131,9, 119,7, 116,5, 115,4, 108,0, 102,5, 69,0, 68,8, 52,3, 32,4, 29,3, 22,9, 20,2, 14,2.

Composto **2AH**⁺

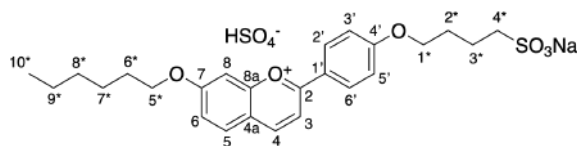


Figura 2.11: Estrutura química do 7-hexiloxi-4'-(butoxi-4*-sulfonato de sódio)-flavílio.

Num balão de fundo redondo, juntaram-se 351 mg (1,19 mmol) de 4'-(4-acetilfenoxi)butano-1'-sulfonato de sódio [57] e 310 mg (1,31 mmol; 1,10 eq.) de **2Al**. De seguida, adicionaram-se 5 mL de ácido acético e 1 mL de ácido sulfúrico. Colocou-se a reação sob agitação, à temperatura ambiente, durante a noite. Precipitou-se a mistura reacional numa mistura de éter etílico e acetato de etilo 1:1. Filtrou-se sob vácuo, lavou-se com éter etílico e levou-se à securo no evaporador rotativo. Após secar totalmente na linha de vácuo, obtiveram-se 451 mg (0,78 mmol) de produto, o que equivale a um rendimento de 65 %. A pureza do composto foi confirmada por ¹H RMN e HPLC-DAD (Tr = 29,60 min; λ_{máx} = 474 nm).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 9,21 (d, J = 8,4 Hz, 1H, 4), 8,58 (d, J = 8,6 Hz, 2H, 2'/6'), 8,48 (d, J = 8,6 Hz, 1H, 3), 8,23 (d, J = 9,2 Hz, 1H, 5), 7,88 (s, 1H, 8), 7,51 (d, J = 9,0 Hz, 1H, 6), 7,30 (d, J = 8,4 Hz, 2H, 3'/5'), 4,37 (t, J = 6,2 Hz, 2H, 5*), 4,27 (s, 2H, 1*), 2,92 (t, J = 7,1 Hz, 2H, 4*), 2,00 (s, 4H, 2*/3*), 1,96 – 1,87 (m, 2H, 6*), 1,60 – 1,50 (m, 2H, 7*), 1,40 (s, 4H, 8*/9*), 0,93 (t, J = 6,7 Hz, 3H, 10*).
¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 173,9, 170,2, 168,1, 160,6, 155,1, 134,0, 133,2, 122,9, 122,5, 120,8, 117,6, 114,6, 102,1, 71,8, 69,9, 52,1, 32,6, 29,8, 29,0, 26,6, 23,6, 22,7, 14,4.

Composto 2Ct

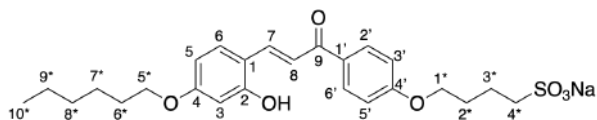


Figura 2.12: Estrutura química da (E)-(2-hidroxi-4'-hexyloxi-4'-(butoxi-4*-sulfonato de sódio))-chalcona

Dissolveram-se 200 mg (0,35 mmol) de 2AH⁺ em 30 mL de metanol, ajustando-se o pH da solução para cerca de 6-7. A conversão foi seguida por espectroscopia de absorção UV-visível e, quando terminada, evaporou-se o solvente à secura. Após purificação por coluna cromatográfica de fase reversa (RP18; eluente: desde 100 % H₂O até 100 % MeOH) e secagem do produto na linha de vácuo, obtiveram-se 99 mg (0,20 mmol) de composto, o que equivale a um rendimento de 57 %. A pureza do composto foi confirmada por ¹H RMN e HPLC-DAD (Tr = 33,86 min; λ_{máx} = 376 nm).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 8,09 – 7,99 (m, 3H, 2'/6'/7), 7,71 (d, J = 15,6 Hz, 1H, 8), 7,58 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 6), 7,05 (d, J = 8,9 Hz, 2H, 3'/5'), 6,46 (dd, J = 8,6, 2,4 Hz, 1H, 5), 6,41 (d, J = 2,4 Hz, 1H, 3), 4,13 (t, J = 5,8 Hz, 2H, 1*), 3,98 (t, J = 6,5 Hz, 2H, 5*), 2,90 (t, J = 8,1 Hz, 2H, 4*), 2,06 – 1,91 (m, 4H, 2*/3*), 1,81 – 1,71 (m, 2H, 6*), 1,54 – 1,44 (m, 2H, 7*), 1,42 – 1,31 (m, 4H, 8*/9*), 1,00 – 0,84 (m, 3H, 10*). ¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 190,5, 163,1, 162,8, 160,0, 141,1, 131,2, 130,6, 130,4, 118,0, 115,2, 114,0, 106,4, 101,3, 67,7, 67,6, 50,9, 31,4, 28,9, 27,9, 25,4, 22,3, 21,5, 13,0.

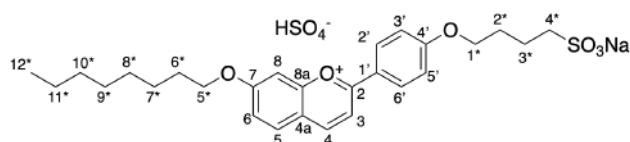
Composto 3AH⁺

Figura 2.13: Estrutura química do 7-octanoxi-4'-(butoxi-4*-sulfonato de sódio)-flavílio.

Num balão de fundo redondo, colocaram-se 453 mg (1,54 mmol) de 4'-(4-acetilfenoxi)butano-1'-sulfonato de sódio ([57]) e 352 mg (1,41 mmol) de 4-octanoxi-2-hidroxibenzaldeído. De seguida, adicionaram-se 5 mL de ácido acético e 1 mL de ácido sulfúrico. Colocou-se a reação sob agitação, à temperatura ambiente, durante quatro dias. Após se verificar por ¹H RMN que a reação estava completa, precipitou-se a mistura reacional numa mistura de éter etílico e acetato de etilo 1:1 e filtrou-se sob vácuo. De seguida, redissolveu-se em metanol, precipitou-se em éter etílico e centrifugou-se a suspensão obtida. Obtiveram-se 592 mg (0,98 mmol) de um pó castanho, o que equivale a um rendimento de 69 %. A pureza do composto foi confirmada por ¹H RMN e HPLC-DAD (Tr = 32,22 min; λ_{máx} = 474 nm).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 9,20 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 4), 8,57 (d, J = 9,1 Hz, 2H, 2'/6'), 8,47 (d, J = 8,8 Hz, 1H, 3), 8,22 (d, J = 9,0 Hz, 1H, 5), 7,87 (d, J = 2,4 Hz, 1H, 8), 7,52 (dd, J = 9,0, 2,3

Hz, 1H, 6), 7,30 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H, 3'/5'), 4,38 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, 5*), 4,26 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H, 1*), 2,93 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, 4*), 2,01 (p, $J = 4,2, 3,5$ Hz, 4H, 2*/3*), 1,93 (p, $J = 6,6$ Hz, 2H, 6*), 1,64 – 1,49 (m, 2H, 7*), 1,48 – 1,26 (m, 8H, 8*/9*/10*/11*), 0,91 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, 12*). ^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 174,0, 170,2, 168,1, 160,6, 155,1, 133,9, 133,2, 122,9, 122,5, 120,9, 117,6, 114,6, 102,1, 71,8, 69,9, 52,1, 32,9, 30,4, 29,8, 29,0, 27,0, 23,7, 22,7, 14,4.

Composto 3Ct

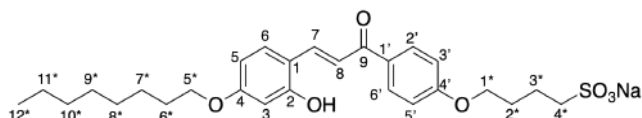


Figura 2.14: Estrutura química da (E)-(2-hidroxi-4-octanoxi-4'-(butoxi-4-sulfonato de sódio))-chalcona

Dissolveram-se 359 mg (0,59 mmol) de 3AH^+ em 50 mL de metanol e neutralizou-se a solução com NaOH 1 M. Colocou-se a mistura sob agitação, protegida da luz, durante três dias. A reação foi monitorizada por espectroscopia de absorção UV-Visível e, quando terminada, evaporou-se completamente o solvente. Após purificação por coluna cromatográfica de fase reversa (RP18; eluente: desde 100 % H_2O até 100 % MeOH) e secagem na linha de vácuo, obtiveram-se 138 mg (0,26 mmol) de um sólido castanho escuro, o que equivale a um rendimento de 44 %. A pureza do composto foi confirmada por ^1H RMN e HPLC-DAD ($T_r = 40,65$ min; $\lambda_{máx} = 376$ nm).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 8,08 – 7,99 (m, 3H, 2'/6'/7), 7,71 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H, 8), 7,59 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, 6), 7,05 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, 3'/5'), 6,49 (dd, $J = 8,7, 2,4$ Hz, 1H, 5), 6,42 (s, 1H, 3), 4,13 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, 1*), 3,98 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, 5*), 2,90 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, 4*), 2,08 – 1,88 (m, 4H, 2*/3*), 1,78 (p, $J = 6,8$ Hz, 2H, 6*), 1,56 – 1,25 (m, 10H, 7*/8*/9*/10*/11*), 0,91 (t, $J = 6,5$ Hz, 3H, 12*). ^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 190,4, 163,1, 162,7, 159,1, 140,7, 131,1, 130,6, 130,5, 118,3, 115,1, 114,0, 106,6, 101,2, 67,7, 67,6, 50,9, 31,6, 29,1, 29,0, 28,9, 27,9, 25,7, 22,3, 21,5, 13,0.

Composto 4AH⁺

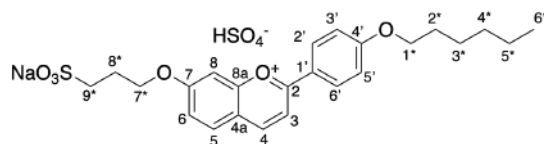


Figura 2.15: Estrutura química do 7-(propanoxi-9-sulfonato de sódio)-4'-hexiloxi-flavílio.

Num balão de fundo redondo, colocaram-se 300 mg (1,36 mmol) de 1Ac e 443 mg (1,57 mmol; 1,15 eq.) de 3'-(4-formil-3-hidroxifenoxi)propano-1'-sulfonato de sódio [58]. De seguida, adicionaram-se 5 mL de ácido acético e 1 mL de ácido sulfúrico. Colocou-se a reação sob agitação, à temperatura ambiente, durante 5 dias. Após se verificar por RMN que a reação estava completa, precipitou-se a mistura reacional numa mistura de éter etílico e acetato de etilo 1:1 e filtrou-se

sob vácuo. De seguida, redissolveu-se em metanol, precipitou-se em éter etílico e centrifugou-se a suspensão obtida. Obtiveram-se 665 mg (1,18 mmol) de um pó laranja, o que equivale a um rendimento de 86 %. A pureza do composto foi confirmada por ^1H RMN e HPLC-DAD (Tr = 30,10 min; $\lambda_{\text{máx}}$ = 470 nm).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 9,20 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 4), 8,57 (d, J = 8,6 Hz, 2H, 2'/6'), 8,49 (d, J = 8,8 Hz, 1H, 3), 8,23 (d, J = 9,0 Hz, 1H, 5), 7,89 (s, 1H, 8), 7,54 (d, J = 9,2 Hz, 1H, 6), 7,28 (d, J = 8,6 Hz, 2H, 3'/5'), 4,54 (t, J = 6,3 Hz, 2H, 7*), 4,22 (t, J = 6,4 Hz, 2H, 1*), 3,07 (t, J = 7,5 Hz, 2H, 9*), 2,39 (p, J = 6,9 Hz, 2H, 8*), 1,85 (p, J = 6,9 Hz, 2H, 2*), 1,52 (p, J = 7,2, 6,6 Hz, 2H, 3*), 1,44 – 1,31 (m, 4H, 4*/5*), 0,94 (t, J = 6,6 Hz, 3H, 6*). ^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 174,1, 169,8, 168,4, 160,4, 155,1, 134,0, 133,2, 122,8, 122,3, 120,9, 117,6, 114,7, 102,2, 70,4, 70,1, 47,2, 32,6, 30,0, 26,7, 25,8, 23,6, 14,4.

Composto 4Ct

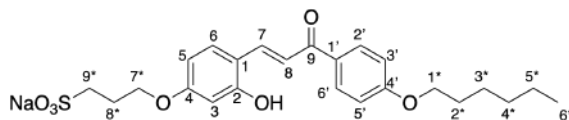


Figura 2.16: Estrutura química da (E)-2-hidroxi-4-(propanoxi-9*-sulfonato de sódio)-4'-hexiloxi-chalcona.

Dissolveram-se 302 mg de 4AH^+ (0,53 mmol) em 50 mL de metanol e neutralizou-se a solução com NaOH 1 M. Colocou-se a mistura sob agitação, protegida da luz, durante a noite. A reação foi monitorizada por espectroscopia de absorção UV-Visível e, quando terminada, evaporou-se completamente o solvente. Após purificação por coluna cromatográfica de fase reversa (RP18; eluente: desde 100 % H_2O até 100 % MeOH) e secagem na linha de vácuo, obtiveram-se 177 mg (0,37 mmol) de um sólido castanho escuro, o que equivale a um rendimento de 68 %. O produto foi analisado por HPLC-DAD (Tr = 34,80 min; $\lambda_{\text{máx}}$ = 376 nm) e por ^1H RMN, sendo que se verificou a presença de impurezas, não tendo sido possível isolar o composto de interesse com a pureza desejada.

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 8,08 – 8,02 (m, 3H, 2'/6'/7'), 7,70 (d, J = 15,7 Hz, 1H, 8), 7,59 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 6), 7,03 (d, J = 8,8 Hz, 2H, 3'/5'), 6,51 (dd, J = 8,7, 2,4 Hz, 1H, 5), 6,45 (d, J = 2,4 Hz, 1H, 3), 4,14 (t, J = 6,4 Hz, 2H, 7*), 4,08 (t, J = 6,4 Hz, 2H, 1*), 3,01 – 2,94 (m, 2H, 9*), 2,30 – 2,20 (m, 2H, 8*), 1,89 – 1,75 (m, 2H, 2*), 1,51 (p, J = 7,0 Hz, 2H, 3*), 1,42 – 1,34 (m, 4H, 4*/5*), 0,97 – 0,91 (m, 3H, 6*).

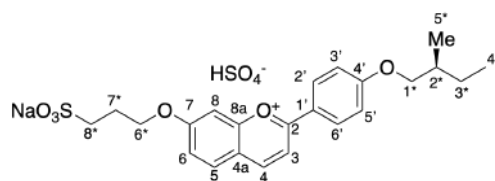
Composto 5AH⁺

Figura 2.17: Estrutura química do 7-(propanoate-8'-sulfonate de sódio)-4'-(S)-2'-metilbutano)-flavílio.

Num balão de fundo redondo, colocaram-se 83 mg (0,40 mmol) de **2Ac** e 125 mg (0,44 mmol, 1,10 eq.) de 3'-(4-formil-3-hidroxifenoxi)propano-1'-sulfonato de sódio [58]. De seguida, adicionaram-se 2,5 mL de ácido acético e 0,5 mL de ácido sulfúrico. Colocou-se a reação sob agitação, à temperatura ambiente, durante três dias. Após se confirmar o término da reação por ¹H RMN, precipitou-se a mistura reacional numa mistura de éter etílico e acetato de etilo 1:1 e filtrou-se sob vácuo. De seguida, redissolveu-se em metanol, precipitou-se em éter etílico e filtrou-se novamente sob vácuo. Obtiveram-se 166 mg (0,30 mmol) de um pó escuro, o que equivale a um rendimento de 75 %. A pureza do composto foi confirmada por ¹H RMN e HPLC-DAD (Tr = 28,31 min; λ_{máx} = 474 nm).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 9,21 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, 4), 8,58 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, 2'/6'), 8,49 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, 3), 8,23 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, 5), 7,89 (s, 1H, 8), 7,54 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, 6), 7,30 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, 3'/5'), 4,54 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, 6*), 4,15 – 4,06 (m, 1H, 1*a), 4,06 – 3,97 (m, 1H, 1*b), 3,07 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, 8*), 2,40 (p, *J* = 7,0 Hz, 2H, 7*), 2,02 – 1,83 (m, 1H, 2*), 1,70 – 1,53 (m, 1H, 3*a), 1,42 – 1,23 (m, 1H, 3*b), 1,07 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H, 5*), 0,99 (t, *J* = 7,3 Hz, 4H, 4*). ¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 174,1, 169,8, 168,5, 160,4, 155,1, 134,0, 133,2, 122,8, 122,3, 120,9, 117,6, 114,7, 102,2, 75,0, 70,1, 48,8, 35,8, 27,0, 25,7, 16,7, 11,7.

Composto 5Ct

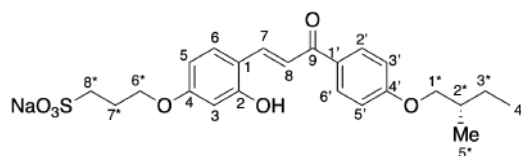


Figura 2.18: Estrutura química da (E)-(2-hidroxi-4-(propanoate-8'-sulfonate de sódio)-4'-(S)-2'-metilbutano))-chalcona

Dissolveram-se 60 mg (0,13 mmol) de 5AH⁺ em 20 mL de metanol e neutralizou-se a solução com NaOH 1 M. Colocou-se a mistura sob agitação, protegida da luz, durante a noite. A reação foi monitorizada por espectroscopia de absorção UV-Visível e, quando terminada, evaporou-se completamente o solvente. Após purificação por coluna cromatográfica de fase reversa (RP18; eluente: desde 100 % H₂O até 100 % MeOH) e secagem do produto na linha de vácuo, obtiveram-se 30 mg de um sólido castanho escuro (0,06 mmol), o que equivale a um rendimento de 46 %.

A pureza do composto foi confirmada por ^1H RMN e HPLC-DAD ($\text{Tr} = 32,88$ min; $\lambda_{\text{máx}} = 378$ nm).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 8,09 – 7,99 (m, 3H, 2'/6'/7), 7,69 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H, 8), 7,58 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, 6), 7,06 – 7,00 (m, 2H, 3'/5'), 6,51 (dd, $J = 8,7, 2,5$ Hz, 1H, 5), 6,46 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 3), 4,14 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, 6*), 4,00 – 3,92 (m, 1H, 1*a), 3,92 – 3,84 (m, 1H, 1*b), 2,98 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H, 8*), 2,25 (p, $J = 13,1, 6,6$ Hz, 2H, 7*), 1,94 – 1,82 (m, 1H, 2*), 1,66 – 1,55 (m, 1H, 3*a), 1,39 – 1,26 (m, 1H, 3*b), 1,05 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, 5*), 0,98 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H, 4*). ^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 190,5, 163,3, 162,5, 159,1, 140,7, 131,1, 131,1, 130,5, 130,5, 118,3, 115,2, 114,0, 106,8, 101,1, 72,7, 66,4, 34,6, 25,7, 24,8, 15,4, 10,2.

Composto 6AH⁺

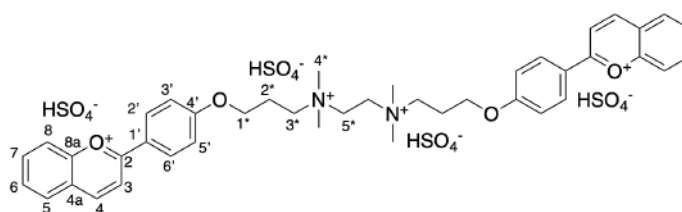


Figura 2.19: Estrutura química do bis-(4'-(N^1, N^2 -bis(3-hidroxipropil)- N^1, N^1, N^2, N^2 -tetrametiletano-1,2-diamônio))-flavílio.

Num balão de fundo redondo colocaram-se 90 mg (0,14 mmol) de acetofenona (dibrometo de N^1, N^2 -bis(3-(4-acetilfenoxi)propil)- N^1, N^1, N^2, N^2 -tetrametiletano-1,2-diamônio) e 66,50 μL (0,64 mmol; 4,57 eq) de 2,4-dihidroxibenzaldeído. De seguida, adicionaram-se 2 mL de ácido acético e 0,5 mL de ácido sulfúrico. Colocou-se a reação sob agitação, à temperatura de 65 °C, durante a noite. Após se verificar por ^1H RMN que a reação estava completa, precipitou-se a mistura reacional numa mistura de éter etílico e acetato de etilo 1:1. Filtrou-se sob vácuo e lavou-se o produto com éter etílico. Obtiveram-se 131 mg (0,13 mmol) de um pó ferrugem, o que equivale a um rendimento de 89 %. A pureza do composto foi confirmada por ^1H RMN e HPLC-DAD ($\text{Tr} = 22,40$ min; $\lambda_{\text{máx}} = 439$ nm).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 8,52 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H, 4), 7,91 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H, 3), 7,82 (d, $J = 9,0$ Hz, 4H, 2'/6'), 7,51-7,38 (m, 6H, 5'/7/8), 7,12-7,05 (m, 2H, 6), 6,60-6,53 (m, 4H, 3'/5'), 3,60 (t, $J = 5,7$ Hz, 4H, 1*), 3,43 (s, 4H, 5*), 3,07-2,97 (m, 4H, 3*), 2,57 (s, 12H, 4*), 1,73-1,62 (m, 4H, 2*). ^{13}C RMN (101 MHz, D_2O): δ (ppm): 173,8, 166,8, 155,7, 154,8, 139,2, 133,5, 130,3, 130,0, 123,1, 120,4, 118,4, 116,6, 116,3, 65,4, 61,3, 55,3, 52,0, 22,4.

Composto 6Ct

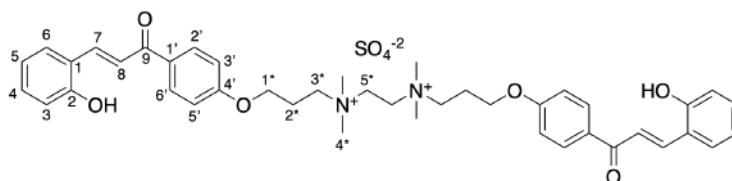


Figura 2.20: Estrutura química da bis-(E)-(2-hidroxi-4'-(N¹,N²-bis(3-hidroxiopropil)-N¹,N¹,N²,N²-tetrametiletano-1,2-diamônio))-chalcona.

Pesou-se 1 mg (1,16 μ mol) de 6AH⁺ para um balão de fundo redondo e dissolveu-se em 10 mL de água. Após se acertar o pH para \approx 6 com NaOH, colocou-se sob agitação, protegido da luz, a 60 °C, durante cerca de 4 h. Verificou-se o término da reação por espectroscopia de absorção UV-Visível e congelou-se a mistura reacional na forma de um filme, para liofilizar. A análise por ¹H RMN permitiu confirmar a obtenção do composto desejado e a análise HPLC-DAD confirmou a pureza do mesmo (Tr = 28,57 min; $\lambda_{máx}$ = 316 nm).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 8,13 – 8,04 (m, 6H, 2'/6'/7), 7,80 (d, J = 15,7 Hz, 2H, 8), 7,66 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 6), 7,24 (t, J = 7,8 Hz, 2H, 5), 7,11 (d, J = 8,5 Hz, 4H, 3'/5'), 6,88 (t, J = 7,2 Hz, 4H, 3/4), 4,28 (t, J = 5,6 Hz, 4H, 1*), 4,14 (s, 4H, 5*), 3,82 – 3,67 (m, 4H, 3*), 3,35 (s, 12H, 4*), 2,48 – 2,36 (m, 4H, 2*).

2.4 Métodos

2.4.1 HPLC-DAD

A análise por HPLC-DAD permitiu não só monitorizar as separações efetuadas por coluna de fase reversa como também confirmar a inexistência de impurezas que absorvessem no UV-Vís. Uma vez que apenas se analisaram flavílios ou chalconas, utilizou-se um método previamente desenvolvido para compostos da família das antocianinas, no qual se utiliza um sistema de três solventes em gradiente: água acidificada com 3 % de HClO₄, metanol e água Milli-Q[®]. A composição de eluente varia ao longo da eluição, conforme apresentado na Tabela 2.1. Desta forma, os espectros de absorção para cada composto eluído podem ser adquiridos em condições distintas e, tratando-se de compostos de natureza solvatocrômica, poderão observar-se diferenças no comprimento de onda ao qual a absorção é máxima. No caso particular dos compostos 3AH⁺ e 3Ct, por terem um caráter mais hidrofóbico, foi necessário aumentar o tempo de eluição para 50 minutos, usando-se 100 % MeOH como eluente nos últimos 10 minutos.

Tempo / min	% Água ácida	% Metanol	% Água Milli-Q®	Fluxo / mL/min
0	93	7	0	
2	93	7	0	
8	85	15	0	
25	25	75	0	
27	20	80	0	1
29	0	100	0	
35	0	100	0	
40	0	100	0	
41	0	7	93	

Tabela 2.1: Composição do eluente (%v/v) ao longo do tempo de eluição, na análise por HPLC-DAD.

2.4.2 Saltos de pH

A técnica de saltos de pH permite caracterizar a cinética e termodinâmica de um sistema químico que dependa do pH, neste caso, a conversão $AH^+ - Ct$. Na prática, efetuaram-se saltos de pH diretos, ou seja, prepararam-se várias células contendo solução tampão a pH's distintos, às quais se adicionaram alíquotas de uma solução do composto a pH ácido (pH = 1), para garantir que inicialmente se encontrava numa só forma: catião flavílio. Adquiriram-se os espectros de absorção ao longo do tempo, até que o sistema atingisse o equilíbrio, tendo-se medido o valor de pH de cada célula no final.

Para além disto, efetuaram-se também saltos de pH reversos, colocando neste caso uma solução de composto inicialmente a pH neutro a vários valores de pH mais ácidos, e irradiaram-se as células a 365 nm até que se atingisse o estado fotoestacionário. No final, adquiriram-se os espectros de absorção e mediram-se os respetivos valores de pH.

Os dados experimentais foram ajustados para calcular o valor de pK'_a ou pK^{\wedge}_a para cada sistema, conforme descrito no Apêndice B.

2.4.3 Comportamento Fotoquímico

Para investigar o comportamento fotoquímico dos vários sistemas em estudo, irradiaram-se a 365 nm soluções tamponizadas de Ct e adquiriram-se espectros de absorção ao longo do tempo de irradiação, até que se atingisse o estado fotoestacionário. O cálculo do rendimento quântico de reação fotoquímica (ϕ), isto é, o quociente entre o número de moles de produto formado por unidade de tempo e o número de moles de fótons absorvidos por unidade de tempo, foi determinado através da equação 2.1, onde $\Delta A/\Delta t$ é o declive da tangente obtida na representação da absorvância em função do tempo de irradiação (região linear), V é o volume de solução irradiada, ϵ é o coeficiente de extinção molar do produto fotoquímico e A_{irr} é a absorvância ao comprimento de onda de irradiação. O fluxo fotónico da lâmpada (I_0) ao comprimento de onda de irradiação (365 nm) foi determinado por actinometria, conforme descrito na literatura, tendo-se utilizado o

ferrioxalato de potássio como actinómetro.[67]

$$\phi = \frac{\frac{\Delta A}{\Delta t \cdot \epsilon} \cdot V}{I_0(1 - 10^{-A_{irr}})} \quad (2.1)$$

2.4.4 Tensiometria

As medidas de tensiometria foram realizadas a 37 °C, com um anel Du Noüy. Prepararam-se soluções stock concentradas de cada composto em água e realizaram-se sucessivas diluições, medindo-se o respetivo valor de tensão superficial após cerca de 5 minutos, para que a solução estivesse equilibrada.

2.4.5 Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear por Difusão Ordenada

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear por difusão ordenada (^1H DOSY RMN) utiliza um gradiente variável ao longo do eixo z , o que permite codificar a posição das partículas na intensidade do sinal e assim estimar o seu tamanho (Figura 2.21).[68, 69]

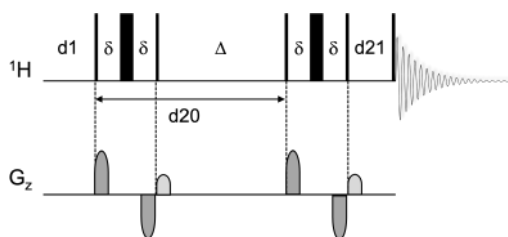


Figura 2.21: Sequência *ledbpgpzs*, utilizada nas experiências de ^1H DOSY RMN.

O ajuste dos dados experimentais à expressão proposta por Stejskal-Tanner (Equação 2.2) permitiu a determinação do valor do coeficiente de difusão (D), a partir da intensidade de sinal não atenuado (I_0), da constante giromagnética do núcleo observado (γ), da duração do gradiente (δ), da força do gradiente (G) e do tempo de difusão (Δ).[68, 69]

$$I = I_0 \times e^{-D(\gamma\delta G)^2(\Delta - \frac{\delta}{3})} \quad (2.2)$$

Assumindo partículas esféricas, o coeficiente de difusão relaciona-se com o raio hidrodinâmico (r) das partículas, a temperatura (T), a constante de Boltzmann (k_B) e a viscosidade do solvente utilizado (η), conforme estabelecido pela Equação de Stokes-Einstein (Equação 2.3).[68, 69]

$$D = \frac{Tk_B}{6\pi\eta r} \quad (2.3)$$

No cálculo dos raios hidrodinâmicos, considerou-se que a viscosidade da água deuterada a 37 °C é de 0,84 mPa.s⁻¹, tendo-se estimado este valor a partir dos dados apresentados na literatura.[70]

2.4.6 Cálculos Teóricos

Os cálculos teóricos de otimização de estruturas químicas foram realizados no programa Gaussian (versão de 2009), utilizando-se o GaussView 5.0.9 para o desenho das estruturas. As geometrias das moléculas foram otimizadas com a base de funções 6-311g* e a teoria de Hartree-Fock. Uma vez que os efeitos de solvatação influenciam a organização espacial das moléculas, considerou-se o modelo contínuo polarizável (PCM) e a água como solvente. As matrizes de coordenadas atômicas para cada estrutura otimizada apresentam-se no Apêndice D, Tabelas D.1 a D.3.

2.4.7 Estudos de Solubilização de Compostos Hidrofóbicos

As medições da capacidade de solubilização de compostos hidrofóbicos pelas micelas formadas foram realizadas considerando o Sudan I (1-fenilazo-2-naftol) - Figura 2.22 - como sonda hidrofóbica. Prepararam-se soluções com várias concentrações de 2Ct e adicionou-se um excesso de corante a todas as soluções, tendo-se deixado equilibrar durante cerca de 2 horas a 37 °C. Após esse tempo, mediram-se as respectivas absorvâncias a 486 nm, descontando-se as absorvâncias correspondentes ao composto anfifílico.[71]

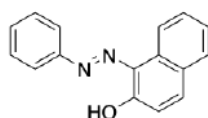


Figura 2.22: Estrutura química do Sudan I, corante utilizado nos estudos de solubilização de compostos hidrofóbicos.

2.4.8 Titulações com macrociclos

As titulações dos compostos com macrociclos foram realizadas usando soluções de CB7 e CB8 previamente aferidas com cobaltocínio conforme descrito na literatura.[72] Exceto quando indicado o contrário, tanto a concentração de substrato como o pH se mantiveram constantes ao longo das experiências, tendo-se monitorizado as variações induzidas pelos macrociclos por espectroscopia de absorção UV-Vis, de emissão ou ^1H RMN. O cálculo das constantes de associação foi efetuado por ajuste dos dados experimentais aos modelos apresentados no Apêndice C. Nas titulações por competição, mantiveram-se as concentrações de macrociclo e substrato constantes, bem como o pH, tendo-se variado apenas a concentração de competidor. Na Figura 2.23 apresentam-se as estruturas dos competidores considerados neste trabalho.

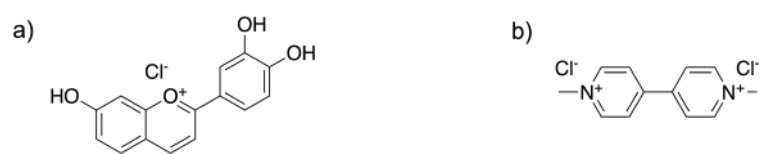


Figura 2.23: Estruturas químicas dos competidores utilizados no âmbito deste trabalho: a) cloreto de 7, 3', 4'-trihidroxi-flavílio e b) dicloreto de metil-viologénio (MV^{2+}).

3 | Apresentação e Discussão de Resultados

No presente Capítulo, serão apresentados os resultados obtidos ao longo deste trabalho, bem como a respetiva discussão e interpretação. Para uma melhor compreensão e exposição dos conteúdos, optou-se incluir algumas observações acerca dos procedimentos sintéticos, seguidas da caracterização, dividida em duas secções principais: **Compostos Funcionalizados com Substituintes Aniônicos** e **Compostos Funcionalizados com Substituintes Catiônicos**, que incluem respetivamente os resultados decorrentes dos estudos dos compostos **1** a **5** e a comparação entre os resultados obtidos para os compostos **6** e **7**.

Alguns dados experimentais foram ajustados a modelos teóricos, com vista a calcular constantes de acidez ou de associação, estando as deduções matemáticas descritas nos Apêndices **B** e **C**. O Apêndice **D** será um apoio ao presente Capítulo, pelo que conterà dados experimentais relevantes para uma melhor compreensão do trabalho realizado.

3.1 Síntese

Os compostos na forma de catião flavílio foram sintetizados através de condensações de Claisen-Schmidt em meio ácido, partindo de 2-hidroxibenzaldeídos e acetofenonas com padrões de substituição variável.[54] As 2-hidroxichalconas, por sua vez, foram obtidas por conversão dos respetivos catiões flavílio, fazendo uso das propriedades do sistema multiestado.

Assim, a preparação dos materiais de partida com os padrões de substituição pretendidos foi o primeiro passo no trabalho de síntese, tendo-se seguido procedimentos previamente estabelecidos na literatura.[58, 62–66] No caso dos compostos funcionalizados com substituintes aniônicos, sintetizaram-se os aldeídos **1Al** e **2Al**, necessários para a posterior obtenção dos compostos **1AH⁺** e **2AH⁺**, respetivamente. Não tendo sido possível sintetizar o aldeído **3Al**, contendo uma cadeia alifática com um centro quiral, optou-se por introduzir essa substituição numa acetofenona, obtendo-se o composto **2Ac**, necessário para a síntese do flavílio **5AH⁺**. Para comparar resultados, planeou-se a síntese de um composto análogo ao anterior, a partir da acetofenona **2Ac** (**4AH⁺**), mas não se conseguiu obter o produto com pureza suficiente para prosseguir estudos de caracterização. Os restantes materiais de partida utilizados neste trabalho já tinham sido preparados previamente no grupo de investigação.

3.2 Caracterização dos Compostos Funcionalizados com Substituintes Aniônicos

Na Figura 3.1 apresentam-se as estruturas químicas das chalconas *trans* aniônicas estudadas no âmbito deste trabalho, bem como dos respectivos catiões flavílio: $1\text{AH}^+\text{-Ct}$ a $5\text{AH}^+\text{-Ct}$. Os resultados obtidos para os sistemas $1\text{AH}^+\text{-Ct}$ a $3\text{AH}^+\text{-Ct}$ serão apresentados em simultâneo e comparados, em função do tamanho da cadeia hidrofóbica na posição 4 da chalcona *trans*. No caso do sistema $4\text{AH}^+\text{-Ct}$, para além de não ter sido possível obter a chalcona *trans* pura conforme descrito previamente no Capítulo 2, o catião flavílio revelou ter baixa solubilidade em água, mesmo a 37 °C, o que impossibilitou a caracterização deste composto em meio aquoso e, por este motivo, não se prosseguiram os estudos. Por último, para o sistema contendo um centro quiral, $5\text{AH}^+\text{-Ct}$, avaliou-se a capacidade de agregação por dicroísmo circular, na presença e na ausência de CB8, tendo-se obtido alguns resultados preliminares que se apresentarão no final desta Secção.

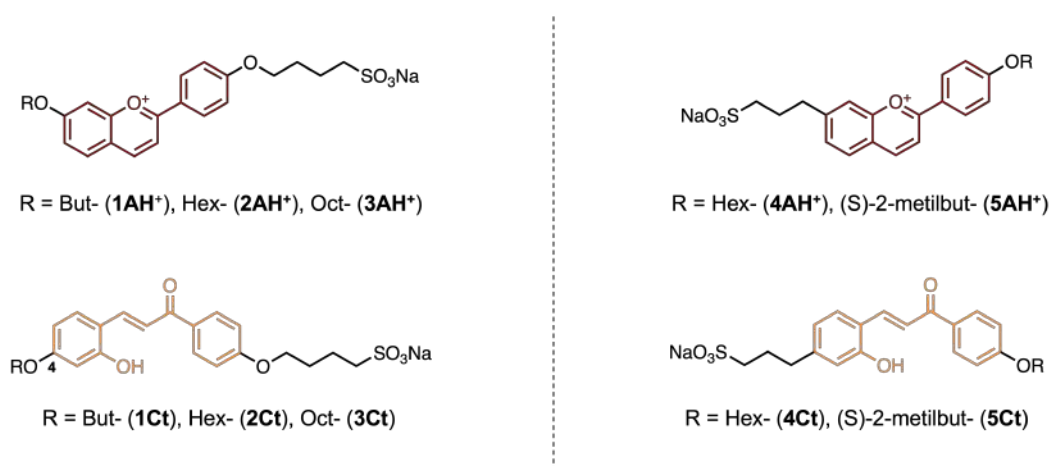


Figura 3.1: Estruturas químicas das chalconas *trans* (cor de laranja) aniônicas em estudo e dos respectivos catiões flavílio (vermelho).

3.2.1 Caracterização dos Compostos 1 a 3

3.2.1.1 Caracterização dos Monómeros

Em primeiro lugar, as constantes de acidez aparentes dos compostos **1**, **2** e **3** foram determinadas tanto no estado fundamental ($\text{p}K'_a$) como no fotoestacionário ($\text{p}K'_a@PSS$), através da técnica de Saltos de pH, conforme descrito no Capítulo 2, com o objetivo de conhecer o comportamento dos compostos em função do pH. Na Figura 3.2, apresentam-se os espectros de absorção do composto **2** em função do pH, juntamente com os ajustes dos dados experimentais e no Apêndice D encontram-se os gráficos relativos aos restantes compostos (Figuras D.1 e D.2, Apêndice D).

Enquanto na Figura 3.2a) se observa o desaparecimento do catião flavílio ($\lambda_{\text{máx}} \approx 460 \text{ nm}$) à medida que se forma a respetiva chalcona *trans* ($\lambda_{\text{máx}} \approx 370 \text{ nm}$), na experiência apresentada na Figura 3.2b), observa-se o processo inverso: após irradiação das soluções de Ct a vários valores

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES ANIÔNICOS

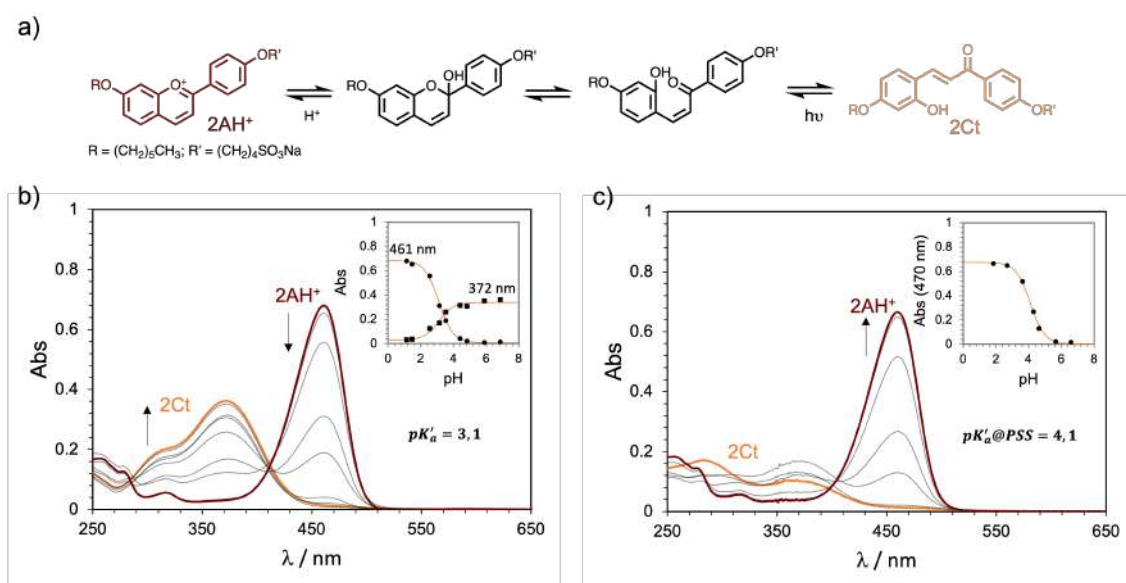


Figura 3.2: a) Esquema das reações a decorrer nas experiências apresentadas nos gráficos b) e c). Espetros de absorção do composto 2, a diferentes valores de pH ([citrato de sódio] = 10 mM), no estado b) fundamental ($20 \mu M$, $T = 37^\circ C$) e c) fotoestacionário ($20 \mu M$, $\lambda_{irr} = 365 \text{ nm}$, $T = 25^\circ C$).

de pH, forma-se o catião flavílio. O ajuste dos dados experimentais ao modelo teórico exposto no Apêndice B permitiu calcular os valores das constantes de acidez aparentes. Importa referir que o aumento do tamanho da cadeia hidrofóbica confere menor solubilidade em meio aquoso aos compostos, ao mesmo tempo que facilita processos de agregação. De facto, no caso do sistema 3, observou-se um comportamento ligeiramente distinto dos restantes, nomeadamente pelo desvio do máximo de absorção do catião flavílio. Assim, os valores de pK'_a e $pK'_a@PSS$ determinados poderão ter a contribuição de fenómenos de pré-agregação, ou seja, formação de agregados pré-micelares ou oligómeros a concentrações inferiores à CAC. Os valores das constantes de acidez determinadas sumarizam-se na Tabela 3.1. Caso todos os compostos estivessem na forma não agregada, os valores de pK'_a deviam ser semelhantes e, no entanto, observa-se uma correlação com o tamanho da cadeia alifática.

Tabela 3.1: Valores de pK'_a , $pK'_a@PSS$ e $\Delta pK'_a$ para os compostos 1, 2 e 3.

	pK'_a	$pK'_a@PSS$	$\Delta pK'_a$
$1AH^+-Ct$	2,8	4,9	2,1
$2AH^+-Ct$	3,1	4,1	1,0
$3AH^+-Ct$	3,4	3,9	0,5

Uma vez conhecido o comportamento dos sistemas em função do pH, investigou-se a resposta fotoquímica de soluções diluídas das chalconas *trans*, de forma a seleccionar um valor de pH que permitisse observar a maior diferença de composição de catião flavílio antes e após a irradiação. Os estudos foram efetuados mantendo a temperatura de $37^\circ C$, de modo a manter a solubilidade

dos compostos e simultaneamente simular as condições do meio fisiológico. No caso da **2Ct**, o pH escolhido foi de $\approx 4,3$ (Figura 3.3).

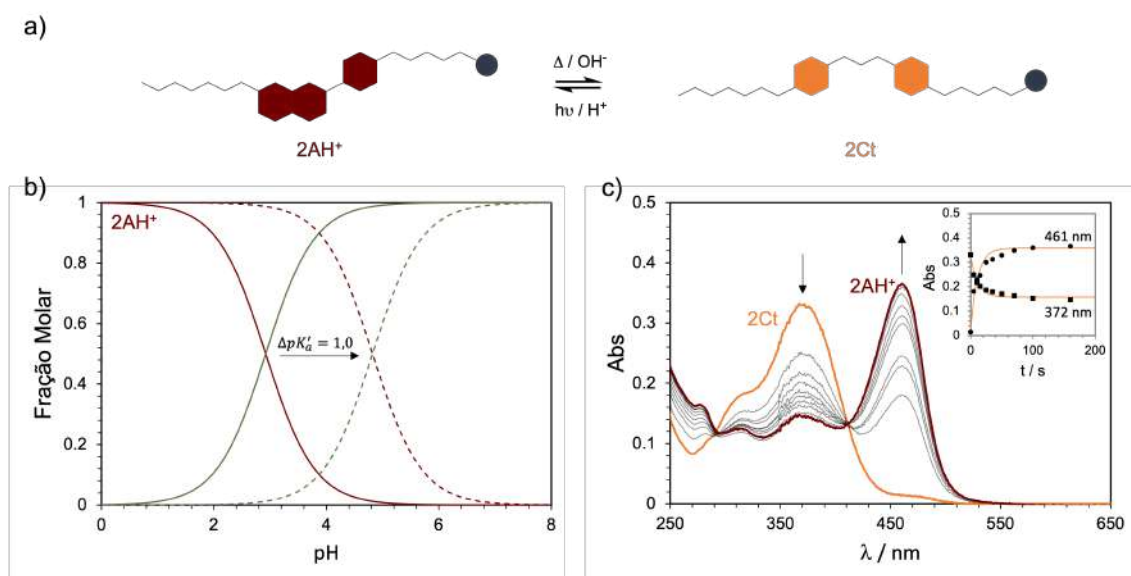


Figura 3.3: a) Representação esquemática do fotocomutador aparente $2\text{AH}^+ - 2\text{Ct}$. b) Distribuição das frações molares de catião flavílio (vermelho) e base conjugada (verde), nos estados fundamental (linha a cheio) e fotoestacionário (linha tracejada) do composto **2**, em função do pH. c) Irradiação a $\text{pH} = 4,3$ e a 37°C da **2Ct** ($20\ \mu\text{M}$; [citrato de sódio] = $10\ \text{mM}$; $\lambda_{\text{irr}} = 365\ \text{nm}$).

Efetivamente verificou-se a existência de resposta fotoquímica, já que após irradiação da **Ct** ($\lambda_{\text{máx}} \approx 370\ \text{nm}$) se formou o catião flavílio ($\lambda_{\text{máx}} \approx 460\ \text{nm}$). Nestas condições de pH, a eficiência de conversão é de cerca de 57 %, o que é compatível com o gráfico apresentado na Figura 3.3a). Esta eficiência de conversão pode ser superior utilizando condições de pH em que AH^+ seja mais estável. Assim, no estudo dos compostos **1Ct** e **3Ct**, realizaram-se as irradiações em condições de pH ácido: ≈ 1 (Figura D.3, Apêndice D). Os espectros de absorção do composto **3** adquiridos ao longo do tempo de irradiação da **Ct** apresentaram um desvio do máximo de absorção do catião flavílio, bem como do ponto isobéstico, tal como se verificou na experiência de Saltos de pH. Presume-se que este fenómeno esteja relacionado com a formação de pré-agregados conforme mencionado anteriormente, já que o composto com menor capacidade de agregação (1) se comportou como é esperado neste tipo de sistemas.

3.2.1.2 Caracterização dos Agregados

• Capacidade de Agregação

Em primeiro lugar, avaliou-se a capacidade de agregação dos compostos em estudo, por análise de soluções aquosas das chalconas *trans* a várias concentrações, mantendo a temperatura de 37°C (Figura 3.4), tanto por tensiometria como por ^1H RMN.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES ANIÔNICOS

Nas análises por tensiometria, verificou-se que os três compostos baixam a tensão superficial da água, indicando que adsorvem na interface líquido-vapor (Figura 3.4). A partir de uma determinada concentração, observou-se a estabilização da tensão superficial, o que corresponde à saturação da referida interface, ao mesmo tempo que se inicia a formação de agregados, correspondendo à concentração de agregação crítica. Determinou-se desta forma a CAC dos compostos 1Ct a 3Ct, observando-se que varia inversamente com o tamanho da cadeia hidrofóbica. O composto 1Ct, com menor cadeia hidrofóbica, apresentou o maior valor de CAC (2,0 mM), enquanto os compostos 2Ct e 3Ct apresentaram valores de 0,25 mM e 0,07 mM, respetivamente.

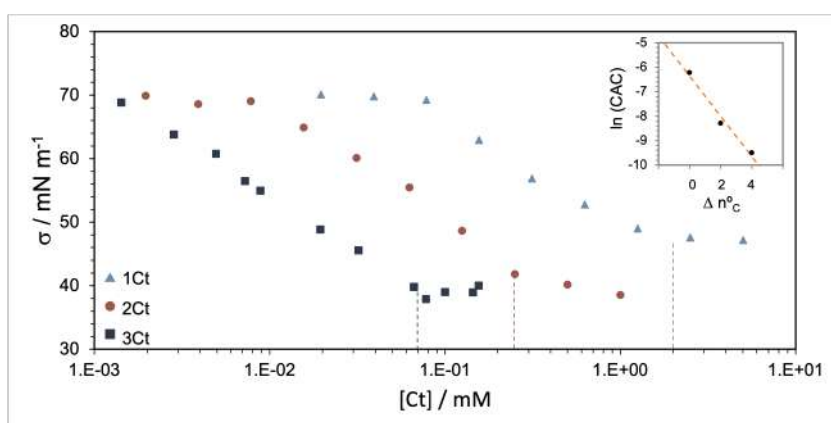


Figura 3.4: Tensão superficial de soluções aquosas de 1Ct (▲), 2Ct (●) e 3Ct (■), a 37 °C, em função da concentração. Em *inset* apresenta-se a relação entre o logaritmo neperiano da CAC e o tamanho da cadeia hidrofóbica.

Com o objetivo de confirmar os dados obtidos por tensiometria, efetuou-se uma análise semelhante por ^1H RMN. Após aquisição dos espectros das soluções de cada composto a várias concentrações, verificou-se um desvio para campo alto, compatível com a formação de agregados, o que permitiu obter um valor aproximado de CAC. Na Figura 3.5, apresentam-se espectros de ^1H RMN do composto 2Ct adquiridos com concentrações variáveis de composto, bem como a representação da média dos desvios químicos de alguns sinais representativos em função da concentração de chalcona *trans*. Os dados correspondentes dos compostos 1Ct e 3Ct apresentam-se nas Figuras D.4 e D.5, no Apêndice D.

No geral, verifica-se que a gama de valores de CAC determinada por ressonância magnética nuclear é inferior ao valor obtido por tensiometria, o que sugere a formação de pré-agregados, conforme já reportado na literatura para outros tensioativos (Tabela 3.2).[73, 74] De facto, este fenómeno será detetável por RMN e não por tensiometria, dado que esta última apenas deteta alterações na interface solução-ar. A discrepância entre os valores de CAC obtidos por RMN e tensiometria é particularmente notável no caso do composto 1Ct, com menor tamanho de cadeia hidrofóbica, indicando que a sua agregação é um processo menos cooperativo do que a dos análogos de maior carácter hidrofóbico.

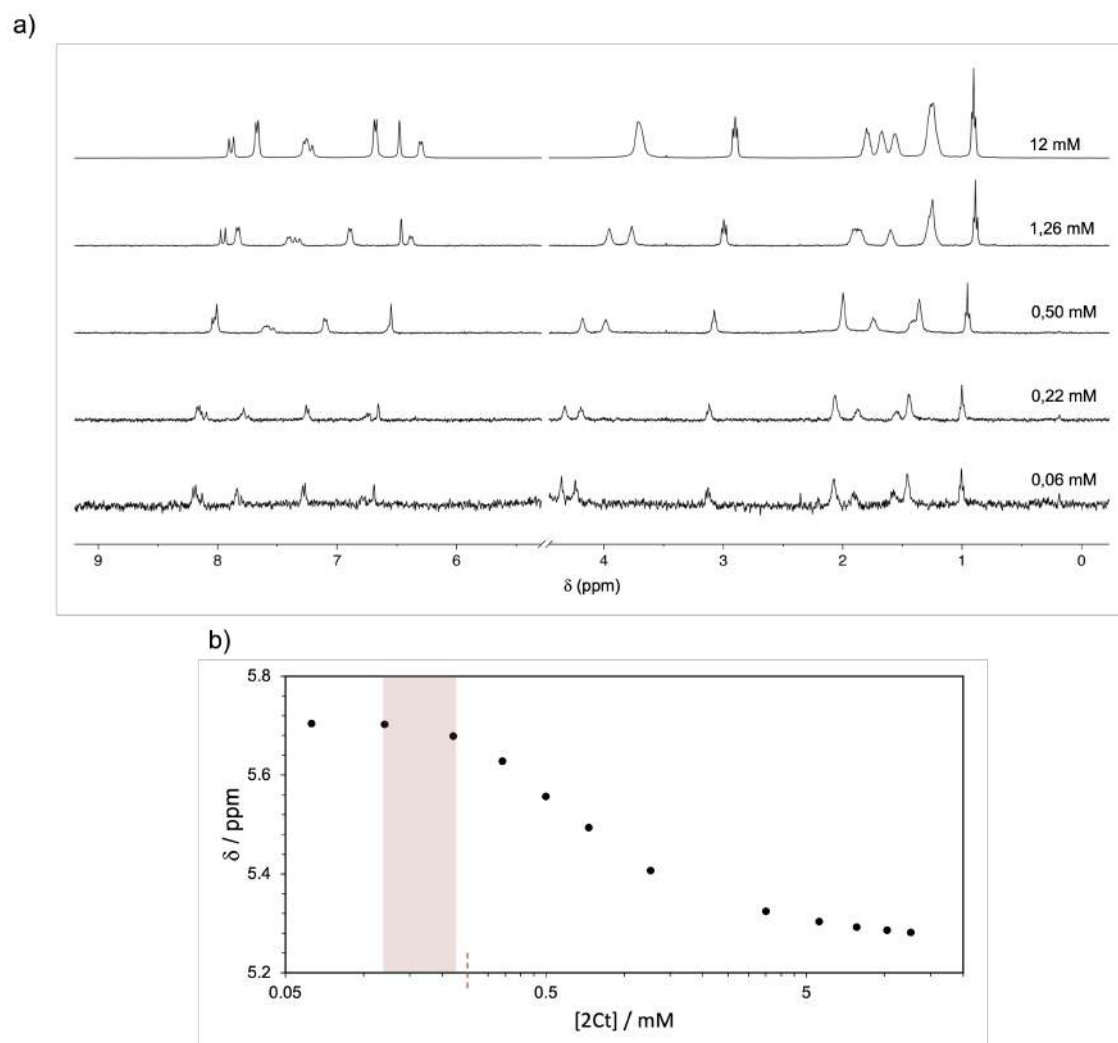


Figura 3.5: a) Espetros de ^1H RMN do composto **2Ct** em D_2O a adquiridos 37°C , com concentrações variáveis. De baixo para cima: 0,06 mM; 0,22 mM; 0,50 mM; 1,26 mM e 12 mM. b) Representação da média dos desvios químicos de alguns sinais representativos do composto **2Ct**, em função da concentração de composto, destacando-se o valor de CAC determinado por tensiometria a tracejado e a gama na qual deverá constar o valor de CAC indicado por ^1H RMN.

Tabela 3.2: Valores de CAC dos compostos **1Ct**, **2Ct** e **3Ct**, determinados por tensiometria e ^1H RMN.

	CAC (tensiometria) / mM	CAC (^1H RMN) / mM
1Ct	2,00	0,21 – 0,37
2Ct	0,25	0,13 – 0,21
3Ct	0,07	< 0,15

• Tamanho e Morfologia dos Agregados

Uma vez confirmada a capacidade de agregação das chalconas *trans*, iniciou-se a caracterização estrutural dos agregados, o que incluiu a determinação do seu tamanho e forma.

As análises efetuadas por dispersão de luz dinâmica (DLS) permitem determinar o tamanho de nanopartículas.[75] Contudo, nas experiências efetuadas, os resultados não se mostraram reproduzíveis e não foi possível retirar nenhuma conclusão. Desta forma, recorreu-se à espectroscopia de ¹H RMN por difusão ordenada. Na Figura 3.6, apresentam-se os espectros de ¹H RMN do composto 2Ct em D₂O, adquiridos com força de gradiente variável, a uma concentração superior à CAC, bem como o ajuste dos dados que permitiu a determinação do respetivo coeficiente de difusão.

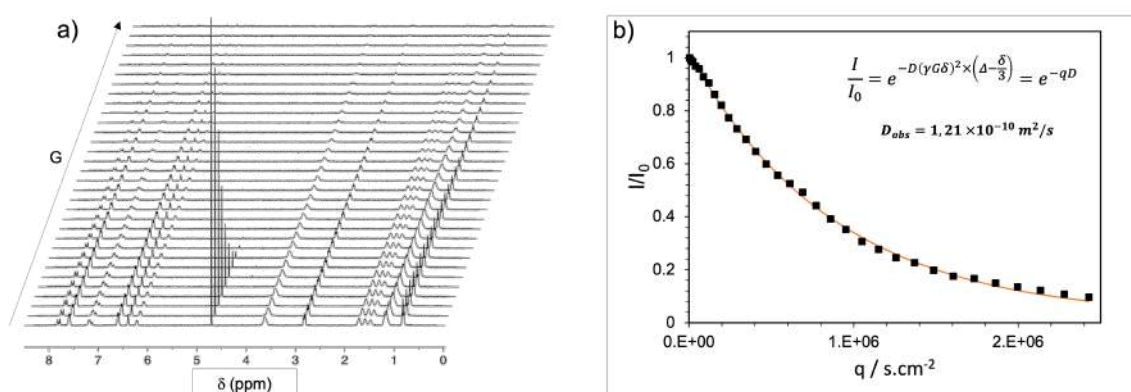


Figura 3.6: a) Espectros de ¹H DOSY RMN do composto 2Ct (13 mM, D₂O), adquiridos a 37 °C. b) Determinação do coeficiente de difusão, com recurso à equação de Stejskal-Tanner.

A mesma experiência foi realizada para os compostos 1Ct e 3Ct (ver Figuras D.6 e D.7, Apêndice D), resumando-se os resultados na Tabela 3.3. Não tendo sido possível determinar o coeficiente de difusão dos monómeros, os valores apresentados são valores aparentes (assim como o de raio hidrodinâmico obtido a partir deste parâmetro), que, conforme apresentado na Equação 3.1, incluem a contribuição dos monómeros (m) e dos agregados (A). Acima da CAC, assume-se que a concentração de monómeros se mantém constante e igual à CAC, pelo que se pode considerar C₀ correspondente à concentração total de monómeros e agregados.[76]

$$D_{obs} = \chi_m D_m + \chi_A D_A \Leftrightarrow D_{obs} = \frac{CAC}{C_0} D_m + \frac{C_0 - CAC}{C_0} D_A \quad (3.1)$$

Tabela 3.3: Valores de coeficiente de difusão e raio hidrodinâmico dos agregados dos compostos 1Ct, 2Ct e 3Ct, determinados por ¹H DOSY RMN.

	D × 10 ⁻¹¹ / m ² /s	r / nm
1Ct	12,0	2,3
2Ct	12,1	2,2
3Ct	6,5	4,2

Foram ainda realizados cálculos teóricos para otimizar as estruturas dos compostos considerados, a fim de estimar o comprimento dos monómeros, permitindo uma melhor interpretação dos dados experimentais apresentados acima. As estruturas otimizadas apresentam-se na Figura 3.7, bem como as distâncias entre os átomos de enxofre e carbono assinalados. As matrizes de coordenadas atômicas apresentam-se nas Tabelas D.1 a D.3, no Apêndice D.

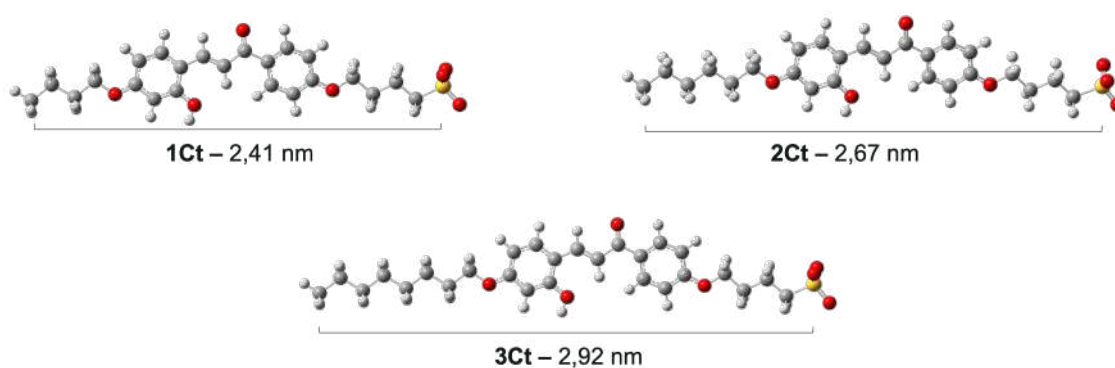


Figura 3.7: Estruturas otimizadas dos compostos 1Ct, 2Ct e 3Ct (HF/6-311G*; PCM; H₂O) e respectivas distâncias entre o átomo de enxofre e o átomo de carbono assinalados.

Os valores de raio hidrodinâmico calculados por ¹H DOSY RMN revelaram ser semelhantes aos valores apresentados de comprimento dos monómeros, obtidos através de cálculos computacionais, o que é compatível com a formação de estruturas micelares esféricas. No entanto, importa referir que o coeficiente de difusão observado depende da concentração de composto, pelo que nas condições utilizadas não é possível efetuar uma comparação quantitativa rigorosa entre os valores obtidos para os diferentes compostos.[76] Contudo, pode verificar-se um aumento do raio nos compostos com maior cadeia hidrofóbica, conforme era expectável.

• Estudos de Solubilização de Compostos Hidrofóbicos

O estudo da capacidade de solubilização de compostos hidrofóbicos pelos agregados formados foi realizado apenas para o composto 2Ct, conforme descrito no Capítulo 2. O Sudan I é um composto de natureza hidrofóbica, pelo que apresenta reduzida solubilidade em água. Dado ser também um corante, pode ser usado como sonda para detetar a formação de estruturas supramoleculares, através da sua absorção. Na Figura 3.8, apresentam-se as absorvâncias do Sudan I a 486 nm, em função da concentração de composto anfifílico 2Ct.[71]

No início, quando a concentração de chalcona 2Ct é inferior à respetiva CAC (0,25 mM), a absorvância do Sudan I é quase nula, indicando que não está solubilizado. A partir da CAC, a absorvância de Sudan I começa a aumentar, o que significa que a quantidade de corante solubilizado é crescente, resultado da formação de agregados. Por fim, a partir de uma concentração de 2Ct de aproximadamente 7,6 mM, a quantidade de Sudan I solubilizada parece estabilizar, o que não é compatível com a crescente formação de micelas à medida que a concentração de composto

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES ANIÔNICOS

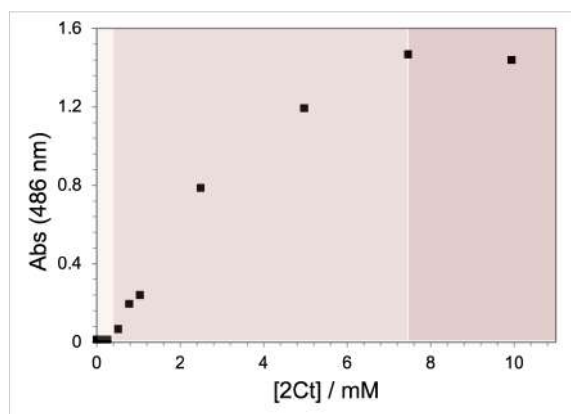


Figura 3.8: Absorvâncias do Sudan I a 486 nm, em soluções de 2Ct com concentração variável, mantendo a temperatura de 37 °C. Da esquerda para a direita destaca-se, respectivamente, a zona onde a solubilização da sonda hidrofóbica é: 1) inexistente; 2) crescente e 3) máxima e constante.

anfílico aumenta. Ainda assim, os resultados permitem evidenciar a formação de estruturas micelares, capazes de solubilizar compostos hidrofóbicos em meio aquoso.

• Resposta Fotoquímica

A resposta fotoquímica dos agregados foi avaliada para o composto 2Ct, por ter o tamanho de cadeia hidrofóbica intermédio, tendo-se adquirido os espectros de absorção de soluções concentradas (acima da CAC) ao longo do tempo de irradiação a 365 nm (Figura 3.9), mantendo o pH = 1. Na Figura 3.9, apresentam-se os resultados obtidos para uma solução com concentração de 1 mM.

Verificou-se uma diminuição da eficiência de conversão $Ct - AH^+$, em comparação com o que se observou em condições abaixo da CAC (ver Figura 3.3), sugerindo a reduzida resposta fotoquímica dos agregados. Ainda assim, seria importante prosseguir estudos para investigar a razão da diminuição da resposta fotoquímica observada, de modo a perceber como pode ser melhorada.

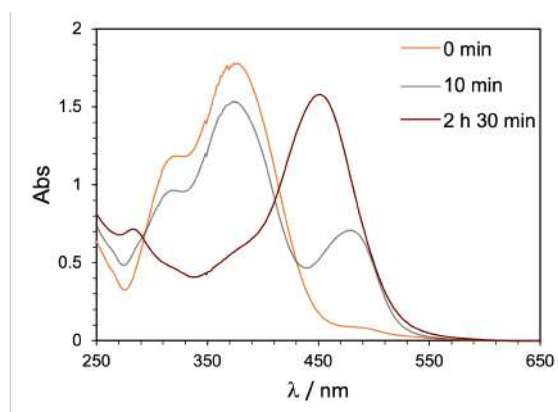


Figura 3.9: Irradiação a pH = 4,1 e a 37 °C da 2Ct (1,0 mM; [citrato de sódio] = 10 mM; b = 0,1 cm; $\lambda_{irr} = 365$ nm). Os espectros de absorção adquiridos antes da irradiação e após 10 min e 2,5 h apresentam-se a cor de laranja, cinzento e vermelho, respectivamente.

3.2.1.3 Estudos de Interação Recetor-Substrato

Na experiência apresentada na Secção anterior, observou-se uma reduzida resposta fotoquímica dos agregados, dado que a eficiência da conversão Ct-AH⁺ mostrou ser baixa comparativamente ao composto não agregado. Assim, tornou-se necessário adotar uma nova estratégia de promover esta conversão, com o objetivo de dissociar as micelas. Considerando os resultados previamente reportados na literatura para um sistema semelhante aos estudados nesta secção (ver Capítulo 1), o CB7 poderá ter uma reduzida afinidade para se associar à Ct ($K \approx 10^2 \text{ M}^{-1}$), o que significa que o processo de agregação é preferencial em comparação com a associação.[57] A afinidade do CB7 com o catião flavílio deverá ser superior ($K \approx 10^5 \text{ M}^{-1}$), favorecendo a conversão Ct-AH⁺ aquando da irradiação.[57] Na Figura 3.10 esquematiza-se esta abordagem.

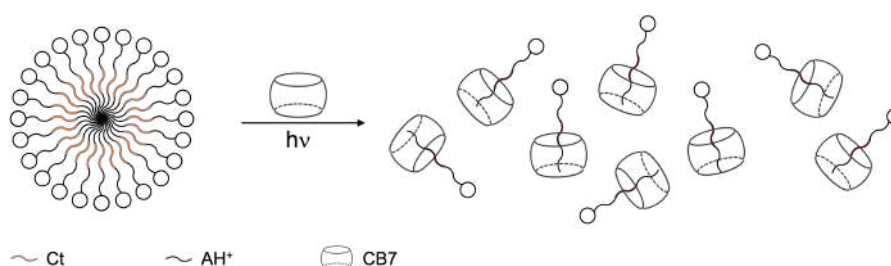


Figura 3.10: Esquema da estratégia adotada para dissociação das micelas formadas.

A primeira fase destes estudos incluiu a determinação das constantes de associação dos compostos 1, 2 e 3, tanto na forma de chalcona *trans* como de catião flavílio, com cucurbit[7]urilo. Em primeiro lugar, monitorizaram-se as titulações de substrato com CB7 por espectroscopia de absorção, mantendo a temperatura de 37 °C, a fim de permitir a solubilidade de todos os compostos e posterior comparação dos resultados. No caso dos compostos na forma de catião flavílio, monitorizaram-se ainda as titulações por espectroscopia de emissão, utilizando neste caso temperatura ambiente, não só por o equipamento não permitir o uso de um banho termostaticável, como também por os compostos serem todos solúveis em água às concentrações exigidas pela técnica. De modo a validar os resultados obtidos, monitorizou-se ainda a titulação dos compostos 1AH⁺ e 1Ct com CB7, por espectroscopia de absorção, à temperatura ambiente.

Relativamente ao composto 1Ct, considerando as titulações monitorizadas por espectroscopia de absorção, observa-se que a constante de associação é superior a 25 °C do que a 37 °C ($K_{25^\circ\text{C}} = 2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; $K_{37^\circ\text{C}} = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) - Figura 3.11.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES ANIÔNICOS

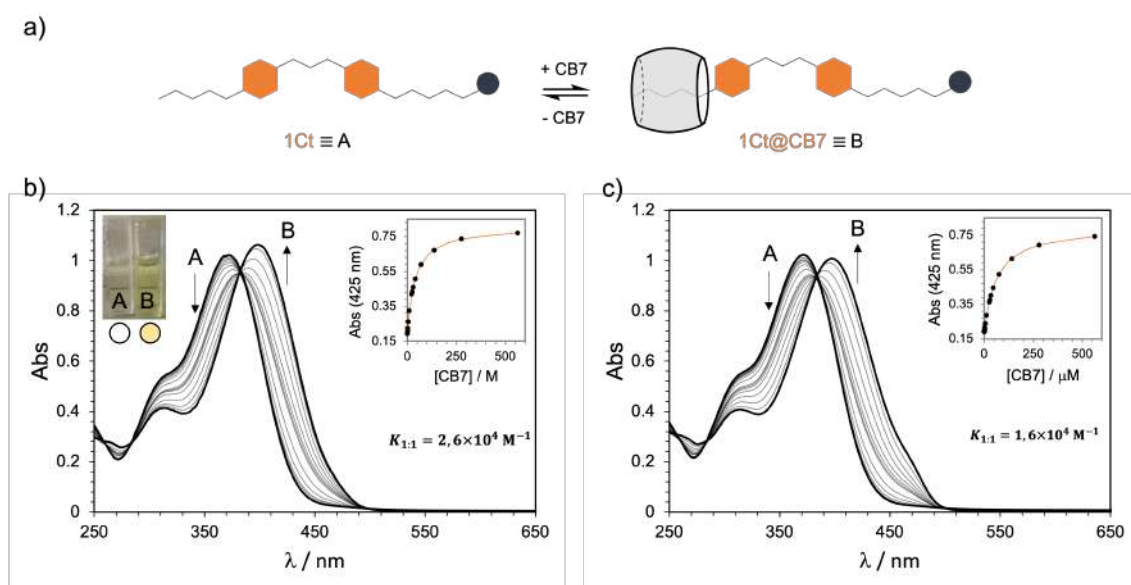


Figura 3.11: a) Representação esquemática da formação da associação 1Ct@CB7 . Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 1Ct ($45 \mu\text{M}$), a pH neutro, a uma temperatura de b) 25°C e de c) 37°C . Em *inset* apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1 descrito no Apêndice C. Na fotografia destaca-se o desvio para o vermelho induzido pela associação.

Aplicando a Lei de van't Hoff (Equação 3.2), esta observação implica uma variação negativa da entalpia ($\Delta H^\circ = -3,2 \times 10^4 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$), o que é concordante com o facto de a associação ser um processo exotérmico.[77] Considerando as constantes de associação determinadas, calculou-se também a variação de entropia, através da Equação 3.3 ($T\Delta S^\circ = -6,1 \times 10^3 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$). Assim, observa-se que o processo de formação da associação supramolecular é favorável entalpicamente e ligeiramente desfavorável entropicamente. A variação negativa de entropia ($\Delta S^\circ < 0$) deverá estar relacionada com a perda de graus de liberdade aquando da associação, que não é suficientemente compensada pela dessolvatação das moléculas de recetor e substrato.[77]

$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = \frac{\Delta H^\circ}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad (3.2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3.3)$$

Esta observação mantém-se para o composto 1AH^+ , quando se comparam as constantes obtidas a 25°C e a 37°C ($K_{25^\circ\text{C}} = 6,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; $K_{37^\circ\text{C}} = 2,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; $\Delta H^\circ = -7,3 \times 10^4 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$; $T\Delta S^\circ = -4,2 \times 10^4 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$) - Figura 3.12. No Apêndice D, apresentam-se os espetros de absorção e respetivo ajuste de dados, para a experiência realizada a 25°C (Figura D.8).

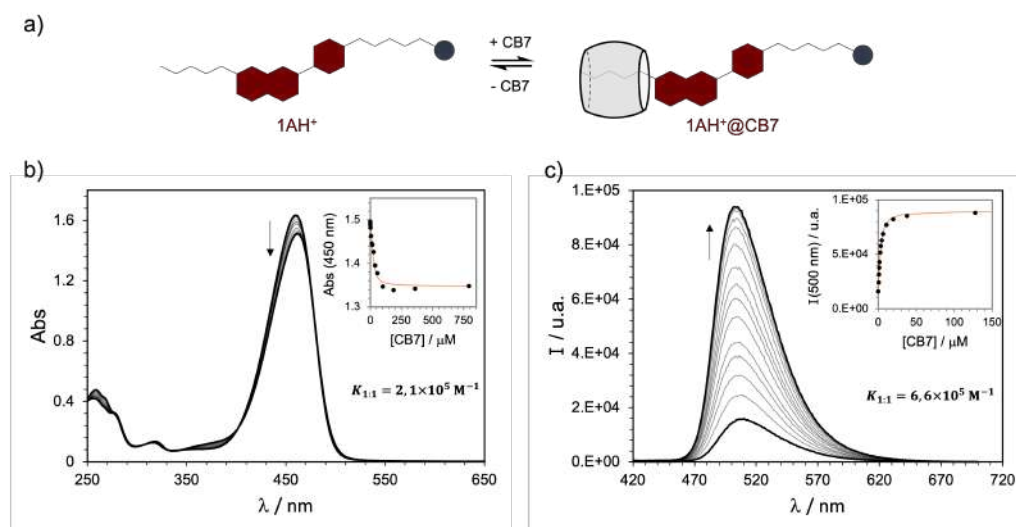


Figura 3.12: a) Representação esquemática da formação da associação $1\text{AH}^+ @ \text{CB7}$. Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 1AH^+ ($34 \mu\text{M}$), a $\text{pH} = 1$, a uma temperatura de b) 37°C , monitorizando-se por espectroscopia de absorção e de c) 25°C , monitorizando-se por espectroscopia de emissão ($\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$). Em *inset* apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1 descrito no Apêndice C.

Para determinar o posicionamento do macrociclo nos compostos 1AH^+ e 1Ct , monitorizaram-se as titulações por ^1H RMN, apresentando-se os espectros do composto 1AH^+ na ausência e na presença de CB7 na Figura 3.13. A titulação foi monitorizada até aos 2 eq. de macrociclo com o objetivo de confirmar se ocorreria formação de associações 2:1.

Não se observando diferenças significativas entre os espectros adquiridos na presença de 1 eq. ou 2 eq. de CB7, conclui-se que apenas se formam associações com estequiometria 1:1. Considerando a estrutura química do macrociclo, sabe-se que os sinais correspondentes aos prótons que se encontrem junto dos portais, são desblindados devido à natureza eletronegativa dos grupos carbonilo aí presentes, deslocando-se para campo baixo, como se observa para os prótons 4 e 5. Contrariamente, os prótons localizados dentro da cavidade do CB7 são blindados, deslocando-se para campo alto após a associação, o que se verificou para os prótons alifáticos 5^* a 8^* e ainda para o aromático 6.

Realizou-se a mesma experiência para a chalcona correspondente (1Ct) e, apesar de não ter sido possível fazer uma atribuição inequívoca dos sinais referentes à associação supramolecular devido ao seu alargamento, observa-se o desvio dos prótons alifáticos 5^* a 8^* para campo alto, sugerindo que o macrociclo se liga a esta posição do substrato (Figura 3.14). Esta evidência explica a subida da constante de associação em cerca de duas ordens de grandeza, quando comparado com o exemplo da literatura ($K(1\text{Ct}) = 2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; $K([\text{57}]) = 3,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$), visto que o composto reportado não continha esta cadeia alifática na sua estrutura.[57] Para além disso, é uma prova de que o efeito hidrofóbico contribui de forma significativa para a estabilização da associação supramolecular.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUINTES ANIÔNICOS

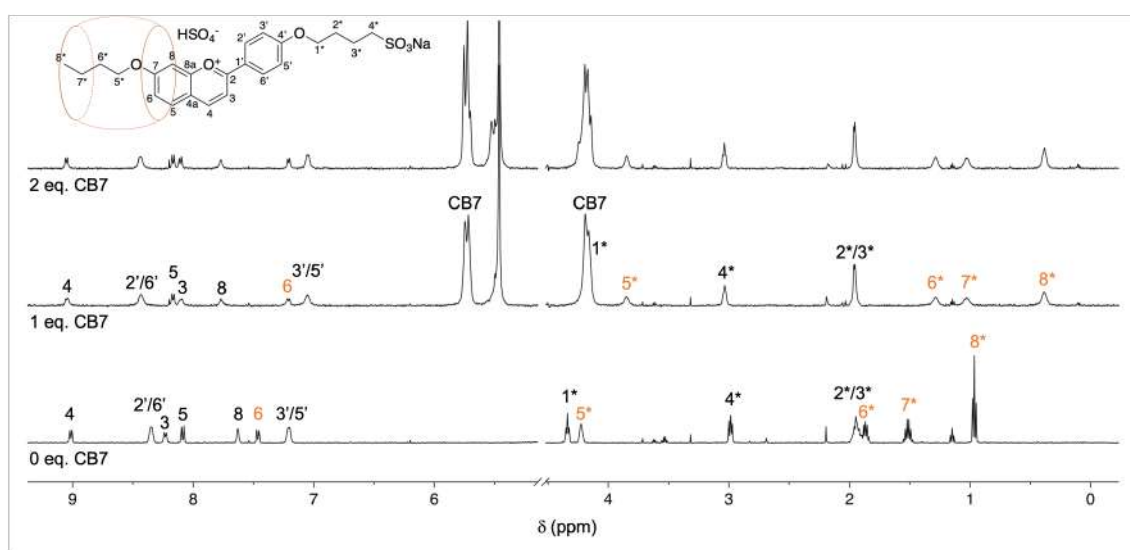


Figura 3.13: Espetros de ^1H RMN do composto 1AH^+ livre (em baixo), com 1 equivalente de CB7 (ao centro) e com 2 equivalentes de CB7 (em cima), a pD = 1, em D_2O , 500 MHz ($[1\text{AH}^+] = 0,5$ mM). A cor de laranja destacam-se os prótons que se deslocam para campo alto após a associação, significando que se encontram no interior da cavidade do macrociclo, conforme esquematizado na estrutura química.

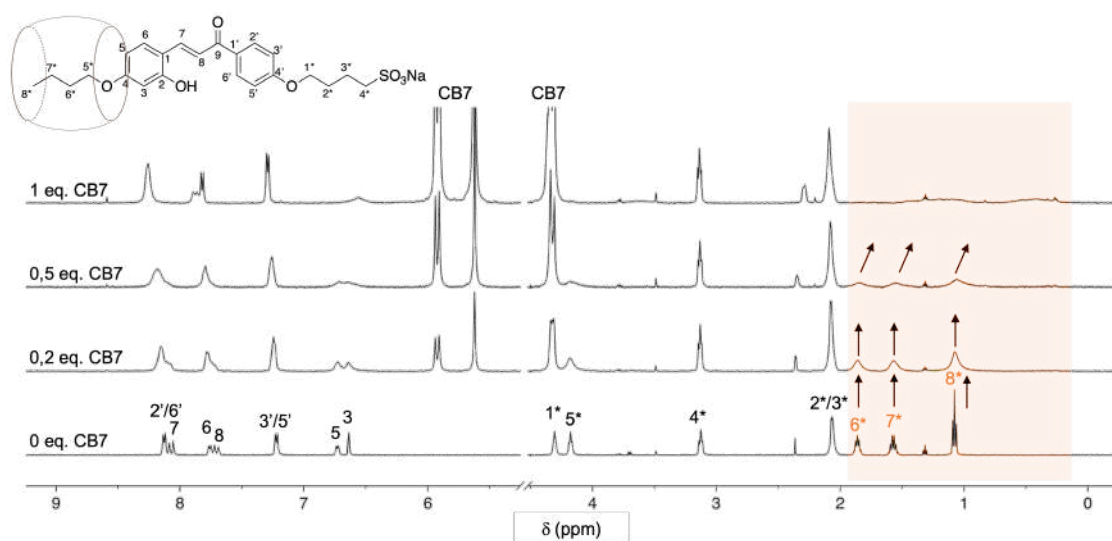


Figura 3.14: Espetros de ^1H RMN do composto 1Ct livre (em baixo) e na presença de CB7 em quantidade variável, a pD neutro, em D_2O , 500 MHz ($[1\text{Ct}] = 0,5$ mM). A cor de laranja destacam-se os prótons que se deslocam para campo alto após a associação, significando que se encontram no interior da cavidade do macrociclo, conforme esquematizado na estrutura química.

Mesmo havendo alguma dependência das constantes de associação com a temperatura, os valores já apresentados mostram que a ordem de grandeza não é alterada, o que permite comparar os valores determinados pela monitorização por espectroscopia de absorção a 37°C com os obtidos

por espectroscopia de emissão a 25 °C. Assim, efetuaram-se estas experiências para os compostos **1AH⁺**, **1Ct**, **2AH⁺**, **2Ct**, **3AH⁺** e **3Ct** e as constantes de associação determinadas sumarizam-se na Tabela 3.4. Os espectros adquiridos, bem como os respetivos ajustes de dados apresentam-se nas Figuras D.9 a D.12, no Apêndice D. No geral, verifica-se um aumento das constantes de associação com o aumento do carácter hidrofóbico e, para além disso, nos compostos **3Ct** e **3AH⁺**, foi necessário ajustar os dados experimentais a um modelo de ligação 2:1, o que sugere que a cadeia alifática tenha tamanho suficiente para possibilitar a associação de duas unidades de macrociclo. Esta evidência carece, no entanto, de confirmação por espectroscopia de RMN.

Tabela 3.4: Constantes de associação dos compostos **1Ct**, **1AH⁺**, **2Ct**, **2AH⁺**, **3Ct** e **3AH⁺** com CB7, determinadas à temperatura ambiente ou a 37 °C, por espectroscopia de absorção ou de emissão.

Substrato	$K_{25^{\circ}C} / M^{-1}$ Absorção	$K_{37^{\circ}C} / M^{-1}$ Absorção	$K_{25^{\circ}C} / M^{-1}$ Emissão
1Ct	$2,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	—
1AH⁺	$6,6 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$6,6 \times 10^5$
2Ct	—	$1,7 \times 10^5$	—
2AH⁺	—	$1,9 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$
3Ct	—	$7,9 \times 10^4$ $8,6 \times 10^1$	—
3AH⁺	—	—	$1,0 \times 10^6$ $1,2 \times 10^3$

O aumento da ordem de grandeza das constantes de associação das chalconas **1Ct**, **2Ct** e **3Ct** em cerca de 2-3 unidades, quando comparado com o composto análogo reportado na literatura, impossibilita que as interações recetor-substrato sejam utilizadas conforme esquematizado anteriormente na Figura 3.10.[57] Contudo, nas titulações monitorizadas por espectroscopia de absorção, observou-se um desvio batocrómico do máximo de absorção induzido pela associação, variável consoante o tamanho da cadeia hidrofóbica (**1Ct**: 28 nm; **2Ct**: 13 nm; **3Ct**: 4 nm). Esta observação, para além de poder estar associada ao grau de entrada de cada composto na cavidade do macrociclo, evidencia que o comprimento de onda de excitação utilizado para perturbar o sistema pode ser superior ao que se utilizaria para o substrato livre, o que é interessante do ponto de vista das aplicações, nomeadamente por adicionar a possibilidade de irradiar sistemas biológicos com luz visível. Deste modo, optou-se por prosseguir com os estudos de interação recetor-substrato, incluindo 1) a determinação do pK'_a das associações formadas no equilíbrio térmico e 2) a avaliação da resposta fotoquímica das chalconas *trans* na presença de macrociclo.

Na Figura 3.15, apresentam-se os resultados obtidos para o composto **1**, com os respetivos ajustes dos dados experimentais aos modelos teóricos. As experiências análogas efetuadas para os compostos **2** e **3** apresentam-se nas Figuras D.13 e D.14, no Apêndice D. Na Tabela 3.5, sumarizam-se os resultados obtidos.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUINTES ANIÔNICOS

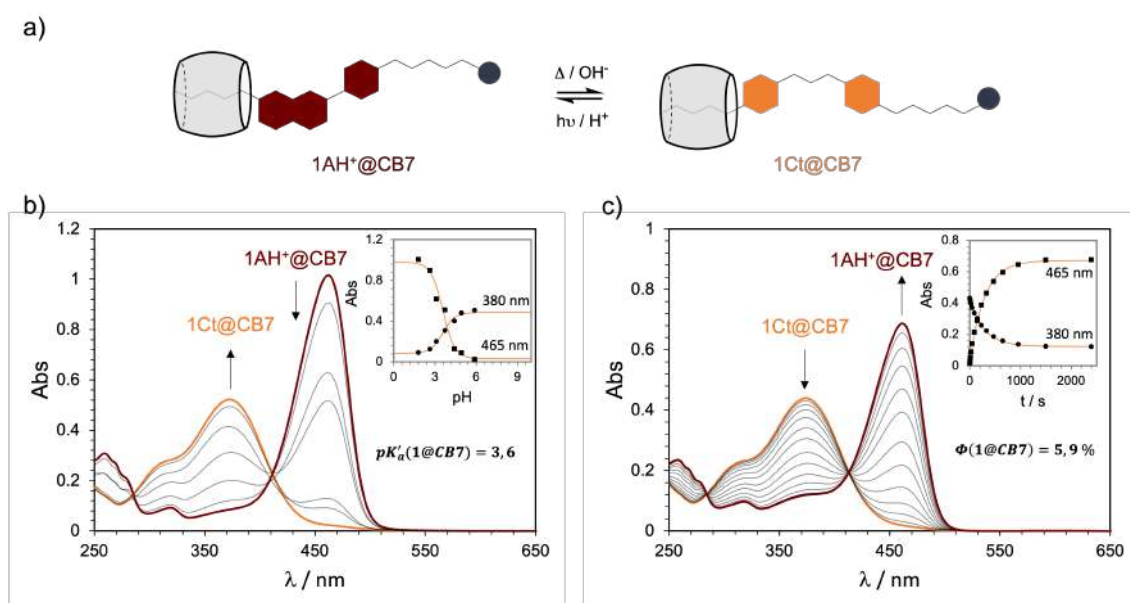


Figura 3.15: a) Representação esquemática do fotocomutador aparente $1AH^+@CB7 - 1Ct@CB7$. b) Espectros de absorção a diferentes valores de pH, mantendo a temperatura a $37\text{ }^\circ\text{C}$ e $[\text{citrato de sódio}] = 10\text{ mM}$, do composto **1** ($23\text{ }\mu\text{M}$), na presença de CB7 (5 eq.). Em *inset* apresentam-se os ajustes dos dados experimentais que permitiram obter o valor de pK'_a . c) Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e a $37\text{ }^\circ\text{C}$ do composto **1Ct** ($19\text{ }\mu\text{M}$), na presença de CB7 (5 eq.), mantendo o $\text{pH} = 5$ e $[\text{citrato de sódio}] = 10\text{ mM}$. Em *inset* apresentam-se as absorvâncias máximas da Ct e AH^+ em função do tempo de irradiação.

No geral, observou-se um aumento do pK'_a do sistema multiestado induzido pela interação com o CB7, o que significa que o macrociclo se associa preferencialmente com o catião flavílio, em comparação com a respetiva chalcona *trans*, estabilizando-o até valores de pH mais elevados. No caso do composto **3**, com maior caráter hidrofóbico, não se observou um aumento significativo do pK'_a após a associação ao CB7, o que sugere que a maior capacidade de formar agregados poderá estabilizar o catião flavílio por si.

A diferença das constantes de associação das associações contendo catião flavílio ou chalcona *trans* relaciona-se com os valores de pK'_a para o composto livre ou associado, de acordo com a Equação 3.4.[52]

$$K_{1:1}(AH^+) = \frac{K'_a(\text{composto livre}) \times K_{1:1}(Ct)}{K'_a(\text{associação})} \quad (3.4)$$

Assim, a determinação dos valores de pK'_a das associações dos compostos **1** a **3** com CB7 permitiu ainda confirmar os valores previamente apresentados das constantes de associação. Tanto no composto **1** como no **2**, a determinação das constantes de associação e de acidez foi realizada mantendo as mesmas condições de temperatura, e verificou-se compatibilidade dos valores apresentados. No caso do composto **3**, a diferença entre as constantes de associação do catião flavílio com o macrociclo e da respetiva chalcona *trans* implicaria um aumento do pK'_a em cerca de uma unidade, induzido pela associação, o que não se verificou ($pK'_a(3) = 3,4$; $pK'_a(3@CB7)$

= 3,5.) A maior capacidade de agregação poderá estabilizar o catião flavílio, diminuindo o efeito habitual que a interação supramolecular com o CB7 despoleta. Para além disso, como já foi referido anteriormente, a determinação do pK'_a deste composto, tanto livre como na presença de CB7, não é rigorosa, por poder haver a contribuição de fenómenos de agregação, constituindo apenas uma indicação.

Relativamente à resposta fotoquímica, os estudos foram realizados à temperatura ambiente, de modo a possibilitar o cálculo dos rendimentos quânticos de reação. Observou-se um aumento da eficiência de conversão Ct-AH⁺ na presença do macrociclo, atingido-se rendimentos quânticos de reação de 8,5 %. Para além disso, a estabilização do catião flavílio até valores de pH superiores possibilitou o funcionamento do fotocomutador em condições de pH ligeiramente superiores (≈ 4).

Tabela 3.5: Valores de pK'_a e Φ das associações 1@CB7, 2@CB7 e 3@CB7, incluindo-se os valores de pK'_a dos substratos livres para comparação.

Composto	pK'_a substrato	pK'_a @CB7	Φ / %
1	2,8	3,6	5,9
2	3,1	3,8	4,1
3	3,4	3,5	4,5

3.2.2 Caracterização do Composto 5

A síntese e caracterização de um composto anfifílico multi-responsivo contendo na sua estrutura um centro quiral surgiu com o objetivo de investigar os fenômenos de agregação por dicroísmo circular, uma vez que esta técnica permite a detecção de compostos aromáticos que apresentem quiralidade, em condições diluídas (na gama dos μM). Para além disso, havia a possibilidade de formação de agregados helicoidais, já que o uso de pequenas moléculas contendo um centro quiral é uma das abordagens mais eficientes de obter este tipo de estruturas.[20] Inicialmente, planeou-se a introdução da cadeia contendo o centro quiral no aldeído, para ser possível comparar a capacidade de agregação com os compostos 1 a 3, cujos estudos já se apresentaram. Contudo, não foi possível sintetizar o aldeído pretendido, tendo-se optado por inverter o padrão de substituição, ou seja, colocou-se a cadeia contendo o centro quiral na acetofenona e a cadeia contendo o grupo sulfonato no aldeído (Figura 3.16).

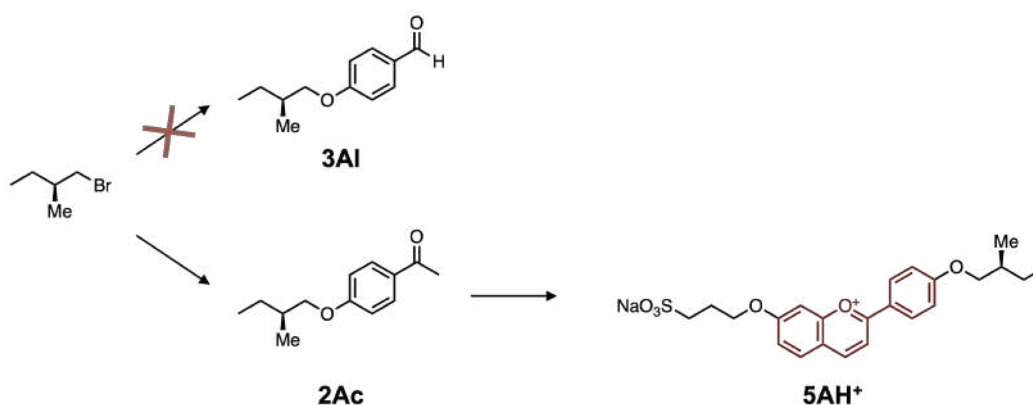


Figura 3.16: Estruturas químicas dos compostos 3Al, 2Ac e 5AH⁺.

Apesar de isto implicar que os resultados não são comparáveis com os compostos anteriores, como inicialmente pretendido, fez-se uma caracterização preliminar do catião flavílio 5AH⁺ por dicroísmo circular na presença e ausência de CB8. O uso deste macrociclo possibilita, de acordo com os resultados obtidos na titulação monitorizada por espectroscopia de emissão, a entrada de duas unidades de substrato numa de macrociclo (Figura 3.17).

De facto, as dimensões da cavidade do CB8 permitem habitualmente a inclusão de duas unidades de catião flavílio.[78] Para além disso, destaca-se ainda a ordem de grandeza superior da constante de associação $K_{1:2}$ em comparação com a $K_{1:1}$, o que significa que a formação da associação 1:2 é mais favorável em comparação com o 1:1. Por outras palavras, existe cooperatividade positiva no sistema, já que $\alpha = \frac{4K_{1:2}}{K_{1:1}} > 1$.[79]

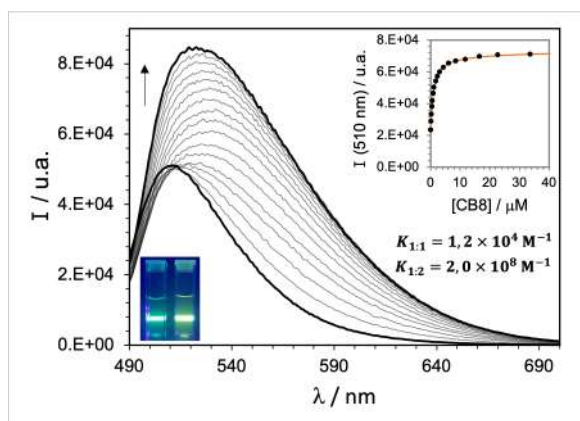


Figura 3.17: Variações espectrais observadas após adição de CB8 a uma solução de 5AH^+ ($2 \mu\text{M}$), a $\text{pH} = 1$, a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, monitorizando-se por espectroscopia de emissão ($\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$). Em *inset* apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 1:2 descrito no Apêndice C. Na fotografia, apresentam-se duas células contendo igual concentração de substrato, antes (esquerda) e após (direita) adição de CB8, sendo evidenciado o desvio batocrômico induzido pela associação supramolecular.

Os estudos de dicroísmo circular compreenderam em primeiro lugar a aquisição dos espectros do composto 5AH^+ *per si* a duas concentrações distintas e da associação $5\text{AH}^+@CB8$, à temperatura ambiente (Figura 3.18).

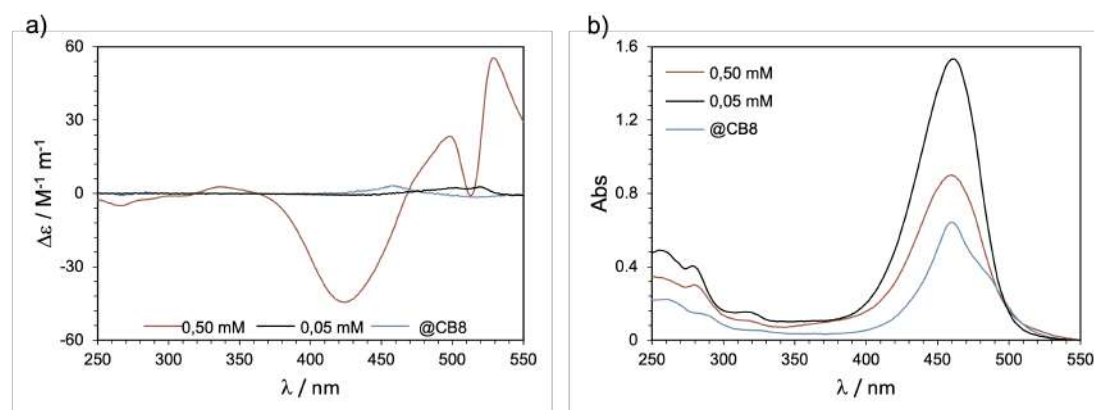


Figura 3.18: Espectro de a) dicroísmo circular eletrónico e b) absorção do composto 5AH^+ (HCl $0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 1$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$) numa solução diluída ($0,05 \text{ mM}$, linha preta), concentrada ($0,50 \text{ mM}$, b = $0,1 \text{ cm}$, linha cor de tijolo) e na presença de CB8 ($0,02 \text{ mM}$, $1,2 \text{ eq. CB8}$, linha azul clara).

Observaram-se bandas de dicroísmo circular em todos os casos, embora com intensidades e sinais distintos. Por comparação com os espectros de absorção, conclui-se que as bandas centradas entre os 425 nm e os 460 nm correspondem ao composto na forma de catião flavílio. Comparando os espectros correspondentes às soluções de composto livre, observa-se que o sinal de dicroísmo circular aumenta com o aumento de concentração do composto, ao contrário da absorvância. Assumindo que o composto forma agregados na solução mais concentrada, o aumento de intensidade do sinal de dicroísmo poderá indicar que as moléculas de 5AH^+ se orientam de modo

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES ANIÔNICOS

análogo. Por outro lado, a adição de CB8 induz a inversão do sinal de dicroísmo circular, visto que o $\Delta\epsilon$ da banda correspondente ao composto em estudo tem sinal positivo, sugerindo a inversão da helicidade dos agregados.

De modo a racionalizar o comportamento do sistema, adquiriram-se espectros de dicroísmo circular eletrônico do composto livre a uma concentração de 0,5 mM, a várias temperaturas, começando por uma rampa de aquecimento, seguida por outra de arrefecimento (Figura 3.19).

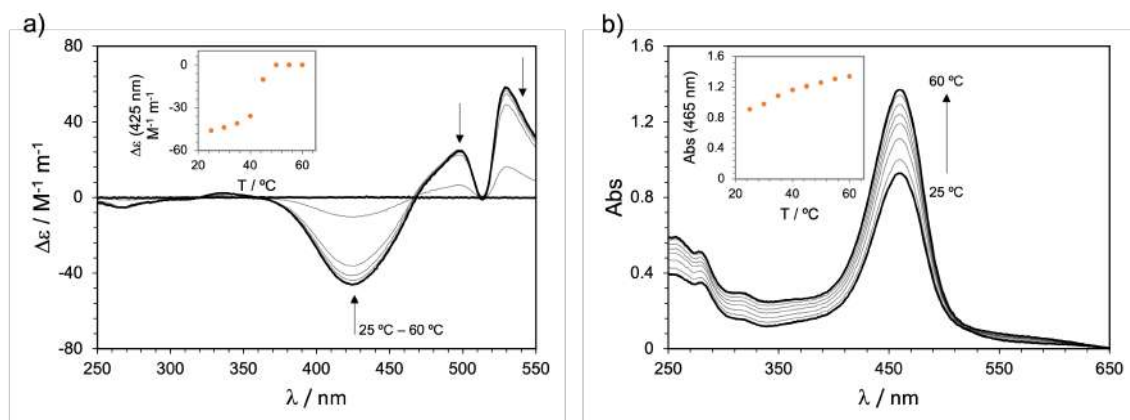


Figura 3.19: Variações no espetro de a) dicroísmo circular eletrônico e b) absorção do composto $5AH^+$ (0,50 mM, HCl 0,1 M, pH = 1), em função da temperatura no aquecimento de 25 °C a 60 °C.

Em primeiro lugar, verifica-se que o aumento de temperatura origina a diminuição da intensidade de todos os sinais de dicroísmo circular, ao mesmo tempo que a absorvância aumenta. Tendo em conta os resultados obtidos anteriormente para a solução de composto livre mais diluída em comparação com a mais concentrada, este comportamento pode indicar que o número de interações diminui em consequência do aquecimento e possivelmente os agregados formados são destruídos. Na rampa de arrefecimento posteriormente efetuada não se observou a retoma do sinal inicial, sugerindo que existe uma barreira de ativação para a formação de agregados. (Figura D.15, Apêndice D).

3.3 Caracterização dos Compostos Funcionalizados com Substituintes Catiônicos

Na Figura 3.20 apresentam-se as estruturas químicas dos compostos catiônicos estudados no âmbito deste trabalho: **6AH⁺**, **6Ct**, **7AH⁺** e **7Ct**. Apesar de os compostos mencionados não se terem revelado promissores a nível da agregação, os estudos de interação recetor-substrato com cucurbit[7]urilo surgiram como ferramenta para construir associações supramoleculares, bem como para controlar a reatividade fotoquímica. Em primeiro lugar, determinou-se o valor da constante de acidez aparente, K_a^\wedge , de ambos os sistemas. De seguida, estudaram-se as propriedades fotoquímicas e os resultados obtidos sugeriram a existência de um processo de fotodimerização intramolecular no caso do composto **6**, o qual compete com o processo fotocromico de isomerização da chalcona *trans* que conduz à formação do catião flavílio, convencionalmente observado nestes sistemas.

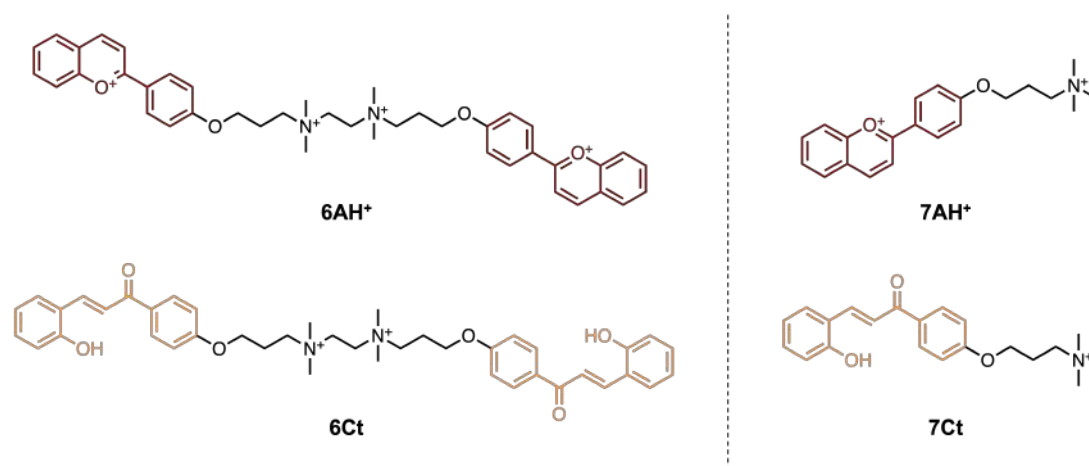


Figura 3.20: Estruturas químicas dos compostos catiônicos em estudo, destacando-se as unidades de catião flavílio (vermelho) e de chalcona *trans* (cor de laranja).

3.3.1 Caracterização Espectroscópica dos Monómeros

3.3.1.1 Determinação do pK_a^\wedge no estado fundamental

Como já foi referido anteriormente, o catião flavílio é a espécie do sistema multiestado mais estável a valores de pH ácidos ($pH < 2$). Contudo, equilibrando uma solução a valores de pH mais elevados é possível seguir por espectroscopia de absorção UV-Vis o desaparecimento do catião flavílio ($\lambda_{máx} \approx 440$ nm), à medida que se formam as outras espécies. [28–36, 51–53] Dado que nenhum dos compostos catiônicos estudados é substituído na posição 4 da chalcona por um grupo eletrodoador, a barreira de ativação da reação de isomerização é elevada, ao contrário do exemplo que se apresenta na Figura 3.21. Assim, é possível considerar um pseudo-equilíbrio, no qual não se observa a formação da chalcona *trans*. [29–33, 35, 53]

3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES CATIÔNICOS

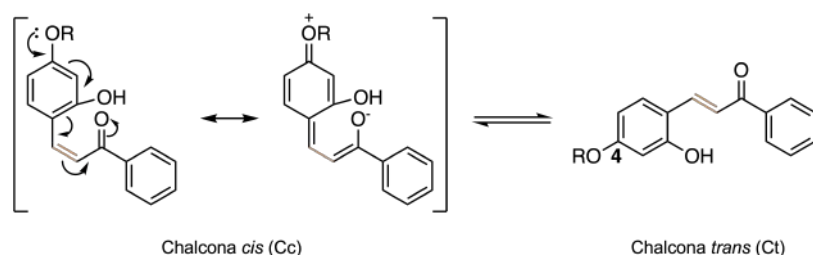


Figura 3.21: Estruturas de ressonância de uma chalcona *cis* (Cc) substituída na posição 4 por um substituinte eletrodoador, destacando-se a cor de laranja a ligação dupla que isomeriza para formar a chalcona *trans* (Ct).

Na Figura 3.22, apresentam-se os espectros de absorção a 25 °C dos compostos 6 e 7, adquiridos cerca de um minuto após o salto de pH, bem como o ajuste dos dados que permitiu o cálculo da constante de acidez aparente, K_a^{\wedge} , de cada sistema.

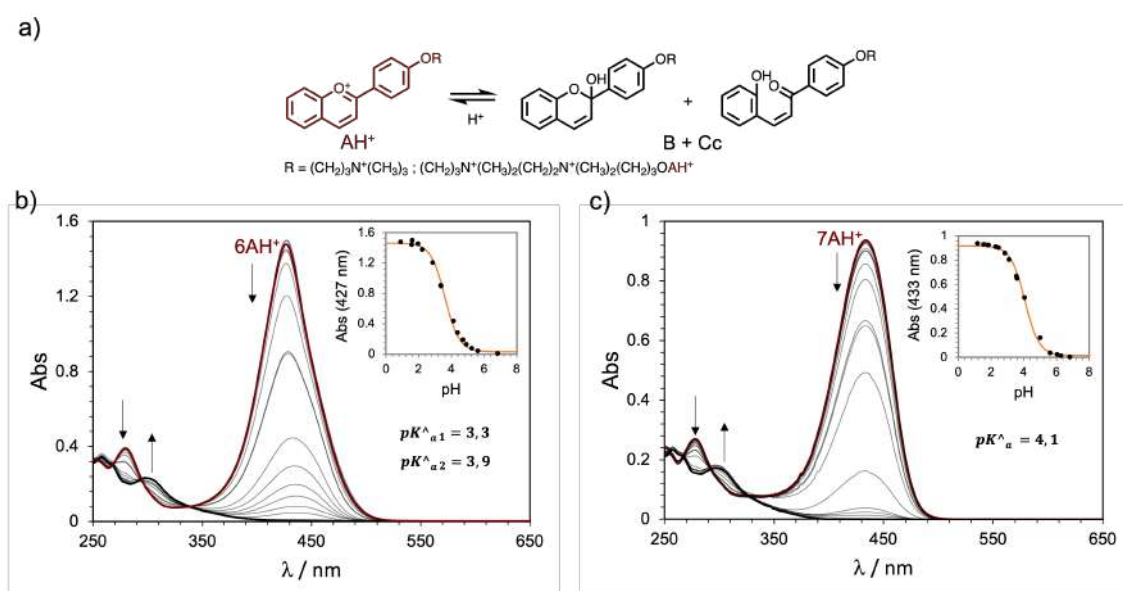


Figura 3.22: a) Representação esquemática das transformações decorrentes dos saltos de pH dos compostos 6 e 7, à temperatura ambiente, desde pH = 1 até valores de pH mais elevados. Espectros de absorção a diferentes valores de pH, mantendo a temperatura de 25 °C e [citrato de sódio] = 10 mM, do composto: b) 6 (25 μM) e c) 7 (23 μM). Em *inset* apresentam-se os ajustes dos dados experimentais que permitiram obter os valores de pK_a^{\wedge} .

Em primeiro lugar, no caso do composto 6, observa-se a alteração da forma da banda referente ao catião flavílio consoante a sua concentração. Na Figura 3.23, verifica-se que a decomposição do espectro do composto 6 adquirido a pH = 6 (condições nas quais existe pouca quantidade de catião flavílio) é sobreponível com o espectro do composto 7 a pH = 1, o que sugere a existência, a pH ácido, de um processo ou interação adicional no sistema que contém duas unidades responsivas. Com o objetivo de testar a ocorrência de fenómenos de agregação, adquiriu-se um espectro de

absorção do composto **6** a pH = 1 em 90 % de metanol, tendo-se verificado a sobreposição com os anteriores, devendo assim corresponder às condições em que o composto não está agregado.

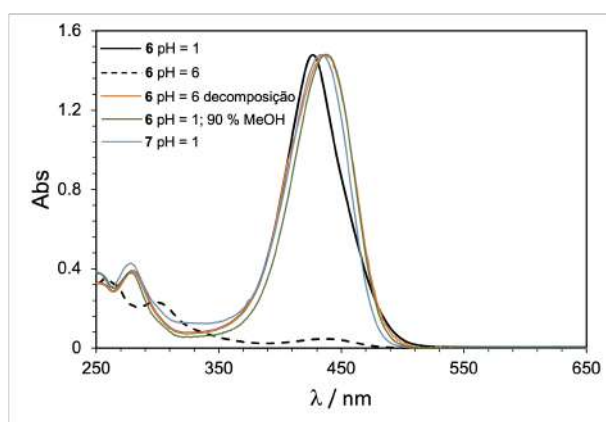


Figura 3.23: Espectros de absorção do composto **6** a pH = 1 (linha preta cheia) e a pH = 6 (linha preta tracejada). A cor de laranja, apresenta-se o espectro normalizado do flavílio obtido por decomposição do espectro registado a pH = 6, com o objetivo de destacar a diferença na forma da banda do catião flavílio, em função do pH (linha laranja); o espectro do composto **6** a pH = 1 numa solução contendo 90 % de metanol (linha verde) e o espectro do composto **7** a pH = 1 (linha azul clara).

De modo a confirmar se a interação existente no composto **6** é de natureza intra ou intermolecular, realizou-se uma experiência de ^1H DOSY RMN do catião flavílio 6AH^+ (6 mM) a pD = 0. O coeficiente de difusão obtido ($D = 2,92 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) é compatível com uma massa molecular de 836 g/mol, de acordo com o método de Stokes-Einstein Gierer-Wirtz (Figura D.16, Apêndice D).[80] Este valor é próximo da massa molecular do composto sem se considerarem os contra-íons: 644 g/mol, o que sugere que se trate de um processo de natureza intramolecular. Contudo, importa referir que um erro de apenas 5% na determinação do coeficiente de difusão origina uma variação da massa do composto em cerca de 106 g/mol.

Relativamente à determinação dos valores das constantes de acidez aparentes, no caso do sistema $6\text{AH}^+\text{-Ct}$, os pontos experimentais deveriam ser ajustados a dois valores de K_a^\wedge por se tratar de um diácido, mas, uma vez que não traçam dois pontos de inflexão bem definidos, tal não foi possível. Assim, com base na dedução matemática apresentada na Secção B.o.3 do Apêndice D e considerando que as duas reações de pseudo-ácido-base são um processo estatístico, ou seja, todas as constantes microscópicas (K_{am}) são iguais, ajustou-se apenas o valor de K_a^\wedge e obteve-se o valor de K_a^\wedge , usando a igualdade estabelecida na Equação 3.5.[28]

$$K_a^\wedge = \frac{K_a^\wedge}{4} \quad (3.5)$$

A constante de acidez microscópica, K_{am} , corresponde, de acordo com a Equação 3.6, a metade da constante de acidez aparente K_a^\wedge e é este valor que se deve comparar com a constante determinada para o sistema $7\text{AH}^+\text{-Ct}$.

$$K_{am} = \frac{K_a^\wedge}{2} \quad (3.6)$$

3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES CATIONÍCOS

Assim, conclui-se que os valores de pK_a^\wedge obtidos para os dois sistemas diferem em cerca de 0,5 unidades ($pK_{am}^\wedge(6) = 3,6$; $pK_a^\wedge(7) = 4,1$), apresentando um valor inferior no sistema $6AH^+-Ct$. Este resultado sugere que neste sistema ocorre algum outro processo, possivelmente a já referida interação intramolecular, que estabiliza as unidades de espécie básica, ou seja $Kd(BC^*) > Kd(AH^+)$, provocando a diminuição do valor de pK_a^\wedge . Na Figura 3.24, estão esquematizadas as espécies e constantes de equilíbrio inerentes ao sistema $6AH^+-Ct$, considerando que as unidades responsivas interagem entre si.

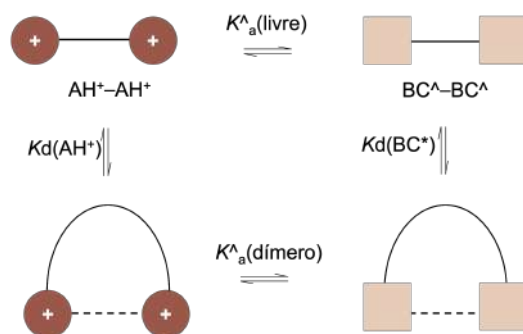


Figura 3.24: Esquema de reações existentes no sistema $6AH^+-Ct$, com as respectivas constantes de acidez ($K_a^\wedge(livre)$ e $K_a^\wedge(dímero)$) e de dimerização ($Kd(AH^+)$ e $Kd(BC^*)$).

De facto, se a dimerização estabilizar as unidades de espécie básica, a constante de acidez aparente do dímero definida na Equação 3.7 deverá ser superior à constante de acidez $K_a^\wedge(livre)$. Deste modo, a constante de acidez global observada será maior do que $K_a^\wedge(livre)$ e o pK_a^\wedge global do sistema deverá ser inferior ao do composto 7.

$$K_a^\wedge(dímero) = \frac{[BC^\wedge - BC^\wedge][H^+]^2}{[AH^+ - AH^+]} \quad (3.7)$$

Assim, tanto a alteração da forma espectral observada no caso do composto 6, como a diferença entre as constantes de acidez calculadas para os dois compostos sugerem a existência de interações entre as unidades responsivas do sistema $6AH^+-Ct$.

3.3.1.2 Resposta Fotoquímica

O estudo da resposta fotoquímica dos sistemas considerados foi realizado através da monitorização da irradiação da Ct a 365 nm por espectroscopia de absorção UV-Vis, em condições de pH ácido ($pH < pK_a^\wedge$) e neutro ($pH > pK_a^\wedge$).

Começando pela experiência efetuada em condições ácidas, observa-se uma discrepância notável na eficiência da conversão, já que no caso do sistema $6AH^+-Ct$ a banda do catião flavílio fica apenas a meia altura da banda da Ct ($\lambda_{max} \approx 320$ nm), enquanto no sistema $7AH^+-Ct$ se observa uma duplicação da absorvância do flavílio face à da chalcona respetiva (Figura 3.25). Conhecendo-se os coeficientes de extinção molar dos compostos em estudo, é possível calcular a percentagem de chalcona *trans* convertida a catião flavílio, tendo-se obtido o valor de 17 % e 88 % para os sistemas $6AH^+-Ct$ e $7AH^+-Ct$, respetivamente ($\epsilon_{440\text{ nm}}(7AH^+) = 36662 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

$\epsilon_{345\text{ nm}}(7\text{Ct}) = 17315\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{440\text{ nm}}(6\text{AH}^+) = 46889\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{345\text{ nm}}(6\text{Ct}) = 19990\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). É ainda possível notar, no caso do sistema $6\text{AH}^+\text{-Ct}$, a formação de uma banda a 280 nm aquando da irradiação. Este comportamento sugere a existência de uma reação fotoquímica paralela no sistema $6\text{AH}^+\text{-Ct}$ que compete com o processo fotocromático de isomerização da chalcona *trans* que conduz à formação do catião flavílio, convencionalmente observado nestes sistemas. [28–35, 51–53] Os rendimentos quânticos de reação foram calculados para ambos os casos, de acordo com a Equação 2.1 apresentada no Capítulo 2 e observa-se um valor bastante inferior no caso do sistema $6\text{AH}^+\text{-Ct}$ ($\Phi(6) = 1,0\%$; $\Phi(7) = 5,6\%$), sugerindo mais uma vez a existência de um processo que compete com a isomerização *trans-cis*.

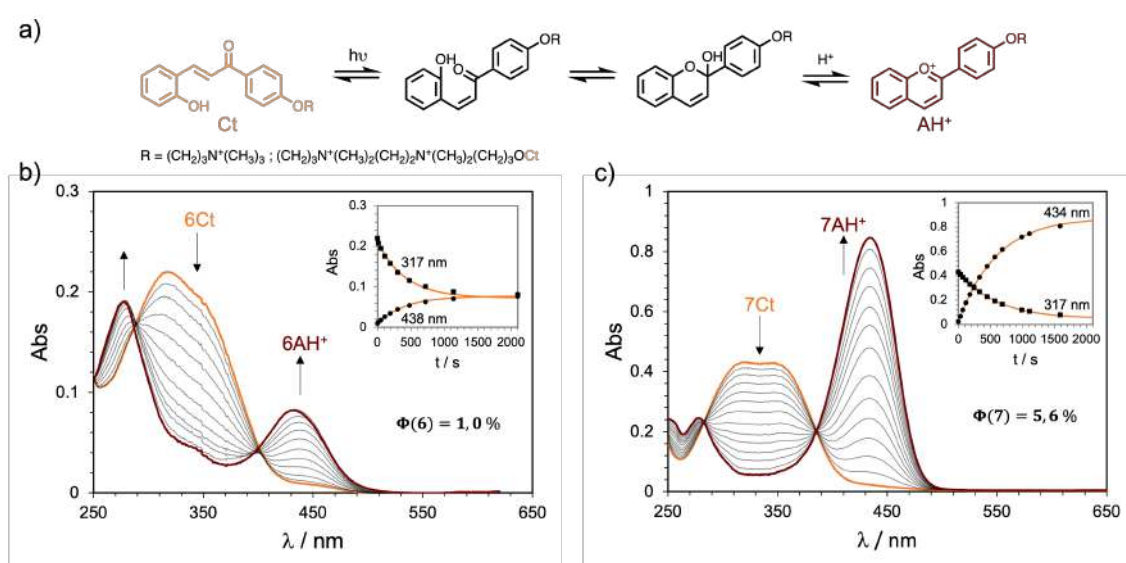


Figura 3.25: a) Representação esquemática das transformações decorrentes da irradiação das chalconas *trans* em condições de pH ácido. Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e à temperatura ambiente do composto: b) 6Ct (10 μM , pH = 2, [citrato de sódio] = 10 mM) e c) 7Ct (21 μM , pH = 2, [citrato de sódio] = 10 mM). Em *inset* apresentam-se as absorvâncias ao comprimento de onda de absorção máxima dos catiões flavílio e chalconas *trans* em função do tempo de irradiação.

Ao contrário do que se verificou anteriormente, na experiência efetuada em condições de pH neutras, não se observou o crescimento da banda a cerca de 440 nm, o que indica que não se forma catião flavílio (Figura 3.26). De facto, esta espécie não é estável ao valor de pH considerado ($\text{pH} > \text{pK}_a^{\wedge}$), sendo as espécies presentes no estado fotoestacionário as chalconas *cis* e *trans*, bem como o hemicetal - e o produto cinético B4, conforme reportado pelo grupo de investigação para o composto 7. [53] Para além disso, verificou-se novamente o aparecimento da banda a 280 nm no caso do sistema $6\text{AH}^+\text{-Ct}$, o que sugere que o processo competitivo ocorre tanto a valores de pH ácidos como neutros.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES CATIONICOS

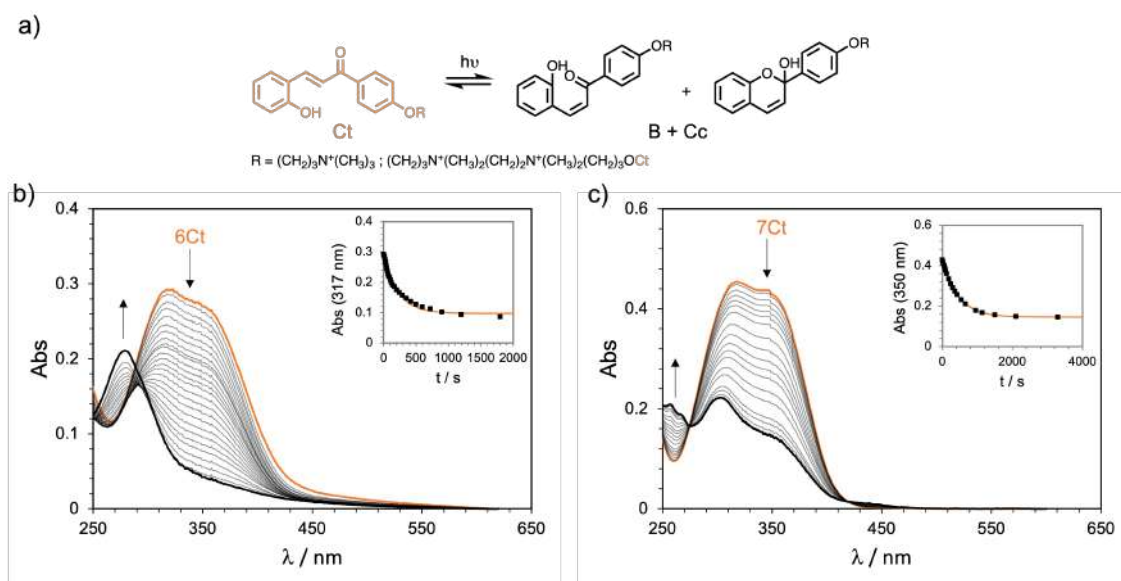


Figura 3.26: a) Representação esquemática das transformações decorrentes da irradiação das chalconas *trans* em condições de pH neutro. Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e à temperatura ambiente do composto: b) 6Ct (14 μ M, pH = 6, [citrato de sódio] = 10 mM) e c) 7Ct (21 μ M, pH = 6,06, [citrato de sódio] = 10 mM). Em *inset* apresentam-se as absorvâncias ao comprimento de onda de absorção máxima dos catiões flavílio e chalconas *trans* em função do tempo de irradiação.

Na literatura, existem exemplos de chalconas *cis* que absorvem a cerca de 280 nm e verifica-se o desaparecimento desta banda por recuperação térmica ou irradiação a 254 nm, com a consequente formação da respetiva chalcona *trans*. [81] No caso do sistema em estudo, já se tinha adquirido o espectro de absorção da mistura do hemiacetal com a chalcona *cis* após um salto de pH, partindo do catião flavílio, a uma temperatura de 25 °C e não se verificou a presença da banda a 280 nm (Figura 3.27).

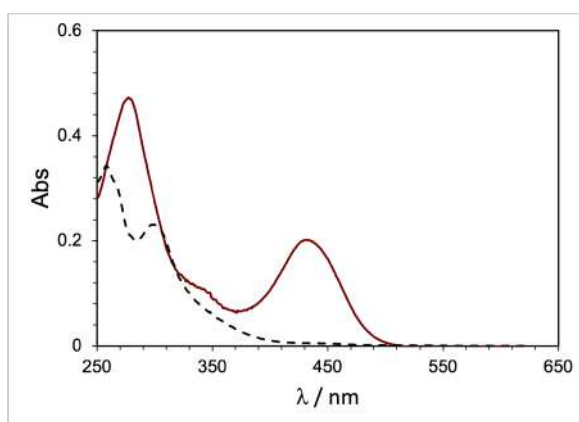


Figura 3.27: Espectro de absorção do composto 6, obtido após o salto de pH a 25 °C desde pH = 1 até pH = 7 (linha preta tracejada) e espectro de absorção do mesmo composto no estado fotoestacionário, a pH = 2 (linha vermelha).

Assim, sabe-se que a espécie que absorve a 280 nm não pertence ao sistema multiestado e testou-se a reversibilidade de formação da mesma, através de recuperação térmica e irradiação a 280 nm. Para tal, o procedimento de irradiação em condições de pH neutras foi repetido e, após se atingir o estado fotoestacionário, colocou-se a solução num banho de água a 50 °C ou irradiou-se a 280 nm e seguiu-se a recuperação por espectroscopia de absorção UV-Vis. Em nenhum dos casos se observou uma diminuição significativa da banda a 280 nm, o que sugere que se trate de um processo irreversível, pelo menos nas condições investigadas (Figura D.18, Apêndice D).

Uma das propostas de estrutura para o produto desconhecido é a que se apresenta na Figura 3.28, uma vez que a bischalcona 6Ct poderá dimerizar intramolecularmente por meio de uma reação de cicloadição [2+2], permitida fotoquimicamente de acordo com as regras de Woodward e Hoffmann. [82–84]

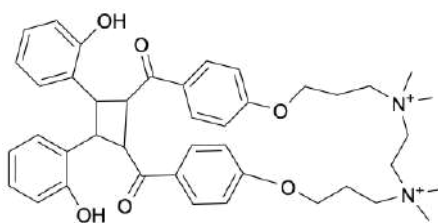


Figura 3.28: Estrutura química do produto de cicloadição [2+2] intramolecular da 6Ct.

Com o objetivo de provar de modo robusto esta hipótese, a resposta fotoquímica do sistema $6AH^+$ -Ct foi seguida por RMN, usando metanol para garantir a solubilidade requerida pela experiência. Apesar de a resposta fotoquímica ser semelhante independentemente da proporção de metanol:água utilizada, os resultados da análise por RMN não se mostraram conclusivos (Figura D.19, Apêndice D), não tendo sido possível determinar inequivocamente a estrutura pretendida. Para além disso, foram feitos alguns cálculos computacionais de TD-DFT (Teoria de Funcionais da Densidade Dependente do Tempo) para ajudar a suportar a hipótese proposta que, apesar de se terem revelado promissores, não se apresentam na presente Dissertação por serem ainda estudos preliminares.

3.3.2 Interações Recetor-Substrato

Os resultados apresentados na Secção anterior sugeriram a existência de um processo fotoquímico no sistema $6AH^+$ -Ct, que compete com o convencional processo de isomerização inerente ao sistema multiestado das antocianinas. Não se tendo revelado promissores para cumprir os objetivos delineados inicialmente, estudaram-se as interações recetor-substrato de ambos os compostos com CB7, com o objetivo de modular a resposta fotoquímica do sistema $6AH^+$ -Ct e, paralelamente, construir e caracterizar a associação supramolecular $7@CB7$. [52, 53, 85].

3.3.2.1 Modulação da resposta fotoquímica do composto 6Ct

Em primeiro lugar, verificou-se por espectroscopia de absorção UV-Vis a formação de associações recetor-substrato dos compostos $6AH^+$ e 6Ct com CB7 (Figura 3.29). Em ambos os casos,

3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES CATIONÍCOS

os dados experimentais foram ajustados a um modelo de ligação recetor-substrato 2:1, dado que o substrato contém dois potenciais sítios de ligação para o macrociclo. Para o catião flavílio, obtiveram-se constantes de $K_{1:1} = 3,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ e $K_{2:1} = 8,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, determinadas por competição com metilviologénio ($K = 4,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ a $\text{pH} = 1$, conforme apresentado na Figura D.20, Apêndice D). As constantes de associação calculadas para a chalcona **6Ct** apresentaram ordem de grandeza inferior em cerca de três unidades à do respetivo catião flavílio ($K_{1:1} = 5,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $K_{2:1} = 1,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), à semelhança do que foi previamente reportado em sistemas análogos.[52, 53] Nestes casos, seria expectável que se tratasse de um processo cooperativo, já que a associação da primeira molécula de CB7 exige a quebra das interações intramoleculares entre as unidades responsivas do substrato, sendo a segunda associação facilitada neste sentido. No entanto, o ajuste dos dados experimentais é compatível com um processo estatístico ($K_{1:1} = 4 \times K_{2:1}$, ver Equação 3.5), o que pode significar que as constantes microscópicas de associação são iguais para o primeiro e segundo processos, por exemplo se as constantes de dimerização forem relativamente baixas. Por outro lado, a não observação de um processo cooperativo pode ser tentativamente atribuída à repulsão entre os CB7's, contrabalançando um possível efeito cooperativo.

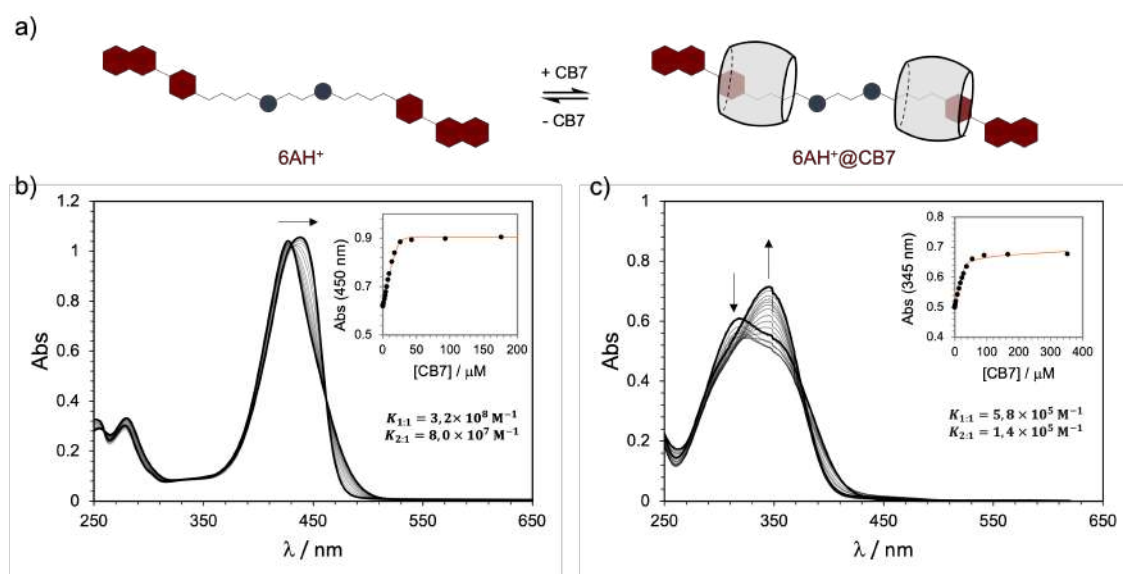


Figura 3.29: a) Representação esquemática da formação da associação supramolecular $6\text{AH}^+ @ \text{CB7}$. Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de b) 6AH^+ ($18 \mu\text{M}$), a $\text{pH} = 1$ e c) 6Ct ($25 \mu\text{M}$), a pH neutro. Em *inset* apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 2:1 descrito no Apêndice C.

A monitorização da titulação do composto 6AH^+ com CB7 por RMN permite determinar o posicionamento do substrato no recetor, isto é, qual a zona do substrato que se encontra no interior, portais ou exterior do macrociclo. Os portais dos cucurbiturilos são constituídos por grupos carbonilo, de natureza eletronegativa, que irão desblindar os protões que aí se encontrem, originando um desvio dos mesmos para campo baixo, após associação. Pelo contrário, os protões

posicionados no interior da cavidade apresentarão um desvio para campo alto. Neste caso, os prótons 2'/6', 3'/5', bem como os alifáticos (destacados a cor de laranja na Figura 3.30) exibem um desvio para campo alto após a associação com CB7, indicando que se encontram no interior da cavidade do mesmo (os espectros COSY e ROESY da associação supramolecular apresentam-se nas Figuras D.22 e D.23, Apêndice D). Dada a reduzida solubilidade da chalcona 6Ct em água, não foi possível realizar o mesmo estudo para este composto. No entanto, considerando os resultados obtidos para a monochalcona 7Ct (apresentados adiante, na Seção 3.3.2.2), assume-se que o posicionamento no macrociclo seja análogo.

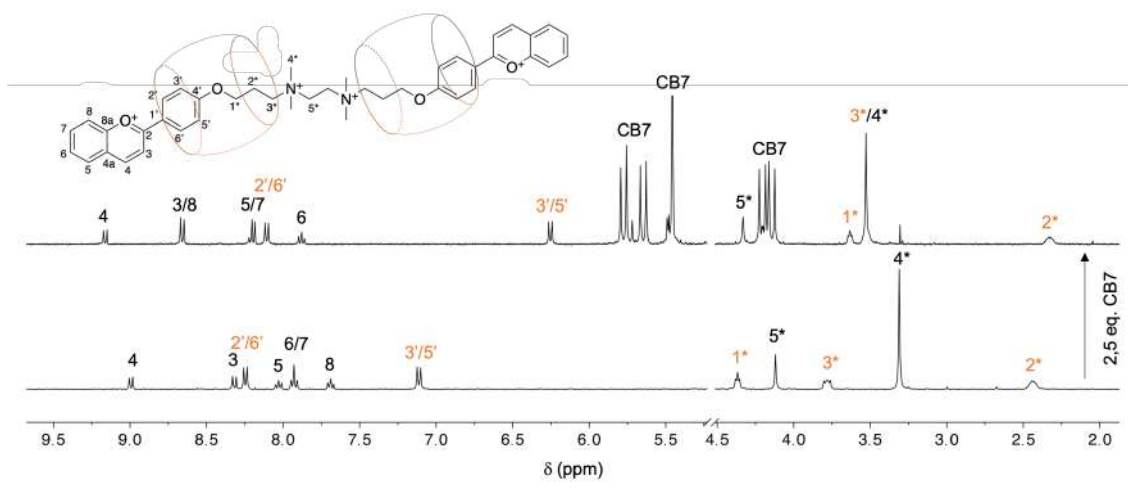


Figura 3.30: Espectros de ^1H RMN do composto 6AH^+ (1 mM) livre (em baixo) e com 2,5 equivalentes de CB7 (em cima), a $\text{pD} = 1$, em D_2O , 400 MHz. A cor de laranja destacam-se os prótons que se deslocam para campo alto após a associação, significando que se encontram no interior da cavidade do macrociclo, conforme esquematizado na estrutura química.

Uma vez que os resultados apresentados anteriormente evidenciaram a existência de associação entre CB7 e os compostos 6AH^+ e 6Ct , formando-se associações recetor-substrato com estequiometria 2:1, determinou-se o pK_a^\wedge do composto 6 na presença de ≈ 2 eq. de macrociclo (Figura 3.31). Os dados experimentais foram ajustados ao modelo teórico, analogamente ao que se fez para o composto livre. No entanto, foi necessário forçar que a absorvância da solução a 440 nm em condições de $\text{pH} > \text{pK}_a^\wedge$ fosse próxima de zero, o que é concordante com o desaparecimento do catião flavílio, já que experimentalmente não foi possível obter espectros de absorção nessas condições. Apesar de esta aproximação adicionar algum erro à determinação dos valores de pK_a^\wedge , estes dados permitiram concluir que a associação induz um aumento do pK_a^\wedge em cerca de 2,8 unidades ($\text{pK}_a^\wedge(6) = 3,3$, $\text{pK}_a^\wedge(6) = 3,9$, $\text{pK}_a^\wedge(6@CB7) = 6,1$, $\text{pK}_a^\wedge(6@CB7) = 6,7$), o que é concordante com a diferença de ordens de grandeza das constantes de associação já apresentadas do catião flavílio e respetiva chalcona *trans* (Equação 3.8). [52, 86, 87]

$$K_{1:1}(\text{AH}^+) = \frac{K_a^\wedge(\text{composto livre}) \times K_{1:1}(\text{Ct})}{K_a^\wedge(\text{associação})} \quad (3.8)$$

3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES CATIÓNICOS

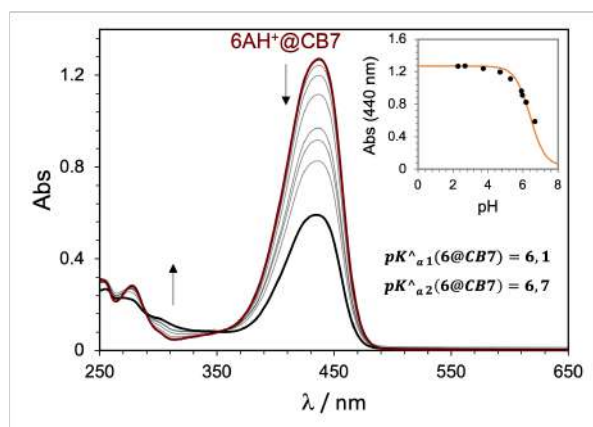


Figura 3.31: Espectros de absorção a diferentes valores de pH, mantendo a temperatura de 25 °C e [citrato de sódio] = 10 mM, do composto **6** (22 μM), na presença de 2 eq. de CB7, cerca de 10 minutos após saltos de pH desde pH = 1 até valores superiores.

Por fim, investigou-se a resposta fotoquímica da chalcona **6Ct** na presença do macrociclo, em condições de pH neutro (Figura 3.32). Dado que a associação induz um aumento do valor de pK_a^{\wedge} , é possível verificar a formação de catião flavílio após irradiação ($\lambda_{máx} \approx 440$ nm) nestas condições, ao contrário do que se observou para o composto livre (ver Figura 3.22). Para além disso, nota-se que a banda a 280 nm previamente mencionada não se forma e observa-se um aumento do rendimento quântico de reação da associação supramolecular face ao previamente apresentado para o composto livre ($\Phi(6) = 1,0 \%$, $\Phi(6@CB7) = 6,3 \%$). Estes resultados sugerem que a associação impede a interação entre as duas unidades fotocromicas, inibindo a ocorrência do processo paralelo previamente referido de fotodimerização.

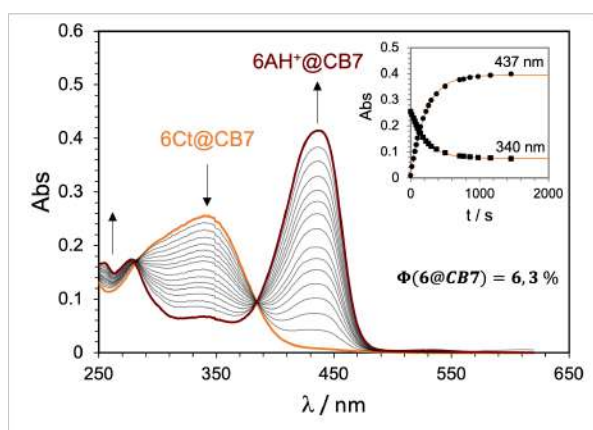


Figura 3.32: Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e à temperatura ambiente do composto **6Ct** associado com CB7 (9 μM, pH = 6, [citrato de sódio] = 10 mM, 2 eq. CB7). Em *inset* apresentam-se as absorvâncias ao comprimento de onda de absorção máximo dos catiões flavílio e chalconas *trans* em função do tempo de irradiação.

Assim, a encapsulação supramolecular permitiu modular a reatividade fotoquímica do composto considerado, melhorando a eficiência da conversão Ct-AH⁺ e permitindo o funcionamento do fotocomutador em condições de pH neutro.

3.3.2.2 Construção e caracterização da associação 7@CB7

À semelhança do que se descreveu na Secção anterior, a associação dos compostos 7AH⁺ e 7Ct com CB7 foi primeiramente investigada por espectroscopia de absorção UV-Vis (Figura 3.33). O ajuste dos dados experimentais permitiu obter uma constante de associação $K_{1:1} = 1,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, determinada por competição com metilviologénio (ver Figura D.24, Apêndice D), e outra com ordem de grandeza bastante inferior $K_{2:1} = 3,4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, o que sugere a possível associação de uma segunda molécula de macrociclo, ainda que numa extensão menor. No caso da chalcona, o ajuste dos dados experimentais a um modelo de ligação recetor-substrato 1:1, permitiu determinar a constante de associação $K = 1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, cerca de duas ordens de grandeza inferior à do catião flavílio correspondente. É possível verificar o crescimento da banda do catião flavílio ($\lambda_{\text{máx}} \approx 433 \text{ nm}$) à medida que a concentração de macrociclo aumenta, o que resulta da conversão das espécies B, B₄ e Cc, inicialmente presentes em solução, devido ao aumento do $\text{p}K_a^{\wedge}$ induzido pela associação. Deste modo, repetiu-se a experiência na presença de tampão citrato de sódio, deixando de se observar a formação da banda a 433 nm e obtendo-se uma constante de associação inferior, possivelmente devido à conhecida complexação competitiva dos catiões Na⁺ com CB7 ($K = 9,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) - Figura D.25, Apêndice D. [88–90]

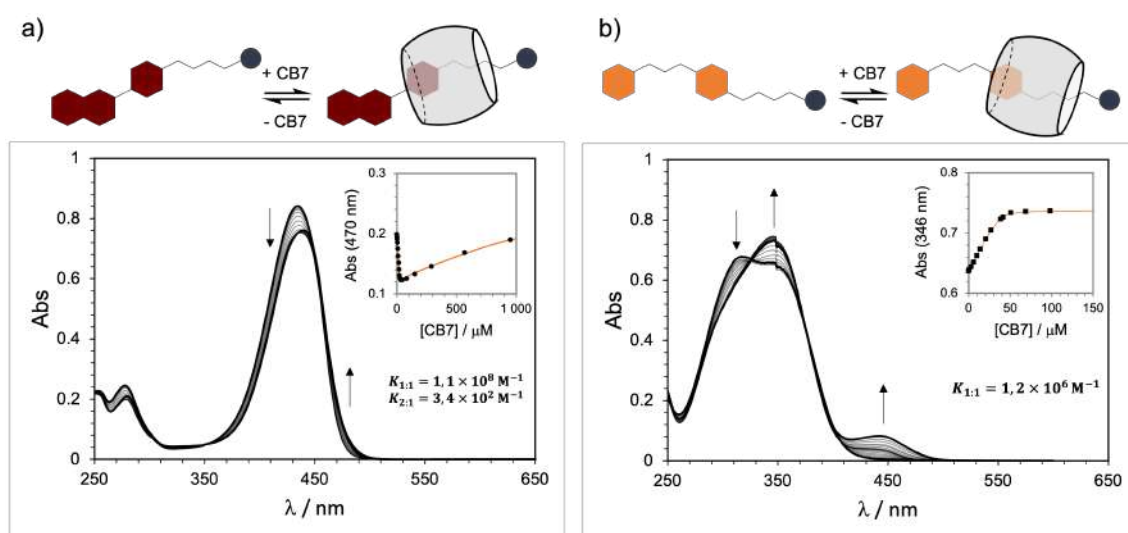


Figura 3.33: Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de a) 7AH⁺ (23 μM, a pH = 1) e b) 7Ct (38 μM, pH neutro), apresentando-se representações esquemáticas da formação das associações supramoleculares 7AH⁺@CB7 e 7Ct@CB7. Em *inset* apresentam-se os ajustes dos dados experimentais aos modelos teóricos 2:1 e 1:1 descritos no Apêndice C, respetivamente.

As titulações monitorizadas por RMN permitiram determinar o posicionamento dos substratos no macrociclo (ver espectros COSY e ROESY apresentados nas Figuras D.26 a D.29, Apêndice D), concluindo-se que os prótons 2^o/6^o, 3^o/5^o e os alifáticos 1^{*}, 2^{*} e 3^{*} do composto 7AH⁺ se encontram no interior da cavidade do cucurbiturilo (Figura 3.34). É possível retirar a mesma conclusão para o composto 7Ct; no entanto, observa-se, contrariamente ao composto anterior, o desvio do sinal do próton 4^{*} para campo alto (Figura 3.35). Esta evidência, juntamente com o maior desvio dos

3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES CATIONÍCOS

protões 2* e 3* da Ct após associação quando comparados com os do respectivo AH⁺, sugere que exista um movimento de vaivém do macrociclo entre a região aromática e o grupo cationício. Este equilíbrio deverá ocorrer mais rápido do que a escala de tempo dos desvios químicos, já que não se observam sinais de permuta.

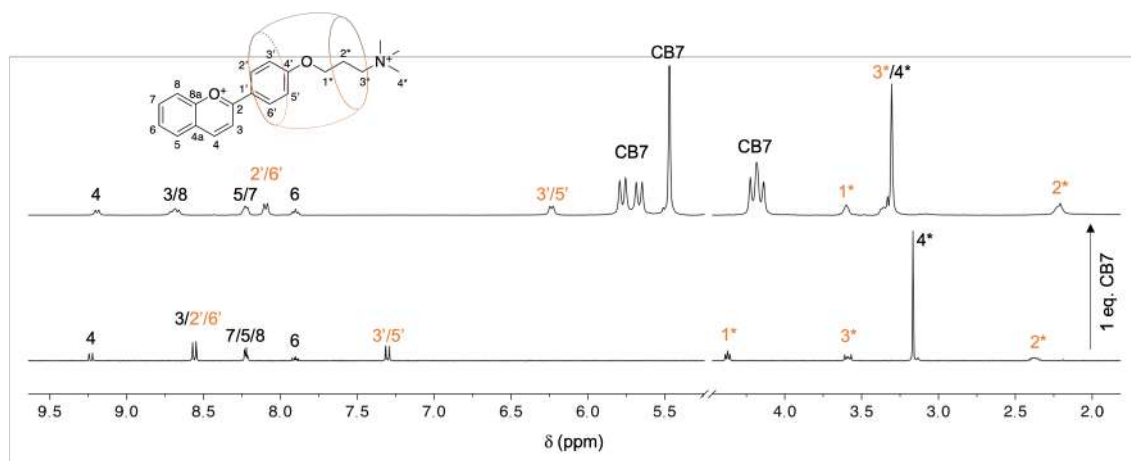


Figura 3.34: Espectros de ¹H RMN do composto 7AH⁺ (0,55 mM) livre (em baixo) e com 1 eq. de CB7 (em cima), a pD = 1, em D₂O, 400 MHz. A cor de laranja destacam-se os protões que se deslocam para campo alto após a associação, significando que se encontram no interior da cavidade do macrociclo, conforme esquematizado na estrutura química.

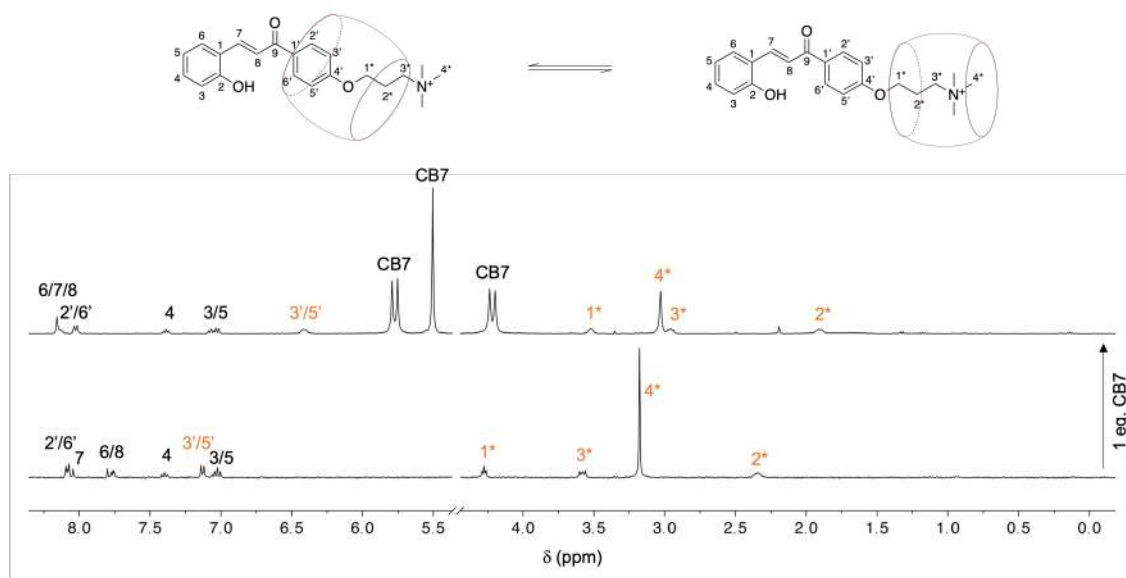


Figura 3.35: Espectros de ¹H RMN do composto 7Ct (0,80 mM) livre (em baixo) e com 1 eq. de CB7 (em cima), em D₂O, 400 MHz. A cor de laranja destacam-se os protões que se deslocam para campo alto após a associação, significando que se encontram no interior da cavidade do macrociclo, conforme esquematizado na estrutura química.

Nas experiências anteriores verificou-se que se formam associações recetor-substrato entre os compostos $7AH^+$ e $7Ct$, maioritariamente com estequiometria 1:1. Assim, determinou-se o pK_a^{\wedge} da associação $7@CB7$ através de saltos de pH desde $pH = 1$ até valores mais elevados, mantendo 1 eq. de $CB7$ (Figura 3.36). Os espectros de absorção foram adquiridos cerca de 10 minutos após o salto de pH, o que significa que se estabelece um pseudo-equilíbrio onde estão presentes as espécies B, B_4 e Cc, não ocorrendo a isomerização de Cc a Ct. À medida que o pH da solução aumenta, verifica-se a diminuição da banda referente ao catião flavílio ($\lambda_{m\acute{a}x} \approx 433$ nm), à semelhança do que se observou para o composto livre (ver Figura 3.22). No entanto, o pK_a^{\wedge} determinado para a associação ($pK_a^{\wedge}(7@CB7) = 6,3$) é cerca de duas unidades superior ao do composto livre, indicando uma estabilização do catião flavílio até valores de pH mais elevados, induzida pela associação preferencial deste composto com $CB7$, em comparação com as formas básicas B, B_4 e Cc. Assim, e de acordo com a Equação 3.8), a deslocação no valor de pK_a^{\wedge} é compatível com uma diferença entre as constantes de associação de duas ordens de grandeza. Contudo, o que se observa é que as constantes diferem em cerca de três ordens de grandeza ($K_{Ct} = 9,7 \times 10^4 M^{-1}$, $K_{AH^+} = 1,1 \times 10^8 M^{-1}$), o que é compatível com o pK_a^{\wedge} determinado na presença de 25 eq. de $CB7$ (Figura D.30, Apêndice D).

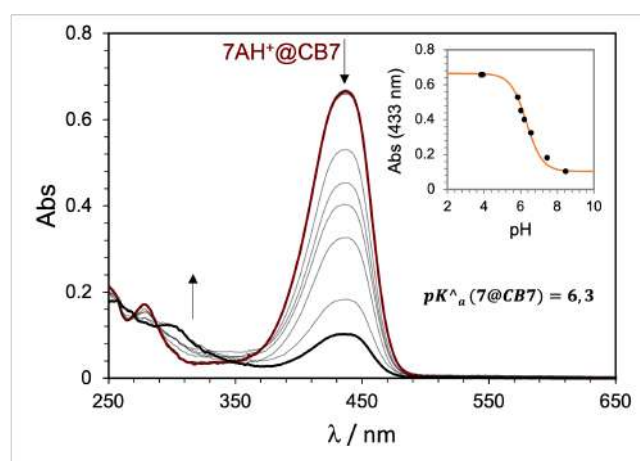


Figura 3.36: Espectros de absorção a diferentes valores de pH, mantendo a temperatura de $25\text{ }^{\circ}C$ e $[citrato\ de\ s\acute{o}dio] = 10\text{ mM}$, do composto 7 ($17\ \mu M$), na presença de 1 eq. de $CB7$, cerca de 10 minutos após saltos de pH desde $pH = 1$ até valores superiores.

As interações recetor-substrato permitiram modificar o pK_a^{\wedge} do sistema em estudo, permitindo uma estabilização do catião flavílio a valores de pH próximos do fisiológico. Deste modo, o comportamento do fotocomutador em condições de pH próximas do neutro será alterado. De facto, os espectros de absorção adquiridos ao longo do tempo da irradiação a 365 nm de uma solução a $pH = 6$ de $7Ct$ contendo 1 eq. de $CB7$ mostram o desaparecimento da Ct ($\lambda_{m\acute{a}x} \approx 365\text{ nm}$), à medida que se forma o catião flavílio ($\lambda_{m\acute{a}x} \approx 433\text{ nm}$) - Figura 3.37. Este resultado contrasta com o previamente apresentado para o composto livre, onde, nas mesmas condições de pH, não ocorre formação de AH^+ (ver Figura 3.26). Para além disso, nota-se um aumento do rendimento quântico de reação após associação ($\Phi(7@CB7) = 13,7\%$ vs $\Phi(7) = 5,6\%$).

3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES CATIONÍCOS

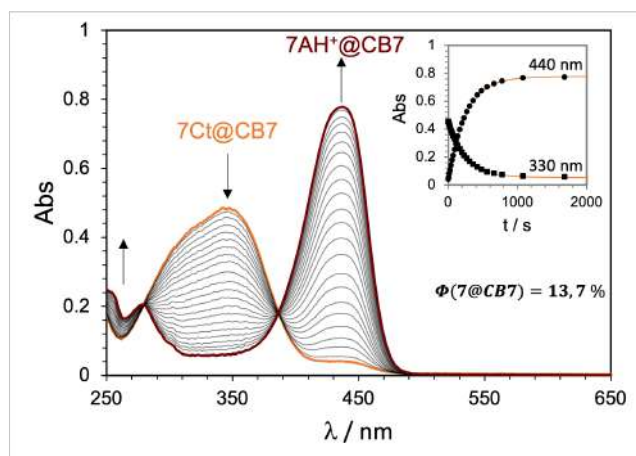


Figura 3.37: Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e à temperatura ambiente da associação supramolecular 7Ct@CB7 ($[7\text{Ct}] = 25 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 6$ [citrato de sódio] = 10 mM, 1 eq. CB7). Em *inset* apresentam-se as absorvâncias ao comprimento de onda de absorção máxima do catião flavílio e chalcona *trans* em função do tempo de irradiação.

Na Tabela 3.6, resumam-se os valores das constantes de equilíbrio e dos rendimentos quânticos de reação determinados para os compostos 6 e 7, na presença e ausência de CB7 .

Tabela 3.6: Constantes de equilíbrio e rendimentos quânticos de reação para os compostos 6 e 7, na presença e ausência de CB7 .

	6	6@CB7^1	7	7@CB7^2
pK_a^\wedge	3,3/6,9	6,1/6,7	4,1	6,3
$\Phi / \%^3$	1,0	6,3	5,6	13,7

¹ Na presença de ≈ 2 eq. de CB7 .

² Na presença de ≈ 1 eq. de CB7 .

³ Valores determinados a $\text{pH} = 2$ ou $\text{pH} = 6$, para os compostos livres ou associações supramoleculares, respetivamente.

4 | Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste trabalho, sintetizaram-se com sucesso vários derivados anfílicos de 2-hidroxichalconas contendo o grupo sulfonato ou tetrametiletilendiamónio como componente hidrofílica, verificando-se para todos eles a resposta combinada a estímulos de luz e pH, na forma monomérica.

No caso dos compostos contendo um grupo sulfonato, obtiveram-se três análogos com diferentes tamanhos de cadeia hidrofóbica, o que permitiu comparar resultados entre todos e definir tendências. Os valores de CAC determinados por tensiometria permitiram verificar o aumento deste parâmetro com a diminuição do carácter hidrofóbico, tendo o composto com menor cadeia hidrofóbica apresentado o maior valor (2,0 mM). Os resultados de CAC obtidos por ^1H RMN foram, no geral, inferiores, o que se atribuiu a fenómenos de pré-agregação, detetáveis por esta técnica.

As experiências de ^1H DOSY RMN permitiram estimar os valores de raio hidrodinâmico dos agregados, que foram posteriormente comparados com os comprimentos das moléculas, determinados com recurso a cálculos computacionais. No geral, verificou-se a concordância entre as duas medidas, concluindo-se que todos os compostos agregam para formar estruturas micelares esféricas. A capacidade de solubilização de compostos hidrofóbicos pelos agregados foi avaliada para o composto com tamanho de cadeia hidrofóbica intermédio, tendo-se verificado a solubilização de Sudan I.

Tendo-se observado uma resposta fotoquímica dos agregados inferior à esperada, exploraram-se as interações recetor-substrato com cucurbit[7]urilo como estímulo adicional para promover a conversão da chalcona *trans* a catião flavílio. Dado que o macrociclo se associa a todos os compostos tanto na forma de flavílio como de chalcona *trans* com constantes de associação na ordem dos 10^5 M^{-1} e 10^4 M^{-1} , respetivamente, não foi possível manter agregados da Ct na presença do CB7. Contudo, notou-se um desvio batocrómico do máximo de absorção do catião flavílio na presença de CB7, o que pode facilitar a aplicação destes compostos em meios biológicos, por este tipo de radiação, de maior comprimento de onda, penetrar mais facilmente os tecidos. Assim, determinaram-se os valores de $\text{p}K'_a$ na presença de CB7, tendo-se verificado serem superiores aos dos respetivos compostos livres ($0,1 < \Delta\text{p}K'_a \text{ (livre vs associado)} < 0,8$), o que indica que ocorre uma estabilização do catião flavílio pelo macrociclo induzida pela associação supramolecular. Este fenómeno permite que o fotocomutador Ct-AH⁺ opere a valores de pH ligeiramente superiores.

Uma vez que não se conseguiu sintetizar um análogo dos compostos anteriores contendo um centro quiral, foi necessário inverter o padrão de substituição, ou seja, introduzir o grupo de interesse na acetofenona em vez de no aldeído. Obtiveram-se assim dois compostos contendo

o grupo sulfonato, um com uma cadeia de hexano e outro com uma cadeia de (S)-metil-butano. Embora não se tenha conseguido obter o primeiro com pureza suficiente para prosseguir estudos, o composto com o centro quiral foi caracterizado na presença e ausência de CB8, por dicroísmo circular e os resultados sugeriram a formação de agregados quirais.

Quanto aos compostos funcionalizados com o substituinte catiónico, sintetizou-se um composto do tipo gemini, contendo duas unidades responsivas, tendo-se comparado os resultados com o anfífilo análogo de cauda única que já havia sido previamente sintetizado no grupo. Os resultados obtidos por espectroscopia de absorção e ^1H DOSY RMN sugeriram a existência de um processo de fotodimerização intramolecular, no caso do composto gemini, o qual compete com o processo de isomerização da chalcona *trans* que conduz à formação do catião flavílio, convencionalmente observado nestes sistemas. Esta hipótese necessita de uma confirmação mais robusta, por exemplo através de cálculos computacionais, estudo que se encontra a decorrer. Os estudos de interação recetor-substrato com cucurbit[7]urilo suportaram também a existência de fotodimerização intramolecular, uma vez que se observou o aumento da resposta fotoquímica na presença do macrociclo. Este tipo de interações foi também investigado para o composto anfífilo de cauda única, tendo permitido modular as propriedades cinéticas e termodinâmicas do sistema multiestado, nomeadamente promovendo a estabilização do catião flavílio e consequente funcionamento do fotocomutador em condições de pH menos ácidas.

No futuro, seria interessante estudar a associação dos compostos sintetizados com outras famílias de macrociclos, por exemplo os pilararenos, com vista a obter agregados supra-anfífilicos com maior capacidade de encapsulação. Para além disso, a determinação da toxicidade dos compostos em meios biológicos seria uma experiência importante a realizar e, se os resultados forem favoráveis, poder-se-iam explorar aplicações *in vivo* e testar a encapsulação de compostos relevantes do ponto de vista farmacológico.

Bibliografia

- [1] J.-M. Lehn. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*. VCH, 1995.
- [2] R. North. *How to Invent Everything: Rebuild All of Civilization (with 96% fewer catastrophes this time)*. Random House, 2018.
- [3] G. Yu, K. Jie e F. Huang. “Supramolecular amphiphiles based on host-guest molecular recognition motifs”. Em: *Chemical Reviews* 115.15 (2015), pp. 7240–7303.
- [4] Y. Tu, F. Peng, A. Adawy, Y. Men, L. K. Abdelmohsen e D. A. Wilson. “Mimicking the cell: bio-inspired functions of supramolecular assemblies”. Em: *Chemical Reviews* 116.4 (2016), pp. 2023–2078.
- [5] D. J. van Dijken, J. Chen, M. C. Stuart, L. Hou e B. L. Feringa. “Amphiphilic molecular motors for responsive aggregation in water”. Em: *Journal of the American Chemical Society* 138.2 (2016), pp. 660–669.
- [6] S. Song, A. Song e J. Hao. “Self-assembled structures of amphiphiles regulated via implanting external stimuli”. Em: *RSC Advances* 4.79 (2014), pp. 41864–41875.
- [7] S. Chen, R. Costil, F. K.-C. Leung e B. L. Feringa. “Self-Assembly of Photoresponsive Molecular Amphiphiles in Aqueous Media”. Em: *Angewandte Chemie International Edition* 60.21 (2021), pp. 11604–11627.
- [8] Q. Zhao, Z. Lian, X. Gao, Y. Yan e J. Huang. “General approach to construct photoresponsive self-assembly in a light-inert amphiphilic system”. Em: *Langmuir* 32.45 (2016), pp. 11973–11979.
- [9] J.-J. Yu, Z.-Q. Cao, Q. Zhang, S. Yang, D.-H. Qu e H. Tian. “Photo-powered stretchable nano-containers based on well-defined vesicles formed by an overcrowded alkene switch”. Em: *Chemical Communications* 52.81 (2016), pp. 12056–12059.
- [10] X.-Y. Hu, K. Jia, Y. Cao, Y. Li, S. Qin, F. Zhou, C. Lin, D. Zhang e L. Wang. “Dual photo- and pH-responsive supramolecular nanocarriers based on water-soluble pillar[6]arene and different azobenzene derivatives for intracellular anticancer drug delivery”. Em: *Chemistry—A European Journal* 21.3 (2015), pp. 1208–1220.
- [11] X. Zhang e C. Wang. “Supramolecular amphiphiles”. Em: *Chemical Society Reviews* 40.1 (2011), pp. 94–101.
- [12] S. Guo, X. Liu, C. Yao, C. Lu, Q. Chen, X.-Y. Hu e L. Wang. “Photolysis of a bola-type supra-amphiphile promoted by water-soluble pillar[5]arene-induced assembly”. Em: *Chemical Communications* 52.71 (2016), pp. 10751–10754.

- [13] R. Zana. *Bolaform and dimeric (gemini) surfactants*. Springer, 1997.
- [14] D. P. Acharya, H. Kunieda, Y. Shiba e K.-i. Aratani. "Phase and rheological behavior of novel gemini-type surfactant systems". Em: *The Journal of Physical Chemistry B* 108.5 (2004), pp. 1790–1797.
- [15] *IUPAC Gold Book*. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/C01395>. Consultado a: 2021-10-30.
- [16] K. Nesměřák e I. Němcová. "Determination of critical micelle concentration by electrochemical means". Em: *Analytical Letters* 39.6 (2006), pp. 1023–1040.
- [17] D. R. Perinelli, M. Cespi, N. Lorusso, G. F. Palmieri, G. Bonacucina e P. Blasi. "Surfactant Self-Assembling and Critical Micelle Concentration: One Approach Fits All?" Em: *Langmuir* 36.21 (2020), pp. 5745–5753.
- [18] Y. Bakkour, V. Darcos, S. Li e J. Coudane. "Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) as a powerful tool for amphiphilic block copolymer characterization and for critical micelle concentration (CMC) determination". Em: *Polymer Chemistry* 3.8 (2012), pp. 2006–2010.
- [19] A. Domínguez, A. Fernández, N. González, E. Iglesias e L. Montenegro. "Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques". Em: *Journal of Chemical Education* 74.10 (1997), p. 1227.
- [20] S. Song, R. Dong, D. Wang, A. Song e J. Hao. "Temperature regulated supramolecular structures via modifying the balance of multiple non-covalent interactions". Em: *Soft Matter* 9.16 (2013), pp. 4209–4218.
- [21] T. Vu, P. Koenig, B. M. Cochran, K. Ananthapadmanabhan, M. Weaver, B. Reeder, H. D. Hutton e G. B. Kasting. "Thickening mechanisms for an amino acid-derived surfactant composition". Em: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 589 (2020), p. 124424.
- [22] H. Lu, C. Zheng, M. Xue e Z. Huang. "pH-regulated surface properties and pH-reversible micelle transition of a zwitterionic gemini surfactant in aqueous solution". Em: *Physical Chemistry Chemical Physics* 18.47 (2016), pp. 32192–32197.
- [23] S. Yagai, T. Karatsu e A. Kitamura. "Photocontrollable self-assembly". Em: *Chemistry—A European Journal* 11.14 (2005), pp. 4054–4063.
- [24] J. Volarić, W. Szymanski, N. A. Simeth e B. L. Feringa. "Molecular photoswitches in aqueous environments". Em: *Chemical Society Reviews* (2021).
- [25] Z. Wu, Q. Wang, P. Li, B. Fang e M. Yin. "Photochromism of neutral spiropyran in the crystalline state at room temperature". Em: *Journal of Materials Chemistry C* 9.19 (2021), pp. 6290–6296.
- [26] M. Colaço, P. Máximo, A. Jorge Parola e N. Basílio. "Photoresponsive Binding Dynamics in High-Affinity Cucurbit[8]uril-Dithienylethene Host-Guest Complexes". Em: *Chemistry—A European Journal* (2021).

- [27] C.-Y. Huang, A. Bonasera, L. Hristov, Y. Garmshausen, B. M. Schmidt, D. Jacquemin e S. Hecht. "N,N-disubstituted indigos as readily available red-light photoswitches with tunable thermal half-Lives". Em: *Journal of the American Chemical Society* 139.42 (2017), pp. 15205–15211.
- [28] N. Basílio, T. Garnier, J. Avó, M. Danel, S. Chassaing e F. Pina. "Synthesis and multistate characterization of bis-flavylium dications–symmetric resorcinol-and phloroglucinol-type derivatives as stochastic systems". Em: *RSC Advances* 6.74 (2016), pp. 69698–69707.
- [29] F. Pina, M. J. Melo, C. A. Laia, A. J. Parola e J. C. Lima. "Chemistry and applications of flavylium compounds: a handful of colours". Em: *Chemical Society Reviews* 41.2 (2012), pp. 869–908.
- [30] F. Pina, V. Petrov e C. A. Laia. "Photochromism of flavylium systems. An overview of a versatile multistate system". Em: *Dyes and Pigments* 92.2 (2012), pp. 877–889.
- [31] F. Pina, M. Maestri e V. Balzani. "Photochromic flavylium compounds as multistate/multifunction molecular-level systems". Em: *Chemical Communications* 2 (1999), pp. 107–114.
- [32] J. Mendoza, N. Basílio, V. de Freitas e F. Pina. "New procedure to calculate all equilibrium constants in flavylium compounds: Application to the copigmentation of anthocyanins". Em: *ACS Omega* 4.7 (2019), pp. 12058–12070.
- [33] N. Basílio e F. Pina. "Chemistry and photochemistry of anthocyanins and related compounds: a thermodynamic and kinetic approach". Em: *Molecules* 21.11 (2016), p. 1502.
- [34] R. A. McClelland e S. Gedge. "Hydration of the flavylium ion". Em: *Journal of the American Chemical Society* 102.18 (1980), pp. 5838–5848.
- [35] F. Pina. "Chemical applications of anthocyanins and related compounds. A source of bioinspiration". Em: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62.29 (2014), pp. 6885–6897.
- [36] N. Basílio e F. Pina. "Flavylium Network of Chemical Reactions in Confined Media: Modulation of 3, 4, 7-Trihydroxyflavylium Reactions by Host–Guest Interactions with Cucurbit [7] uril". Em: *ChemPhysChem* 15.11 (2014), pp. 2295–2302.
- [37] N. Basílio, A. J. Parola, D. Sousa, V. Petrov, L. Cruz, V. de Freitas e F. Pina. "Achieving Complexity at the Bottom: Molecular Metamorphosis Generated by Anthocyanins and Related Compounds". Em: *ACS Omega* (2021).
- [38] B. Yan, J.-C. Boyer, N. R. Branda e Y. Zhao. "Near-infrared light-triggered dissociation of block copolymer micelles using upconverting nanoparticles". Em: *Journal of the American Chemical Society* 133.49 (2011), pp. 19714–19717.
- [39] A. Wu, F. Lu, P. Sun, X. Gao, L. Shi e L. Zheng. "Photoresponsive self-assembly of surface active ionic liquid". Em: *Langmuir* 32.32 (2016), pp. 8163–8170.
- [40] N. Basílio e L. García-Río. "Photoswitchable vesicles". Em: *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 32 (2017), pp. 29–38.

- [41] J.-M. Lehn. "Supramolecular chemistry". Em: *Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Chemical Sciences)* 106.5 (1994), pp. 915–922.
- [42] *The Nobel Prize in Chemistry 1987*. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1987/summary/>. Consultado a: 2021-10-31.
- [43] C. J. Pedersen. "The discovery of crown ethers (Noble Lecture)". Em: *Angewandte Chemie* 27.8 (1988), pp. 1021–1027.
- [44] K. I. Assaf e W. M. Nau. "Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis". Em: *Chemical Society Reviews* 44.2 (2015), pp. 394–418.
- [45] H. Zhang e Y. Zhao. "Pillararene-based assemblies: Design principle, preparation and applications". Em: *Chemistry—A European Journal* 19.50 (2013), pp. 16862–16879.
- [46] S. Gadde, E. K. Batchelor, J. P. Weiss, Y. Ling e A. E. Kaifer. "Control of H- and J-aggregate formation via host-guest complexation using cucurbituril hosts". Em: *Journal of the American Chemical Society* 130.50 (2008), pp. 17114–17119.
- [47] M. Pessêgo, N. Basílio, J. A. Moreira e L. Garcia-Río. "Cucurbit[7]uril: Surfactant Host-Guest Complexes in Equilibrium with Micellar Aggregates". Em: *ChemPhysChem* 12.7 (2011), pp. 1342–1350.
- [48] A. J. Valente e O. Söderman. "The formation of host-guest complexes between surfactants and cyclodextrins". Em: *Advances in Colloid and Interface Science* 205 (2014), pp. 156–176.
- [49] Y. Wang, N. Ma, Z. Wang e X. Zhang. "Photocontrolled reversible supramolecular assemblies of an azobenzene-containing surfactant with α -cyclodextrin". Em: *Angewandte Chemie* 119.16 (2007), pp. 2881–2884.
- [50] Y. Yao, J. Li, J. Dai, X. Chi e M. Xue. "A water-soluble pillar[6]arene: synthesis, host-guest chemistry, controllable self-assembly, and application in controlled release". Em: *RSC Advances* 4.18 (2014), pp. 9039–9043.
- [51] Y. Xue, J. Mou, Y. Liu, X. Gong, Y. Yang e L. An. "An ab initio simulation of the UV/Visible spectra of substituted chalcones". Em: *Central European Journal of Chemistry* 8.4 (2010), pp. 928–936.
- [52] A. Seco, A. M. Diniz, J. Sarrato, H. Mourão, H. Cruz, A. J. Parola e N. Basílio. "A pseudorotaxane formed from a cucurbit[7]uril wheel and a bioinspired molecular axle with pH, light and redox-responsive properties". Em: *Pure and Applied Chemistry* 92.2 (2020), pp. 301–313.
- [53] R. Anastácio, A. Seco, P. Mateus, A. J. Parola e N. Basílio. "Exploring the pH-dependent kinetics, thermodynamics and photochemistry of a flavylum-based pseudorotaxane". Em: *Pure and Applied Chemistry* 93.11 (2021), pp. 1313–1325.
- [54] D. D. Pratt e R. Robinson. "A synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type". Em: *Journal of the Chemical Society, Transactions* 121 (1922), pp. 1577–1585.
- [55] D. Elias, M. Beazely e N. Kandepu. "Bioactivities of chalcones". Em: *Current Medicinal Chemistry* 6.12 (1999), p. 1125.

- [56] B. P. Chetana, S. Mahajan e A. K. Suvarna. "Chalcone: a versatile molecule". Em: *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 1.3 (2009), pp. 11–22.
- [57] N. Basílio e U. Pischel. "Drug delivery by controlling a supramolecular host–guest assembly with a reversible photoswitch". Em: *Chemistry–A European Journal* 22.43 (2016), pp. 15208–15211.
- [58] H. L. Nguyen, N. Kumar, J.-F. Audibert, R. Ghasemi, J.-P. Lefevre, M.-H. Ha-Thi, C. Mongin e I. Leray. "Water-soluble aluminium fluorescent sensor based on aggregation-induced emission enhancement". Em: *New Journal of Chemistry* 43.38 (2019), pp. 15302–15310.
- [59] F. Diederich, P. J. Stang e R. R. Tykwinski. *Modern Supramolecular Chemistry: Strategies for Macrocyclic Synthesis*. John Wiley & Sons, 2008.
- [60] D. B. G. Williams e M. Lawton. "Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants". Em: *The Journal of Organic Chemistry* 75.24 (2010), pp. 8351–8354.
- [61] W. C. Still, M. Kahn e A. Mitra. "Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution". Em: *The Journal of Organic Chemistry* 43.14 (1978), pp. 2923–2925.
- [62] W. A. Greenbank e K. M. McGrath. "Photophysical behaviour of 4-hexyloxysalicylaldehydes and their copper (II) complexes". Em: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 279 (2014), pp. 52–58.
- [63] K. J. Nakum, K. D. Katariya, R. Jadeja e A. Prajapati. "Schiff base of 4-n-alkoxy-2-hydroxy benzaldehyde with 4-amino acetophenone and their Cu(II) complexes: synthesis, characterization and mesomorphic behavior". Em: *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 690.1 (2019), pp. 1–13.
- [64] X. Song, H. Yu, X. Yan, Y. Zhang, Y. Miao, K. Ye e Y. Wang. "A luminescent benzothiadiazole-bridging bis (salicylaldehyde) zinc (II) complex with mechanochromic and organogelation properties". Em: *Dalton Transactions* 47.17 (2018), pp. 6146–6155.
- [65] S. K. Krishnammagari, K. T. Lim, B. G. Cho e Y. Tae Jeong. "Choline hydroxide: An efficient and biodegradable catalyst for the synthesis of 2-amino-3-nitro-4 H-chromene derivatives in an aqueous medium". Em: *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* 193.9 (2018), pp. 574–581.
- [66] L. Zakharkin, S. Sokolovskaya, L. Moldovanova e V. Guseva. "Novel liquid crystal compounds, derivatives of 2-pyrone". Em: *Russian Chemical Bulletin* 43.10 (1994), pp. 1698–1699.
- [67] M. Montalti, A. Credi, L. Prodi e T. Gandolfi. *Handbook of Photochemistry*. CRC Press, 2006.
- [68] T. D. Claridge. *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*. Vol. 27. Elsevier, 2016.
- [69] C. S. Johnson Jr. "Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications". Em: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 34.3-4 (1999), pp. 203–256.

- [70] C. Cho, J. Urquidi, S. Singh e G. W. Robinson. "Thermal offset viscosities of liquid H₂O, D₂O, and T₂O". Em: *The Journal of Physical Chemistry B* 103.11 (1999), pp. 1991–1994.
- [71] R. R. Kashapov, Y. S. Razuvayeva, A. Y. Ziganshina, R. K. Mukhitova, A. S. Sapunova, A. D. Voloshina e L. Y. Zakharova. "Self-assembling and Biological Properties of Single-chain Dicationic Pyridinium-based Surfactants". Em: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 175 (2019), pp. 351–357.
- [72] S. Yi e A. E. Kaifer. "Determination of the Purity of Cucurbit[n]uril (n= 7, 8) Host Samples". Em: *The Journal of Organic Chemistry* 76.24 (2011), pp. 10275–10278.
- [73] D. Lombardo, G. Munaò, P. Calandra, L. Pasqua e M. T. Caccamo. "Evidence of pre-micellar aggregates in aqueous solution of amphiphilic PDMS–PEO block copolymer". Em: *Physical Chemistry Chemical Physics* 21.22 (2019), pp. 11983–11991.
- [74] H. Zettl, Y. Portnoy, M. Gottlieb e G. Krausch. "Investigation of micelle formation by fluorescence correlation spectroscopy". Em: *The Journal of Physical Chemistry B* 109.27 (2005), pp. 13397–13401.
- [75] M. Kaszuba, D. McKnight, M. T. Connah, F. K. McNeil-Watson e U. Nobbmann. "Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering". Em: *Journal of nanoparticle research* 10.5 (2008), pp. 823–829.
- [76] N. Basílio, L. García-Río e M. Martin-Pastor. "NMR evidence of slow monomer-micelle exchange in a calixarene-based surfactant". Em: *The Journal of Physical Chemistry B* 114.14 (2010), pp. 4816–4820.
- [77] L. Garnier, C. Bonal e P. Malfreyt. "Thermodynamics of Supramolecular Associations with Macrocyclic Water-Soluble Hosts". Em: *ACS Omega* 4.16 (2019), pp. 16899–16905.
- [78] M. A. Romero, R. J. Fernandes, A. J. Moro, N. Basílio e U. Pischel. "Light-induced cargo release from a cucurbit[8]uril host by means of a sequential logic operation". Em: *Chemical Communications* 54.95 (2018), pp. 13335–13338.
- [79] P. Thordarson. "Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry". Em: *Chemical Society Reviews* 40.3 (2011), pp. 1305–1323.
- [80] R. Evans, G. Dal Poggetto, M. Nilsson e G. A. Morris. "Improving the interpretation of small molecule diffusion coefficients". Em: *Analytical Chemistry* 90.6 (2018), pp. 3987–3994.
- [81] D.-m. Song, K.-h. Jung, J.-h. Moon e D.-m. Shin. "Photochemistry of chalcone and the application of chalcone-derivatives in photo-alignment layer of liquid crystal display". Em: *Optical Materials* 21.1-3 (2003), pp. 667–671.
- [82] S. Poplata, A. Trøster, Y.-Q. Zou e T. Bach. "Recent advances in the synthesis of cyclobutanes by olefin [2+2] photocycloaddition reactions". Em: *Chemical Reviews* 116.17 (2016), pp. 9748–9815.
- [83] D.-M. Shin, D.-M. Song, K.-H. Jung e J.-H. Moon. "Photochemical transformation of chalcone derivatives". Em: *Journal of Photoscience* 8.1 (2001), pp. 9–12.

- [84] E. V. Ansly e D. A. Dougherty. *Modern Physical Organic Chemistry*. University Science Books, 2006.
- [85] P. Dalvand, K. N. Nono, D. Shetty, F. Benyettou, Z. Asfari, C. Platas-Iglesias, M. A. Olson, A. Trabolsi e M. Elhabiri. "Viologen–cucurbituril host/guest chemistry–redox control of dimerization versus inclusion". Em: *RSC Advances* 11.47 (2021), pp. 29543–29554.
- [86] N. Basílio, S. Gago, A. J. Parola e F. Pina. "Contrasting pKa Shifts in Cucurbit[7]uril Host-Guest Complexes Governed by an Interplay of Hydrophobic Effects and Electrostatic Interactions". Em: *ACS Omega* 2.1 (2017), pp. 70–75.
- [87] I. Ghosh e W. M. Nau. "The strategic use of supramolecular pKa shifts to enhance the bioavailability of drugs". Em: *Advanced Drug Delivery Reviews* 64.9 (2012), pp. 764–783.
- [88] H. Tang, D. Fuentealba, Y. H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim e C. Bohne. "Guest binding dynamics with cucurbit[7]uril in the presence of cations". Em: *Journal of the American Chemical Society* 133.50 (2011), pp. 20623–20633.
- [89] S. S. Thomas, H. Tang e C. Bohne. "Noninnocent Role of Na⁺ Ions in the Binding of the N-Phenyl-2-naphthylammonium Cation as a Ditopic Guest with Cucurbit[7]uril". Em: *Journal of the American Chemical Society* 141.24 (2019), pp. 9645–9654.
- [90] S. Zhang, L. Grimm, Z. Miskolczy, L. Biczók, F. Biedermann e W. M. Nau. "Binding affinities of cucurbit[n]urils with cations". Em: *Chemical Communications* 55.94 (2019), pp. 14131–14134.
- [91] P. Atkins e J. de Paula. *Physical Chemistry*. Oxford University Press, 2006.

A | Espectros de RMN e Cromatogramas

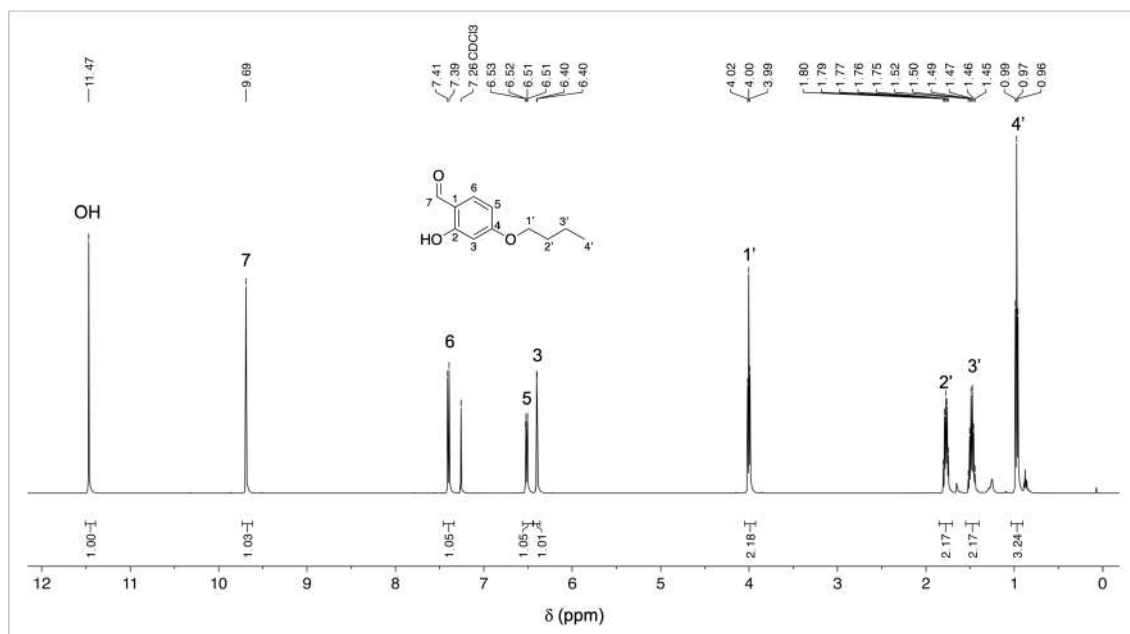


Figura A.1: Espectro de ^1H RMN do composto 1Al em CDCl_3 .

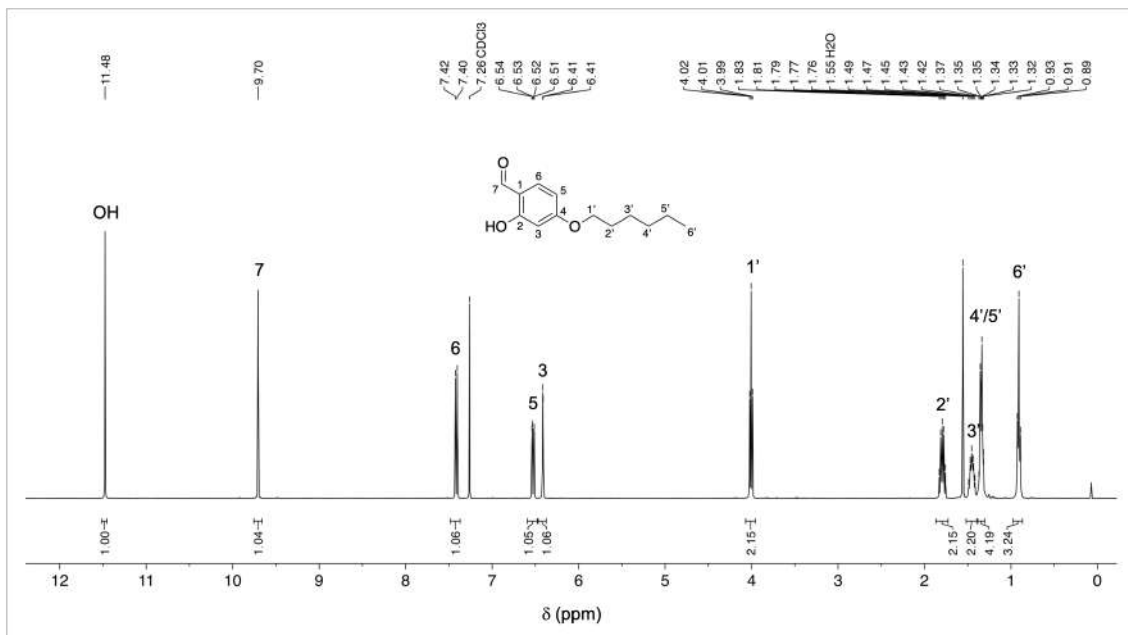


Figura A.2: Espectro de ^1H RMN do composto **2Al** em CDCl_3 .

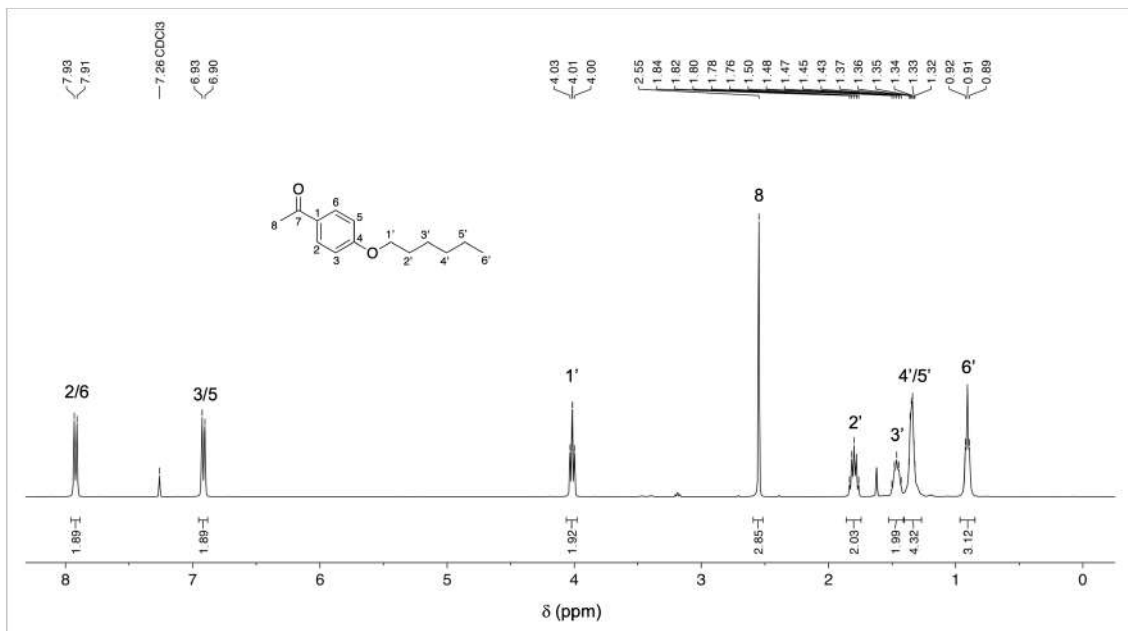


Figura A.3: Espectro de ^1H RMN do composto **1Ac** em CDCl_3 .

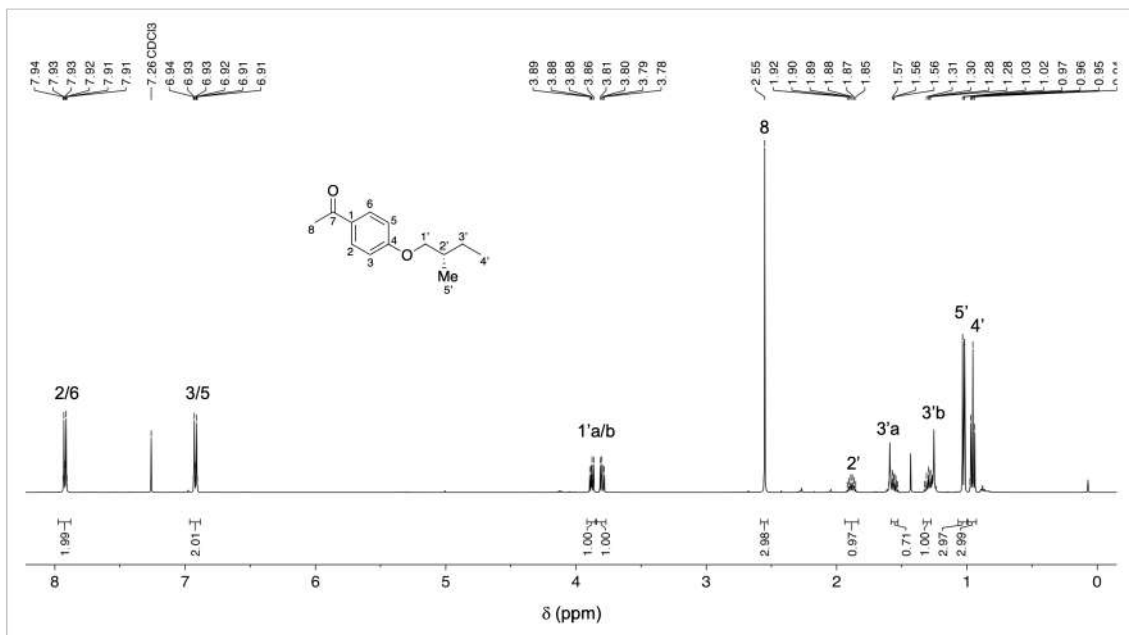


Figura A.4: Espetro de ¹H RMN do composto 2Ac em CDCl₃.

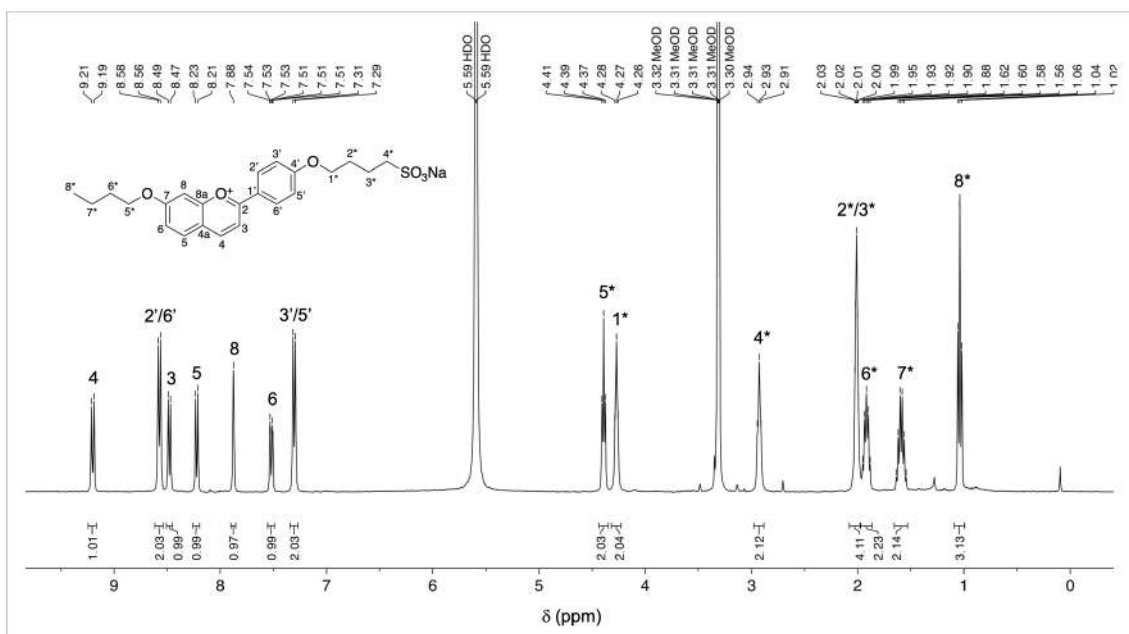


Figura A.5: Espetro de ¹H RMN do composto 1AH⁺ em CD₃OD.

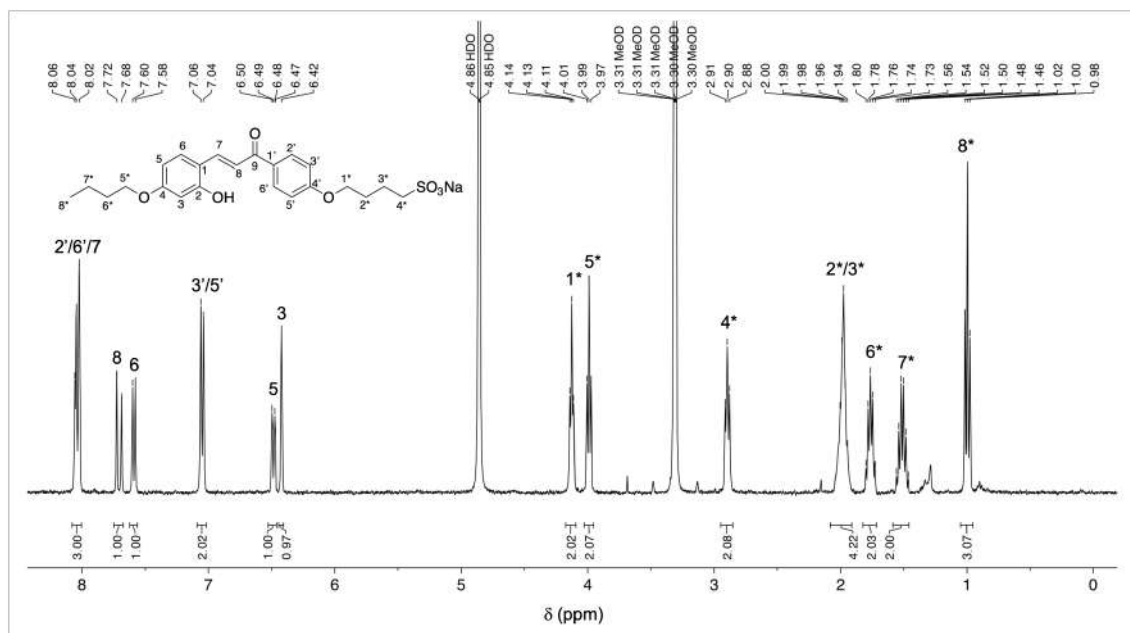


Figura A.6: Espectro de ^1H RMN do composto **1Ct** em CD_3OD .

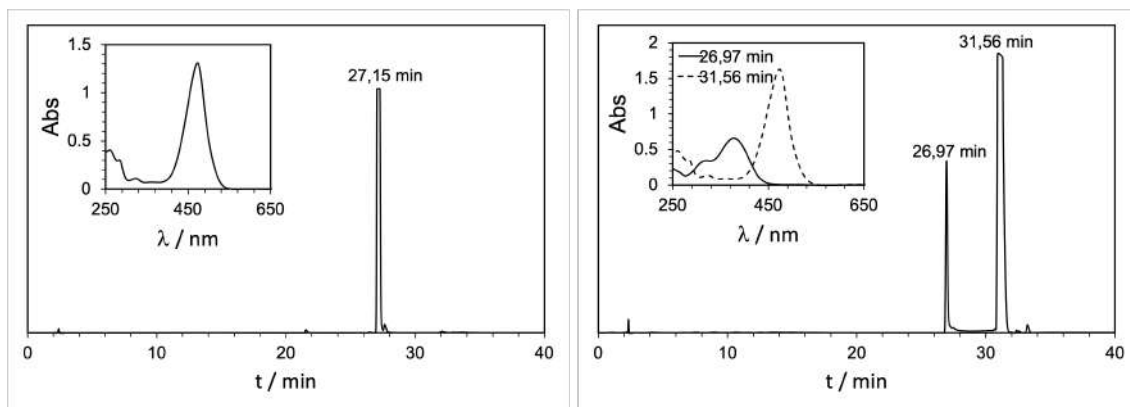


Figura A.7: Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD do composto **1AH⁺** (à esquerda) e **1Ct** (à direita). Em *inset* apresentam-se os espectros de absorção correspondentes aos picos cromatográficos detetados.

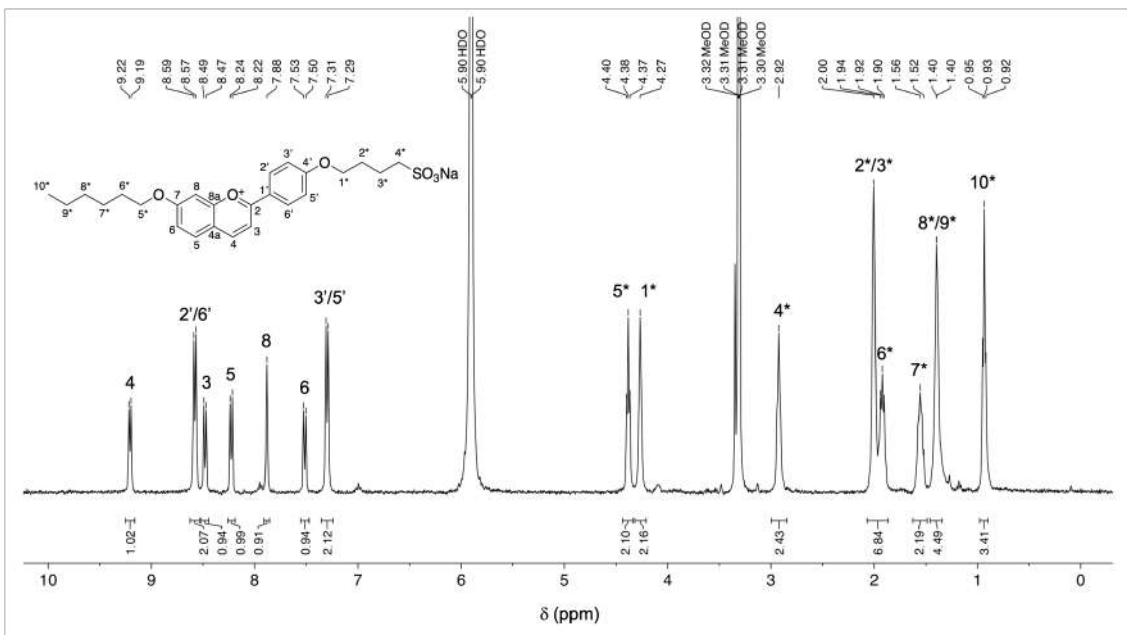


Figura A.8: Espectro de ¹H RMN do composto 2AH⁺ em CD₃OD.

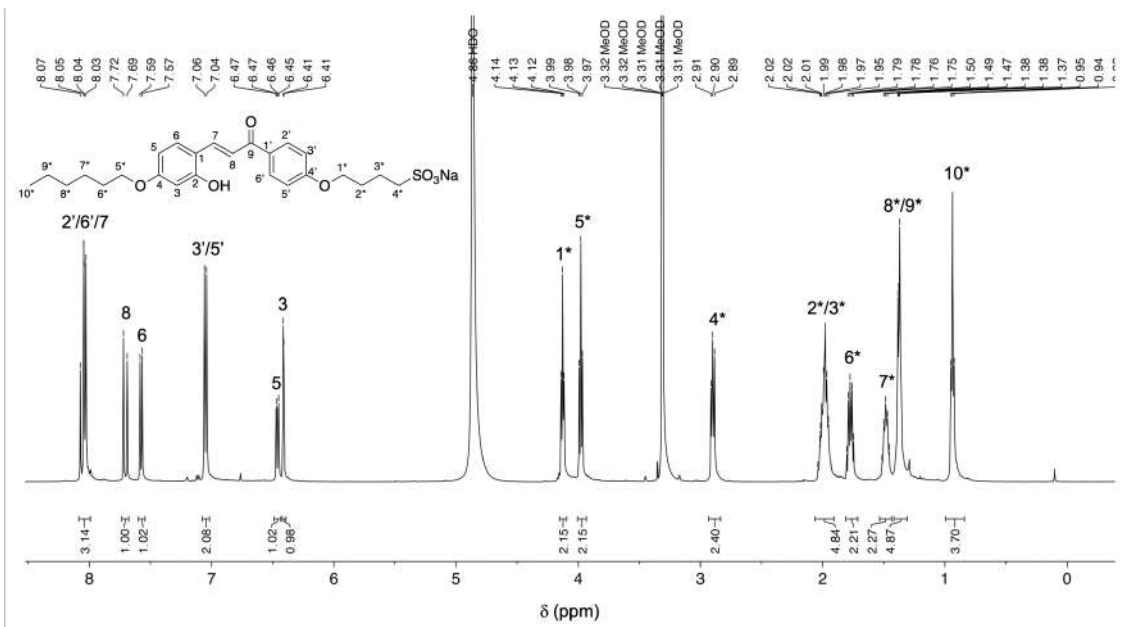


Figura A.9: Espectro de ¹H RMN do composto 2Ct em CD₃OD.

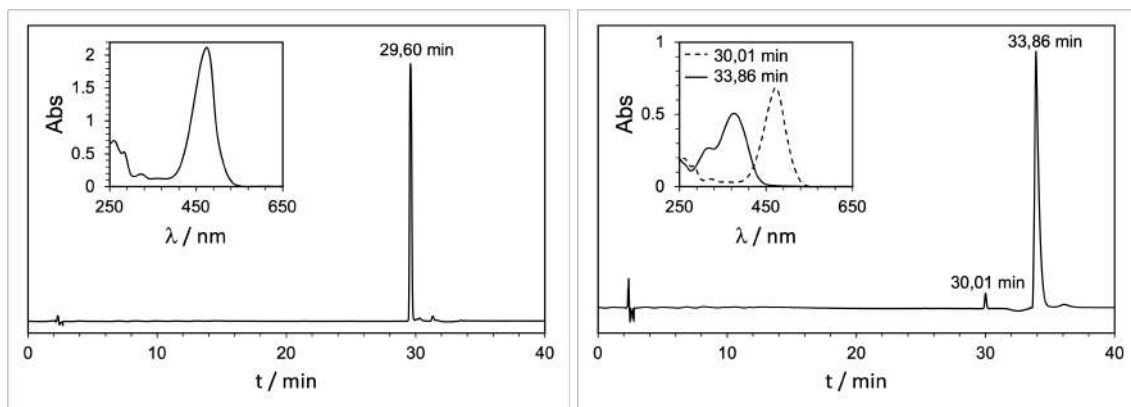


Figura A.10: Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD do composto 2AH^+ (à esquerda) e 2Ct (à direita). Em *inset* apresentam-se os espectros de absorção correspondentes aos picos cromatográficos detetados.

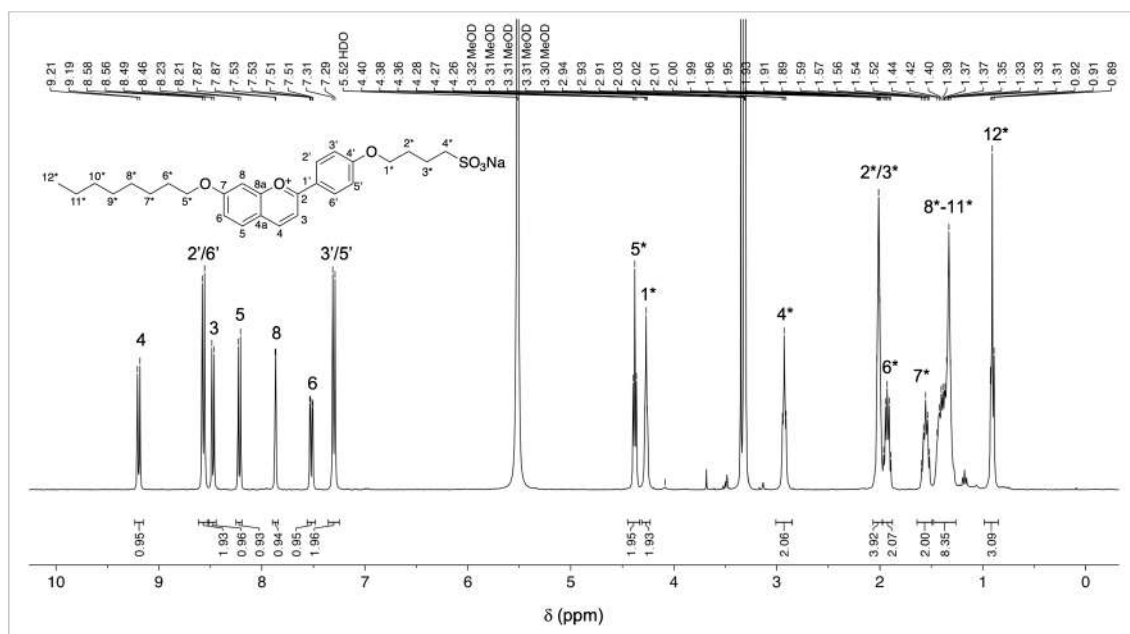


Figura A.11: Espectro de ^1H RMN do composto 3AH^+ em CD_3OD .

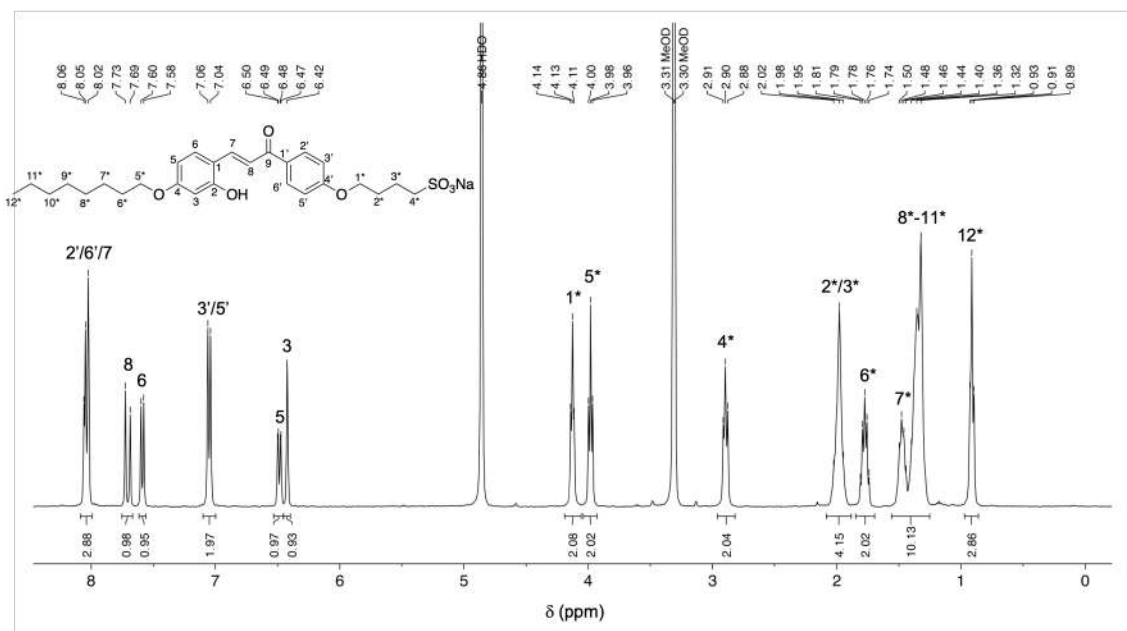


Figura A.12: Espectro de ^1H RMN do composto 3Ct em CD_3OD .

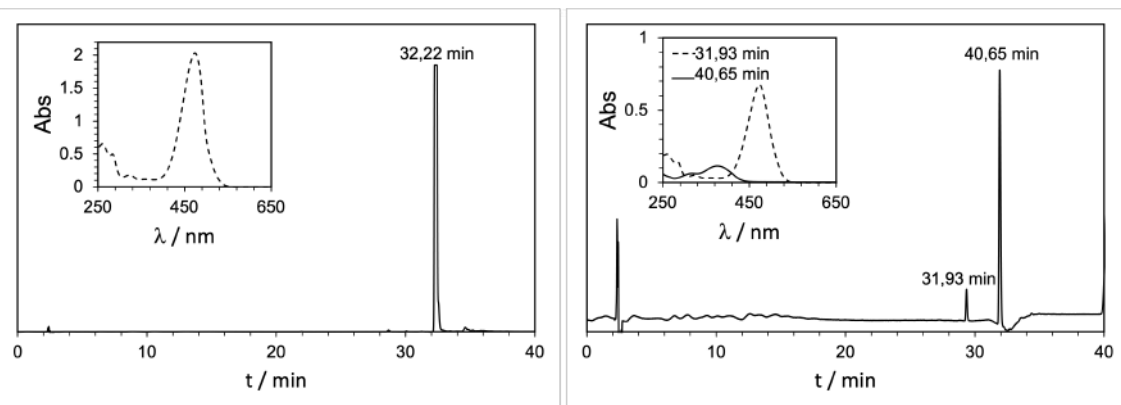


Figura A.13: Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD do composto 3AH⁺ (à esquerda) e 3Ct (à direita). Em *inset* apresentam-se os espectros de absorção correspondentes aos picos cromatográficos detetados.

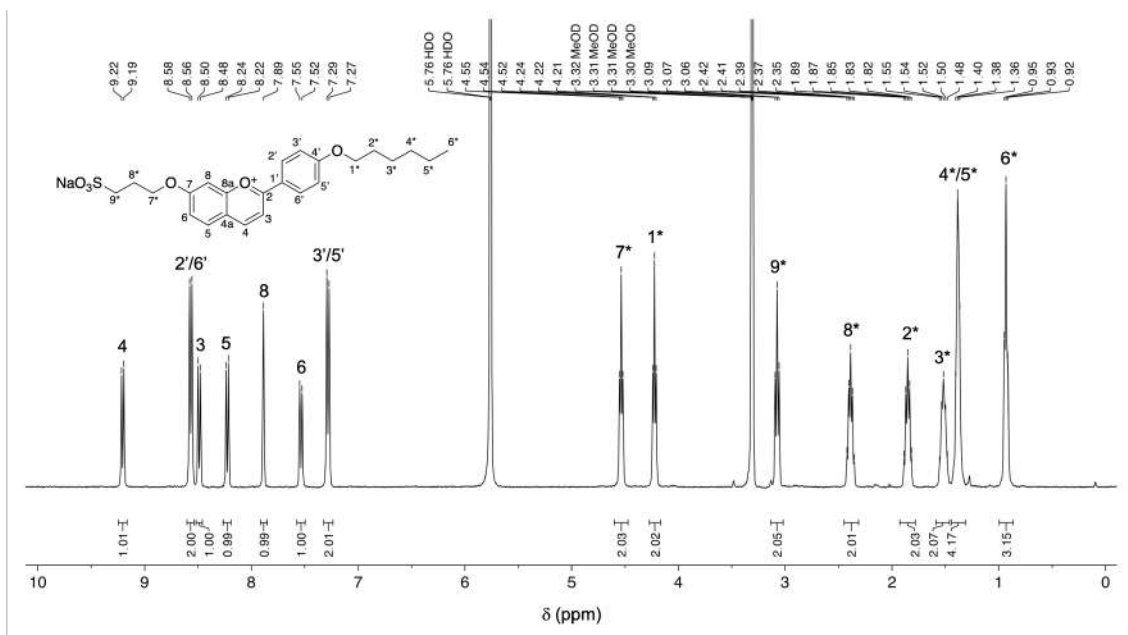


Figura A.14: Espectro de ¹H RMN do composto 4AH⁺ em CD₃OD.

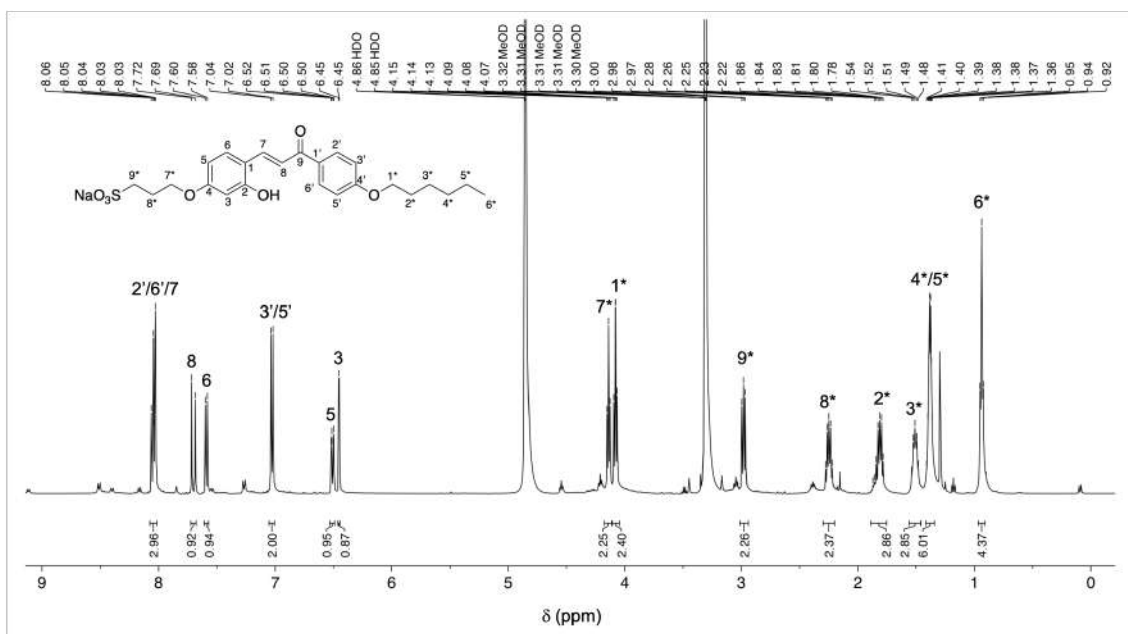


Figura A.15: Espectro de ¹H RMN do composto 4Ct em CD₃OD.

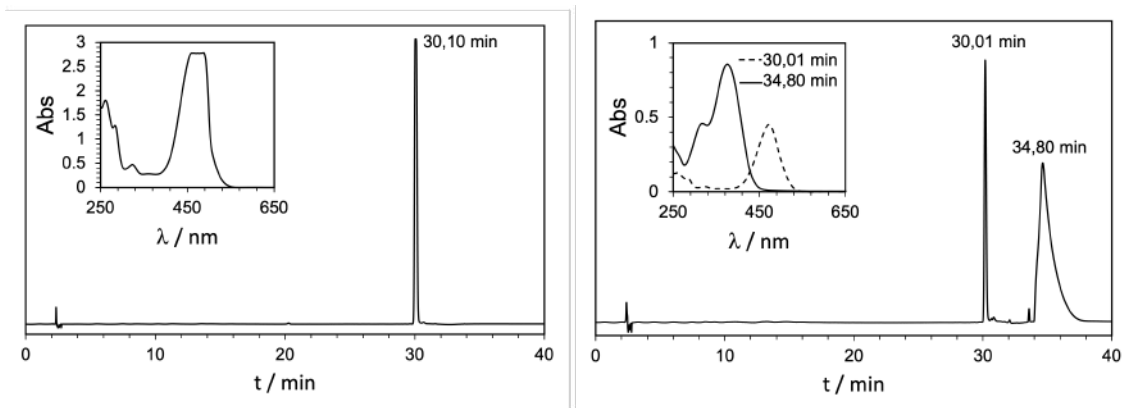


Figura A.16: Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD do composto 4AH^+ (à esquerda) e 4Ct (à direita). Em *inset* apresentam-se os espectros de absorção correspondentes aos picos cromatográficos detetados.

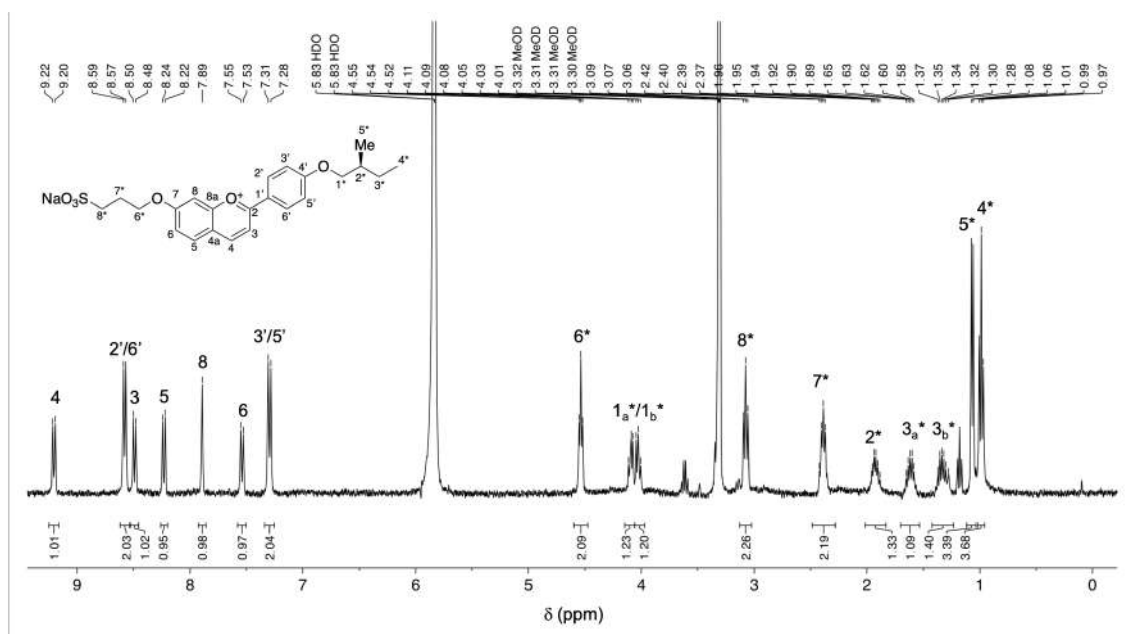


Figura A.17: Espectro de ^1H RMN do composto 5AH^+ em CD_3OD .

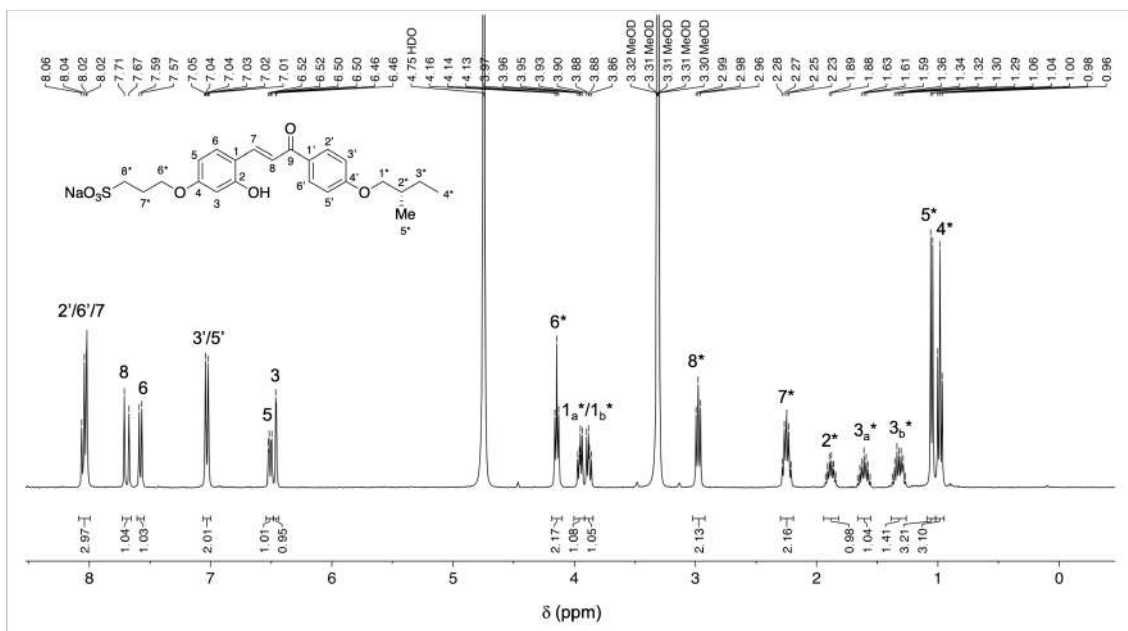


Figura A.18: Espectro de ^1H RMN do composto 5Ct em CD_3OD .

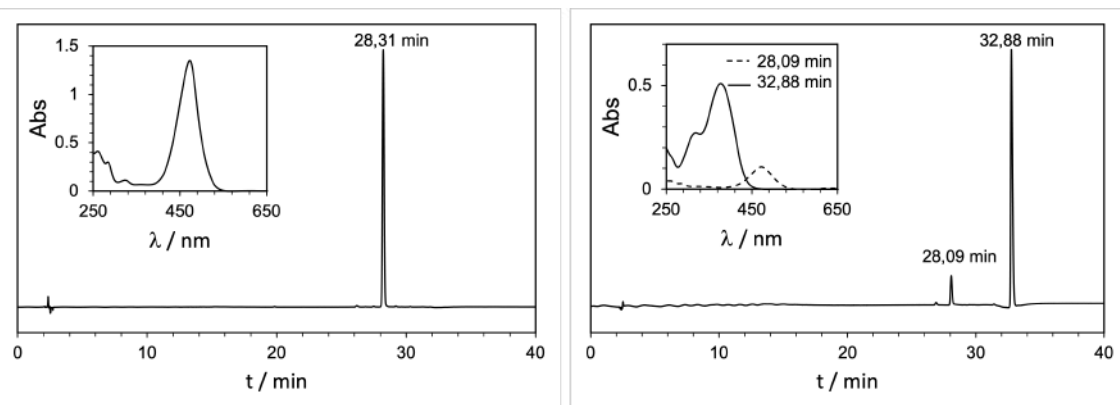


Figura A.19: Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD do composto 5AH⁺ (à esquerda) e 5Ct (à direita). Em *inset* apresentam-se os espectros de absorção correspondentes aos picos cromatográficos detetados.

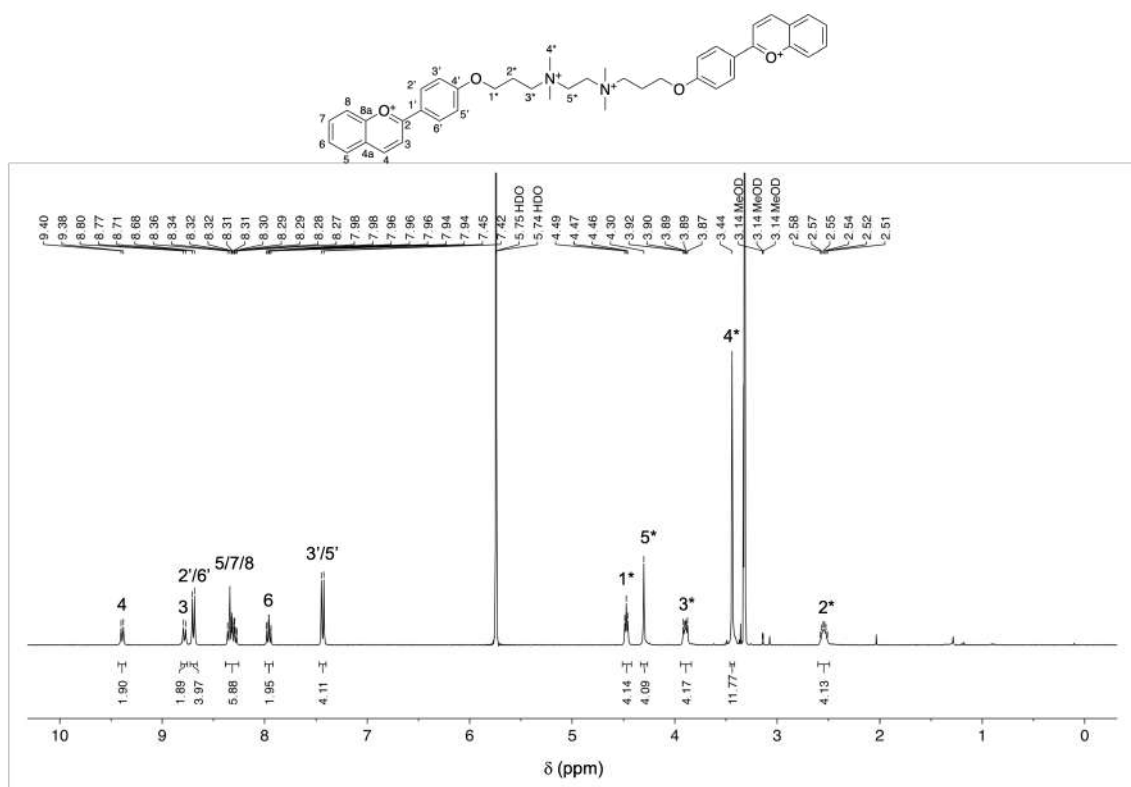


Figura A.20: Espectro de ^1H RMN do composto 6AH^+ em CD_3OD .

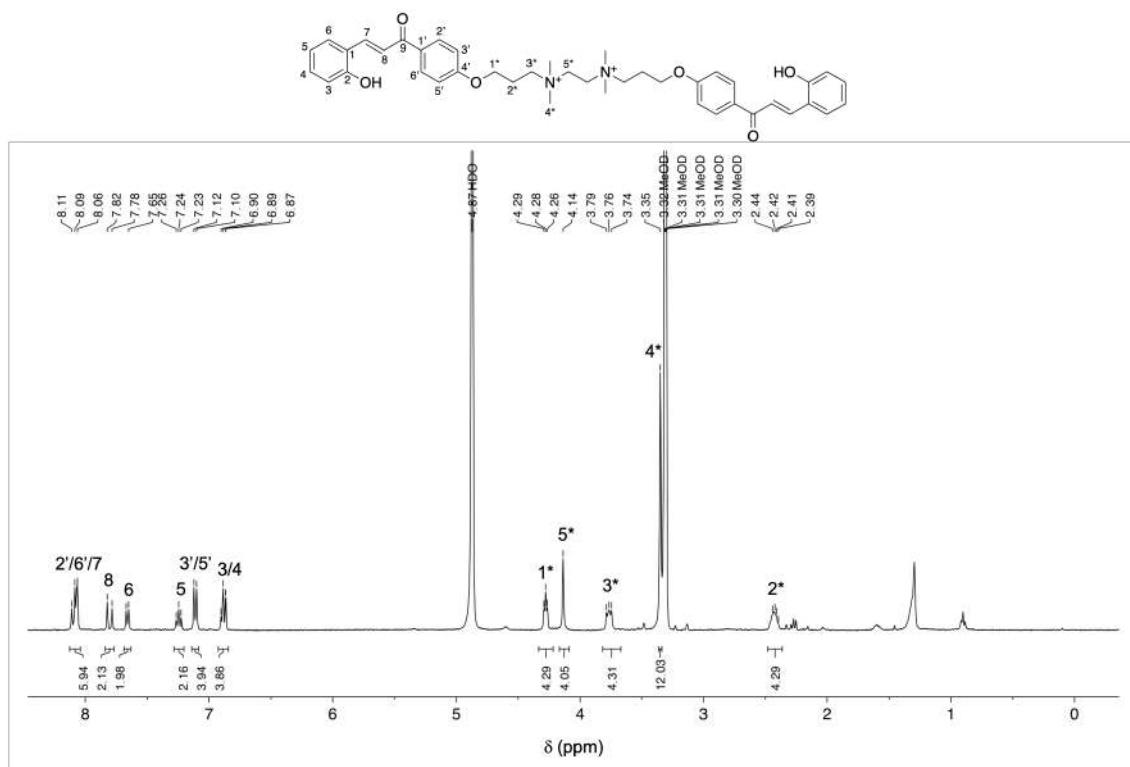


Figura A.21: Espectro de ^1H RMN do composto 6Ct em CD_3OD .

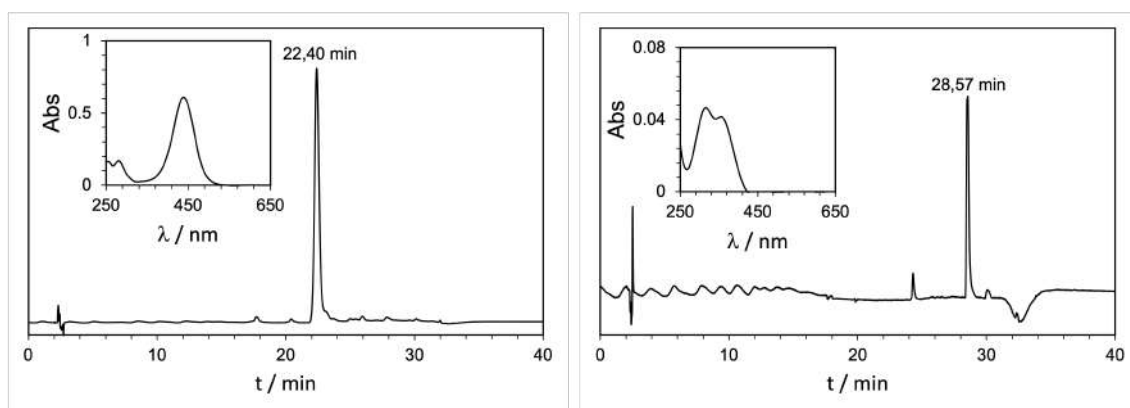


Figura A.22: Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD do composto 6AH⁺ (à esquerda) e 6Ct (à direita). Em *inset* apresentam-se os espectros de absorção correspondentes aos picos cromatográficos detetados.

B | O Sistema Multiestado

Tal como já foi descrito no Capítulo 1, o sistema multiestado compreende a existência de várias espécies que se interconvertem entre si por meio de reações reversíveis, através de estímulos externos como a luz ou o pH. No âmbito desta tese, nenhum dos compostos estudados inclui a existência de base quinoidal nem de chalconas ionizadas, resumindo-se o sistema às estruturas apresentadas na Figura B.1. No composto 7, detetou-se a presença da espécie B₄, resultante da hidratação do catião flavílio na posição 4, mas tal não será considerado no âmbito deste trabalho.

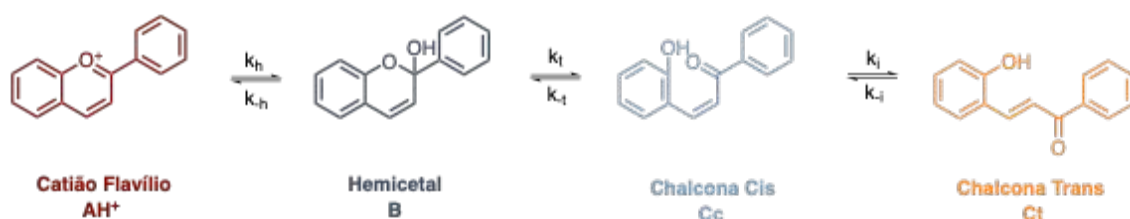


Figura B.1: Cascata de reações associadas ao sistema multiestado.

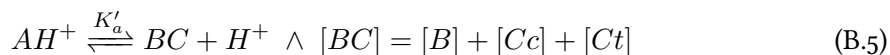
B.o.1 Determinação de pK'_a

O estudo completo deste tipo de sistemas inclui a investigação do comportamento termodinâmico e cinético, o que compreende a determinação experimental de todas as constantes de equilíbrio e de velocidade envolvidas (Equações B.1 a B.4).



$$K_n = \frac{k_n}{k_{-n}} \wedge n = h, t, i \quad (\text{B.4})$$

Apesar da complexidade inerente ao sistema multiestado, é possível simplificá-lo ao considerar que se estabelece um equilíbrio ácido-base entre o catião flavílio e uma base conjugada, BC, definida pela soma de todas as espécies existentes em meio básico (Equação B.5).



A constante de acidez aparente, K'_a , é definida conforme apresentado na Equação B.6.

$$K'_a = \frac{([B] + [Cc] + [Ct])[H^+]}{[AH^+]} = \frac{[BC][H^+]}{[AH^+]} \quad (\text{B.6})$$

Considerando que as únicas espécies presentes em solução são o catião flavílio e a respetiva base conjugada, e ainda a igualdade estabelecida na Equação B.6, é possível estabelecer o seguinte balanço de massas:

$$C_0 = [AH^+] + [B] + [Cc] + [Ct] = [AH^+] + [BC] = [AH^+] + \frac{K'_a[AH^+]}{[H^+]} \quad (\text{B.7})$$

As frações molares de AH^+ e BC em solução são então definidas pelas Equações B.8 e B.9, respetivamente.

$$\chi_{AH^+} = \frac{[AH^+]}{C_0} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K'_a} \quad (\text{B.8})$$

$$\chi_{BC} = \frac{[BC]}{C_0} = \frac{[K'_a]}{[H^+] + K'_a} \quad (\text{B.9})$$

Caso se pretendam calcular as frações molares das espécies B , Cc e Ct individualmente, basta considerar as igualdades estabelecidas nas Equações B.4 e B.6, obtendo-se a seguinte expressão:

$$K'_a = K_h + K_h K_t + K_h K_t K_i \quad (\text{B.10})$$

Sabendo-se que a concentração total (C_0) é dada pelo estabelecido na Equação B.7, ao colocar a concentração de B , Cc ou Ct em evidência, obtêm-se as seguintes expressões para os cálculos das respetivas frações molares:

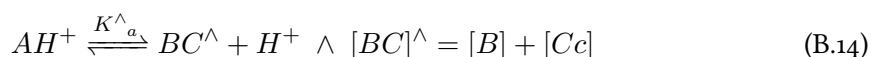
$$\chi_B = \frac{K_h}{[H^+] + K'_a} \quad (\text{B.11})$$

$$\chi_{Cc} = \frac{K_h K_t}{[H^+] + K'_a} \quad (\text{B.12})$$

$$\chi_{Ct} = \frac{K_h K_t K_i}{[H^+] + K'_a} \quad (\text{B.13})$$

B.o.2 O Pseudo-Equilíbrio

Em alguns sistemas, uma vez que as constantes de velocidade das reações de hidratação e de tautomerização são bastante superiores à de isomerização, é possível observar a existência de um estado meta-estável (pseudo-equilíbrio), no qual o catião flavílio equilibra com o hemiacetal e a chalcona *cis*, antes de se formar chalcona *trans* numa quantidade significativa (Equação B.14). Assim, pode calcular-se a constante de acidez aparente, K_a^\wedge , conforme descrito na Equação B.15. [29–33, 35, 53]



$$K_a^\wedge = \frac{([B] + [Cc])[H^+]}{[AH^+]} = \frac{[BC]^\wedge}{[AH^+]} = K_h + K_h K_t \quad (B.15)$$

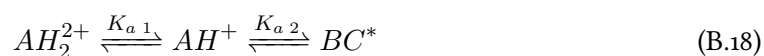
Efetuando um raciocínio semelhante ao que se fez anteriormente, é possível obter as frações molares de AH^+ e BC^\wedge (Equações B.16 e B.17).

$$\chi_{AH^+} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a^\wedge} \quad (B.16)$$

$$\chi_{BC^\wedge} = \frac{[K_a^\wedge]}{[H^+] + K_a^\wedge} \quad (B.17)$$

B.o.3 O Sistema Bis

No caso particular do sistema $6AH^+ - Ct$, por conter duas unidades de $AH^+ - Ct$, deve ser considerado como um diácido (AH_2^{2+}) que origina sucessivamente as espécies AH^+ e BC^* , sendo esta última equivalente a BC ou BC^\wedge , consoante se considere a existência de Ct ou não, respetivamente (Equação B.18).



Separando as transformações em dois equilíbrios distintos, é possível definir as constantes de acidez K'_{a1} e K'_{a2} (Equações B.19 e B.20).

$$AH_2^{2+} \xrightleftharpoons{K'_{a1}} AH^+ + H^+ \quad \wedge \quad K'_{a1} = \frac{[AH^+][H^+]}{[AH_2^{2+}]} \quad (B.19)$$

$$AH^+ \xrightleftharpoons{K'_{a2}} BC^* + H^+ \quad \wedge \quad K'_{a2} = \frac{[BC^*][H^+]}{[AH^+]} \quad (B.20)$$

A concentração total de espécies em solução é dada pela expressão apresentada na Equação B.21.

$$C_0 = [AH_2^{2+}] + [AH^+] + [BC^*] \quad (B.21)$$

Conjugando as Equações B.19 a B.21, obtêm-se as frações molares das espécies AH_2^{2+} , AH^+ e BC^* (Equações B.22 a B.24).

$$\chi_{AH_2^{2+}} = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + K_{a1}[H^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (\text{B.22})$$

$$\chi_{AH^+} = \frac{K_{a1}[H^+]}{[H^+]^2 + K_{a1}[H^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (\text{B.23})$$

$$\chi_{BC^*} = \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2 + K_{a1}[H^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (\text{B.24})$$

B.o.4 Ajuste dos Dados Experimentais

No âmbito deste trabalho, recorreu-se à espectroscopia de absorção UV-Vis para determinar os valores das constantes de acidez. De acordo com a Lei de Lambert-Beer, a absorvância é uma propriedade aditiva, o que significa que, a um determinado comprimento de onda, a absorvância total corresponde à soma das absorvâncias das espécies presentes em solução ponderadas pelas respetivas frações molares (Equação B.25).[91]

$$\begin{aligned} Abs_{total}^{\lambda} &= Abs_{AH^+}^{\lambda} + Abs_{BC}^{\lambda} = \epsilon_{AH^+}^{\lambda}[AH^+] + \epsilon_{BC}^{\lambda}[BC] = \epsilon_{AH^+}^{\lambda} \frac{\chi_{AH^+}}{C_0} + \epsilon_{BC}^{\lambda} \frac{\chi_{BC}}{C_0} = \\ &= Abs_{máx}^{\lambda}{}_{AH^+} \times \chi_{AH^+} + Abs_{máx}^{\lambda}{}_{BC} \times \chi_{BC} \end{aligned} \quad (\text{B.25})$$

Conjugando as Equações B.8, B.9 e B.25, obtém-se a seguinte igualdade:

$$Abs_{total}^{\lambda} = Abs_{máx}^{\lambda}{}_{AH^+} \times \frac{[H^+]}{[H^+] + K'_a} + Abs_{máx}^{\lambda}{}_{BC} \times \frac{K'_a}{[H^+] + K'_a} \quad (\text{B.26})$$

Desta forma, usando a ferramenta Solver, disponível no Microsoft Office Excel, é possível calcular a constante de acidez aparente por métodos iterativos, em que se alteram as absorvâncias máximas de AH^+ e BC aos comprimentos de onda considerados, bem como o valor de pK'_a . Para calcular o $pK^{\wedge}a$, é feito um procedimento análogo, considerando BC^{\wedge} em vez de BC . No caso particular do sistema $6AH^+ - Ct$, considera-se ainda a contribuição da espécie AH_2^{2+} .

C | Modelos Recetor-Substrato

No presente Apêndice, reúnem-se as deduções matemáticas que permitem calcular as constantes de associação entre um determinado recetor (macrociclo) e um substrato. As associações formadas poderão ter estequiometrias variadas, considerando-se neste trabalho as associações 1:1, 1:2 e 2:1 (Figura C.1).

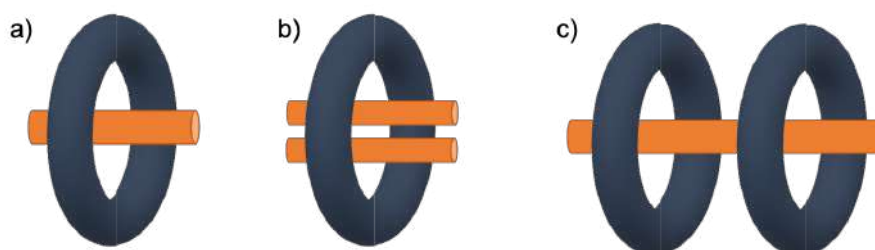


Figura C.1: Esquema ilustrativo do substrato (cor de laranja) associado ao recetor (azul escuro) em associações com estequiometria a) 1:1, b) 1:2 e c) 2:1.

C.1 Complexos 1:1

As associações mais simples apresentam uma estequiometria de 1:1, o que significa que ocorre a ligação entre uma molécula de recetor (R) e uma de substrato (S), formando-se a associação RS .



A constante de equilíbrio ($K_{1:1}$) deste sistema define-se então através da seguinte expressão:

$$K_{1:1} = \frac{[RS]}{[R][S]} \quad (\text{C.2})$$

Considerando que tanto o substrato como o recetor apenas se encontram livres ou associados um ao outro em solução, é possível estabelecer os seguintes balanços de massa:

$$[R]_0 = [R] + [RS] \quad (\text{C.3})$$

$$[S]_0 = [S] + [RS] \quad (\text{C.4})$$

Combinando as Equações C.2 e C.3, obtém-se a expressão que permite calcular a concentração de recetor, a partir da concentração inicial de recetor, da concentração de substrato e da constante de associação:

$$[R] = \frac{[R]_0}{1 + K_{1:1}[S]} \quad (\text{C.5})$$

A concentração de substrato livre calcula-se a partir da resolução de uma equação quadrática, cuja expressão se obtém através das Equações C.2, C.4 e C.5.

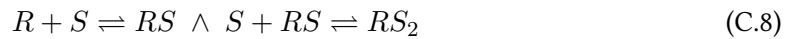
$$[S] = \frac{K_{1:1}[S]_0 - K_{1:1}[R]_0 - 1 + \sqrt{(K_{1:1}[R]_0 - K_{1:1}[S]_0 + 1)^2 + 4K_{1:1}[R]_0}}{2K_{1:1}} \quad (\text{C.6})$$

A concentração da associação supramolecular é obtida através da concentração de substrato e recetor, de acordo com a Equação C.7.

$$[RS] = K_{1:1}[R][S] \quad (\text{C.7})$$

C.2 Complexos 1:2

Neste trabalho, observou-se também a formação de associações com estequiometria 1:2, o que significa que uma molécula de recetor interage com duas moléculas de substrato, obtendo-se a associação RS_2 (Equação C.8).



Analogamente ao caso anterior, apresentam-se as expressões que permitem calcular as constantes de associação $K_{1:1}$ e $K_{1:2}$, a concentração de associação RS e RS_2 e ainda os balanços de massa (Equações C.9 a C.13).

$$K_{1:1} = \frac{[RS]}{[R][S]} \quad \wedge \quad K_{1:2} = \frac{[RS_2]}{[RS][S]} \quad (\text{C.9})$$

$$[RS] = K_{1:1}[R][S] \quad (\text{C.10})$$

$$[RS_2] = K_{1:1}K_{1:2}[S]^2[R] \quad (\text{C.11})$$

$$[R]_0 = [R] + [RS] + [RS_2] \quad (\text{C.12})$$

$$[S]_0 = [S] + [RS] + 2[RS_2] \quad (\text{C.13})$$

Através da combinação das Equações C.9 e C.12, obtém-se a expressão que permite calcular a concentração de recetor livre.

$$[R] = \frac{[R]_0}{1 + K_{1:1}[S] + K_{1:1}K_{1:2}[S]^2} \quad (\text{C.14})$$

A expressão que permite calcular a concentração de substrato livre obtém-se a partir das Equações C.9, C.13 e C.14 (Equação C.15).

$$K_{1:1}K_{1:2}[S]^3 + (K_{1:1} + 2K_{1:1}K_{1:2}[R]_0 - K_{1:1}K_{1:2}[S]_0)[S]^2 + (1 + K_{1:1}[R]_0 - K_{1:1}[S]_0)[S] - [S]_0 = 0 \quad (\text{C.15})$$

Tratando-se de uma equação polinomial de terceiro grau, poderão obter-se as respetivas soluções utilizando o método iterativo de Newton-Rapson (Equação C.16).

$$G_{N+1} = G_N - \frac{f(G_N)}{f'(G_N)} \quad (\text{C.16})$$

C.3 Complexos 2:1

Inversamente ao caso anterior, pode observar-se a formação de associações 2:1, ou seja, duas unidades de recetor associam-se apenas a uma molécula de substrato, como se verificou no composto 6. Uma vez que matematicamente os dois casos se assemelham bastante (1:2 e 2:1), omitiram-se os balanços de massa da presente dedução e obtiveram-se as seguintes igualdades:

$$R + S \rightleftharpoons RS \quad \wedge \quad R + RS \rightleftharpoons R_2S \quad (\text{C.17})$$

$$K_{1:1} = \frac{[RS]}{[R][S]} \quad \wedge \quad K_{2:1} = \frac{[R_2S]}{[RS][R]} \quad (\text{C.18})$$

$$[RS] = K_{1:1}[R][S] \quad (\text{C.19})$$

$$[R_2S] = K_{2:1}K_{1:1}[R]^2[S] \quad (\text{C.20})$$

$$[S] = \frac{[S]_0}{1 + K_{1:1}[R] + K_{1:1}K_{2:1}[R]^2} \quad (\text{C.21})$$

De um modo análogo ao que foi descrito na Secção anterior, obteve-se uma equação cúbica que permite determinar a concentração de recetor livre (Equação C.22).

$$K_{1:1}K_{2:1}[R]^3 + (K_{1:1} + 2K_{1:1}K_{2:1}[S]_0 - K_{1:1}K_{2:1}[R]_0)[R]^2 + (1 + K_{1:1}[S]_0 - K_{1:1}[R]_0)[R] - [R]_0 = 0 \quad (\text{C.22})$$

C.4 Titulações por Competição

Quando o produto entre a constante de associação e a concentração inicial de substrato é superior a 100 ($K[S]_0 > 100$), a fraca curvatura que se obtém não permite determinar com rigor a constante de associação. Nestes casos, realizam-se titulações por competição, utilizando-se um segundo substrato que se associa ao mesmo recetor, conforme explicitado no Capítulo 2.[79] Inicia-se a titulação com a associação RS formada e efetuam-se adições sucessivas de competidor (C) cuja constante de associação se conhece com rigor, obtendo-se no final a associação RC e substrato livre (S) (Equação C.23).



Separando os dois sistemas e considerando que tanto o substrato em estudo como o competidor se ligam ao recetor seguindo um modelo 1:1, é possível estabelecer as seguintes igualdades:

$$R + S \xrightleftharpoons{K_S} RS \wedge K_S = \frac{[RS]}{[R][S]} \quad (\text{C.24})$$

$$R + C \xrightleftharpoons{K_C} RC \wedge K_C = \frac{[RC]}{[R][C]} \quad (\text{C.25})$$

Os balanços de massa para o substrato, competidor e recetor apresentam-se nas Equações C.26 a C.28.

$$[S]_0 = [S] + [RS] \quad (\text{C.26})$$

$$[C]_0 = [C] + [RC] \quad (\text{C.27})$$

$$[R]_0 = [R] + [RS] + [RC] \quad (\text{C.28})$$

Sendo o objetivo obter uma expressão matemática que permita calcular $[R]$ em função das constantes K_S e K_C e das concentrações iniciais de S , C e R , utilizam-se as igualdades estabelecidas nas Equações C.24 e C.25 para substituir os termos $[RS]$ e $[RC]$ na Equação C.28.

$$[R]_0 = [R] + K_S[R][S] + K_C[R][C] \quad (\text{C.29})$$

Para substituir os termos $[S]$ e $[C]$ da Equação anterior, combinam-se as Equações C.24 a C.27, obtendo-se a seguinte igualdade:

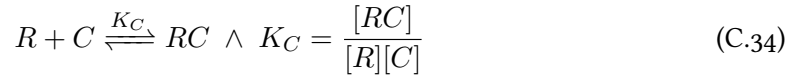
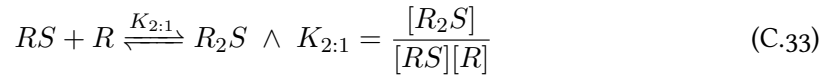
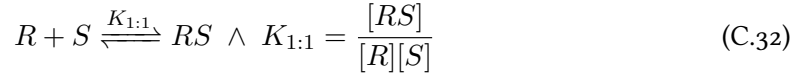
$$[R]_0 = [R] + \frac{K_S[R][S]_0}{1 + K_S[R]} + \frac{K_C[R][C]_0}{1 + K_C[R]} \quad (\text{C.30})$$

Resolvendo a Equação anterior em ordem a $[R]$, obtém-se uma equação polinomial de terceiro grau que se resolve com recurso à função iterativa apresentada na Equação C.16.

$$K_S K_C [R]^3 + (K_S K_C ([S]_0 + [C]_0 - [R]_0) + K_S + K_C) [R]^2 + (1 + K_S ([S]_0 - [R]_0) + K_C ([C]_0 - [R]_0)) [R] - [R]_0 = 0 \quad (\text{C.31})$$

C.4.1 Complexos 2:1

No caso do composto 6AH^+ , foi necessário determinar ambas as constantes de associação ($K_{1:1}$ e $K_{2:1}$) com CB7 por competição. Para tal, efetuou-se um raciocínio análogo ao anterior, considerando os equilíbrios apresentados nas Equações C.32 a C.34 e obteve-se a expressão C.35, segundo a qual se efetuou o ajuste dos dados experimentais.



$$2K_{1:1}K_{2:1}K_C[S][R]^3 + (K_C + K_C K_{1:1}[S] + 2K_{1:1}K_{2:1}[S])[R]^2 + (1 + K_{1:1}[S] + K_C[C]_0 - K_C[R]_0)[R] - [R]_0 = 0 \quad (\text{C.35})$$

C.5 Ajuste dos Dados Experimentais

De um modo análogo ao que se apresentou no Apêndice B, as constantes de associação das várias associações foram calculadas recorrendo a experiências seguidas por espectroscopia de absorção e/ou emissão. Deste modo, a propriedade considerada foi a absorvância ou intensidade de fluorescência, respetivamente, fazendo-se uso das propriedades aditivas de ambas.

Dado que as titulações são monitorizadas através de variações nas propriedades espectroscópicas do substrato (S), apenas se consideram as espécies em que este está presente. Como caso exemplificativo, apresenta-se um modelo 1:1.

$$Abs_{total} = Abs_S^\lambda + Abs_{RS}^\lambda \quad (\text{C.36})$$

Para efetuar o ajuste dos dados experimentais ao modelo teórico, podem considerar-se, à semelhança do que se referiu no Apêndice B, as absorvâncias máximas de cada espécie a um determinado comprimento de onda e as respetivas frações molares (Equação C.37).

$$Abs_{teórica}^\lambda = Abs_{máxS}^\lambda \times \chi_S + Abs_{máxRS}^\lambda \times \chi_{RS} \quad (\text{C.37})$$

No caso das titulações seguidas por emissão, a expressão é semelhante, considerando-se intensidades em vez de absorvâncias (Equação C.38).

$$I_{teórica}^{\lambda} = I_{máxS}^{\lambda} \times \chi_{S} + I_{máxRS}^{\lambda} \times \chi_{RS} \quad (C.38)$$

Importa ainda referir que nas titulações por competição a abordagem é semelhante, sendo que nesta situação se selecionam competidores que não absorvem nem emitem no comprimento de onda selecionado, podendo então considerar-se que apenas S e RS absorvem/emitem no ajuste dos dados experimentais.

Por fim, o ajuste dos dados experimentais aos modelos teóricos respetivos foram feitos com recurso à ferramenta Solver do Microsoft Office Excel, seguindo um processo iterativo.

D | Informação Suplementar

No presente Apêndice, reúnem-se alguns dados experimentais e deduções matemáticas que permitirão uma melhor compreensão dos resultados apresentados no Capítulo 3. Manteve-se a organização em secções equivalente, de modo a facilitar a leitura.

D.1 Caracterização dos Compostos Funcionalizados com Substituintes Aniônicos

D.1.1 Caracterização dos Compostos 1 a 3

D.1.1.1 Caracterização dos Monómeros

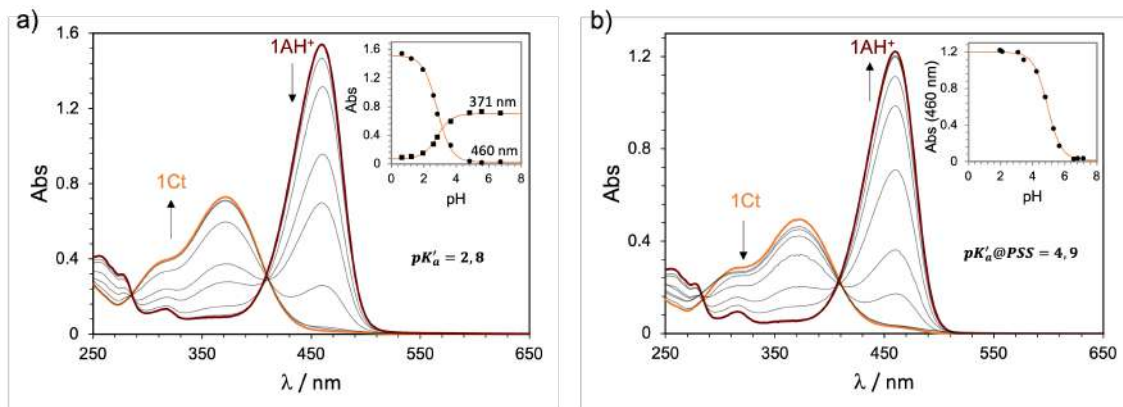


Figura D.1: Espectros de absorção do composto 1, a diferentes valores de pH ([citrato de sódio] = 10 mM), no estado a) fundamental (31 μM , $T=37^\circ\text{C}$) e b) fotoestacionário (25 μM , $\lambda_{irr} = 365 \text{ nm}$).

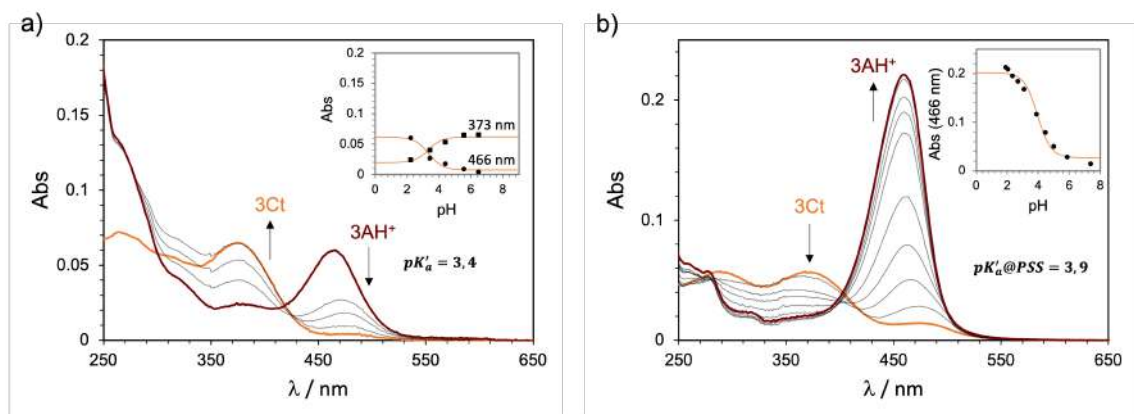


Figura D.2: Espectros de absorção do composto 3, a diferentes valores de pH ([citrato de sódio] = 10 mM), no estado a) fundamental ($4 \mu\text{M}$, $T=37^\circ\text{C}$) e b) fotoestacionário ($5 \mu\text{M}$, $\lambda_{irr} = 365 \text{ nm}$).

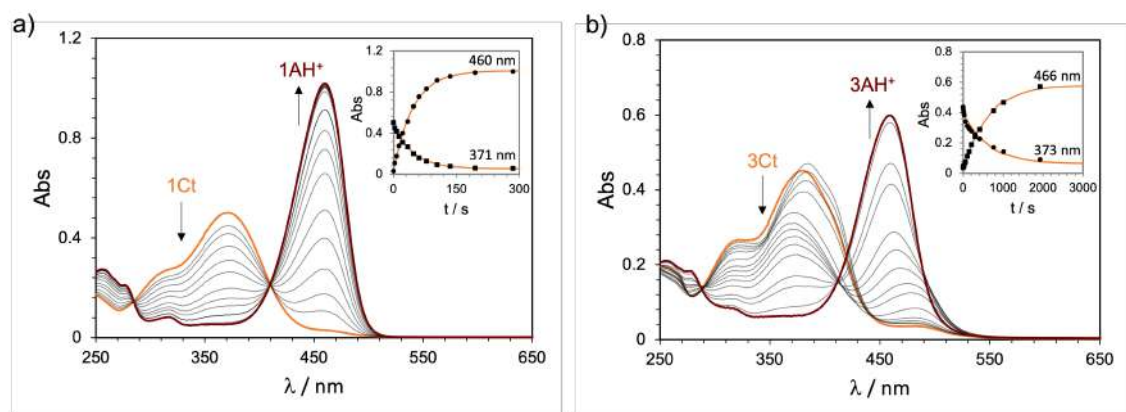


Figura D.3: Irradiação a pH = 1,0 e a 37°C da a) 1Ct ($22 \mu\text{M}$) e b) 3Ct ($9 \mu\text{M}$), mantendo [citrato de sódio] = 10 mM e $\lambda_{irr} = 365 \text{ nm}$.

D.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM
SUBSTITUINTES ANIÔNICOS

Tabela D.1: Matrizes de coordenadas atômicas do composto **1Ct**, após otimização pelo *Gaussian 09* (HF/6-311G*; PCM; H₂O).

C	-7.060621	1.074474	-0.068824	C	-9.658187	-0.090104	-0.014159
C	-5.756888	1.534918	-0.084344	H	-9.691025	0.624284	0.80095
C	-4.645388	0.704185	0.023531	H	-9.647792	0.457665	-0.94983
C	-4.900461	-0.673868	0.1553	C	-10.842133	-1.033835	0.045852
C	-6.192095	-1.155713	0.172316	H	-10.753433	-1.756144	-0.760791
C	-7.278712	-0.291469	0.060916	H	-10.796364	-1.592354	0.97657
H	-7.86944	1.770871	-0.156413	C	-12.176938	-0.296607	-0.056627
H	-5.59466	2.59281	-0.185503	H	-12.253644	0.429882	0.748789
H	-6.378928	-2.209805	0.272484	H	-12.208946	0.27017	-0.984063
C	-3.321268	1.328046	-0.01111	C	-13.374783	-1.241545	-0.000609
H	-3.35243	2.399029	-0.111324	H	-14.30884	-0.694361	-0.074239
C	-2.105611	0.783402	0.055921	H	-13.347743	-1.959194	-0.8152
H	-1.974092	-0.269537	0.159915	H	-13.392	-1.799847	0.930682
C	-0.909306	1.658192	0.00008	C	5.416656	0.102543	-0.064867
O	-1.00371	2.858919	0.01884	H	5.401233	0.551652	0.921921
O	-8.481112	-0.870434	0.089328	H	5.484996	0.895608	-0.801414
C	0.441636	1.022629	-0.067134	C	6.578522	-0.861392	-0.197781
C	0.652595	-0.329763	-0.347451	H	6.45709	-1.654738	0.533587
C	1.559282	1.822705	0.139612	H	6.538829	-1.324332	-1.179135
C	1.924605	-0.851188	-0.414281	C	7.922805	-0.16143	0.001289
H	-0.171265	-0.990398	-0.534029	H	7.944644	0.325341	0.970243
C	2.844054	1.313584	0.086328	H	8.04788	0.613808	-0.746937
H	1.419125	2.865145	0.350283	C	9.085595	-1.143012	-0.091385
C	3.033554	-0.035939	-0.192947	H	9.018313	-1.904867	0.675299
H	2.083066	-1.889698	-0.637185	H	9.109414	-1.637108	-1.054823
H	3.674357	1.968251	0.260496	S	10.68565	-0.387619	0.109022
O	-3.857911	-1.510389	0.264829	O	11.640504	-1.480535	0.015816
H	-4.138911	-2.405346	0.349949	O	10.685172	0.24417	1.419302
O	4.227046	-0.634071	-0.269985	O	10.828598	0.573868	-0.973429

Tabela D.2: Matrizes de coordenadas atômicas do composto **2Ct**, após otimização pelo *Gaussian 09* (HF/6-311G*; PCM; H₂O).

C	-6.065037	1.221288	-0.059316	C	-9.875482	-0.834404	0.062713
C	-4.755064	1.663569	-0.077079	H	-9.800953	-1.551294	-0.750007
C	-3.654941	0.817063	0.024807	H	-9.831028	-1.400604	0.988733
C	-3.928845	-0.55775	0.152678	C	-11.199607	-0.076543	-0.02564
C	-5.227006	-1.021615	0.171519	H	-11.260161	0.643242	0.788206
C	-6.301824	-0.141949	0.066227	H	-11.226119	0.501134	-0.947447
H	-6.864335	1.929181	-0.142053	C	-12.416123	-1.000025	0.025711
H	-4.578433	2.719463	-0.175078	H	-12.35688	-1.718558	-0.789856
H	-5.428246	-2.073311	0.268791	H	-12.388461	-1.581085	0.945804
C	-2.322366	1.422543	-0.011195	C	6.397353	0.075308	-0.072513
H	-2.338901	2.494101	-0.108612	H	6.386423	0.521575	0.915615
C	-1.114226	0.86096	0.052033	H	6.478266	0.86959	-0.806479
H	-0.997098	-0.193953	0.153125	C	7.545947	-0.904311	-0.206153
C	0.094001	1.719215	-0.003487	H	7.411906	-1.698279	0.522326
O	0.016327	2.921098	0.017712	H	7.502147	-1.36342	-1.189131
O	-7.512031	-0.704196	0.095918	C	8.899201	-0.22351	-0.001532
C	1.43594	1.065097	-0.073158	H	8.925253	0.259716	0.96908
C	1.627889	-0.28924	-0.357695	H	9.036788	0.552474	-0.746785
C	2.564707	1.848837	0.135693	C	10.048928	-1.220342	-0.094499
C	2.892452	-0.828244	-0.426599	H	9.968314	-1.98495	0.66815
H	0.794777	-0.93767	-0.545986	H	10.070094	-1.709913	-1.060306
C	3.842185	1.321876	0.080514	S	11.657819	-0.486867	0.116318
H	2.439251	2.8925	0.349609	O	12.599356	-1.591061	0.019931
C	4.012746	-0.0293	-0.202956	O	11.660285	0.136928	1.430429
H	3.036238	-1.868179	-0.652787	O	11.816873	0.479315	-0.959639
H	4.681622	1.964275	0.256491	C	-13.745469	-0.250906	-0.05775
O	-2.897743	-1.409037	0.256765	H	-13.773759	0.331763	-0.976042
H	-3.190896	-2.300195	0.340748	H	-13.807219	0.465421	0.758713
O	5.197807	-0.64376	-0.282009	C	-14.957866	-1.177942	-0.009807
C	-8.678715	0.093064	0.002674	H	-14.979164	-1.750867	0.912891
H	-8.697374	0.802936	0.822169	H	-15.885742	-0.61786	-0.07014
H	-8.664998	0.646236	-0.929769	H	-14.946085	-1.88432	-0.835011

D.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM
SUBSTITUINTES ANIÔNICOS

Tabela D.3: Matrizes de coordenadas atômicas do composto 3Ct, após otimização pelo *Gaussian 09* (HF/6-311G*; PCM; H₂O).

C	-5.035811	1.327992	-0.055285	C	-10.184623	0.089582	-0.005262
C	-3.720994	1.755604	-0.073867	H	-10.232902	0.80138	0.816399
C	-2.630249	0.896325	0.021822	H	-10.208099	0.677342	-0.920768
C	-2.919323	-0.475906	0.143982	C	-11.412039	-0.819841	0.041596
C	-4.222571	-0.925239	0.163238	H	-11.364812	-1.528618	-0.78311
C	-5.287658	-0.033069	0.064351	H	-11.385279	-1.412419	0.954224
H	-5.82727	2.045208	-0.132922	C	7.41363	0.046136	-0.076373
H	-3.532745	2.809909	-0.167364	H	7.40579	0.489491	0.913093
H	-4.435452	-1.975002	0.256246	H	7.504375	0.841731	-0.807766
C	-1.291085	1.487063	-0.013858	C	8.551992	-0.945213	-0.211041
H	-1.295947	2.55907	-0.107221	H	8.408189	-1.74009	0.51458
C	-0.089084	0.912078	0.04582	H	8.505346	-1.400608	-1.195614
H	0.016612	-0.14442	0.142863	C	9.911821	-0.279205	-0.001431
C	1.128345	1.757394	-0.007526	H	9.94099	0.200164	0.971
O	1.063657	2.959999	0.01659	H	10.058825	0.498085	-0.743517
O	-6.50405	-0.581788	0.093917	C	11.051545	-1.287322	-0.095885
C	2.463217	1.089085	-0.078415	H	10.960934	-2.05468	0.662875
C	2.64082	-0.266506	-0.366269	H	11.070614	-1.772434	-1.063981
C	3.600203	1.860185	0.132891	S	12.666968	-0.570859	0.12333
C	3.899583	-0.81883	-0.43606	O	13.598182	-1.683512	0.023561
H	1.800918	-0.905557	-0.556421	O	12.671624	0.045809	1.4408
C	4.871988	1.319716	0.076934	O	12.838404	0.399575	-0.946852
H	3.48582	2.904585	0.349413	C	-12.732149	-0.05291	-0.025026
C	5.028253	-0.032482	-0.209899	H	-12.755505	0.544112	-0.935164
H	4.032294	-1.859676	-0.664815	H	-12.779606	0.653029	0.802448
H	5.718146	1.952661	0.254929	C	-13.961199	-0.960258	0.01452
O	-1.897632	-1.339152	0.242291	H	-13.937558	-1.559838	0.923178
H	-2.200564	-2.22728	0.32368	H	-13.915722	-1.664588	-0.814662
O	6.206757	-0.659309	-0.290039	C	-15.282584	-0.194763	-0.048163
C	-7.661906	0.229372	0.010659	H	-15.332157	0.50698	0.781832
H	-7.669016	0.933921	0.834924	H	-15.308584	0.405635	-0.955163
H	-7.64561	0.788592	-0.918131	C	-16.506156	-1.107661	-0.011592
C	-8.869103	-0.684562	0.069367	H	-17.427756	-0.535759	-0.056897
H	-8.807264	-1.395384	-0.749814	H	-16.506796	-1.798715	-0.849823
H	-8.826345	-1.259045	0.990361	H	-16.530068	-1.6976	0.900323

D.1.1.2 Caracterização dos Agregados

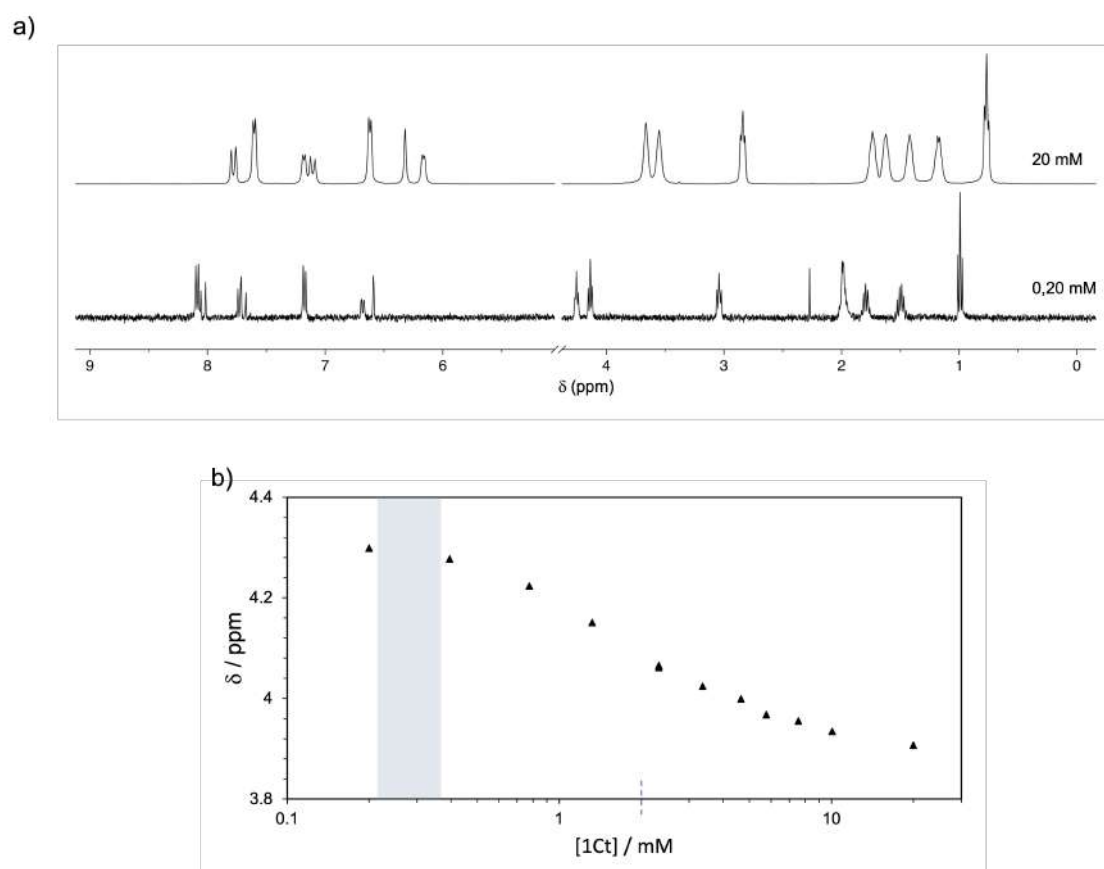


Figura D.4: a) Espetros de ^1H RMN do composto **1Ct** em D_2O adquiridos a $37\text{ }^\circ\text{C}$ (0,20 mM em baixo e 20 mM em cima). b) Representação da média dos desvios químicos de alguns sinais representativos do composto **1Ct**, em função da concentração de composto, destacando-se o valor de CAC determinado por tensiometria a tracejado e a gama na qual deverá constar o valor de CAC indicado por ^1H RMN.

D.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUÍNTES ANIÔNICOS

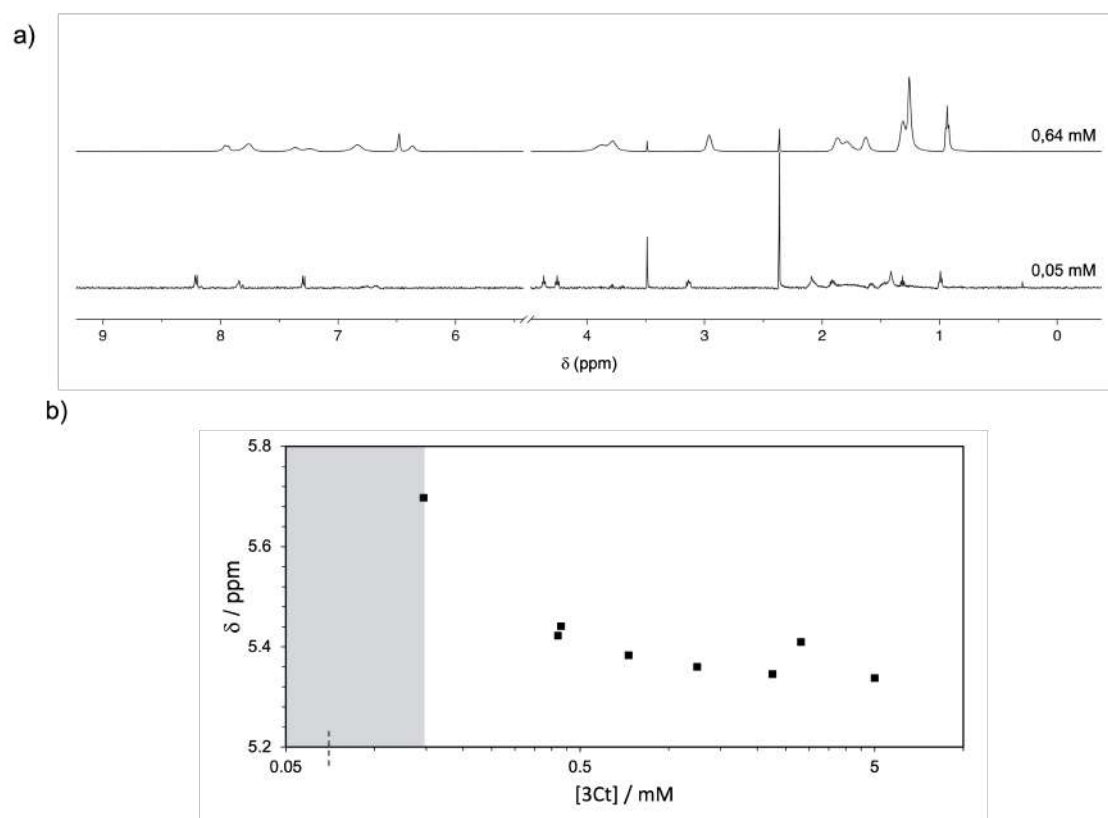


Figura D.5: a) Espectros de ^1H RMN do composto 3Ct em D_2O adquiridos a 37°C (0,05 mM em baixo e 0,64 mM em cima). b) Representação da média dos desvios químicos de alguns sinais representativos do composto 3Ct, em função da concentração de composto, destacando-se o valor de CAC determinado por tensiometria a tracejado e a gama na qual deverá constar o valor de CAC indicado por ^1H RMN.

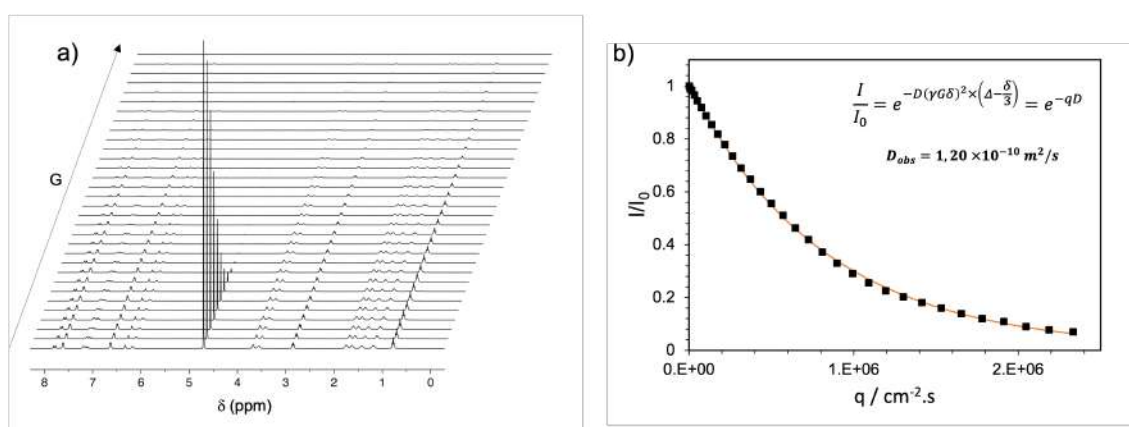


Figura D.6: a) Espectros de ^1H DOSY RMN do composto 1Ct (20 mM, D_2O), adquiridos a 37°C . b) Determinação do coeficiente de difusão, com recurso à equação de Stejskal-Tanner.

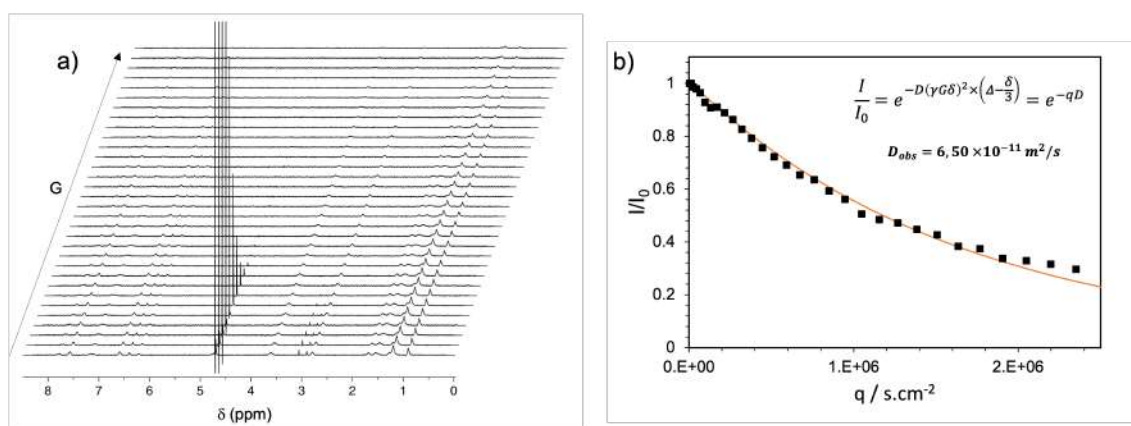


Figura D.7: a) Espetros de ^1H DOSY RMN do composto 3Ct (5 mM, D_2O), adquiridos a 37°C . b) Determinação do coeficiente de difusão, com recurso à equação de Stejskal-Tanner.

D.1.1.3 Estudos de Interação Recetor-Substrato

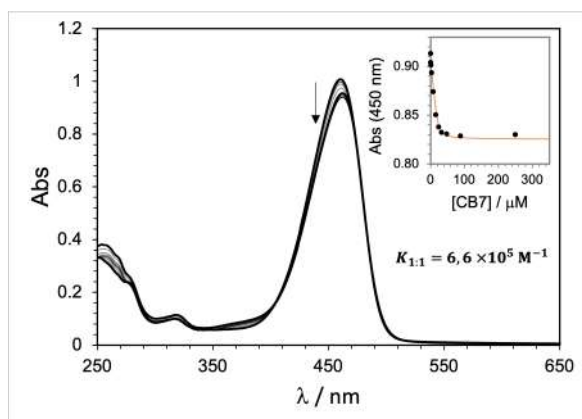


Figura D.8: Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 1AH^+ ($20 \mu\text{M}$), a $\text{pH} = 1$, a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, monitorizando-se por espectroscopia de absorção. Em inset apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1 descrito no Apêndice C.

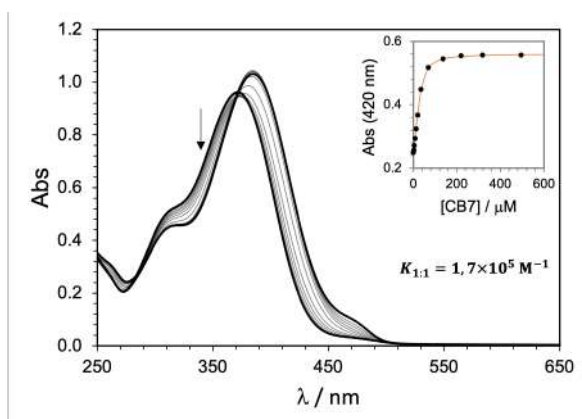


Figura D.9: Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 2Ct ($56 \mu\text{M}$), a pH neutro, a uma temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$, monitorizando-se por espectroscopia de absorção. Em inset apresenta-se o ajuste dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1 descrito no Apêndice C.

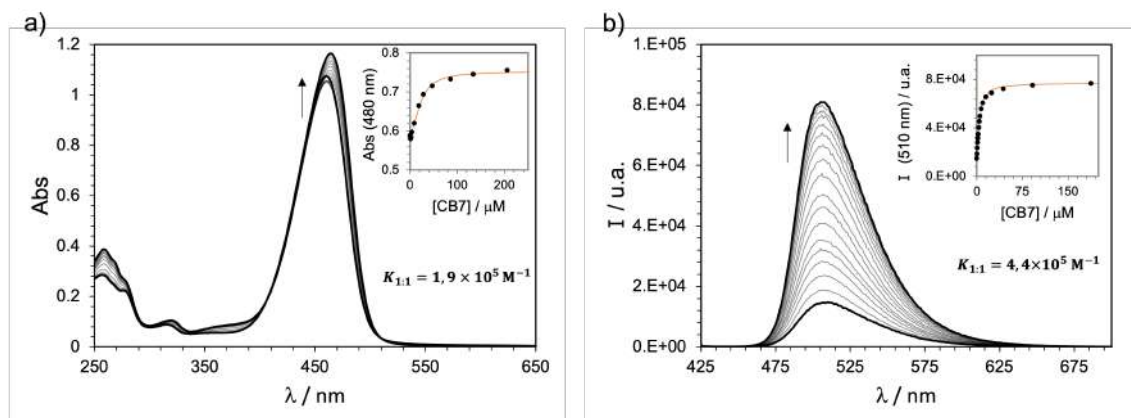


Figura D.10: Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 2AH⁺ (32 μM), a pH = 1, a uma temperatura de a) 37 °C, monitorizando-se por espectroscopia de absorção e de b) 25 °C, monitorizando-se por espectroscopia de emissão ($\lambda_{exc} = 415 \text{ nm}$). Em inset apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1 descrito no Apêndice C.

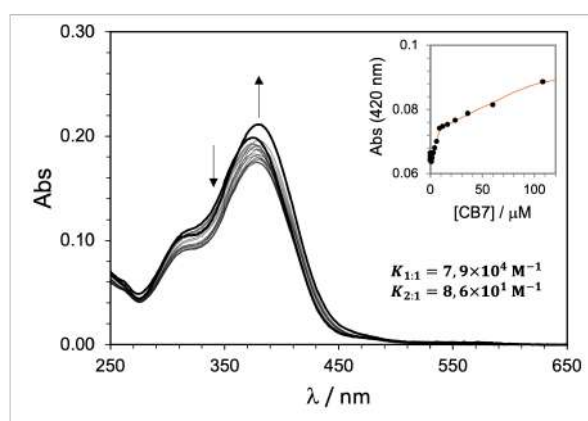


Figura D.11: Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 3Ct, a pH neutro, a uma temperatura de 37 °C, monitorizando-se por espectroscopia de absorção. Durante a experiência a concentração de substrato variou, pois adicionou-se diretamente macrociclo para prevenir a formação do catião flavílio, o que se verificou numa experiência anterior. Em inset apresenta-se o ajuste dos dados experimentais ao modelo teórico 2:1 descrito no Apêndice C.

D.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM SUBSTITUINTES ANIÔNICOS

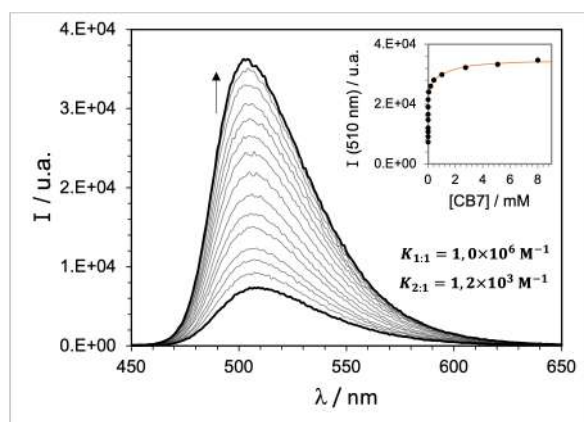


Figura D.12: Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 3AH^+ ($3 \mu\text{M}$), a $\text{pH} = 1$, a uma temperatura de 25°C , monitorizando-se por espectroscopia de emissão ($\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$). Em inset apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 2:1 descrito no Apêndice C.

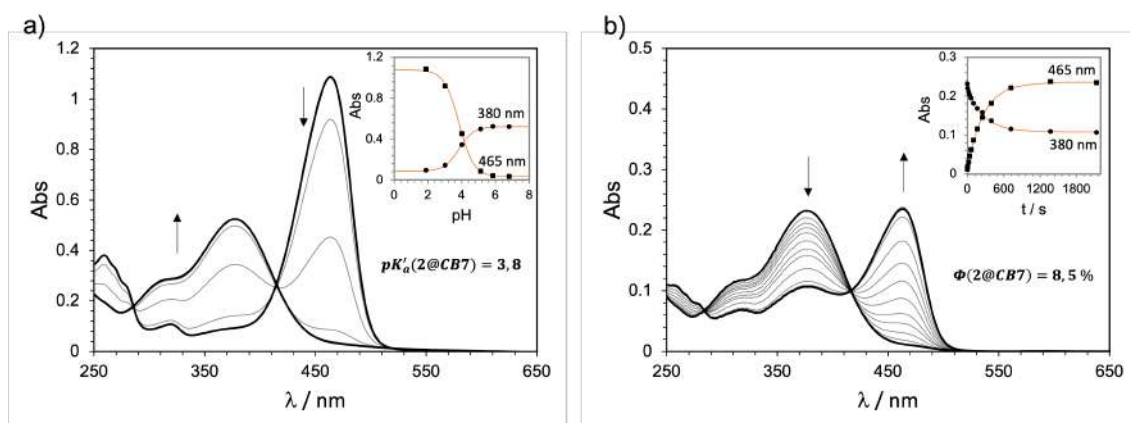


Figura D.13: a) Espectros de absorção a diferentes valores de pH , mantendo a temperatura a 37°C e $[\text{citrato de sódio}] = 10 \text{ mM}$, do composto **2** ($30 \mu\text{M}$), na presença de CB7 (5 eq.). Em *inset* apresentam-se os ajustes dos dados experimentais que permitiram obter o valor de pK'_a . b) Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e a 37°C do composto **2Ct** ($13 \mu\text{M}$), na presença de CB7 (5 eq.), mantendo o $\text{pH} = 5$ e $[\text{citrato de sódio}] = 10 \text{ mM}$. Em *inset* apresentam-se as absorvâncias ao comprimento de onda de absorção máximo do catião flavílio e chalcona *trans* em função do tempo de irradiação.

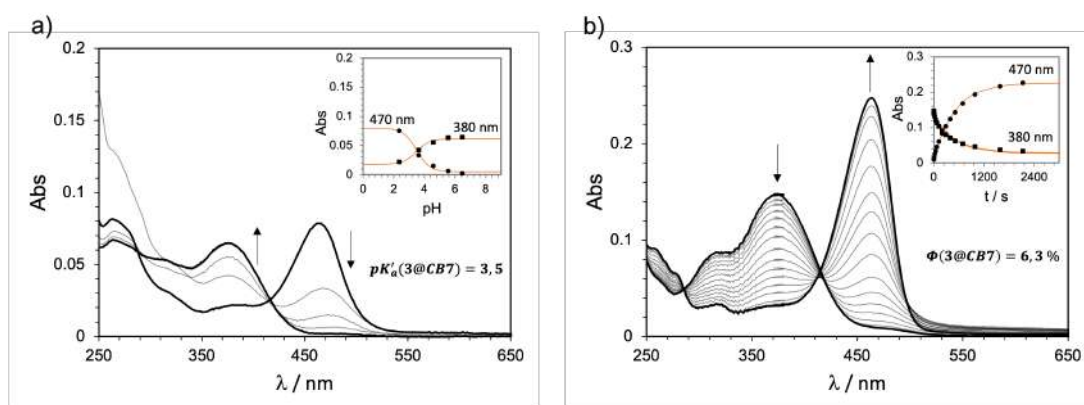


Figura D.14: a) Espectros de absorção a diferentes valores de pH, mantendo a temperatura a 37 °C e [citrato de sódio] = 10 mM, do composto 3 (4 μM), na presença de CB7 (5 eq.). Em *inset* apresentam-se os ajustes dos dados experimentais que permitiram obter o valor de pK'_a . b) Alterações espectrais após irradiação a 365 nm e a 37 °C do composto 3Ct (8 μM), na presença de CB7 (5 eq.), mantendo o pH = 4 e [citrato de sódio] = 10 mM. Em *inset* apresentam-se as absorvâncias ao comprimento de onda de absorção máximo do catião flavílio e chalcona *trans* em função do tempo de irradiação.

D.1.2 Caracterização do Composto 5

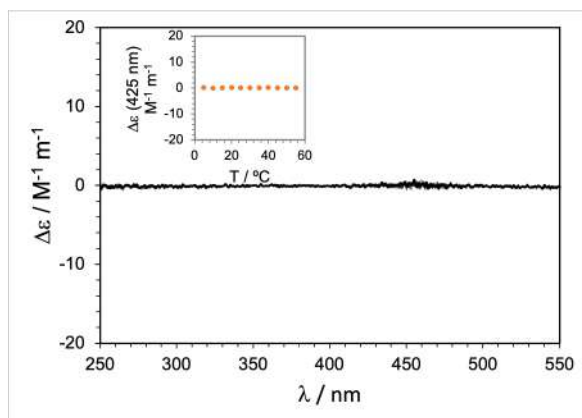


Figura D.15: Variações no espectro de dicroísmo circular eletrónico do composto 5AH^+ ($\text{HCl } 0,1\text{M}$), em função da temperatura no arrefecimento.

D.2 Caracterização dos Compostos Funcionalizados com Substituintes Catiônicos

D.2.1 Caracterização Espetroscópia dos Monómeros

D.2.1.1 Determinação do pK^a no estado fundamental

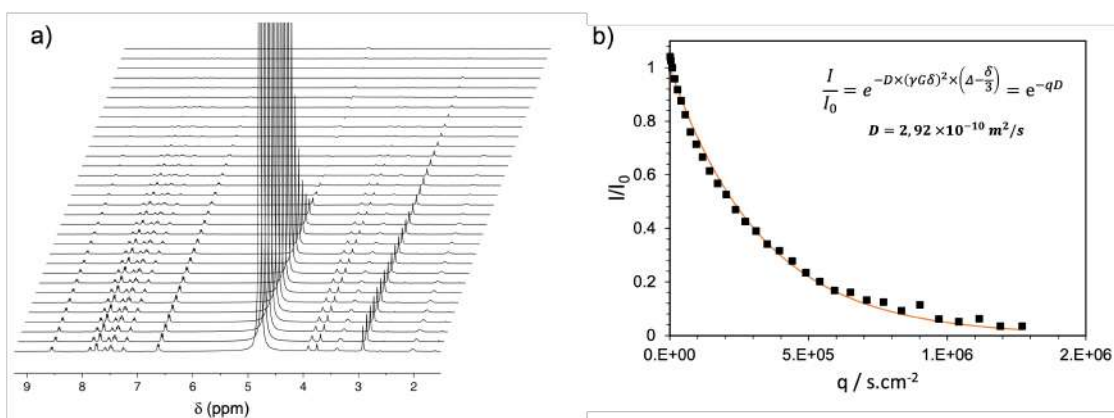


Figura D.16: a) Espetros de ^1H RMN do composto 6AH^+ , adquiridos em condições de gradiente variável, com a sequência *ledbpgpzs* (6 mM, D_2O , $\text{pD} = 0$). b) Ajuste dos dados experimentais de acordo com a equação de Stejskal-Tanner que permitiu a determinação do coeficiente de difusão: $D = 2,92 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

Deduções matemáticas - Sistema diácido

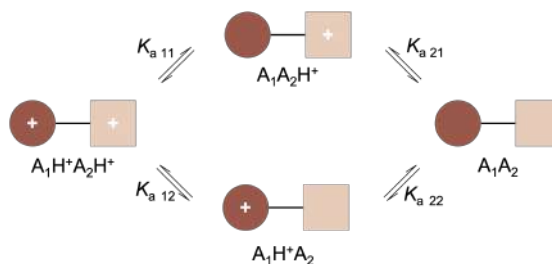


Figura D.17: Esquema ilustrativo da desprotonação de um composto contendo duas unidades ácidas ligadas covalentemente.

Considerando o esquema apresentado na Figura D.17, é possível definir as constantes de acidez microscópicas do sistema (Equações D.1 a D.4).

$$K_{a11} = \frac{[A_1A_2H^+][H^+]}{[A_1H^+A_2H^+]} \quad (\text{D.1})$$

$$K_{a12} = \frac{[A_1H^+A_2][H^+]}{[A_1H^+A_2H^+]} \quad (\text{D.2})$$

$$K_{a21} = \frac{[A_1A_2][H^+]}{[A_1A_2H^+]} \quad (\text{D.3})$$

$$K_{a\ 22} = \frac{[A_1A_2][H^+]}{[A_1H^+A_2]} \quad (D.4)$$

Para além disso, pode ainda definir-se uma constante de acidez aparente para a formação da espécie monocatiónica (Equação D.5).

$$K'_{a\ 1} = \frac{([A_1A_2H^+] + [A_1H^+A_2])[H^+]}{[A_1H^+A_2H^+]} \quad (D.5)$$

Conjugando as Equações D.1 e D.2, obtém-se uma expressão que permite calcular a concentração total de espécies monocatiónicas (Equação D.6).

$$[A_1A_2H^+] + [A_1H^+A_2] = \frac{K_{a\ 11}[A_1H^+A_2H^+] + K_{a\ 12}[A_1H^+A_2H^+]}{[H^+]} \quad (D.6)$$

Por outro lado, a concentração total de espécies monocatiónicas pode ser também obtida através da Equação D.5, concluindo-se que a constante de acidez aparente $K'_{a\ 1}$ é dada pela soma das constantes microscópicas $K_{a\ 11}$ e $K_{a\ 12}$ (Equação D.7).

$$K'_{a\ 1} = K_{a\ 11} + K_{a\ 12} \quad (D.7)$$

De um modo análogo, podem deduzir-se as expressões que permitem calcular a concentração total da espécie neutra A_1A_2 , bem como relacionar a constante de acidez aparente $K'_{a\ 2}$ com as constantes microscópicas (Equações D.8 a D.10).

$$[A_1A_2H^+] + [A_1H^+A_2] = \frac{[A_1A_2][H^+]}{K_{a\ 21}} + \frac{[A_1A_2][H^+]}{K_{a\ 22}} \quad (D.8)$$

$$K'_{a\ 2} = \frac{[A_1A_2][H^+]}{[A_1A_2H^+] + [A_1H^+A_2]} \quad (D.9)$$

$$K'_{a\ 2} = \frac{K_{a\ 21}K_{a\ 22}}{K_{a\ 21} + K_{a\ 22}} \quad (D.10)$$

Assumindo que se trata de um sistema estatístico, em que $A_1 = A_2$, as constantes microscópicas (K_{am}) são iguais entre si, sendo possível estabelecer as seguintes igualdades (Equações D.11 a D.14).

$$K'_{a\ 1} = K_{a\ 11} + K_{a\ 12} = 2K_{am} \quad (D.11)$$

$$K'_{a\ 2} = \frac{K_{a\ 21}K_{a\ 22}}{K_{a\ 21} + K_{a\ 22}} = \frac{K_{am}^2}{2K_{am}} = \frac{K_{am}}{2} \quad (D.12)$$

$$K'_{a\ 1} = 4 \times K'_{a\ 2} \quad (D.13)$$

$$pK'_{a\ 1} = pK'_{a\ 2} - 0,6 \quad (D.14)$$

D.2.1.2 Resposta Fotoquímica

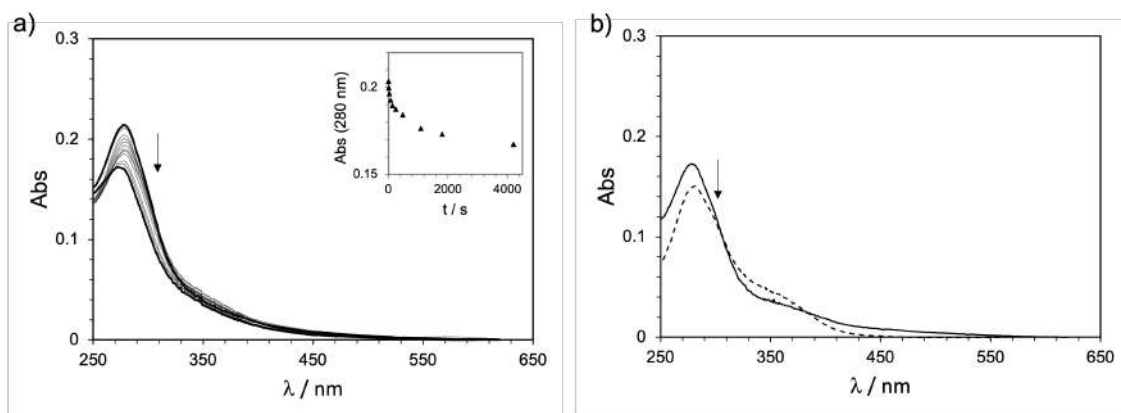


Figura D.18: Irradiação da 6Ct a pH neutro e à temperatura ambiente ($[\text{citrato de sódio}] = 10 \text{ mM}$; $\lambda_{irr} = 365 \text{ nm}$), seguida de a) irradiação a 280 nm ($[6\text{Ct}] = 10 \mu\text{M}$) ou b) recuperação térmica a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ($[6\text{Ct}] = 9 \mu\text{M}$), apresentando-se a tracejado o espectro de absorção adquirido após 24 h de incubação.

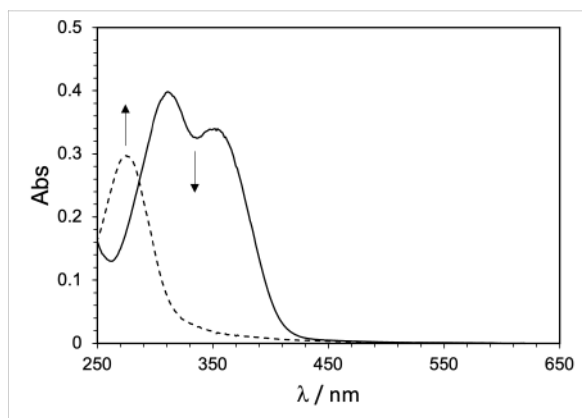


Figura D.19: Espectro de absorção do composto 6 ($17 \mu\text{M}$) antes (linha a cheio) e após (linha a tracejado) irradiação a 365 nm, a pH neutro, na presença de 80% de metanol.

D.2.2 Interações Recetor-Substrato

D.2.2.1 Modulação da resposta fotoquímica do composto 6Ct

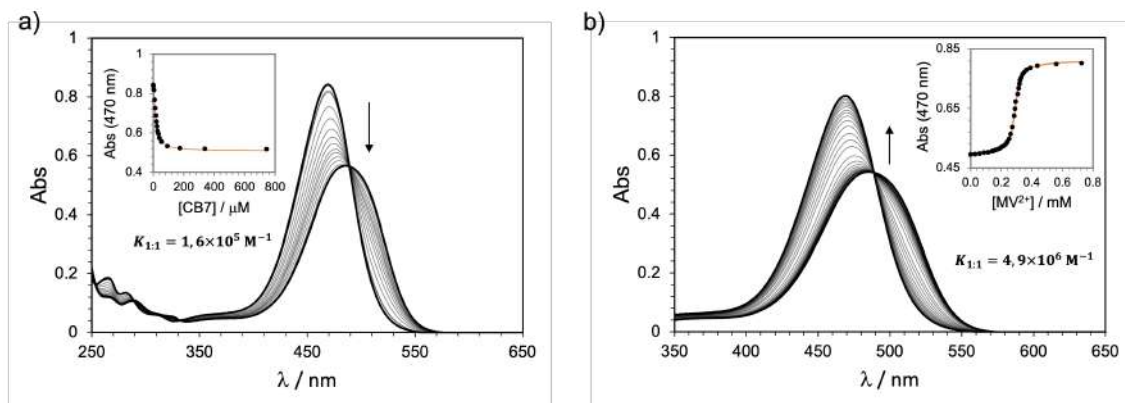


Figura D.20: a) Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 7,3',4'-trihidroxi-flavílio ($21 \mu\text{M}$), a $\text{pH} = 1$. Em *inset* apresenta-se o ajuste dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1, descrito no Apêndice C. b) Variações espectrais observadas após adição de competidor (MV^{2+}) a uma solução de 7,3',4'-trihidroxi-flavílio ($21 \mu\text{M}$), na presença de CB7 ($299 \mu\text{M}$), a $\text{pH} = 1$. [36] Em *inset* apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 1:1 apresentado no Apêndice C.

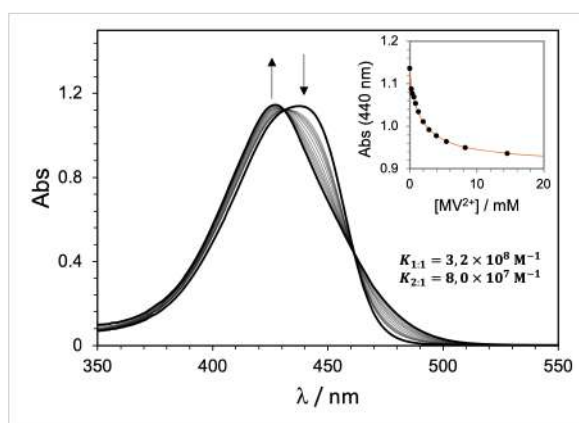


Figura D.21: Variações espectrais observadas após adição de competidor (MV^{2+}) a uma solução de 6AH^+ ($19 \mu\text{M}$), na presença de CB7 ($34 \mu\text{M}$), a $\text{pH} = 1$. Em *inset* apresentam-se os ajustes dos dados experimentais ao modelo teórico 2:1, na presença de competidor, conforme descrito no Apêndice C.

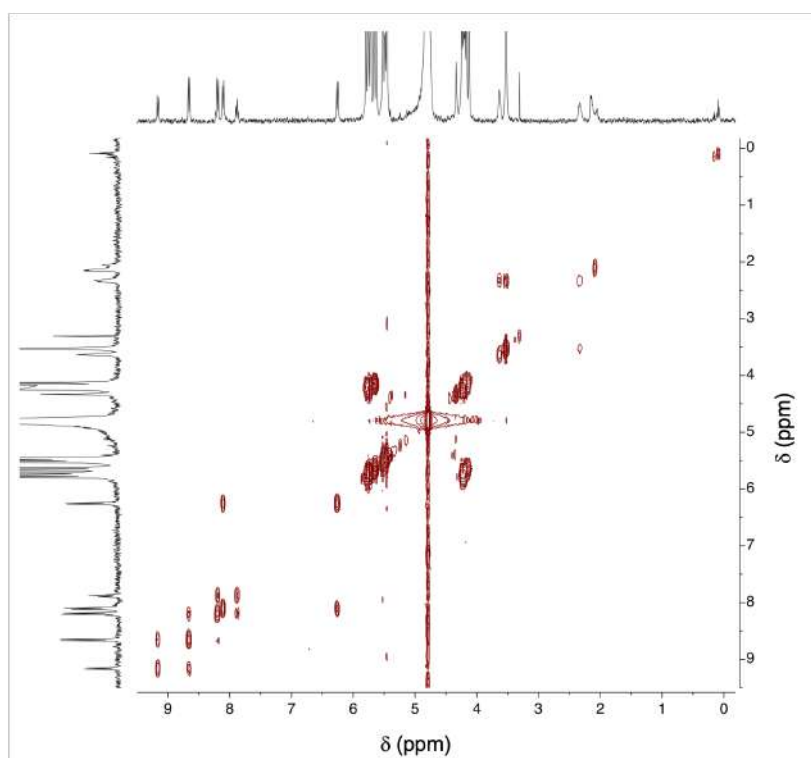


Figura D.22: Espectro COSY do composto $6AH^+$ (1 mM, D_2O , pD = 1 ajustado com DCl), adquirido na presença de 2,5 eq. de CB7.

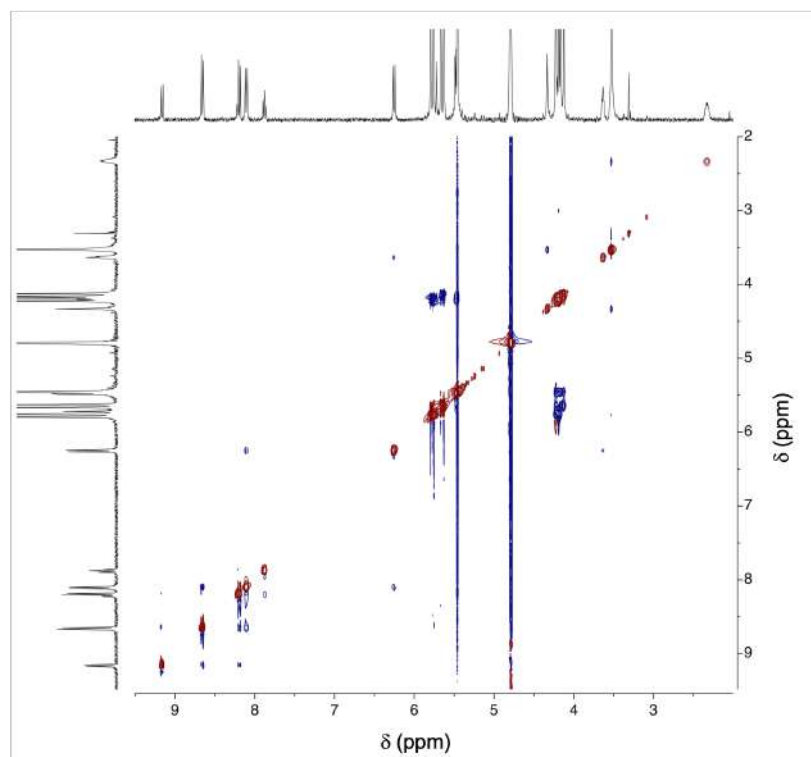


Figura D.23: Espectro ROESY do composto $6AH^+$ (1 mM, D_2O , pD = 1 ajustado com DCl), adquirido na presença de 2,5 eq. de CB7.

D.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM
SUBSTITUÍNTES CATIONÍCOS

D.2.2.2 Construção e caracterização da associação 7@CB7

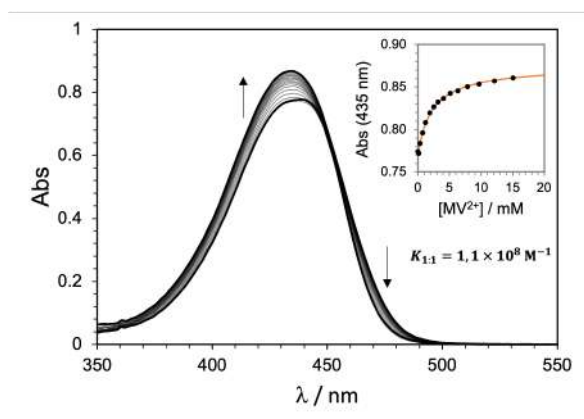


Figura D.24: Variações espectrais observadas após adição de competidor (MV^{2+}) a uma solução de 7AH^+ ($28 \mu\text{M}$), na presença de CB7 ($113 \mu\text{M}$), a $\text{pH} = 1$.

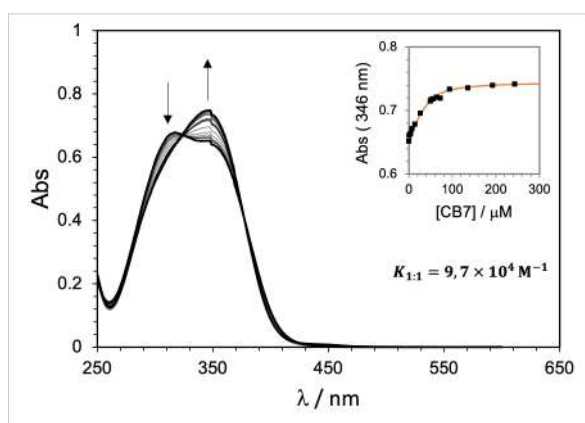


Figura D.25: Variações espectrais observadas após adição de CB7 a uma solução de 7Ct ($38 \mu\text{M}$), a pH neutro, contendo tampão citrato de sódio (10 mM).

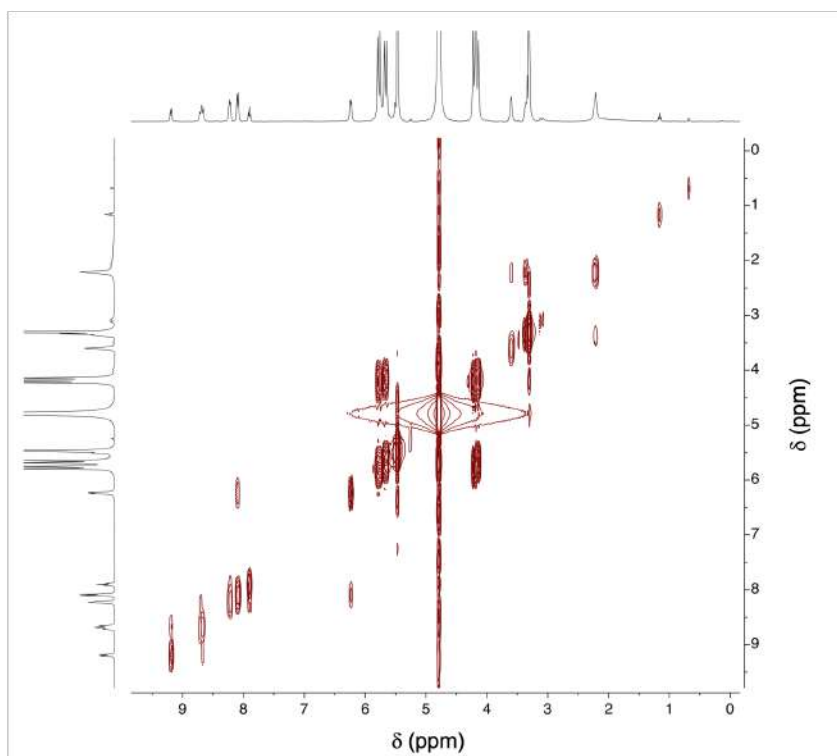


Figura D.26: Espectro COSY do composto 7AH^+ (0,55 mM, D_2O , pD = 1 ajustado com DCl), adquirido na presença de 1 eq. de CB7.

D.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FUNCIONALIZADOS COM
SUBSTITUENTES CATIÔNICOS

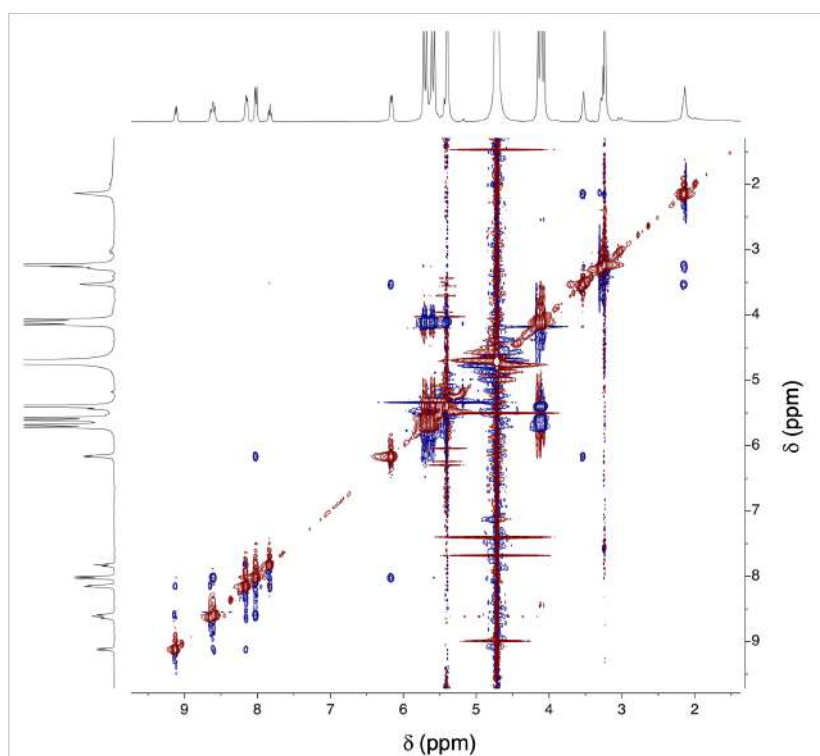


Figura D.27: Espectro ROESY composto 7AH⁺ (0,55 mM, D₂O, pD = 1 ajustado com DCl), adquirido na presença de 1 eq. de CB7.

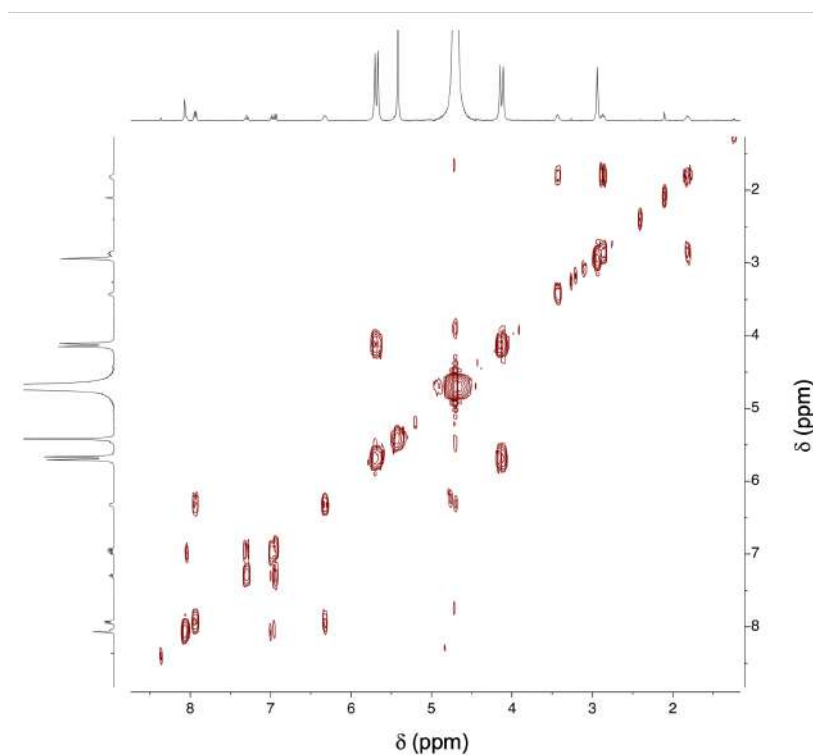


Figura D.28: Espectro COSY do composto 7Ct (0,80 mM, D₂O), adquirido na presença de 1 eq. de CB7.

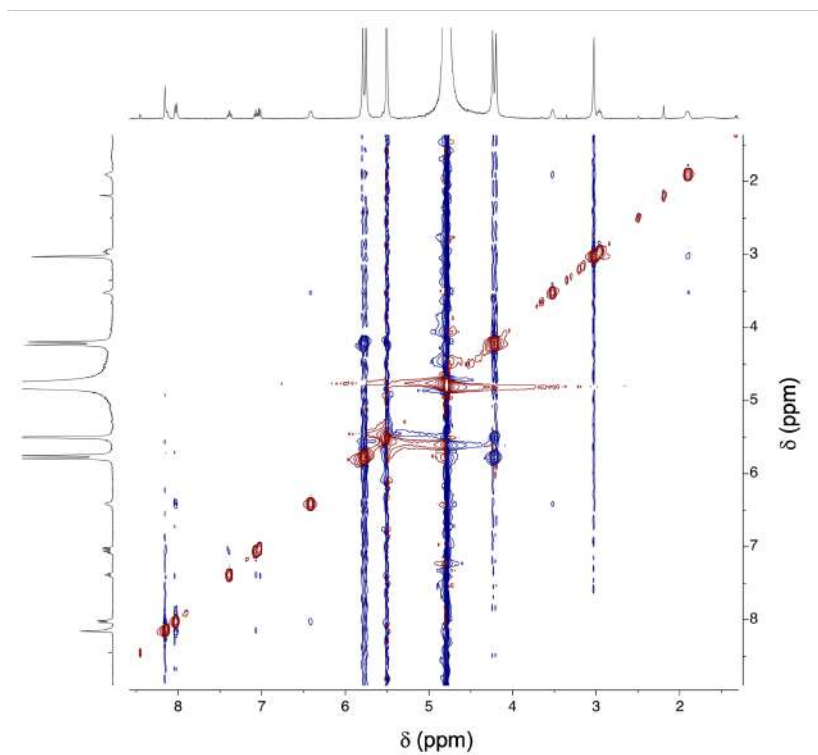


Figura D.29: Espectro ROESY do composto 7Ct (0,80 mM, D₂O), adquirido na presença de 1 eq. de CB7.

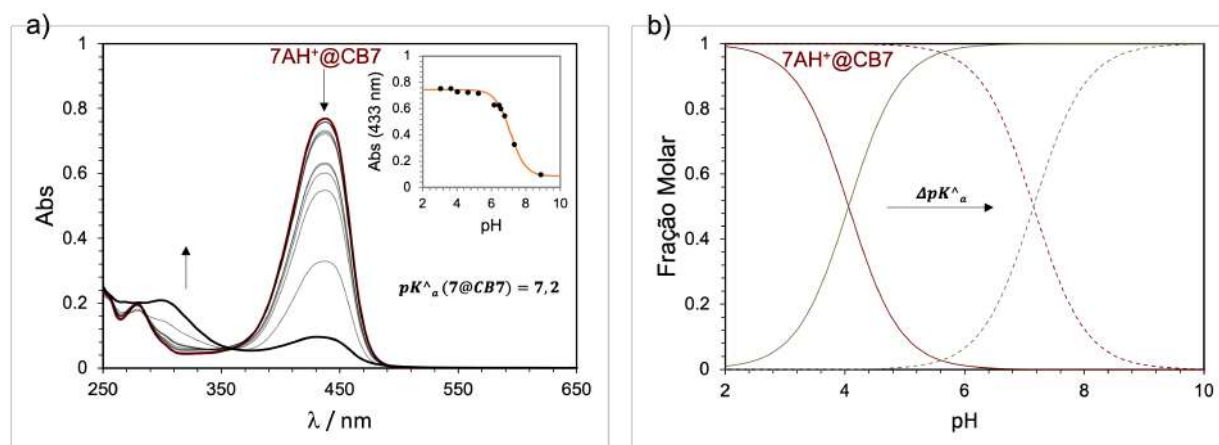


Figura D.30: a) Espectros de absorção a diferentes valores de pH, mantendo a temperatura a 25 °C e [citrato de sódio] = 10 mM, do composto 7 (18 μM), na presença de 25 eq. de CB7, cerca de 10 minutos após saltos de pH desde pH = 1 até valores superiores. b) Distribuição molar em função do pH da espécie 7AH⁺ (vermelho) e das espécies básicas do sistema 7 (verde), livre (linhas a cheio) e na presença de 25 eq. de CB7 (linhas a tracejado).

E | Comunicação de Resultados

Para que a investigação em ciência progrida, é fundamental que haja comunicação e discussão dos resultados obtidos com os restantes membros da comunidade. Assim, ao longo desta tese, sempre se trabalhou nesse sentido, através de comunicações orais ou em painel e da publicação de artigos científicos.

E.1 Comunicações Orais

No âmbito das Jornadas Intercalares dos Mestrados dos Departamentos de Química e de Ciências da Vida da FCT-NOVA, que decorreram via digital, nos dias 11 e 12 de fevereiro de 2021, foi apresentada a comunicação oral intitulada "pH and Photoresponsive Soft Materials for Drug-Delivery Applications", que incidiu principalmente sobre os estudos realizados para o composto 2.

Na sequência dos resultados obtidos nos estudos comparativos entre os compostos 6 e 7, foi ainda proferida a comunicação oral intitulada "Dimerização vs Fotodimerização: Reatividade Fotoquímica de Derivados Anfílicos de 2-hidroxicalconas Controlada por Cucurbit[7]uril", no Colóquio Digital de Estudantes de Química em Portugal, que decorreu entre 26 e 28 de março de 2021, organizado pela Associação Nacional de Estudantes de Química.

E.2 Comunicações em Painel

No decorrer do VII PYChem - Portuguese Young Chemists Meeting, que ocorreu via digital entre os dias 19 e 21 de maio de 2021, apresentou-se uma comunicação em painel intitulada: "Modulation of the Photochemical Reactivity of a Bisalcone upon Complexation with Cucurbit[7]uril".

Ainda no âmbito das comunicações em painel, no XXVII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, que teve lugar na Universidade do Minho, em Braga, entre os dias 14 e 16 de julho de 2021, apresentou-se uma comunicação em painel intitulada: "Self-assembly of 2-hydroxychalcones amphiphilic derivatives: A new approach for a drug-delivery system", que compreendeu a comparação dos resultados obtidos para os compostos 1, 2 e 3.

E.3 Artigos Científicos

O sistema multiestado $7\text{AH}^+-7\text{Ct}$ foi caracterizado em maior detalhe para além do que foi descrito na presente tese, nomeadamente considerando a existência da espécie B_4 , com o objetivo de caracterizar o comportamento cinético e termodinâmico da associação $7@CB7$, tendo originado a publicação do artigo intitulado: "Exploring the pH dependent kinetics, thermodynamics and photochemistry of a flavylum-based pseudorotaxane", na revista *Pure and Applied Chemistry*, que pode ser consultado sob o DOI <https://doi.org/10.1515/pac-2021-0603>.



(2021)

Rita Anastácio

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS ANFIFÍLICOS MULTI-RESPONSIVOS