

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**SÍNTESE E UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS
HETEROCÍCLICOS DA CLASSE 1,3,4-TIADIAZÓLIO
COMO SONDAS FLUORESCENTES**

MARCO ANTONIO SOARES DE SOUZA

SOB ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA:

DR^a. Áurea Echevarria Aznar Neves Lima

Tese submetida como requisito parcial para a
obtenção do grau de *Mestre em Química*.

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO

1996

SÍNTESE E UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS
HETEROCÍCLICOS DA CLASSE 1,3,4-TIADIAZÓLIO
COMO SONDAS FLUORESCENTES

Por


MARCO ANTONIO SOARES DE SOUZA

TESE APROVADA EM: ____ / ____ / 1996

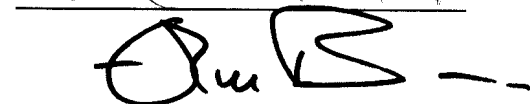
Prof^a. Dra. Áurea Echevarria Aznar Neves Lima



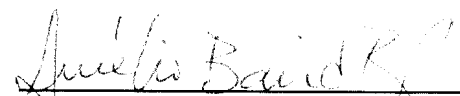
Prof. Dr. José Carlos Neto Ferreira



Prof. Dr. Eliezer de Jesus Barreiro



Prof. Dr. Aurélio Baird Buarque Ferreira



(Suplente)

BIOGRAFIA

MARCO ANTONIO SOARES DE SOUZA, filho de Sérgio Túlio Soares de Souza e Maria Alice Altenbernd Soares de Souza, nasceu em 30 de junho de 1967, no município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro.

Graduado em Engenharia Química, em 1992, pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Atuou como monitor das disciplinas de Química Orgânica no Departamento, de Química do Instituto de Ciências Exatas da UF.R.R.J. no período de agosto de 1987 a setembro de 1989. Desenvolveu trabalhos de iniciação científica sob orientação do Prof. Dr. Aurélio Baird Buarque Ferreira nos anos de 1987, 1989 e 1991. Foi Prof. Substituto de Química Orgânica no Departamento de, Química, do Instituto de Ciências Exatas da U.F.R.R.J. entre setembro de 1994 e agosto de 1995. Ingressou como Prof. Assistente em setembro de 1995 no Departamento de Física e Química, do Centro de Filosofia Ciências e Letras da Universidade Severino Sombra (Vassouras, RJ) onde leciona disciplinas relacionadas à química até a presente data.

“Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei”.

Paulo de Tarso

À minha família, especialmente ao meu avô, Dr. Oswaldo Soares de Souza (in memoriam) pelo exemplo de caráter e justiça que tem direcionado minha vida, fazendo-me crer que tais valores tornam o ser humano viável.

AGRADECIMENTOS

A Deus, verdadeiro amigo e presença mais constante em minha vida.
À minha mulher e filho que são, sem sombra de dúvida, minha maior fonte de inspiração e força.

À professora, orientadora e amiga Dr^a. Áurea Echevarria, pela sua incansável paciência e estímulo, os quais foram fundamentais à realização deste trabalho.

Ao Professor e amigo, Francisco de Assis da Silva cujo exemplo de luta e esforço tem servido de inspiração nos momentos em que julgamos nossa sorte pequena.

À professora e amiga Dr^a. Ceres Maria Gomes que contribuiu e, tem contribuído, para o processo de aperfeiçoamento do ser humano.

Ao professor Dr. Aurélio Baird Buarque Ferreira que, ainda nos tempos de iniciação científica, despertou em mim um sentimento de amor à pesquisa, sendo muitas vezes um misto de orientador e pai, contribuindo assim não só na minha formação profissional, mas também na construção do meu caráter.

Ao Professor Dr. José Carlos Neto Ferreira pela ajuda e solidariedade sempre disponíveis a qualquer tempo.

Aos professores Raimundo Braz Filho, Mário Geraldo de Carvalho, Silas Varella Fraiz Jr., Leila Vilela Alegrio, Anselmo Alpande Moraes, Vitor Marcos Rumjanek, Edna da Cruz Fantini (in memorian) e Porfírio Jesus das Neves, que, em suas respectivas especialidades, muito contribuíram ao longo desse aprendizado.

Especiais à aluna de doutorado Samira Portugal e funcionária Leonice B. Coelho da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo auxílio na obtenção dos espectros de fluorescência.

Aos amigos Hélio Jr., Javier, Sílvio, Márcia, Darí, Edson, Miguel e Margarete pelo companheirismo e solidariedade sempre presentes.

E, finalmente aos funcionários do departamento de química da U.F.R.R.J., Áurea, Francis, Eli, Fábio, Osmar, Carlos, Pimentel, Rui, Rubens, Maurício e Aldir, que, com seus exemplos de profissionalismo, demonstram que pode haver dignidade e competência no serviço público.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

1.1 OBJETIVOS

1.2 COMPOSTOS MESOIÔNICOS 2

1.2.1 Estrutura e Conceito 6

1.2.2 Nomenclatura dos Compostos Mesoioônicos 14

1.3 SÍNTESE DOS : SISTEMAS MESOIÔNICOS 16

1.3.1 Ciclodesidratação 16

1.3.2 Ciclizações Envolvendo Nitrilas 17

1.3.3 Ciclizações Envolvendo Hidrazinas N,N-substituídas 18

1.3.4 Formação a Partir de Cátions Heterocíclicos 19

1.3.5 Interconversão de Sistemas Mesoioônicos 20

1.3.6 Reações de Espécies Binucleofílicas Monoprotonadas com 1,2-Bieletrófilos 21

1.3.7 Reação de Anidroacilação da 1,4-Difeniltiossemicarbazida 22

1.4 FOTOQUÍMICA: ALGUNS ASPÉCTOS BÁSICOS 23

1.4.1 Luz e Matéria 23

1.4.2 Estados Excitados das Moléculas 26

1.4.3 Estudos de Fluorescência de DNA 34

1.4.4 Fotoquímica de Compostos Mesoioônicos 36

CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 APARELHOS E MATERIAIS	37
2.1.1 Aparelhos	37
2.1.2 Materiais	38
2.2 SÍNTESES	39
2.2.1 Síntese da 1,4-difeniltiossemicarbazida	39
2.2.2. Síntese do Ácido α -naftóico	40
2.2.3 Síntese do Cloreto de α -naftoíla	41
2.2.4. Síntese do Cloreto de α -naftilacetoíla	42
2.2.5. Síntese do Cloreto de α -pirenilacetoíla	43
2.2.6 Síntese do Cloreto de Cinamoíla	43
2.2.7 Síntese dos Heterociclos do Sistema 1,3,4-Tiadiazólio-2-fenilaminas	44
2.2.7.1 Síntese do Cloreto de 4,5-difenil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina	45
2.2.7.2 Síntese do Cloreto de 4-fenil-5- α -naftil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina	46
2.2.7.3 Síntese do Cloreto de 4-fenil-5- α -naftometil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina	47

2.2.7.4 Síntese do Cloreto de 4-fenil-(5- α -pirenometil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina	48
2.2.7.5 Síntese do Cloreto de 4-fenil-5-estiril-2,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina	49
2.2.7.6 Síntese do Cloreto de 1,4,5-trifenil-1,3,4-triazólio-2-tiol	50
2.3 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA ESPECTROSCOPIA NO UVVIS E FLUORESCÊNCIA	51
2.3.1 Soluções dos Sais Heterocíclicos e Mesoionicos (Bases Livres)	51
2.3.2 Soluções de DNA X Sais Heterocíclicos e Bases Livres	53
2.4 PREPARAÇÃO DAS BASES LIVRES (MESOIÔNICOS)	54
2.5 CÁLCULOS	56

CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SÍNTESE DOS HETEROCICLOS	57
3.2 ESPECTROS NA REGIÃO DO UV/VIS	59
3.2.1 Espectros de Absorção	59
3.2.1.1 UV/VIS dos cloretos de 4-fenil-5-X-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina	59
3.2.1.2 UV/VIS das Bases Livres	62
3.2.2 Espectros de Emissão de Fluorescência	70
3.2.2.1 Emissão de Fluorescência dos Heterociclos	70
3.2.2.2 Estudo Qualitativo da Interação dos Heterociclos com DNA por Emissão de Fluorescência	79
3.3 RMN DE ¹³C DOS COMPOSTOS HETEROCICLOS	
CAPÍTULO 4. CONCLUSÃO	122
CAPÍTULO 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.2.1.1	Concentrações das soluções dos sais, em acetonitrila, utilizadas na obtenção dos espectros de UV/VIS e fluorescência.	40
Tabela 2.2.1.1	Concentrações das soluções das bases livres, em acetonitrila, utilizadas na obtenção dos espectros de UV/VIS e fluorescência.	40
Tabela 2.4.2.1	Esquema geral para síntese, pontos de fusão e rendimentos obtidos para os cloridratos do sistema 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminas.	53
Tabela 2.5.1	Concentrações das soluções dos sais, em acetonitrila, ao se adicionar solução de NaOH 0,78 M.	55
Tabela 2.5.2	Comparação entre as cores das soluções dos sais X solução das bases livres, em acetonitrila.	56
Tabela 3.2.1	ϵ (s) nos principais comprimentos de onda de absorção para os sais.	61
Tabela 3.2.2	ϵ (s) nos principais comprimentos de onda de absorção para as bases livres.	63
Tabela 3.4.1	Dados de RMN de ^{13}C para o MICO-1.	98
Tabela 3.4.2	Dados de RMN de ^{13}C para o MICO-2.	98
Tabela 3.4.3	Dados de RMN de ^{13}C para o MICO-3.	98
Tabela 3.4.4	Dados de RMN de ^{13}C para o MICO-5.	99
Tabela 3.4.5	Dados de RMN de ^{13}C para o MICO-6.	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.2.1	Primeiros compostos mesoiônicos descritos na literatura.	2
Figura 1.2.2	Primeiro sistema 1,2,3-oxadiazólio-5-olato (sidnona) sintetizado.	3
Figura 1.2.3	Representação proposta por Schönemberg em 1939.	
Figura 1.2.1.1	Representação esquemática da proposta de Ollis e Ramsden, onde, a,b,c,d,e,f = átomos de C ou heteroátomos e 1 & 2 = n° de elétrons p.	7
Figura 1.2.1.2	Cicloadição 1,3-dipolar típica de sistemas mesoiônicos do tipo A	8
Figura 1.2.1.3	Formação do tautômero acíclico para o mesoiônico do tipo B	9
Figura 1.2.1.4	Representação do ácido conjugado 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida proposta por Montanari.	10
Figura 1.2.1.5	Representação do mesoiônico 1,3,4-triazólio-2-tiol proposta por Motanari.	11
Figura 1.2.1.6	Sugestões feitas por Echevarria quanto à correta representação das cargas sobre sistemas tiadiazólios e triazólios.	12
Figura 1.2.2.1	Nomenclatura utilizada pela IUPAC para uma sidnona.	14
Figura 1.2.2.2	Exemplo da nomenclatura utilizada neste trabalho.	15
Figura 1.3.1.1	Reação de ciclodesidratação para síntese de sistemas mesoiônicos.	16
Figura 1.3.2.1	Reação de ciclização envolvendo nitrilas.	17
Figura 1.3.3.1	Ciclização envolvendo hidrazinas N,N-substituídas.	18
Figura 1.3.4.1	Formação à partir de cátions heterocíclicos.	19
Figura 1.3.5.1	Interconversão de sistemas mesoiônicos.	20

Figura 1.3.6.1	Reação de espécies binucleofílicas monoprotônicas com 1,2-bieletrófilos.	21
Figura 1.3.7.1	Reação de anidroacilação da 1,4-difeniltiosemicarbazida.	22
Figura 1.4.1	Diagrama de Jablonski.	28
Figura 3.2.1	Espectros de absorção no UV/VIS de MICO-1 e BMICO-1.	64
Figura 3.2.2	Espectros de absorção no UV/VIS de MICO-2 e BMICO-2.	65
Figura 3.2.3	Espectros de absorção no UV/VIS de MICO-3 e BMICO-3.	66
Figura 3.2.4	Espectros de absorção no UV/VIS de MICO-4 e BMICO-4.	67
Figura 3.2.5	Espectros de absorção no UV/VIS de MICO-5 e BMICO-5.	68
Figura 3.2.6	Espectros de absorção no UV/VIS de MICO-6 e BMICO-6.	69
Figura 3.2.7	Espectro de emissão de fluorescência de MICO-1.	73
Figura 3.2.8	Espectro de emissão de fluorescência de MICO-2.	74
Figura 3.2.9	Espectro de emissão de fluorescência de MICO-3.	75
Figura 3.2.10	Espectro de emissão de fluorescência de MICO-4.	76
Figura 3.2.11	Espectro de emissão de fluorescência de MICO-5.	77
Figura 3.2.12	Espectro de emissão de fluorescência de MICO-6.	78
Figura 3.2.13	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro sem a presença dos heterociclos.	82
Figura 3.2.14	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em presença do composto MICO-1.	83
Figura 3.2.15	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em presença do composto MICO-2.	84
Figura 3.2.16	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em presença do composto MICO-3.	85
Figura 3.2.17	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em presença do composto MICO-4.	86

Figura 3.2.18	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em presença do composto MICO-5.	87
Figura 3.2.19	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em presença do composto MICO-6.	88
Figura 3.2.20	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em presença do composto BMICO-1.	89
Figura 3.2.21	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em presença do composto BMICO-2.	90
Figura 3.2.22	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em presença do composto BMICO-3.	91
Figura 3.2.23	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em presença do composto BMICO-4.	92
Figura 3.2.24	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em presença do composto BMICO-5.	93
Figura 3.2.25	Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em presença do composto BMICO-6.	94
Figura 3.2.26	Espectro de infravermelho para o composto MICO-1.	100
Figura 3.2.27	Espectro de infravermelho para o composto MICO-2.	101
Figura 3.2.28	Espectro de infravermelho para o composto MICO-3.	102
Figura 3.2.29	Espectro de infravermelho para o composto MICO-4.	103
Figura 3.2.30	Espectro de infravermelho para o composto MICO-5.	104
Figura 3.2.31	Espectro de infravermelho para o composto MICO-6.	105
Figura 3.2.32	Espectro de RMN ^1H para o composto MICO-1.	106
Figura 3.2.33	Espectro de RMN ^1H para o composto MICO-2.	107
Figura 3.2.34	Espectro de RMN ^1H para o composto MICO-3.	108
Figura 3.2.35	Espectro de RMN ^1H para o composto MICO-5.	109
Figura 3.2.36	Espectro de RMN ^1H para o composto MICO-6.	110

Figura 3.2.37	Espectro de RMN ^{13}C para o composto MICO-1.	111
Figura 3.2.38	Espectro de RMN ^{13}C para o composto MICO-2.	112
Figura 3.2.39	Espectro de RMN ^{13}C para o composto MICO-3.	113
Figura 3.2.40	Espectro de RMN ^{13}C para o composto MICO-4.	114
Figura 3.2.41	Espectro de RMN ^{13}C para o composto MICO-5.	115
Figura 3.2.42	Espectro de RMN ^{13}C para o composto MICO-6.	116

RESUMO

Os compostos mesoiônicos são heterociclos dotados de estruturas não clássicas cuja síntese tem mostrado interesse, principalmente, por apresentarem potencial atividade biológica.

Compostos heterocíclicos do sistema 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, precursores dos respectivos sistemas mesoiônicos, foram sintetizados com grupos que apresentam fluorescência conhecida unidos ao C-5 do heterociclo, via reação de Anidroacilação da 1,4-difeniltiossemicarbazida. Os produtos obtidos desta forma foram: cloreto de 5-x-4-fenil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina onde X= benzila, naftila, a-acetonaftila, a-acetopirenila e cinamoíla, MICO-1, MICO-2, MICO-3, MICO-4 e MICO-5, respectivamente. Os compostos MICO-2, MICO-3 e MICO-4 não estão descritos na literatura sendo que, tanto estes, quanto MICO-1 e MICO-2 foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho, ultravioleta, e de RMN ^1H e ^{13}C .

Foi obtido ainda o isômero estrutural do MICO-1, o cloreto de 1,4,5-trifenil-1,3,4-triazólio-2-tiol (MICO-6), por refluxo do tiadiazólio correspondente em piridina, sendo, a exemplo dos outros, caracterizado pelas mesmas técnicas espectroscópicas.

Espectros de emissão no UVNIS destes compostos, foram obtidos sendo observada fluorescência significativa somente para os derivados do sistema 1,3,4-tiadiazólio.

Foram também preparados os mesoiônicos correspondentes para cada um dos ácidos conjugados, BMICO-1, BMICO-2, BMICO-3, BMICO-4, BMICO-5 e BMICO-6, respectivamente, pela adição de NaOH a soluções de acetonitrila contendo os ácidos. As bases livres não foram isoladas, sendo suas caracterizações feitas por espectroscopia no UVNIS.

Obtiveram-se espectros de emissão de fluorescência para o DNA de timo de bezerro na ausência e em presença destes doze compostos. Observou-se, a partir dos dados obtidos, interação significativa da maior parte dos mesmos com a biomolécula.

ABSTRACT

Mesoionic compounds are heterocycles whose not classical structures have been considered of interest, specially because of their potential biological activity.

Heterocyclic compounds of 1,3,4-thiadiazolium-2-phenilamine system, the mesoionic compounds precursors were synthetized with well known fluorescent groups bound to the C-5 of the heterocycle, using the anhydroacylation of the 1,4-diphenylthiosemicarbazide. The products obtained were 5-X-4-phenil-1,3,4-thiadiazolium-2-phenilamine where X = benzyl, naphtyl, α -acetyl naphtyl, a-acetilpirenyl and cinamoil, MICO-1, MICO-2, MICO-3, MICO-4 and MICO-5, respectively. MICO-2, MICO-3 and MICO-4 compounds were not described in the literature. Ali of these compounds, including MICO-1 and MICO-5 were characterized by spectroscopy using infrared, ultraviolet and RMN ^1H and ^{13}C techniques.

An structural isomer of MICO-1, the 1,4,5-triphenyl-1,3,4-triazolium-2-thio (MICO-6) was obtained by the reflux of the corresponding thiadiazolium in pyridine, characterized by the same spectroscopic techniques.

The UVNIS emission spectra of these compounds showed significative fluorescência only for the 1,3,4-thiadiazolium system derivatives.

Corresponding mesoionics to each of the conjugated acids, BMICO-1, BMICO-2, BMICO-3, BMICO-4, BMICO-5 and BMICO-6, were prepared by the adition of NaOH to acetonitrile solution containing these acids. Free bases were not isolated, and their characterization were done by UV/VIS spectroscopy.

Fluorescence emission spectra of calf thymus ADN were obtained in the presence or absence of these twelve compounds. Data showed a significative interaction of the compounds and the biomolecule.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Objetivos do Trabalho

(a) Sintetizar e caracterizar uma série de novos sais heterociclos precursores de composto mesoiônico dos sistemas 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida e 1,3,4-triazólio-2-tiol (seus ácidos conjugados) que apresentem possibilidade fluorescência, considerando a presença de grupos cromóforos, com parâmetros fotofísicos já bem conhecidos, ligados ao anel mesoiônico;

(b) Avaliar por espectroscopia no UV-VIS e de fluorescência as possibilidades de interação destes compostos com DNA;

(c) Contribuir, desta forma, para a abertura de um novo campo de pesquisa envolvendo compostos mesoiônicos.

1.2 Compostos Mesoiónicos

Data da penúltima década do século passado o relato da síntese do primeiro composto considerado como mesoiônico (1)⁽¹⁾.

Durante o período de 1895 a 1905 Max Bush⁽²⁾ baseado nos trabalhos de Emil Fisher & Emil Besthorn, descreveu a preparação e as propriedades químicas de um determinado grupo de compostos mesoiônicos (2-5).

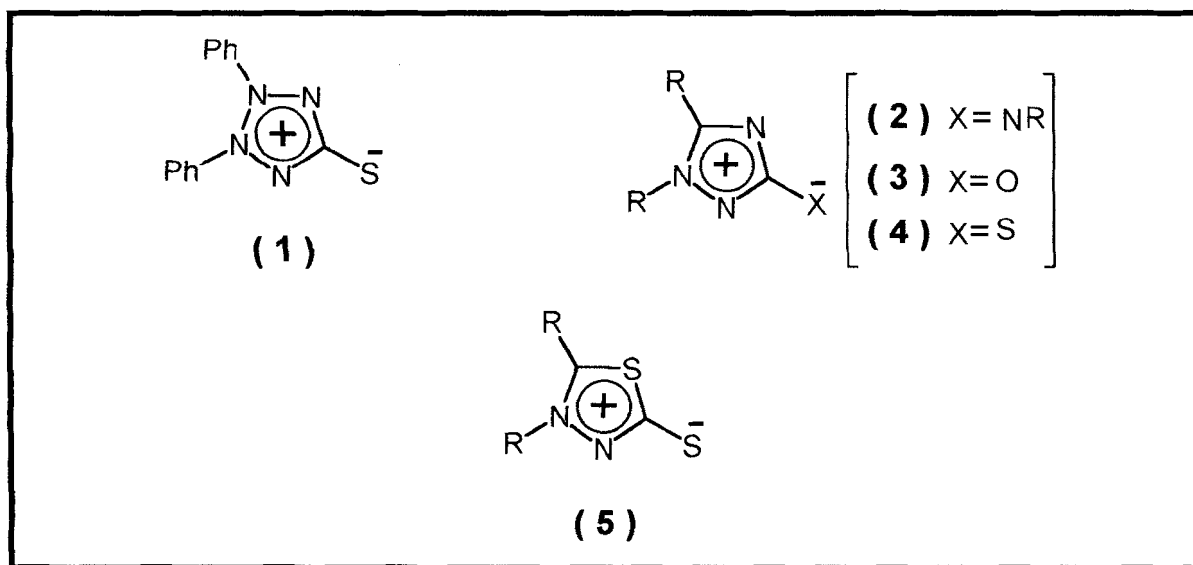


Figura 1.2.1 Primeiros compostos mesoiônicos descritos na literatura.

Trinta anos depois, em 1935, Earl & Mackney (3) relataram a síntese da molécula batizada como N-fenilsidnona (6; R=Ph), em razão do trabalho ter sido realizado na Universidade de Sydney, Austrália. A N-fenilsidnona foi a precursora dos sistemas atualmente classificados como 1,2,3-oxadiazólio-5-olato, ou, conforme a nomenclatura trivial: sidnonas.

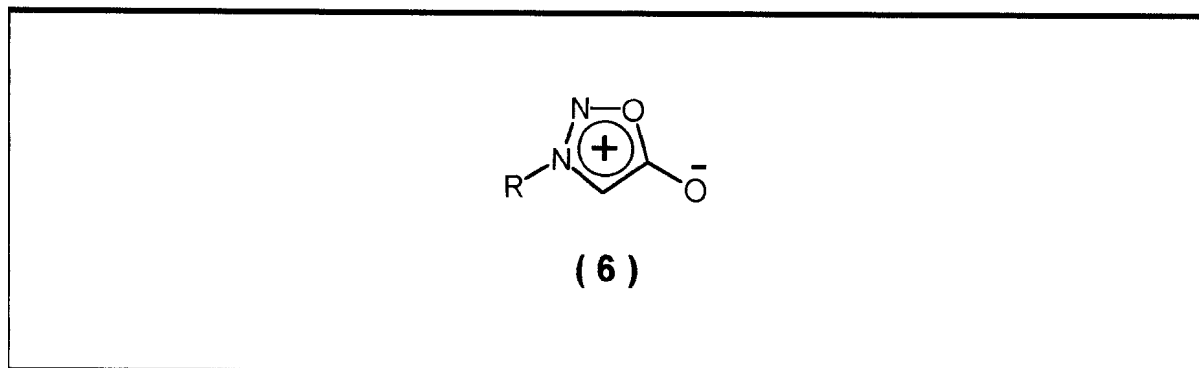


Figura 1.2.2 Primeiro sistema 1,2,3-oxadiazólio-5-olato (sidnona) sintetizado.

Schönberg (4), em 1938, propôs que estes compostos fossem representados por híbridos de ressonância com cargas, uma vez que as estruturas propostas até então não possuíam uma formulação aceitável, descritas na época apenas com ligações covalentes (por exemplo 7 e 8).

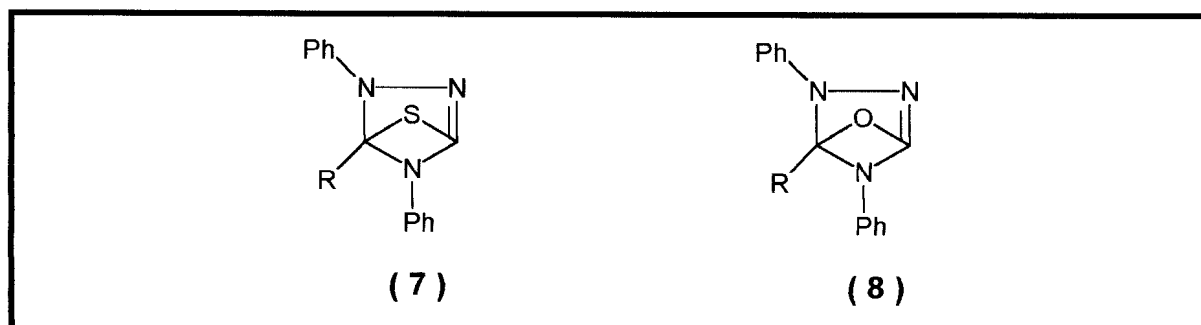


Figura 1.2.3 Representação proposta por Schönberg em 1938.

Coube a Simpson (5) em 1946 a tarefa de sugerir que estes compostos recebessem o nome de mesoiônicos (mesomérico+iônico). Em 1949 Baker, Ollis & Poole já relatavam na literatura a síntese de sidnonas classificando-as como mesoiônicos. A provável existência de outros compostos com estas características foi prevista por Baker & Ollis e subsequente a isso muitos sistemas novos foram preparados.

Trabalhos realizados por Huisgen em 1964 (6) foram responsáveis por extensos estudos de compostos mesoiônicos reportados nas duas décadas seguintes.

Ollis & Ramsden propuseram em 1976 (7) que o uso do termo "mesoiônico" fosse restringido a "um composto heterocíclico de cinco membros que não possa ser satisfatoriamente representado por nenhuma estrutura covalente polar e possua um sexteto de elétrons π em associação com os átomos que definem o anel de cinco membros".

Além destes trabalhos "históricos" relacionados aos compostos mesoiônicos, mais recentemente diversos grupos de pesquisa no Brasil e no exterior têm buscado o aprimoramento do conceito que envolve a estrutura dos mesoiônicos e desenvolvem pesquisas a respeito das possíveis aplicações práticas destes sistemas.

Badachikar e Puranik relataram em 1986 atividade antiinflamatória em compostos da série 3-(2-arilíioetil)-sidnonas (8).

Echevarria e colaboradores relataram em 1987 apreciável atividade biológica de compostos da classe 1,3,4-triazólio-5-tiolatos frente a fungos dermatófitos, leveduras, bactérias gram-positivas e gram-negativas (9).

Nobuo Watanabe e colaboradores têm relatado e patenteado desde 1992 a utilização de compostos mesoiônicos, dentre eles os da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida e 1,3,4-triazólio-2-tiolato, como fixadores em fotografia de alta resolução (10)

Lattes e colaboradores publicaram artigos tratando da natureza tensoativa dos sistemas 1,2,3-oxadiazólio-5-olato (sidnonas), inclusive visando a utilização dos mesmos como cristais líquidos⁽¹¹⁾.

Noema Grynberg e colaboradores relataram em 1992 (12) os efeitos anti-tumorais de algumas novas aril-sidnonas em camundongos portadores de Sarcoma 180, carcinoma de Ehrlich, histiocitoma fibroso B10MCII e leucemia L1210. Em 1994 os mesmos autores relataram a atividade antitumoral *in vivo* de compostos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida⁽¹³⁾.

As propriedades físicas e biológicas citadas nos parágrafos acima, tomando apenas alguns exemplos, indicam a relevância da síntese e estudo de novos compostos mesoiônicos.

1.2.1 Estrutura e Conceito

A definição clássica (7) para os compostos mesoiônicos define-os como: "um composto heterocíclico de cinco membros que não possa ser satisfatoriamente representado por nenhuma estrutura covalente ou iônica e possua um sexteto de elétrons π em associação com os átomos que definem o anel, sendo melhor descrito por um híbrido de todas as formas possíveis carregadas, envolvendo a presença de um caráter aromático $(4n+2) \pi e^-$ capaz de suportar uma carga positiva contrabalanceada por uma negativa no átomo que ocupa a posição a da cadeia lateral".

Essa idéia pode ser estendida a uma grande variedade de sistemas com anéis de cinco membros, totalizando 228 estruturas. No entanto, o conceito de mesoiônico pode ser extrapolado para anéis maiores ou menores^(14,15) sendo que para sistemas de 7 e 8 membros, por exemplo, além de não mostrarem aromaticidade de acordo com a regra de Hückel, não há possibilidade da existência da carga positiva do anel contrabalanceada com a carga negativa exocíclica.

Os compostos mesoiônicos mais estudados até o momento são, sem sombra de dúvida, os que compõem o grupo dos anéis de cinco membros. Ollis e Ramsden^(7,14) classificaram esses compostos em dois tipos:

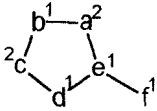
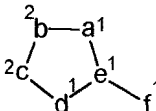
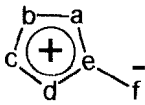
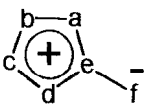
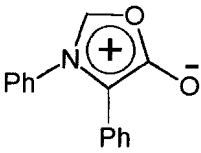
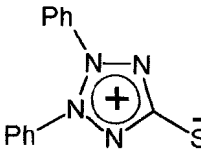
<u>Tipo A</u>	<u>Tipo B</u>
	
	
Ex.:	Ex.:
	

Figura 1.2.1.1 Representação esquemática da proposta de Ollis e Ramsden, onde, a, b, c, d, e, f = átomos de C ou heteroátomos, e 1 & 2 = n^o de elétrons π .

A diferenciação química dos mesoiônicos do tipo **A** está na capacidade que estes têm de participar de reações de cicloadição 1,3-dipolar⁽¹⁵⁾, como por exemplo:

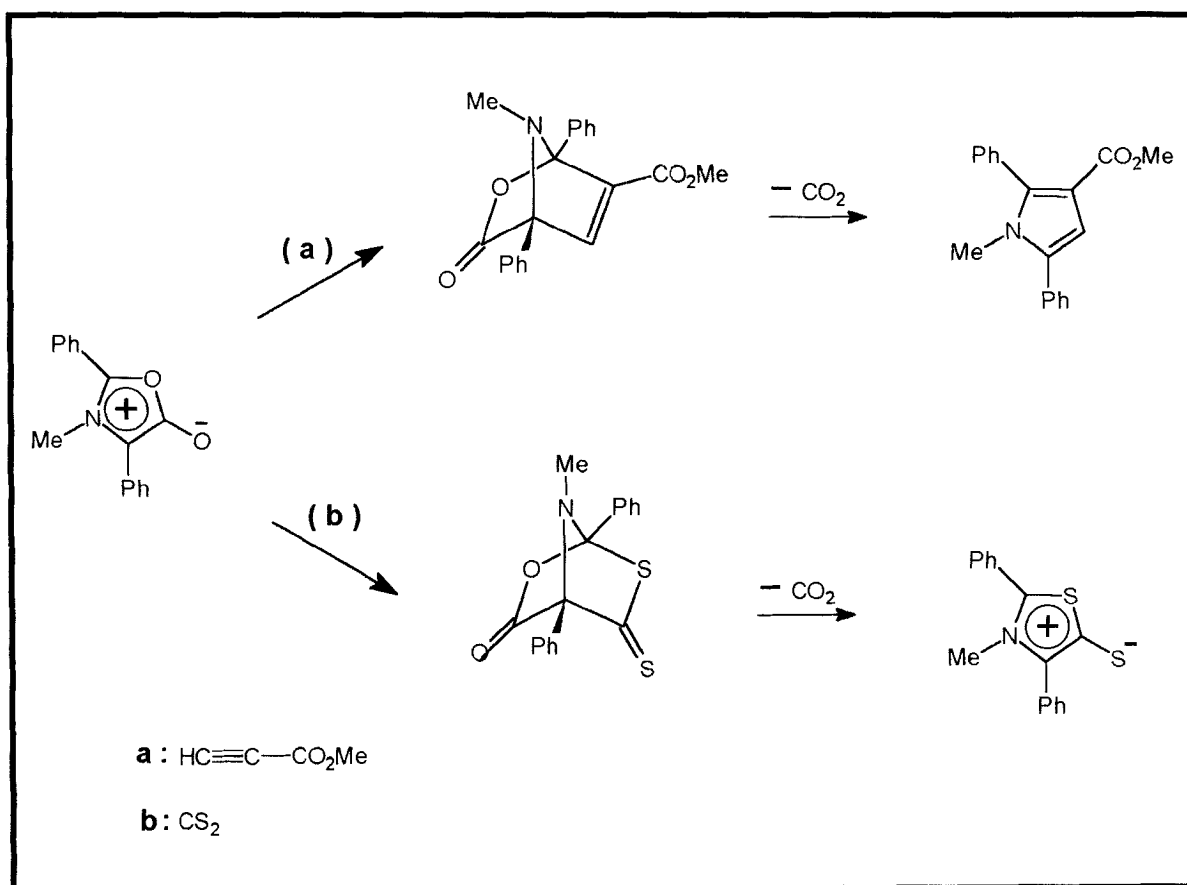


Figura 1.2.1.2 Cicloadição 1,3-dipolar típica de sistemas mesoiônicos do tipo **A**

Já os compostos do tipo B possuem como principal característica a facilidade em sofrerem aanel para abertura do formarem os tautômeros acíclicos⁽¹⁵⁾.

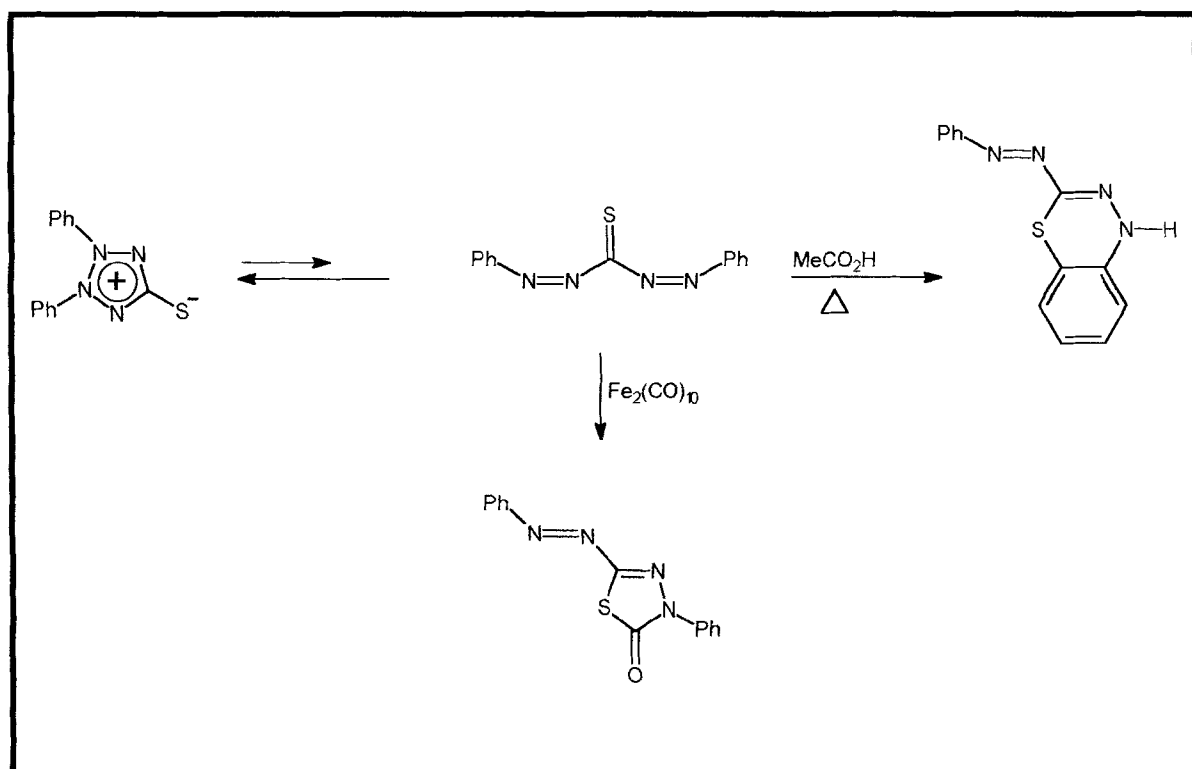


Figura 1.2.1.3 Formação do tautômero acíclico para mesoiônicos do tipo B.

Após diversos estudos teóricos e experimentais a definição de composto mesoiônico está mais apropriada à similar de betaínas mesoméricas. Sendo assim, os mesoiônicos têm sido descritos como "betaínas mesomérico-conjugadas".

A aplicação do conceito de betaína-mesomérica aos compostos mesoiônicos possui limitações uma vez que sua distribuição eletrônica pode ser diferente dependendo das espécies e arranjo dos átomos que constituem o anel e os heteroátomos exocíclicos.

Com o rápido avanço nos últimos anos das técnicas espectroscópicas, novos conceitos e modelos vêm sendo propostos buscando soluções quanto à definição estrutural de várias moléculas orgânicas e, naturalmente, tais conceitos e modelos ora derrubam ora somam-se aos já aceitos anteriormente.

Com os mesoiônicos não haveria de ser diferente, até por que, a discussão a respeito de estruturas definitivas para tais compostos é bastante antiga.

Especificamente para os sistemas 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida e 1,3,4-triazólio-2-tiolato, alguns trabalhos têm sido realizados com o intuito de propor soluções quanto às possibilidades de formas canônicas viáveis. Montanari, em sua tese de doutoramento (16), a partir de cálculos teóricos semi-empíricos e ab initio, R.M.N. de ^{13}C e ^{15}N apresentou uma nova proposta para a representação do ácido conjugado de 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida (9), sugerindo ser essa a forma canônica mais provável para a descrição desta molécula.

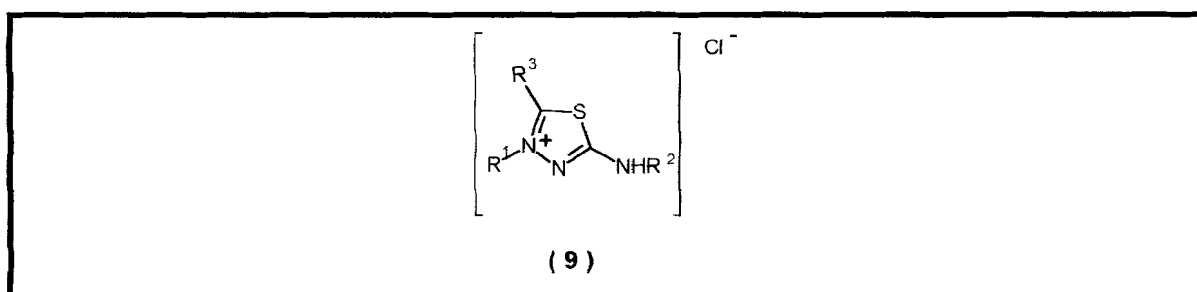
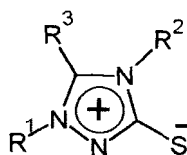


Figura 1.2.1.4 Representação do ácido conjugado 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida proposta por Montanari.

Quanto ao sistema 1,3,4-triazólio-2-tiolato valeria a definição clássica sendo proposta a estrutura abaixo (10):



(10)

Figura 1.2.1.5 Representação do mesoiônico 1,3,4-triazólio-2-tiol proposta por Montanari.

Através de análises por difração de raio-X Echevarria e colaboradores propuseram a partir de experimentos para determinação dos momentos dipolo (17), estudos cinéticos (18) e das evidências espectroscópicas, que as cargas positivas em (11) e (12) estão substancialmente associadas com o átomo de N-4, este ligado ao grupamento fenila, onde a carga negativa, formalmente ligada ao átomo exocíclico está substancialmente deslocalizada sobre o grupamento fenila e o N-3 e um pouco menos, mas ainda significativamente sobre o hidrocloreto em (12).

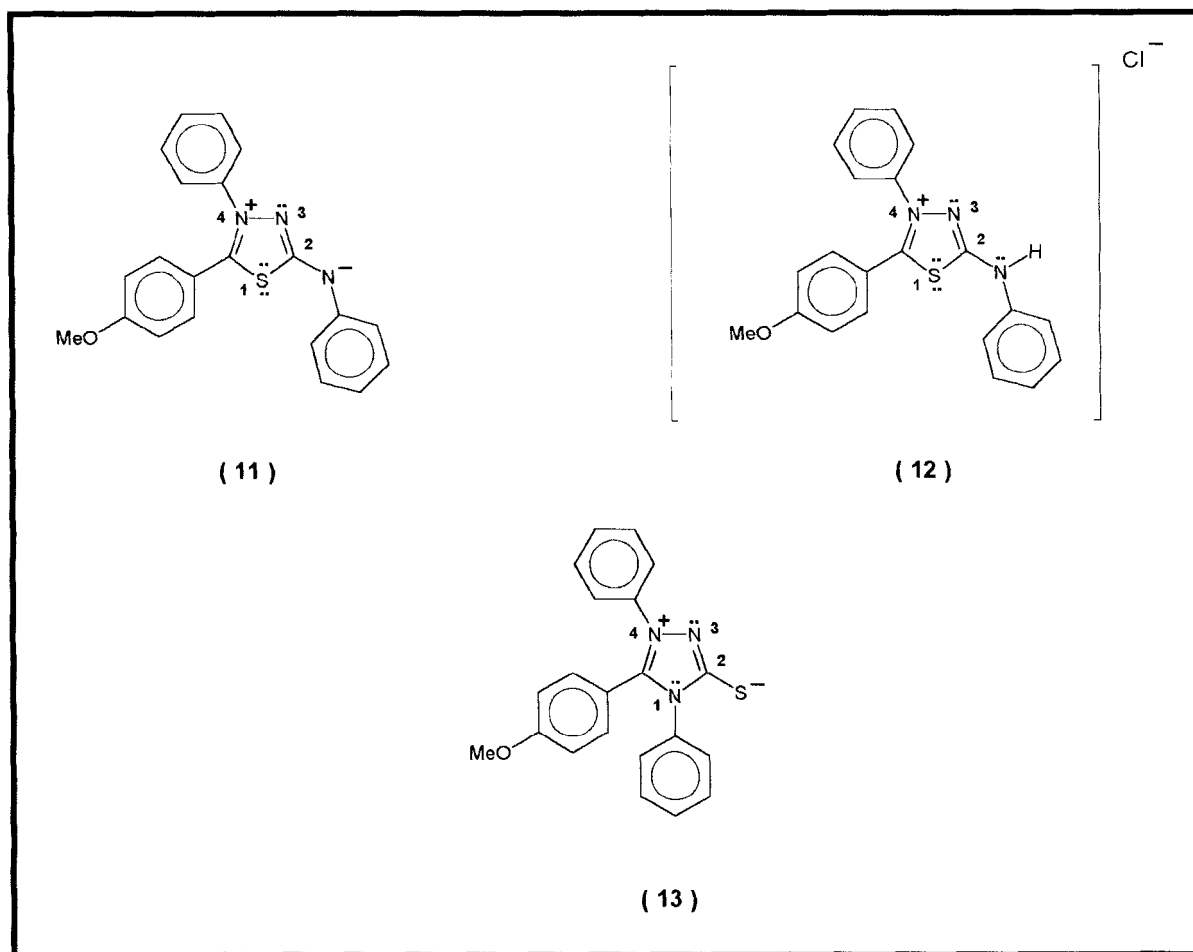


Figura 1.2.1.6 Sugestões feitas por Echevarria quanto à correta representação das cargas sobre sistemas tiadiazólios e triazólios.

Um ponto adicional de grande importância é que o composto mesoiônico (11) rearranja dando o isômero (13) também considerado mesoiônico, o qual é mais estável. No rearranjo, o átomo exocíclico de N de (11) se torna N-1 de (13), enquanto o átomo S -1 de (11) se torna o átomo exocíclico de (13).

Pode-se supor a partir destas evidências que nos compostos (11) e (12):

(a) As ligações de N-3 a N-4 e S-1 a C-2 são mais próximas à ligações simples e que a ligação de S-1 a C-5 parece ser um pouco diferente daquela de S-1 a C-2;

(b) A ligação de C-2 ao N exocíclico tem caráter substancial de ligação dupla - provavelmente mais na base livre (11) do que no seu ácido conjugado (12);

(c) As ligações C-5 a N-4 e C-2 a N-3 têm caráter substancial de ligação dupla;

(d) N-4 tem carga positiva substancial, enquanto N-3 negativa.

Resultados preliminares dos cálculos teóricos estão de acordo com as suposições das evidências químicas e espectroscópicas^(18,19).

1.2.2 Nomenclatura dos Compostos Mesoiónicos

Existem algumas propostas na literatura para nomenclatura dos compostos mesoiônicos. No entanto nem todas atingem o objetivo final de um sistema de nomenclatura, ou seja, traduzir em texto a estrutura de um composto definindo sua "identidade" sem possibilidades de confundi-lo com outro qualquer.

A nomenclatura utilizada pelo Chemical Abstracts está baseada em normas convencionais da IUPAC, onde os mesoiônicos são tidos como compostos derivados de hidróxidos anidros, por exemplo no caso da sidnona:

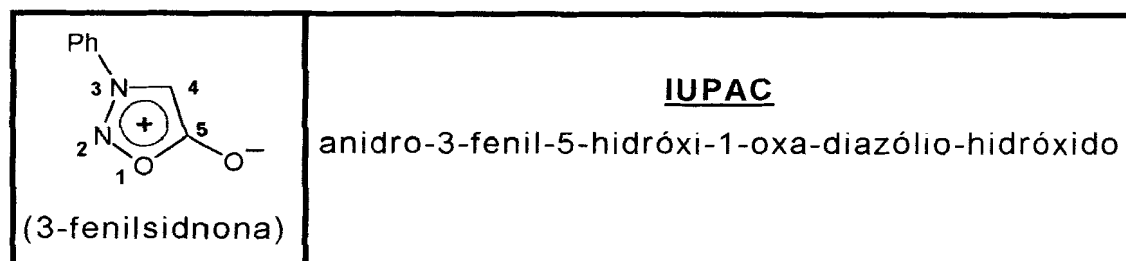


Figura 1.2.2.1 Nomenclatura utilizada pela IUPAC para uma sidnona.

Esta nomenclatura, no entanto, não é satisfatória, pois pode confundir os mesoiônicos com betaínas.

Além desta nomenclatura existem outras que surgiram por pequenas modificações das já propostas. Neste trabalho utilizamos a nomenclatura que nos parece mais adequada, ou seja: primeiramente numeramos os átomos do anel mesoiônico a partir do hétero-átomo que contribui com o elétron-par para complementar o sexteto aromático; depois localizamos os substituintes, os hétero-átomos e finalmente o hétero-átomo ou grupo de átomos exocíclico ao anel mesoiônico. No caso da 3-fenilsidnona portanto:

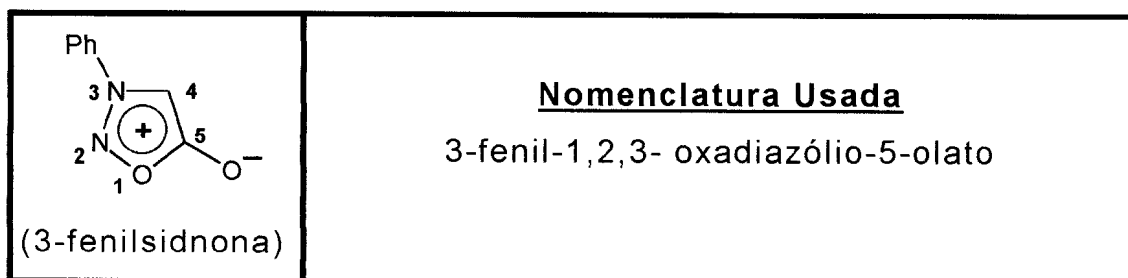


Figura 1.2.2.2 Exemplo da nomenclatura utilizada neste trabalho.

1.3 Síntese dos Sistemas Meso-iônicos

Existem 7 rotas gerais (15) conhecidas para síntese de compostos meso-iônicos que possuem anéis heterocíclicos de cinco membros. Algumas delas no entanto também são úteis para síntese de sistemas de anéis condensados e de seis membros. Essas rotas são:

1.3.1 Ciclodesidratação

Nesta rota usam-se ácidos carboxílicos ou derivados que possuam hidrogênio ligado ao carbono- α e ainda formem no meio reacional um grupo de caráter nucleofugitivo ligado ao carbono carbonílico. Esta reação é uma desidratação do ácido carboxílico correspondente. Dependendo do sistema desejado poderão ser usados agentes desidratantes como dicitloexilcarbodiimida, cloreto de tionila, anidrido acético ou trifluoroacético, etc.

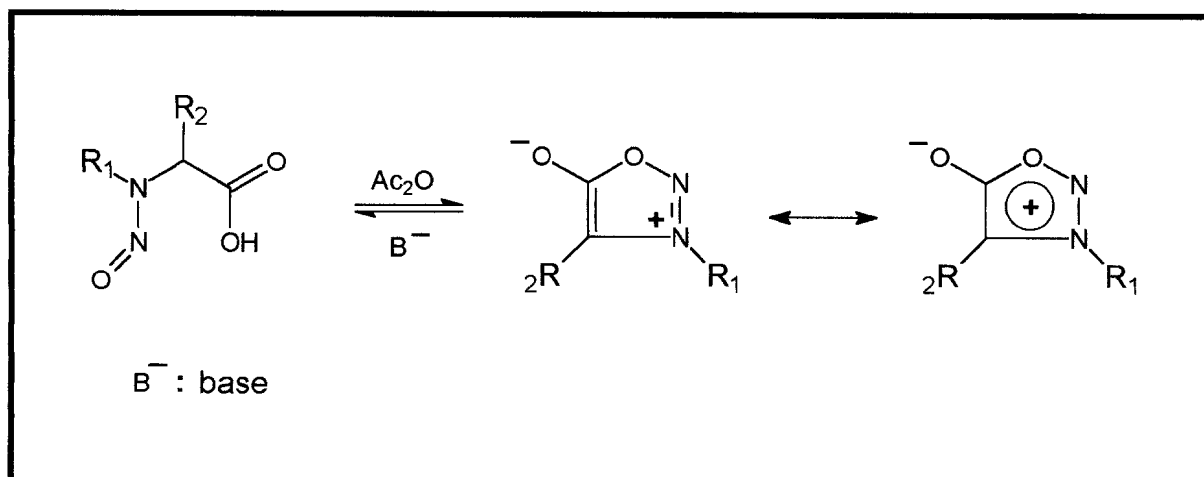


Figura 1.3.1.1 Reação de ciclodesidratação para síntese de sistemas meso-iônicos.

1.3.2 Ciclizações Envolvendo Nitrilas

Neste caso a etapa de ciclização envolve uma adição nucleofílica ao grupo nitrila.

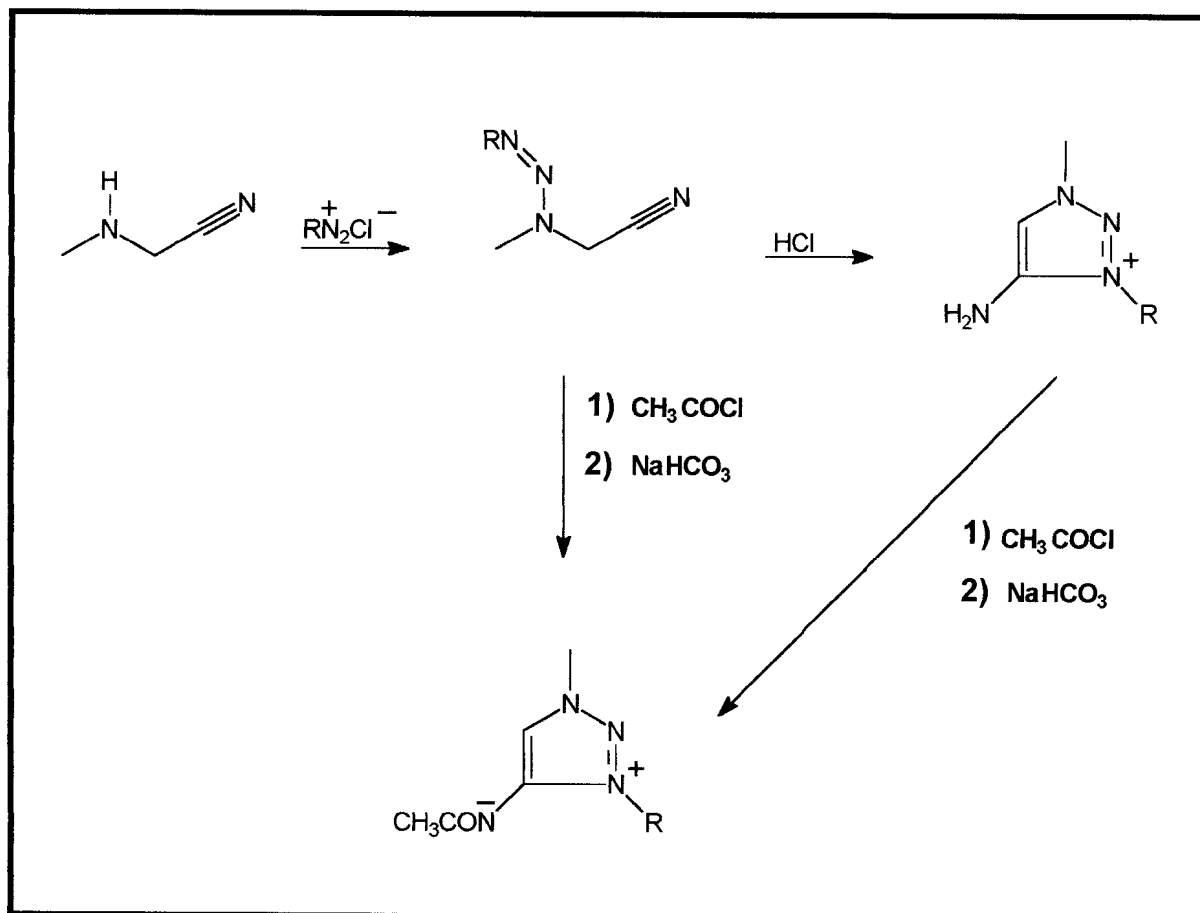


Figura 1.3.2.1 Reação de ciclização envolvendo nitrilas.

1.3.3 Ciclizações Envolvendo Tioacilhidrazinas N,N-substituídas

Consiste na ciclização de hidrazinas N,N-substituídas com fosgênio, tiofosgênio, cloretos de ácidos, etc. sendo usado para formação de sistemas mesoiônicos com diazo- ou triazo-anéis.

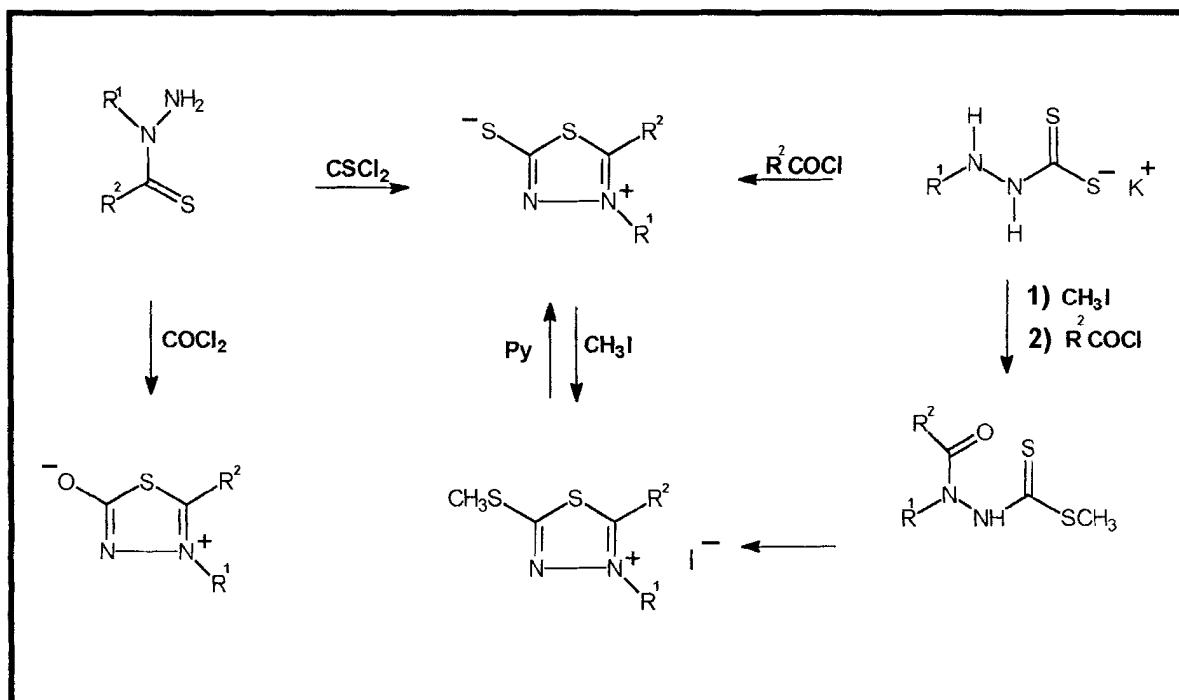


Figura 1.3.3.1 Ciclização envolvendo hidrazinas N,N-substituídas.

1.3.4 Formação a Partir de Cátions Heterocíclicos

Cátions heterocíclicos podem ser usados na formação de compostos mesoiônicos. Na maioria das vezes ocorre uma desprotonação ou desalquilação de sistemas heterocíclicos quaternários formando os sistemas mesoiônicos correspondentes.

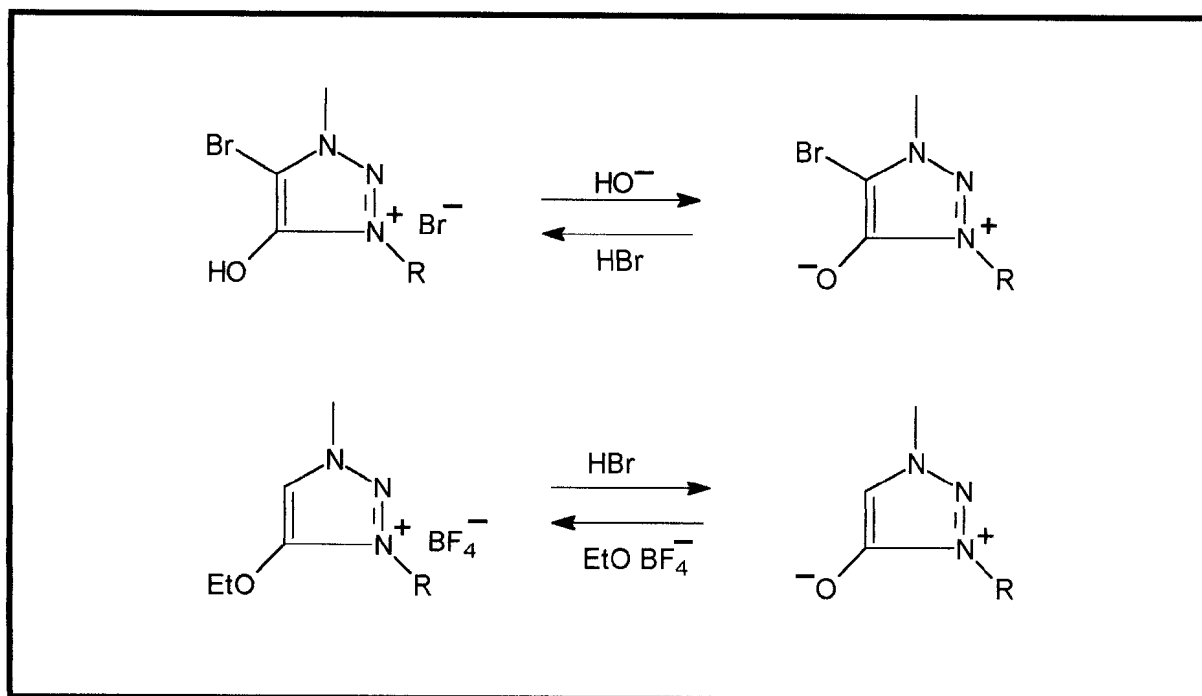


Figura 1.3.4.1 Formação a partir de cátions heterocíclicos.

1.3.5 Interconversão de Sistemas Meso-iônicos

Esta rota tem sido utilizada principalmente para síntese de sistemas meso-iônicos de difícil obtenção por outros métodos. Existem várias maneiras de realizarmos a interconversão, algumas delas estão esquematizadas abaixo:

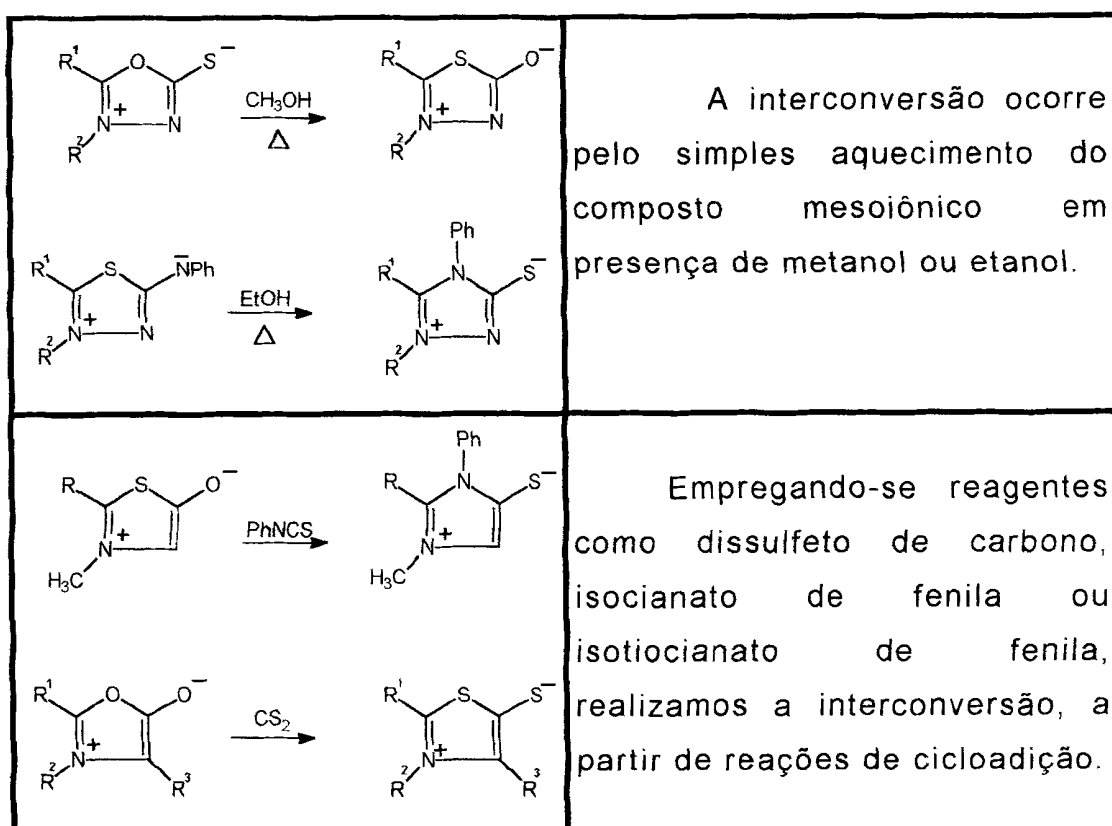


Figura 1.3.5.1 Interconversão de sistemas meso-iônicos.

1.3.6 Reações de Espécies Binucleofílicas Monoprotônicas com 1,2-Bieletrófilos.

Eletrófilos bifílicos, como os cloretos de α -bromoacila, são utilizados nas reações com diferentes nucleófilos ambidentes. A partir dessas reações pode ser obtida uma série de sistemas mesoiônicos com uma grande variedade de substituintes.

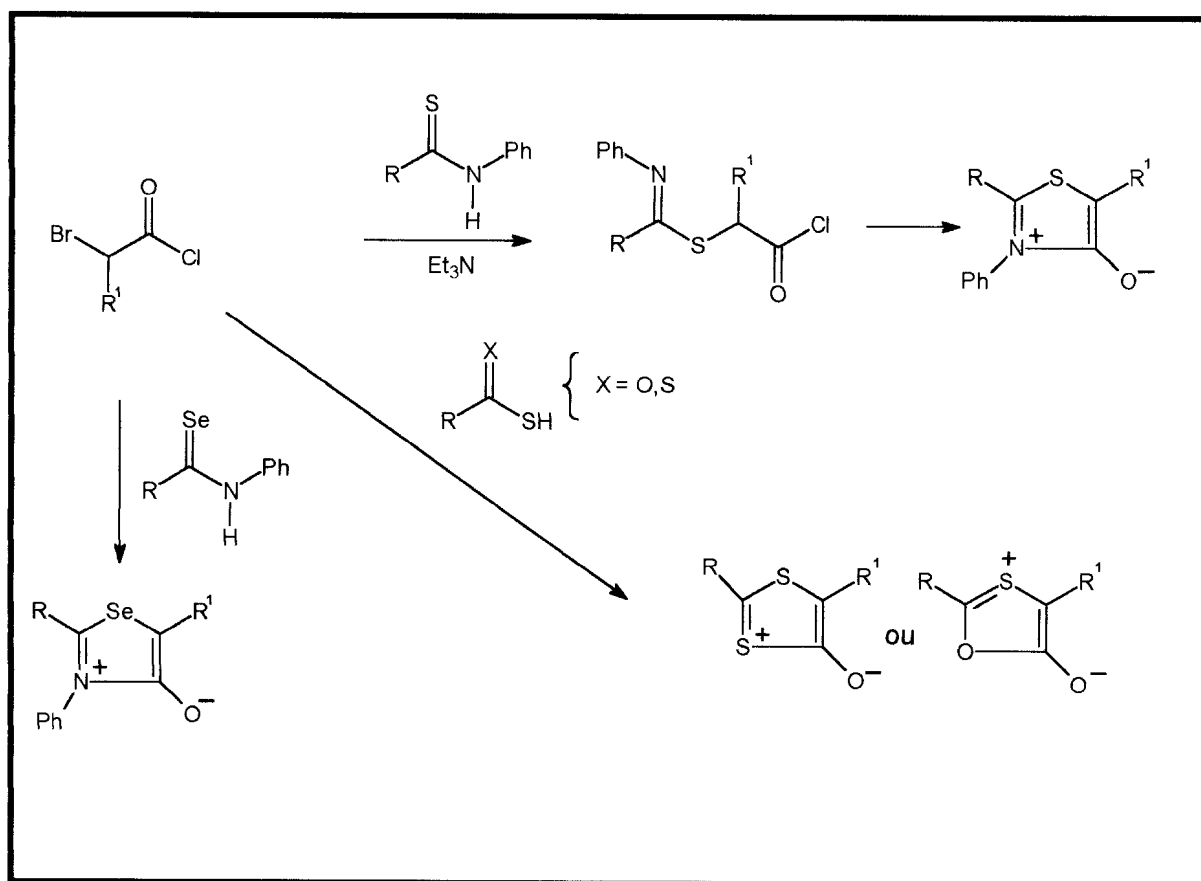


Figura 1.3.6.1 Reação de espécies binucleofílicas monoprotônicas com 1,2-bieletrófilos.

1.3.7 Reação de Anidroacilação da 1,4-Difeniltiossemicarbazida.

Esta reação é específica para a síntese de sistemas do tipo 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina e 1,3,4-triazólio-2-tiol, sendo a formação de um ou outro produto derivada das condições reacionais, e ainda pode-se isomerizar o composto (A) ao composto (B).

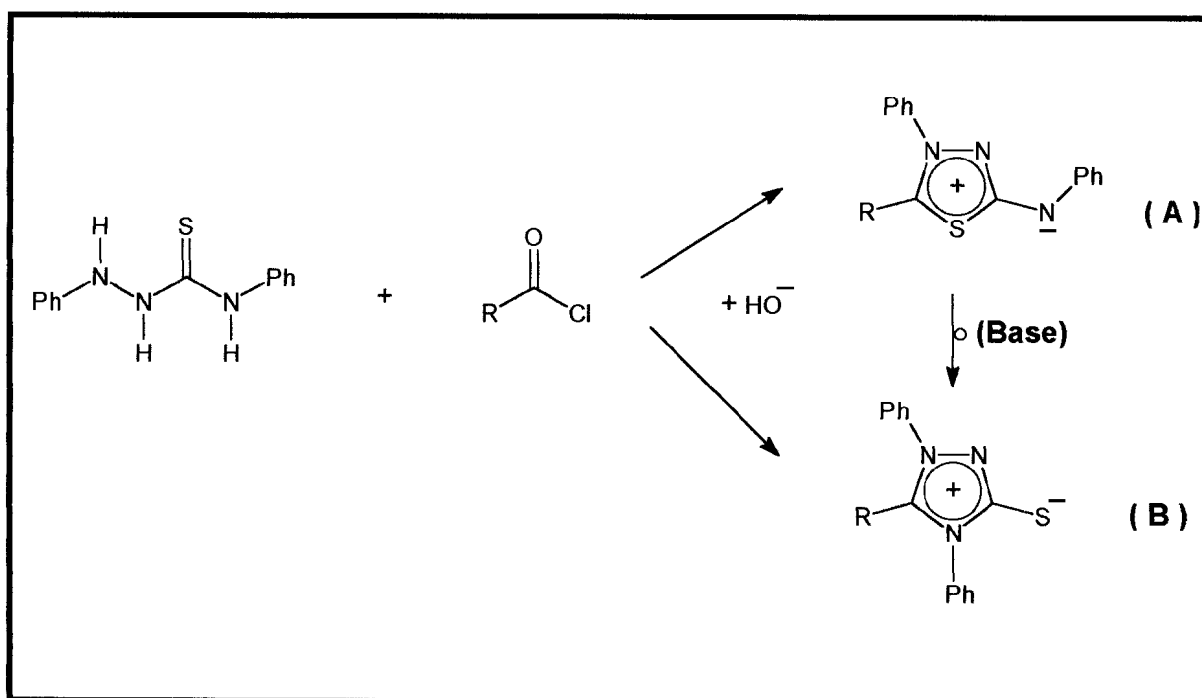


Figura 1.3.7.1 Reação de anidroacilação da 1,4-difeniltiossemi-carbazida.

Esta foi a rota escolhida no presente trabalho, sendo que visamos mais a síntese dos sais heterocíclicos do sistema 1,3,4-tiadiazólio, sendo os mesmos obtidos na etapa anterior à adição da base

1.4 Fotoquímica : Alguns Aspectos Básicos

1.4.1 Luz e Matéria

A natureza da luz é algo que impressiona o homem desde a antiguidade. Ela figura como referencial religioso em várias culturas, nas mais variadas etnias, sempre associada às divindades que de alguma forma eram tidas como "iluminadas", graças ao seu potencial gerador de vida. Biblicamente, o relato da criação inicia-se pela frase: "E disse Deus: haja luz, e houve luz", e, após o aparecimento da luz, o surgimento da vida. Através desta descrição, o argumento do cético ressaltaria a grande capacidade intuitiva e de observação inerentes à espécie humana, ao passo que o crédulo atribuiria à revelação divina o fato, hoje incontestado, de que a vida, como nós a conhecemos não teria, provavelmente, surgido em nosso planeta sem que antes houvesse surgido a luz.

As plantas verdes, usando a luz solar como fonte de energia através do processo de *fotosíntese*, convertem dióxido de carbono e água em moléculas orgânicas associadas à vida; o oxigênio gasoso também aparece como um dos produtos. Ao mesmo tempo, as plantas verdes reconstróem o mundo orgânico que é continuamente destruído pelos organismos heterotróficos. A vida neste planeta, portanto, está na dependência completa da luz.

A *fotosíntese* não é o único processo biológico influenciado pela luz. A visão de todos os animais é estimulada por energia luminosa, que impressiona células especializadas em seus olhos. O movimento de plantas e de certos animais para (*fototropismo*) ou contra (*fotofofobismo*) a luz e muitos outros fenômenos biológicos rítmicos demonstram que a energia luminosa é de importância preponderante no funcionamento dos organismos.

A "luz" é comumente associada ao que pode ser visto pelo olho. No entanto, o conceito real de luz não significa apenas a radiação que é visível a "olho nu". A distinção entre os vários tipos de radiação luminosa é feita por conveniência; todas as radiações do espectro eletromagnético representam um único fenômeno e suas distinções são somente as de comprimento de onda e energia do fóton.

A princípio julgava-se que a luz possuía um comportamento corpuscular. Isaac Newton observou que um raio de luz solar ao passar por um prisma de vidro, se dissocia em suas cores componentes: vermelho, alaranjado, amarelo, verde, azul e violeta, e, ao passar por um segundo prisma as luzes coloridas se recombinarão dando luz branca. Deste experimento, Newton concluiu que a luz branca é composta de muitas cores que podem ser separadas em unidades ou partículas distintas. Todavia, quando foi apresentada a evidência de que os raios luminosos poderiam propagar-se de maneira análoga às das ondas que se formam ao atirar-se uma pedra sobre a superfície de um lago, a teoria corpuscular ou de partículas foi rejeitada em favor de uma teoria ondulatória.

Não obstante, numerosos experimentos têm revelado que a luz se assemelha à partículas materiais comuns. Observou-se que quando a luz atingia placas de certos metais, eram emitidos elétrons e que a velocidade destes não era influenciada pela intensidade da luz, estando esta relacionada à quantidade de elétrons emitidos. O efeito fotoelétrico levou Einstein a sugerir que a luz existe na forma de partículas chamadas por ele de fótons ou quanta de energia. Anteriormente Max Planck ao estudar a radiação emitida pelos corpos quentes, descobriu uma constante fundamental que relaciona frequência com energia. Essa constante, h , é necessária para fornecer as energias adequadas ao efeito fotoelétrico.

A energia, E , de um *fóton* pode ser calculada pela equação:

$$E = h\nu \quad (\text{equação 1})$$

onde ν é a frequência e h é a constante de Planck. A frequência tem sua significação comum, normalmente expressa como o número de vibrações por segundo.

Consideremos, a título de comparação, as ondas formadas na superfície de um lago ao atirmos uma pedra. Forma-se uma onda próxima ao ponto de impacto. Se atirmos pedras repetidamente, formar-se-ão ondas múltiplas; quanto mais depressa atirmos as pedras, mais próximos estarão os picos de duas ondas contíguas. Essa distância entre os picos de duas ondas é o comprimento de onda. A frequência é definida como sendo a divisão entre a velocidade de propagação sobre o comprimento de onda. Admitindo-se que a velocidade de propagação permaneça constante, é claro que quanto menor for o comprimento de onda, maior é a frequência. No caso da luz, podemos modificar a equação de energia de um fóton para a seguinte expressão:

$$E = hc/\lambda \quad (\text{equação 2})$$

onde c é a velocidade de propagação da luz no vácuo ($\approx 3 \times 10^{23}$ cm/s), e λ é o comprimento de onda da luz em centímetros. O valor de h é $6,624 \times 10^{-27}$ erg.s⁻¹. Através desta fórmula, podemos portanto, calcular a energia relacionada a cada comprimento de onda específico de uma determinada radiação do espectro luminoso. Observamos ainda que o traço de união entre as teorias da luz, corpuscular e ondulatória, reside no fato da energia dos fótons ser diretamente proporcional à frequência das ondas luminosas.

1.4.2 Estados Excitados da Molécula

A matéria interage com a luz considerando-se a forma como os elétrons presentes em uma determinada substância são afetados por uma radiação luminosa de comprimento de onda específico. A impossibilidade de se afirmar a posição exata de um elétron em relação a um núcleo de um átomo qualquer (princípio da incerteza de Heisenberg), associada ao fato de que este elétron existe em algum ponto ao redor deste núcleo, e ainda, atribuindo-se a este um caráter corpuscular e ondulatório, fez com que Schrödinger propusesse que a distribuição dos elétrons em torno do núcleo fosse considerada de forma estatística. Ou seja, quanto à probabilidade de um determinado elétron se encontrar num determinado tempo infinitesimal numa região específica ao redor do núcleo. E ainda, através da associação do comportamento do elétron com o comportamento ondulatório (postulado de de Bröglie), determina-se o movimento deste elétron baseado em equações de onda. A junção do fator estatístico (relacionado ao princípio da incerteza) e do fator mecânico (equações de onda) está expressa na famosa equação de Schrödinger:

$$\hat{H} \Psi (\mathbf{x},\mathbf{y},\mathbf{z}) = E \cdot \Psi (\mathbf{x},\mathbf{y},\mathbf{z}) \quad (\text{equação 3})$$

onde Ψ representa uma equação de onda relacionada a uma determinada região no espaço tridimensional onde existe a probabilidade de se encontrar um determinado elétron (é a esta região que chamamos de *orbital*), E é a soma das energias cinética e potencial de uma partícula e \hat{H} é o operador hamiltoniano introduzido durante a dedução desta equação.

Não é de nosso interesse um aprofundamento em mecânica quântica, sendo que obviamente lançaremos mão de alguns conceitos caso sejam necessários a uma argumentação teórica.

Na forma como está descrita acima, a equação de Schrödinger não relaciona a variável tempo podendo portanto ser utilizada somente considerando-se estados estacionários. Variações desta equação relacionando a variável tempo ao estado de energia do elétron podem ser utilizadas para compreendermos os estados transitórios de um elétron após absorver energia oriunda de um fóton.

Os estados de energia de um elétron estão associados ao tipo de orbital que o elétron pode ocupar após a irradiação.

Tal interação relaciona-se tanto com a natureza corpuscular quanto ondulatória da luz. O fóton ao se "chocar" com um elétron transfere sua energia fazendo com que este elétron passe de um estado de energia fundamental para um excitado. A passagem de um elétron do estado fundamental ao excitado nós chamamos de transições. As transições correspondem à excitação de um elétron de um orbital molecular totalmente ocupado (usualmente um orbital p não ligante ou um orbital p ligante) a um orbital de energia superior (geralmente o primeiro orbital antiligante p^* ou s^*).

A energia total de uma molécula corresponde à soma de suas energias de ligação ou energia eletrônica, vibracional e rotacional, e quando uma molécula absorve radiação, sua energia aumenta em uma quantidade igual à cedida pelo fóton como expressa a equação (1).

Se uma molécula absorve um fóton de uma fonte que irradia na região do ultravioleta (VIS), suas energias eletrônica, vibracional e rotacional serão modificadas. Após a absorção, a molécula excitada pode voltar ao seu estado fundamental devolvendo o excesso de energia na forma de calor (emissão não radiativa) ou como radiação fluorescente e fosforescente (emissões radiativas).

O processo de absorção de energia pode, em alguns casos, ser descrito pela lei de Lambert-Beer, a qual estabelece que a fração de luz incidente que é absorvida por uma amostra, é proporcional ao número de moléculas encontradas em seu caminho.

Esta lei é expressa como:

$$\log_{10} (I_0/I) = \epsilon \cdot l \cdot c = A \text{ (equação 4)}$$

onde I_0/I representa a razão entre a fração de luz que incide sobre uma determinada amostra e a que emana ao final do caminho percorrido pela luz (caminho óptico), ou a absorbância propriamente dita (A); ϵ é o coeficiente de absorção; c , a concentração do soluto e l o comprimento da cubeta. Se c se expressa em moles por litro (M) e l em centímetros, o coeficiente de absorção passa a ser denominado como coeficiente de extinção molar.

A lei de Lambert-Beer no entanto é falha. Hoje em dia sabe-se que a densidade ótica de uma determinada solução varia de acordo com a concentração do soluto conseqüentemente variando seu coeficiente de extinção molar. Os desvios podem estar associados à uma série de causas como por exemplo: associação molecular do soluto a altas concentrações; ionização do soluto no caso de ácidos, bases ou sais; fluorescência do soluto; etc.

A lei de Lambert-Beer só pode ser utilizada para determinações quantitativas, uma vez comprovada sua validade caso a caso, considerando-se o solvente e o intervalo de concentrações utilizados.

No presente trabalho, graças ao caráter exploratório do mesmo, nosso interesse foi qualitativo sendo portanto considerada a lei para os cálculos pertinentes. Um tratamento mais aprofundado pode ser consultado na referência (21).

A fluorescência é o processo de emissão de luz que acompanha a transição espontânea de uma molécula ou de um átomo. Quando a molécula absorve luz, ela pode passar do seu estado singlete fundamental (S_0), a um estado excitado (S_1 , S_2 , S_3 , T_1 , T_2 , T_3 ; observar no diagrama de Jablonski) o qual sofre desativação por mecanismos diversos, como, por exemplo, transferindo parte de sua energia de excitação por colisão com outras moléculas (decaimento não radiativo), ou por emissão de radiação luminosa (decaimento radiativo), que acompanha a transição do estado excitado até os níveis de vibração do estado fundamental. Este processo de emissão se denomina *luminescência*, e pode ocorrer diretamente em um tempo da ordem de 10^{-9} segundos, ou através de um estado metaestável em um intervalo de tempo muito maior (da ordem de $\sim 10^{-3}$ segundos). O estado metaestável possui menor energia que o estado singlete excitado e recebe o nome de "estado triplete" sendo representado pela letra T com seus respectivos índices relacionados aos níveis de energia atingidos. O primeiro processo se denomina fluorescência e o segundo fosforescência⁽²⁰⁾.

Quase todas as substâncias que possuem absorção seletiva são luminescentes; e com uma eleição cuidadosa das condições físicas e químicas, pode se observar emissão radiativa em todos os estados da matéria. Nos sólidos e líquidos, as moléculas excitadas perdem facilmente parte de sua energia absorvida na forma de calor em função dos choques com outras moléculas. A lei de Stokes, baseada neste fato, estabelece que o comprimento de onda de emissão fluorescente tem de ser maior que o comprimento de onda da luz de excitação⁽²²⁾.

A fluorescência normal bem como a fosforescência são processos monomoleculares que decaem de acordo com a lei exponencial:

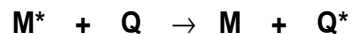
$$I = I_0 \cdot \exp.(-t/\tau) \text{ (equação 5)}$$

onde I é a intensidade da luz de emissão no tempo t após cessar a excitação, com luz de intensidade I_0 , e τ é o período médio de decaimento, que representa o tempo requerido para que a intensidade da emissão varie em $1/\exp.(/0)$.

A fluorescência pode ser fortemente afetada por fatores químicos e físicos que interfiram na emissão de um determinado composto provocando uma diminuição da intensidade, duração da emissão ou alargamento das bandas no espectro. Este fenômeno recebe o nome de supressão (quenching) da fluorescência. A presença de porções da molécula que possam dissipar a energia de excitação na forma de calor, também contribui para um processo de redução da intensidade de fluorescência. Um exemplo que pode ser citado é o nitro benzeno, onde a presença do grupamento NO_2 simplesmente anula a fluorescência apresentada pelo anel aromático não substituído⁽²³⁾.

Os principais mecanismos de supressão podem ser descritos de forma simplificada como sendo:

- Supressão por transferência de energia \Rightarrow quando uma molécula quencher (Q) no seu estado fundamental, aproxima-se de uma outra molécula qualquer em seu estado excitado (M^*), e, sendo a energia do estado excitado do supressor (Q^*) menor que a de M^* , ocorre transferência de energia de M^* para Q segundo o esquema abaixo:



processos de desativação radiativos e não radiativos de Q^* para Q complementam o processo de supressão;

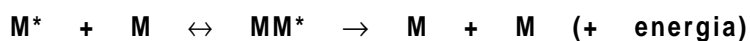
- Supressão por transferência de elétron \Rightarrow moléculas neutras podem ser ionizadas à partir da interação de uma delas no estado excitado M^* com outra no estado fundamental Q, sendo que o retorno à neutralidade ocorre de forma não radiativa:



- Efeito do átomo pesado \Rightarrow o efeito do átomo pesado é observado quando temos um átomo de alto peso molecular diretamente ligado à molécula com propriedades luminescentes (efeito interno), ou no ambiente próximo à mesma (efeito externo);

•Supressão paramagnética \Rightarrow campos magnéticos externos oriundos de moléculas com propriedades paramagnéticas possuem um efeito similar ao do átomo pesado. A molécula de $^3\text{O}_2$ é uma espécie paramagnética das mais comuns para a observação deste efeito;

•Supressão por concentração \Rightarrow o incremento na concentração de soluto, em alguns casos, promove a supressão de fluorescência por mecanismos ainda pouco esclarecidos. Supõe-se à formação de um exímero (dímero formado pelo estado excitado com o fundamental para o mesmo tipo de molécula) instável que se dissociaria sem emissão de luz:



Os espectros de emissão de fluorescência, podem fornecer-nos informações importantes quanto a natureza de um determinada molécula, sendo da mesma natureza que as do espectro de absorção.

1.4.3 Estudos de Fluorescência de DNA

A natureza dinâmica da ligação de micro moléculas a biopolímeros, representa uma área de ativas investigações. Estudos dirigidos através da modelagem de reagentes, de conformações e sítios específicos prevê rotas sintéticas como um meio para desenvolver sondas químicas sensitivas. Um exemplo simples é dado pela intercalação de heterociclos no DNA. A intercalação, por exemplo de um corante, entre os pares de bases nitrogenadas adjacentes é particularmente favorecida por espécies carregadas positivamente e quando possuem unidades aromáticas planares. Os intercaladores tendem a ser fortemente mutagênicos e alguns têm demonstrado promessa de atividade quimioterapêutica⁽²⁴⁾.

Recentemente o reconhecimento da sequência do DNA por drogas como também por micro moléculas que são conjugadas a peptídeos ou oligonucleotídeos são de grande interesse. Estudos da interação com varias destas pequenas moléculas são valiosos para buscar a síntese racional de drogas.

Moléculas providas de carga positiva possuem uma afinidade muito grande pela cadeia de fosfato do DNA através de interações eletrostáticas. Sistemas π tendem a se locomover entre as bases pareadas, intercalando-se à dupla hélice do DNA interagindo desta forma com o interior da cadeia⁽²⁵⁾.

Trabalhos com complexos de rutênio demonstraram uma capacidade de intensificação das bandas de emissão de fluorescência tanto dos compostos de rutênio quanto da biomolécula após a adição de DNA de timo de bezerro⁽²⁶⁾.

As informações, tanto quantitativas quanto qualitativas oriundas da interpretação dos espectros de emissão, fornecem importantes dados quanto a estrutura do DNA ajudando-nos a descrever a natureza das interações possíveis entre a cadeia do ácido nucleico e toda sorte de micromoléculas que apresentem características de intercalação entre a dupla hélice. Os mecanismos de supressão, no entanto, só podem ser devidamente esclarecidos através de medidas quantitativas⁽²⁷⁾.

Medidas qualitativas de emissão de fluorescência são utilizadas para indicar, sem sombra de dúvida a possibilidade, ou não, de um determinado composto vir a ser utilizado como sonda em materiais biológicos, indicando, por exemplo, possíveis interações entre o DNA e a micromolécula^(28,29).

1.4.4 Fotoquímica dos Mesoionicos

Até o presente momento não foi relatado nenhum trabalho na literatura específico quanto à fotoquímica e/ou fotofísica para os sistemas mesoionicos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida ou 1,3,4-triazólio-2-tiolato. No entanto alguns trabalhos (16,30) citam a possibilidade de que os sistemas 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida sofram isomerização fotocatalizada formando o sistema 1,3,4-triazólio-2-tiolato.

Sem dúvida alguma, os sistemas que mais foram estudados fotoquimicamente foram as sidnonas.

A irradiação destes tipos de compostos no estado estacionário, tanto a temperatura ambiente quanto a baixa temperatura leva à eliminação de fragmentos reativos tais como nitrilaminas,⁽³¹⁾.

Estudos por fotólise de pulso em sidnonas e derivados mostraram que estes compostos, em solução, formam estado triplete excitado por transferência de energia de doadores convenientes, os quais apresentam tempo de vida em torno de $1\mu\text{s}$. Tais tripletes são fotoquimicamente inativos, não levando à formação de nitrilaminas. Por outro lado, estudos de supressão de tripletes de sidnonas por oxigênio mostraram a formação de oxigênio singlete em rendimentos quantitativos⁽³²⁾.

A geração de $^1\text{O}_2$ é de fundamental importância pois sabe-se que moléculas de DNA são quebradas pela reação com o oxigênio singlete^(33,34). Estudos mais recentes comprovaram que o estado triplete excitado de alguns compostos mesoionicos é suprimido por oxigênio, via mecanismo de transferência de energia⁽³²⁾.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Aparelhos e Materiais

2.1.1 Aparelhos

a) Espectrômetros

i) Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetro Bruker modelo AC 200, operando a 200 MHz para ^1H e 50,3 MHz para ^{13}C .

ii) Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer 1420, calibrado com filme de poliestireno a 1600 cm^{-1} .

ii) Os espectros de absorção na região do UV/VIS foram obtidos em espectrômetro modelo DMS-80 da Varian.

ii) Os espectros de fluorescência foram obtidos em espectrofluorímetro Hitachi modelo F 4500.

b) Pontos de Fusão

Os pontos de fusão foram determinado utilizando-se aparelho MEL-TEMP II com tubos capilares, e não foram corrigidos.

d) Computador

Foi utilizado o software MicroCal Origin 2.8 for Windows em um microcomputador tipo PC-486 (100MHz) para confecção dos gráficos correspondentes aos espectros de UV/VIS e fluorescência.

2.1.2 Materiais

a) Solventes

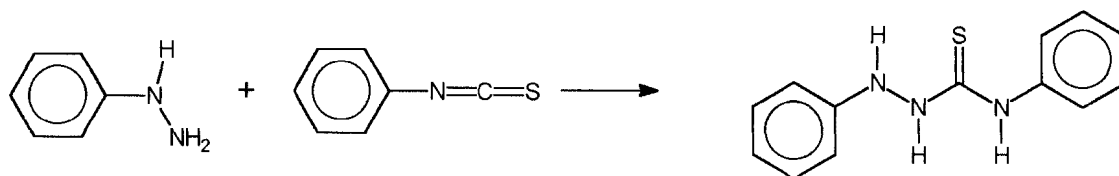
i) Todos os solventes utilizados nas sínteses, recristalizações e cromatografia em camada fina foram de grau PA, sendo os seguintes: éter, benzeno (ambos da Merck), 1,4-dioxano, etanol, metanol e diclorometano (todos da VETEC). Os solventes utilizados na reação de Grignard e nas cromatografias foram devidamente purificados⁽³⁵⁾.

ii) As soluções para as determinações espectroscópicas foram preparadas com os seguintes solventes:

- RMN de ^1H e ^{13}C \Rightarrow em CDCl_3 ;
- Infravermelho \Rightarrow foram utilizadas pastilhas de KBr;
- UV/VIS e Fluorescência \Rightarrow em acetonitrila (grau espectroscópico) da marca Aldrich para os compostos MICOS e BMICOS; solução tampão de fosfato 1 mM (pH 7,0) e 5mM de Na_2SO_4 (preparada com água recém destilada e deionizada) para o DNA de timo de bezerro.

2.2 Sínteses

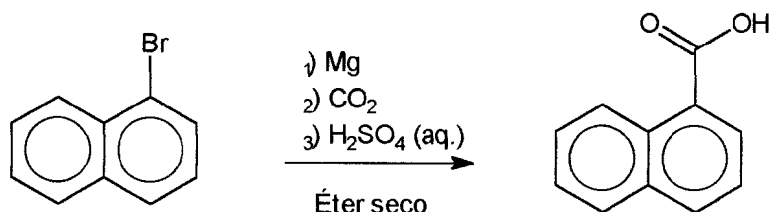
2.2.1- Síntese da 1,4-difeniltiossemicarbazida



Utilizou-se um balão de 250 ml com três bocas e agitação magnética ao qual foram adicionados 7,10 mmoles (7ml) de fenilhidrazina acrescido a seguir de 5,32 mmoles (6,3ml) de isotiocianato de fenila derramado em pequenas frações. A reação é bastante exotérmica ocorrendo quase instantaneamente sendo o produto cristalizado assim que é formado.

Os cristais foram então filtrados e lavados a frio com tolueno seguido de éter etílico. Foram obtidos 10g de cristais brancos com P.F.: 175-176°C (lit.:⁽³⁶⁾= 176°C) e rendimento bruto de 94%.

2.2.2 - Síntese do ácido α -naftóico



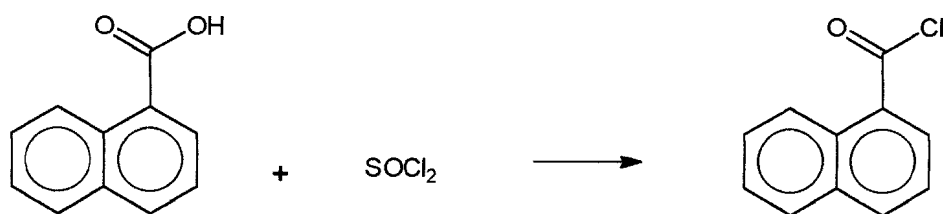
O ácido α -naftóico foi preparado através da síntese de Grignard.

Utilizou-se um balão de 100ml com três bocas (com condensador de refluxo, funil de adição e tubo dessecador) e agitação magnética, ao qual foram adicionados raspas de Mg seco, um cristal de I_2 , 5ml de éter seco (CaCl_2 , Na) e 3.54 mmoles de α -bromonaftaleno (0,5ml). A mistura foi ligeiramente refluxada dando início à reação, sendo adicionada a seguir, aos poucos, uma solução de 6,5 ml de α -bromonaftaleno em 30 ml de éter seco. Após duas horas de reação a mistura foi novamente refluxada por mais 40 minutos. Findo este tempo, foram adicionados mais 30 ml de benzeno seco (CaCl_2/Na) ao líquido morno, com o intuito de solubilizar completamente o reagente de Grignard. O balão foi então resfriado em banho de gelo e sal. Nesta etapa o funil de adição foi então substituído por um termômetro (com o bulbo imerso no meio reacional). Quando a temperatura caiu a -7°C , introduziu-se CO_2 (oriundo de um gerador com $\text{K}_2\text{CO}_3 + \text{HCl}$) pelo tubo dessecador onde foi feita uma adaptação para que o gás fosse borbulhado na solução contendo o reagente de Grignard. O fluxo do gás foi constantemente controlado visando impedir que a temperatura do sistema não ultrapassasse os -2°C . Após mais duas horas de reação a solução foi tratada com H_2SO_4 a 25% em água até o consumo total do Mg residual.

A camada aquosa foi então lavada com três porções de 30 ml de éter, sendo os extratos etéreos reunidos e tratados com solução de NaOH a 25% em água. Os extratos alcalinos ($\text{pH} \approx 14$) foram então acidificados com solução de H_2SO_4 a 50% em água, precipitando então o ácido α -naftóico, que foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada. Foram obtidos assim 4,7g de produto sendo o rendimento bruto de 54,7%. O ácido foi recristalizado em tolueno a quente obtendo-se cristais branco acinzentados com P.F.: de 159°C (Lit⁽³⁵⁾.: 160°C).

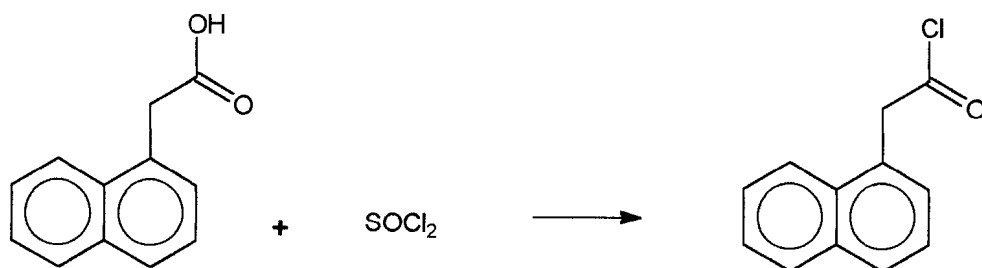
Obs.: O ácido foi caracterizado por RMN^1H e RMN^1C (Figuras 3.2.32 e 3.2.33 respectivamente).

2.2.3 - Síntese do cloreto de α -naftoíla



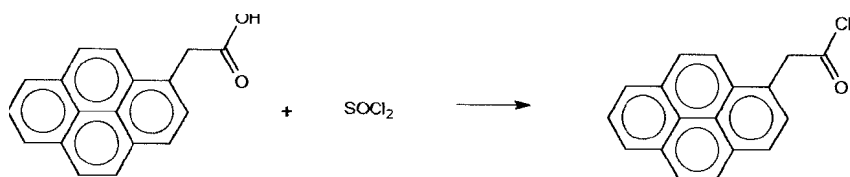
Colocou-se em um balão de 25 ml com agitação magnética, 11,6 mmoles (2,0 g) do ácido α -naftóico mais 48,0 mmoles (6ml) de SOCl_2 . Refluxou-se por 5 horas até que todo o ácido fosse convertido no respectivo cloreto. O SOCl_2 foi então evaporado a pressão atmosférica obtendo-se como produto 1,98g de um óleo amarelo alaranjado. O rendimento da reação foi de 90%.

2.2.4 - Síntese do cloreto de α -naftilacetoíla



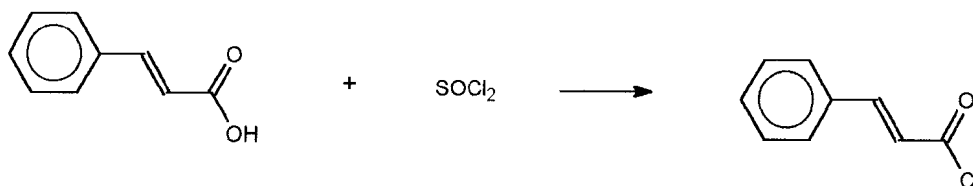
Colocou-se em um balão de 50 ml com agitação magnética, 10,7 mmoles (2,0 g) de ácido α -naftilacético mais 48,0 mmoles (6ml) de $SOCl_2$ em 20ml de benzeno anidro ($CaCl_2/Na$). Refluxou-se por 4 horas. O excesso de $SOCl_2$ e o benzeno foram destilados a pressão atmosférica ficando ao final um óleo amarelo alaranjado escuro, que, por cromatografia em camada fina (eluente $CH_2Cl_2/MeOH$, 9:1), demonstrou haver ácido não reagido. O óleo foi então destilado a vácuo (2,5 mmHg) sendo o seu ponto de ebulição registrado em $111^\circ C$. Obteve-se ao final da destilação 9,63 mmoles (1,97g) de um óleo alaranjado, com pureza confirmada por cromatografia. O rendimento foi de 90%.

2.2.5 - Síntese do cloreto de α -pirenitacetoíla



Colocou-se em um balão de 25 ml com agitação magnética, 1,92 mmoles (0,5 g) de ácido α -naftilacético mais 24,0 mmoles (3ml) de SOCl_2 em 10ml de benzeno anidro (CaCl_2/Na). Refluxou-se por 6 horas. O excesso de SOCl_2 foi destilado a pressão reduzida ficando ao final uma solução amarelo esverdeada do cloreto de ácido em benzeno anidro, que, por cromatografia em camada fina (eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1), demonstrou não haver mais ácido. O produto foi mantido em solução por ser altamente hidrolizável. O rendimento foi estimado após a síntese heterociclo correspondente (2.2.7.4) ficando em torno de 80%.

2.2.6 - Síntese do cloreto de cinamoíla



Colocou-se em um balão de 25 ml com agitação magnética, 12 mmoles (1,8 g) de ácido cinâmico mais 48,0 mmoles (6ml) de SOCl_2 . A reação foi mantida a uma temperatura de 50°C durante 4 horas. O excesso de SOCl_2 foi destilado a pressão reduzida ficando ao final um óleo amarelo esverdeado. O produto obtido foi utilizado imediatamente sem ser purificado.

2.2.7 Síntese dos Heterociclos do Sistemas 1,3,4-Tiadiazólio-2-fenilaminas

Tabela 2.2.7.1 Esquema geral para síntese, pontos de fusão e rendimentos obtidos para os cloridratos do sistema 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminas.

COMPOSTO	X =	R (%)	P.F. (°C)
MICO-1		90	260
MICO-2		85	320
MICO-3		70	286
MICO-4		81	>400
MICO-5		68	192

Obs.: Ao final de cada descrição experimental são definidas, previamente, as absorções espectroscópicas de RMN ¹H e IV (principais bandas), sendo os espectros indicados por figuras ao final da tese.

2.2.7.1 Síntese do cloreto 4,5-difenil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MICO-1)

Colocou-se em um balão de 50 ml com agitação magnética, 4,00 mmoles (0,58 g) de cloreto de benzoíla mais 4,00 mmoles de 1,4-difeniltiosemicarbazida (1,00 g) em 25ml de 1,4-dioxano anidro, refluxando-se a solução por 4 horas. Quase imediatamente após cessar o refluxo, formaram-se cristais amarelo claros. A solução foi então deixada em repouso por 12 horas ocorrendo assim a precipitação de todo o produto. Os cristais foram filtrados a vácuo e lavados com 3 porções de 15ml de 1,4-dioxano gelado. Apesar da pouca solubilidade destes compostos em solventes orgânicos comuns, foi feita uma recristalização em mistura proporcional de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ obtendo-se assim 1,46g de cristais amarelo claros que foram filtrados e secos em dessecador a vácuo. O ponto de fusão fo de 260°C (lit ⁽¹⁶⁾ 260°C) e o rendimento bruto 90 %.

[IV(cm^{-1}) - 3050 ($\nu\text{C-H Ar.}$); 2750 ($\nu\text{N-H}$),1610 ($\nu\text{C=C Ar.}$); 1570 ($\nu\text{ C=N}$)];(Fig.3.2.26)

[RMN¹H δ (ppm) 7, 72-7, 74 (m); 12,92 (s)] (Fig.3.2.32)

2.2.7.2 Síntese do cloreto 4-fenil-5- α -naftil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MICO-2)

Colocou-se em um balão de 50 ml com agitação magnética, 10,4 mmoles (1,98 g) de cloreto de α -naftoila mais 10,4 mmoles de 1,4-difeniltiossemicarbazida (2,540 g) em 25ml de 1,4-dioxano anidro, refluxando-se a solução por 4 horas. A solução foi então deixada em repouso por 12 horas ocorrendo assim a precipitação de todo o produto. Os cristais foram então filtrados à vácuo e lavados com 3 porções de 15ml de 1,4-dioxano gelado. Foi feita uma recristalização em mistura proporcional de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ obtendo-se assim cristais amarelo claros que foram filtrados e secos em dessecador à vácuo. O ponto de fusão foi determinado em 320°C e o rendimento bruto 85%.

[IV(cm^{-1}) 3050 (vC-H Ar.); 2750 (vN-H);1610 (vC=C Ar.); 1570 (v C=N)];(Fig.3.2.27)

[RMN¹H δ (ppm) 7,72-7,74 (m); 12,92 (s)] (Fig.3.2.34)

2.2.7.3 - Síntese do cloreto 4-fenil-5- α -naftometil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MICO-3)

Colocou-se em um balão de 50 ml com agitação magnética, 9,67 mmoles (1,97g) de cloreto de α -acetilnaftoíla mais 9,67 mmoles de 1,4-difeniltiossemicarbazida (2,33g) em 25ml de 1,4-dioxano anidro, refluxando-se a mistura por 4 horas. A solução foi então deixada em repouso por 12 horas ocorrendo assim a precipitação de todo o produto. Os cristais foram então filtrados a vácuo e lavados com 3 porções de 15ml de 1,4-dioxano gelado. Foi feita uma recristalização em mistura proporcional de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ obtendo-se assim cristais brancos ligeiramente rosados que foram filtrados e secos em dessecador a vácuo. O ponto de fusão foi determinado em 286°C e o rendimento bruto foi de 70%.

[IV(cm^{-1}) -3050 (v-H Ar.); 2750 (vN-H); 1610 (vC=C Ar.); 1470 (δCH_2); 1570 (v C=N)];(Fig.3.2.28)

[RMN¹H δ (ppm) 4,97(s); 7,72-7,74 (m); 12,92 (s)] (Fig.3.2.36)

2.2.7.4 - Síntese do cloreto 4-fenil-5- α -pirenometil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MICO-4)

Colocou-se em um balão de 50 ml com agitação magnética, uma mistura de 1,92 mmoles (0,53g) (estimado da reação 2.2.5) do cloreto do ácido α -pirenilacético em benzeno anidro, mais 1,92 mmoles de 1,4-difeniltiossemicarbazida (0,47g) em 25ml de 1,4-dioxano anidro, refluxando-se por 4 horas. A solução foi então deixada em repouso por 12 horas ocorrendo assim a precipitação de todo o produto. Os cristais foram então filtrados a vácuo e lavados com 3 porções de 15ml de 1,4-dioxano gelado. Foram feitas duas análises em camada fina (eluentes \Rightarrow CH₂Cl₂/MeOH 9:1 e acetato de etila, respectivamente) constatando-se que o produto precipitou completamente puro. Obteve-se assim cristais verde claros que foram filtrados e secos em dessecador a vácuo. O ponto de fusão apresentou-se acima de 400°C. O rendimento foi determinado evaporando-se a mistura de solventes (1,4-dioxano + benzeno) sendo recuperados 1,54mmoles (94mg) correspondentes a 19,5% de 1,4-difeniltiossemicarbazida não consumida na reação, sendo que todo o cloreto do ácido precursor foi consumido. Portanto o rendimento foi de 80,5%.

[IV(cm⁻¹) -3050 (vC-H Ar.); 2750 (vN-H); 1610 (vC=C Ar.); 1470 (δ CH₂); 1570 (v C=N)];(Fig.3.2.29)

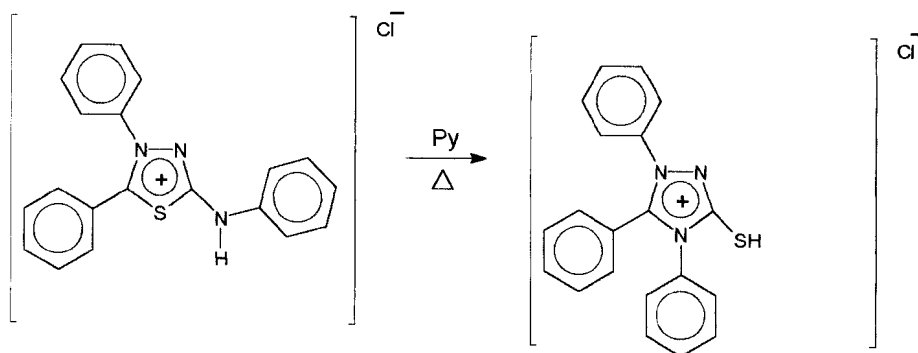
2.2.7.5 Síntese do cloreto 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MICO-5)

Colocou-se em um balão de 50 ml com agitação magnética, 12,0 mmoles de cloreto de cinamoíla (1,99g) mais 12,0 mmoles de 1,4-difeniltiossemicarbazida (2,93g) em 25ml de 1,4-dioxano anidro. A solução foi deixada em agitação, a temperatura ambiente, por 24 horas ocorrendo a precipitação do produto logo após cessar a agitação. Os cristais foram então filtrados a vácuo e lavados com 3 porções de 15ml de 1,4-dioxano gelado. Foram feitas recristalizações em mistura proporcional de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ obtendo-se assim cristais amarelos que foram filtrados e secos em dessecador a vácuo. O P.F. foi determinado em 192 °C (Lit.: 192 °C⁽³⁰⁾), e o rendimento bruto foi de 68%.

[IV(cm^{-1}) - 3050 ($\nu\text{C-H Ar.}$); 2750 ($\nu\text{N-H}$); 1610 ($\nu\text{C=C Ar.}$); 1570 ($\nu\text{C=N}$)];(Fig.3.2.30)

[RMN¹H δ (ppm) 7,18-7,69 (m); H α 7,60; H β 6,83; 12,92 (s)] (Fig.3.2.38)

2.2.8-Síntese do Cloreto de 1,4,5-trifenil-1,3,4-triazólio-2-tiol (MICO-6)



Em um balão de 50 ml foram postos 2,78 mmoles (1,02g) do composto MICO-1 em 25 ml de piridina recém destilada refluxando-se por 3 horas. Obtiveram-se assim 1,67 mmoles (0,61g) do produto na forma de cristais brancos que foram filtrados a vácuo e lavados com éter gelado. O ponto de fusão foi determinado em 332°C (Lit.: 335°C ⁽¹⁶⁾), e o rendimento foi de 60%.

[IV(cm⁻¹) -3050 (νC-H Ar.); 1610 (νC=C Ar.); 1570(ν C=N)];(Fig.3.2.31)

[RMN¹H δ (ppm) 7,02-7,33 (m)] (Fig.3.2.40)

2.3 Preparações das Soluções para Espectroscopia no UV/VIS e Fluorescência

2.3.1 Soluções dos sais heterocíclicos e mesoiônicos (bases livres)

Foram realizadas várias pesagens, tanto na preparação das soluções para o UV/VIS quanto para fluorescência. O procedimento consistiu na diluição dos sais heterocíclicos em balões volumétricos utilizando-se sempre Acetonitrila (grau espectroscópico) como solvente. Desta forma foram atingidas concentrações diversas.

Nos espectros de UV/VIS e fluorescência das bases livres as soluções das mesmas foram preparadas a partir da adição de 150 μl de NaOH 0,78 M em água às soluções dos seus respectivos ácidos conjugados.

Nas duas tabelas abaixo estão representadas as concentrações dos sais e bases livres para obtenção dos seus espectros de UV/VIS e fluorescência.

Tabela 2.3.1.1 Concentrações das soluções dos sais, em acetonitrila, utilizadas na obtenção dos espectros de UV/VIS e fluorescência.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (M)	
	UV/VIS	FLUORESCÊNCIA
MICO-1	$5,47 \times 10^{-5}$	$5,47 \times 10^{-4}$
MICO-2	$4,76 \times 10^{-5}$	$4,81 \times 10^{-4}$
MICO-3	$6,04 \times 10^{-5}$	$4,65 \times 10^{-4}$
MICO-4	desconhecida	desconhecida
MICO-5	$1,63 \times 10^{-5}$	$5,10 \times 10^{-4}$
MICO-6	$3,26 \times 10^{-5}$	$5,47 \times 10^{-4}$

Tabela 2.3.1.2 Concentrações das soluções das bases livres, em acetonitrila, utilizadas na obtenção dos espectros de UV/VIS e fluorescência.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (M)	
	UV/VIS	FLUORESCÊNCIA
BMICO-1	$2,01 \times 10^{-5}$	$6,04 \times 10^{-4}$
BMICO-2	$1,74 \times 10^{-5}$	$5,24 \times 10^{-4}$
BMICO-3	$1,70 \times 10^{-5}$	$5,08 \times 10^{-4}$
BMICO-4	desconhecida	desconhecida
BMICO-5	$1,90 \times 10^{-5}$	$5,60 \times 10^{-4}$
BMICO-6	$2,01 \times 10^{-5}$	$6,04 \times 10^{-4}$

2.3.2 Soluções de DNA X sais heterocíclicos e bases livres

A solução de DNA de timo de bezerro foi preparada adicionando-se 5mg do ácido a uma solução tampão de fosfato 1 mM (pH 7,0) e 5mM de Na₂SO₄ (preparada com água recém destilada e deionizada). A concentração do ácido nucleico foi calculada baseando-se no valor do seu coeficiente de extinção molar (ϵ) que é de 6600 M⁻¹ cm⁻¹ a 260 nm ⁽³⁷⁾, sendo determinada desta forma em $2,28 \times 10^{-5}$ M ($A_{260} = 0,163$).

Os espectros de fluorescência do DNA X sais heterocíclicos e mesoiônicos foram obtidos a temperatura e pressão constantes (22°C a 1 atm), adicionando-se a 3ml da solução de DNA duas porções consecutivas de 50 e 150 ml das soluções descritas nas tabelas acima, sendo obtidos dois espectros por composto;

As concentrações dos compostos, por experimento, com o DNA estão expressas nos respectivos espectros em anexo.

2.4 - Preparação das bases livres (Mesoiónicos)

As bases livres foram preparadas a partir da adição de 150 μl de NaOH 0,78 M em água às soluções de seus respectivos ácidos em 25ml de acetonitrila (grau espectroscópico). As concentrações das soluções estão expressas na tabela abaixo:

Tabela 2.4.1 Concentrações das soluções dos sais heterocíclicos, em acetonitrila, ao se adicionar solução de NaOH 0,78 M.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO
MICO-1	$5,47 \times 10^{-4} \text{ M}$
MICO-2	$4,81 \times 10^{-4} \text{ M}$
MICO-3	$4,65 \times 10^{-4} \text{ M}$
MICO-4	Indeterminada
MICO-5	$5,10 \times 10^{-4} \text{ M}$
MICO-6	$5,47 \times 10^{-4} \text{ M}$

As bases livres não foram isoladas, sendo caracterizadas pelos seus espectros no UV/VIS, sendo ainda observada a alteração da coloração das soluções.

Na tabela 2.4.2 estão representadas as cores das soluções dos ácidos comparando-se à coloração assumida após a adição de NaOH 0,78M.

Tabela 2.4.2 Comparação entre as cores das soluções dos sais heterocíclicos X solução das bases livres, em acetonitrila.

CORES DAS SOLUÇÕES

SAL HETEROCÍCLICO		MESOIÔNICO	
MICO-1	Amarelo pálido	BMICO-1	Laranja intenso
MICO-2	Amarelo pálido	BMICO-2	Amarelo intenso
MICO-3	Incolor	BMICO-3	Amarelo intenso
MICO-4	Incolor	BMICO-4	Verde intenso
MICO-5	Amarelo	BMICO-5	Vermelho
MICO-6	Incolor	BMICO-6	Amarelo pálido

2.5 Cálculos

Os cálculos para determinação da absorbtividade molar, bem como o cálculo para determinar a concentração do DNA em solução, foram feitos baseados na lei de Lambert-Beer:

$$\log_{10} (I/I_0) = \varepsilon \cdot l \cdot c = A$$

sendo que, como c está expresso em moles por litro e o comprimento do caminho ótico em centímetros, a equação fica:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

 \Rightarrow

$$\varepsilon = A/(l \cdot c)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese dos Heterociclos

Os heterociclos do sistema 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina foram obtidos através da reação de anidro acilação entre a 1,4-difeniltiossemicarbazida e os cloretos de ácido correspondentes, utilizando-se 1,4-dioxano como solvente. Os produtos foram obtidos com rendimentos brutos na faixa de 70 a 90 %, que pudemos considerar como sendo satisfatórios. Apesar da baixíssima solubilidade destes compostos em solventes orgânicos comuns, foi possível, com relativo sucesso, sua purificação através de recristalizações sucessivas. As tentativas de purificação via cromatografia em coluna, placa preparativa e Chromatotron, não foram bem sucedidas, obtendo-se ao final, invariavelmente, uma mistura de produtos, indicando a possibilidade de reação dos compostos com a sílica.

O sistema 1,3,4-triazólio-2-tiol (MICO-6), foi preparado através de refluxo em piridina do composto MICO-1, sendo seu isolamento feito por evaporação do solvente, seguida de recristalização.

Na síntese do composto MICO-2 houve a necessidade de preparação do ácido α -naftóico, substrato de partida, através de uma reação de Grignard a partir do α -bromonaftaleno, obtendo-se o produto com bom rendimento (\approx 60%).

O composto MICO-4, derivado do pireno, foi obtido com elevado grau de pureza, devido, provavelmente, à sua grande insolubilidade em 1,4-dioxano em comparação aos demais componentes da mistura reacional. Em face desta característica, foi possível obter-se somente os espectros de RMN ^1H e UV/VIS a baixíssima concentração (desconhecida). A técnica de Espectroscopia de Massas que poderia nos fornecer subsídios melhores para determinação da estrutura deste composto, não pode ser utilizada devido a indisponibilidade do equipamento, sendo que a possibilidade de tentar-se outro local, foi descartada em função do tempo para apresentação deste trabalho.

Os heterociclos, precursores dos correspondentes compostos mesoiônicos, MICOS 2,3 e 4 (cloreto de 4-fenil-5-X-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, onde X = α -naftil, α -acetonaftil e α -acetopirenil, respectivamente) não foram, ainda, descritos na literatura.

Os compostos mesoiônicos correspondentes, BMICO : 1, 2, 3, 4, 5, (4-fenil-5-X-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, onde X = benzil, α -naftil, α -naftoacetil, α -pirenoacetil, cinamoil) e BMICO-6 (1,4,5-trifenil-1,3,4-triazólio-2-tiolato), foram obtidos *in situ* nas soluções utilizadas para obtenção dos espectros de UV/VIS, pela adição de NaOH, não sendo portanto isolados.

3.2 Espectroscopia na Região do UV/VIS

3.2.1 Espectros de Absorção

3.2.1.1 UV/VIS dos cloretos de 4-fenil-5-X-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina

Os espectros de absorção na região do UV/VIS dos sais heterocíclicos e mesoiônicos correspondentes foram obtidos conforme descrito nos itens 2.3.1 e 2.4

A tabela 3.2.1 mostra os valores da absorbtividade molar (ϵ) calculada para as principais bandas de absorção para os cloretos de 4-fenil-5-X-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.

A análise dos espectros de absorção indica duas bandas características do sistema mesoiônico ($\lambda_{\text{máx}} \approx 250$ e 350 nm) que, para os compostos MICO-1 (Fig 3.2.1, pg 64) e MICO-2 (Fig 3.2.2, pg 65), permaneceram sem apresentar deslocamentos significativos com absorbtividades molares ligeiramente maiores para o MICO-2 em função da natureza do cromóforo mais conjugado ligado ao C-5 do anel heterocíclico. A banda característica do naftaleno para o composto MICO-2 sofreu um pequeno efeito batocrômico, comparando-se com o MICO-1, sobrepondo-se às absorções características dos anéis benzênicos presentes na estrutura

O composto MICO-3 (Fig. 3.2.3, pg 66) apresentou deslocamentos batocrômicos (para as bandas características do sistema mesoiônico) sendo que a absorção em $\lambda=300\text{nm}$ apresentou diminuição na intensidade, provavelmente devido ao grupo $-\text{CH}_2-$ intercalado entre o cromóforo (naftaleno) e o C-5 do heterociclo, interferindo na deslocalização eletrônica. As bandas características do naftaleno podem ser nitidamente observadas no espectro.

O derivado MICO-4 (Fig 3.2.4, pg 67) permitiu-nos observar, aparentemente, apenas uma das bandas características do sistema 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina ($\lambda = 240 \text{ nm}$), sendo a outra completamente encoberta pelas absorções do pireno. Um fato a ser considerado foi a baixíssima concentração utilizada para a obtenção do espectro do pireno-derivado.

A análise do espectro de absorção do derivado MICO-5 indicou deslocamento batocrômico intenso das bandas características do sistema heterociclo, sendo ainda observadas bandas originadas pela absorção do substituinte cinamoila em C-5 (Fig. 3.2.5, pg 68). A presença do grupo cinamoila provocou um aumento significativo na intensidade da segunda banda característica do anel heterocíclico.

O composto MICO-6 (Fig. 3.2.6, pg 69), isômero estrutural do MICO-1, apresentou absorções características nos comprimentos de onda de 225 nm ($\epsilon=15000$) e 350 nm ($\epsilon=3000$). Comparando-se o composto MICO-6 com o MICO-1 observa-se uma diminuição da intensidade de absorção das duas bandas típicas, e deslocamento hipsocrômico intenso para a 1ª-absorção ($\lambda_{255} \text{ nm}$ MICO-1 & $\lambda_{225} \text{ nm}$ - MICO-6).

Tabela 3.2.1 $\epsilon(s)$ nos principais comprimentos de onda de absorção para os sais heterocíclicos.

COMPOSTO	λ (nm)	ϵ
MICO-1	260 350	10000 3300
MICO-2	220 260 350	19000 10000 4000
MICO-3	240 315 360	13000 5600 4900
MICO-4	ver discussão	[M] desconhecida
MICO-5	275 330 415	19600 21400 23300
MICO-6	230 340	15000 3000

3.2.1.2 UV/VIS das Bases Livres

Os espectros de absorção no UV/VIS para os compostos mesoiônicos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida e 1,3,4-triazólio-2-tiolato, apresentaram perfis semelhantes para os compostos MICO-1, MICO-2 e MICO-6, indicando uma possível predominância do efeito de deslocalização dos elétrons oriundos do heteroátomo exocíclico, em relação à natureza do substituinte em C-5 (Fig. 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.6). Observa-se ainda que a 2ª banda de absorção que corresponde a um dos máximos dos sais heterocíclicos, nas bases livres, equivale à um dos mínimos no espectro de absorção.

Considerando-se o composto BMICO-3, pôde-se observar que a presença do -CH₂- entre o cromóforo e o anel mesoiônico impede a deslocalização estendida, permitindo o aparecimento da banda característica do naftaleno (λ 225 nm) e um deslocamento batocrômico de 250nm (BMICO-1) para 275 nm (BMICO-3) (Fig. 3.2.1e Fig. 3.2.3).

No composto BMICO-5 (Fig. 3.2.5) observa-se também o deslocamento batocrômico de 250 nm (BMICO-1) para 300 nm (BMICO-5) e o aparecimento de um máximo de absorção em torno de 500 nm (ϵ =7000) indicando uma extensão da conjugação.

O composto BMICO-4, semelhante ao sal correspondente (MICO-4), apresentou um espectro diferenciado dos demais, sendo que, um fato relevante, é a visualização da banda característica do sistema mesoiônico (impossível de ser observado no MICO-4) sofrendo intenso deslocamento batocrômico (600nm). (Fig. 3.2.4)

A tabela 3.2.2 mostra os valores da absorbtividade molar (ϵ) calculada nas principais bandas de absorção para as bases livres.

Tabela 3.2.2 ϵ (s) nos principais comprimentos de onda de absorção para as bases livres.

COMPOSTO	λ (nm)	ϵ
BMICO-1	230 325	26000 5400
BMICO-2	275	7000
BMICO-3	275	22400
BMICO-4	600	Idem MICO-4
BMICO-5	275 490	20000 7000
BMICO-6	240 330	31000 6200

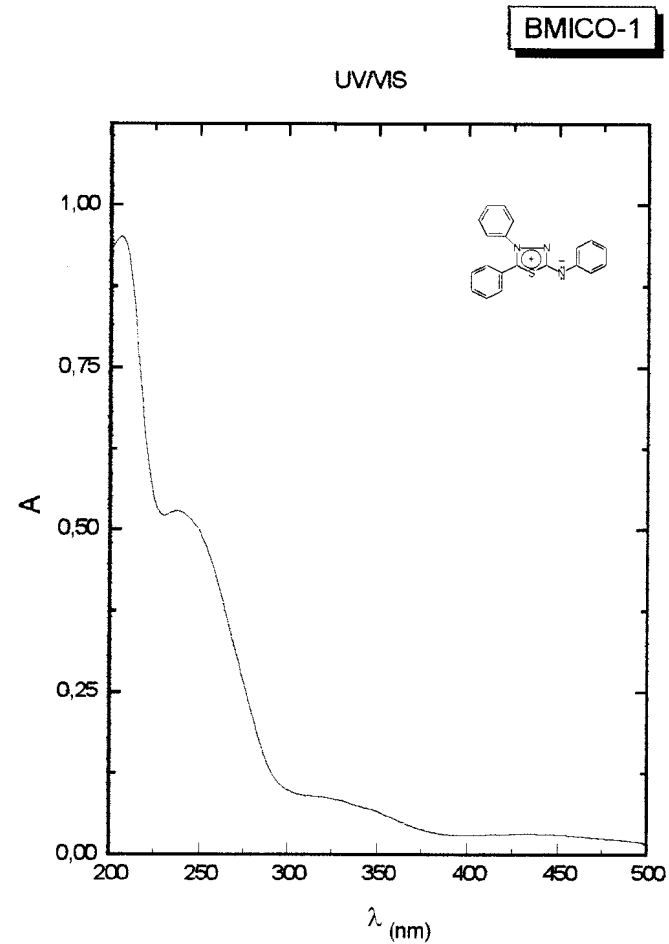
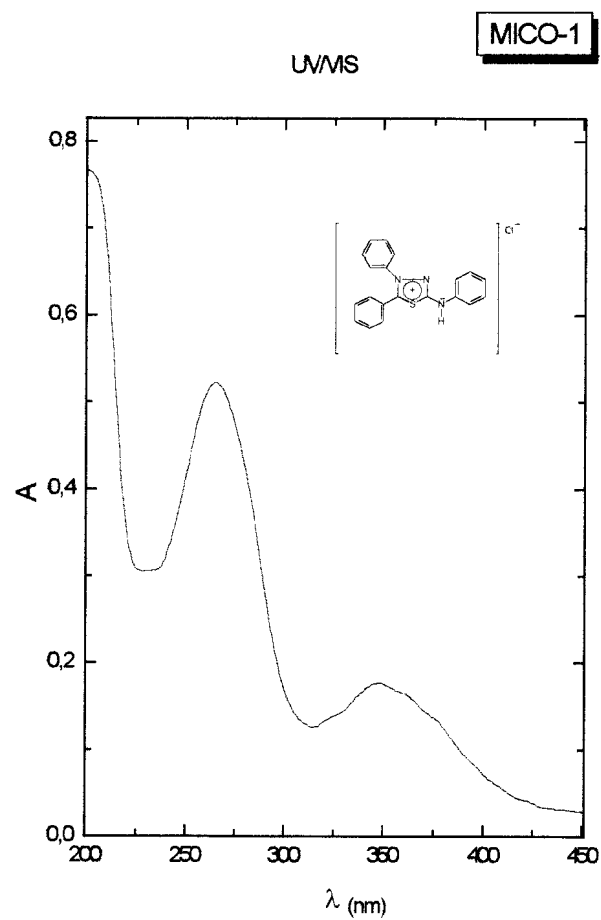


Figura 3.2.1 Espectros de absorção no UVVIS de MICO-2 e BMICO-2 em acetonitrila à concentrações de $5,47 \times 10^{-5}$ M e $2,01 \times 10^{-5}$ M, respectivamente.

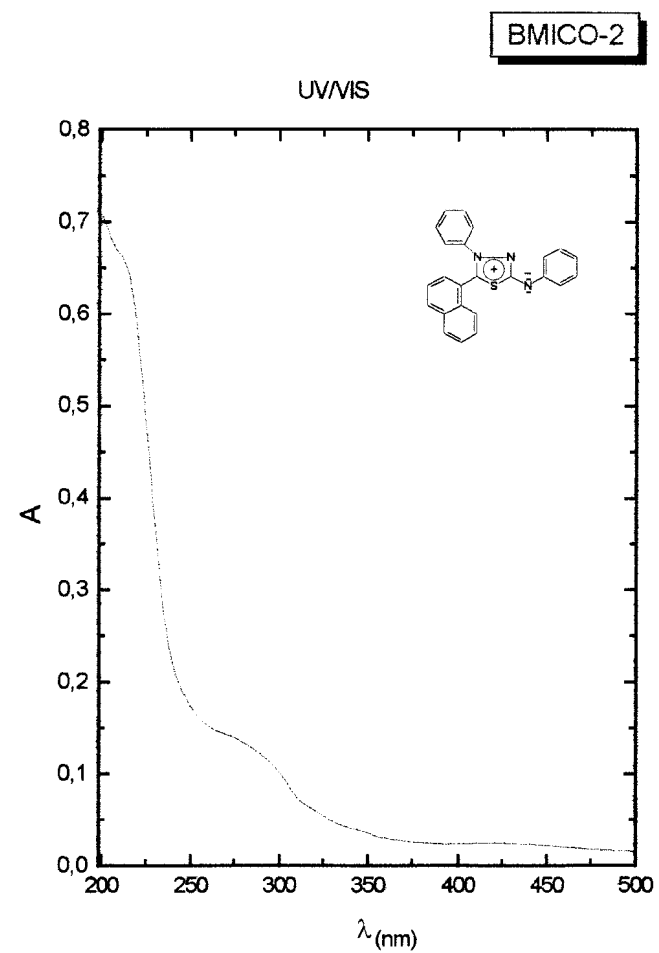
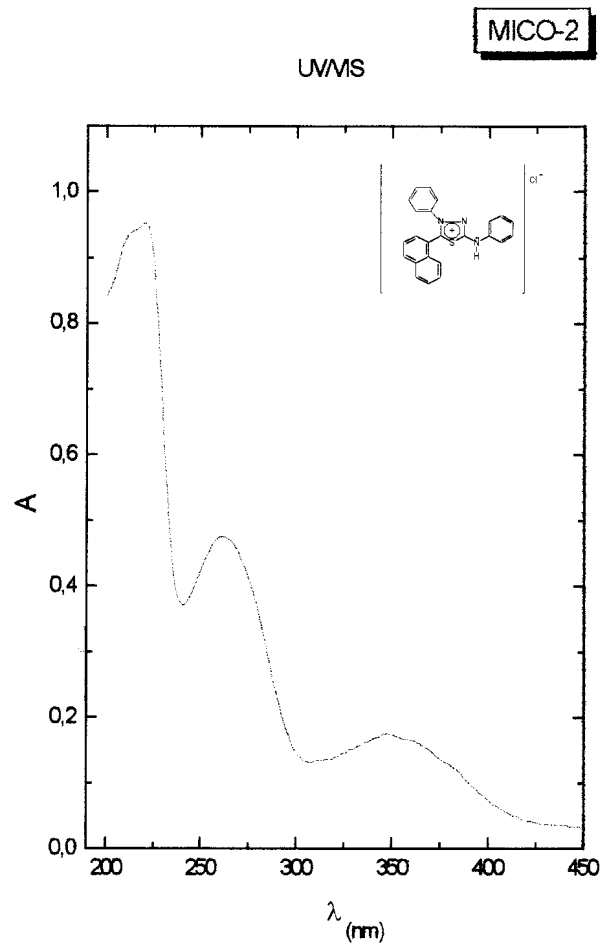


Figura 3.2.2 Espectros de absorção no UV/VIS de MICO-2 e BMICO-2 em acetonitrila à concentrações de $4,76 \times 10^{-5}$ M e $1,74 \times 10^{-5}$ M, respectivamente.

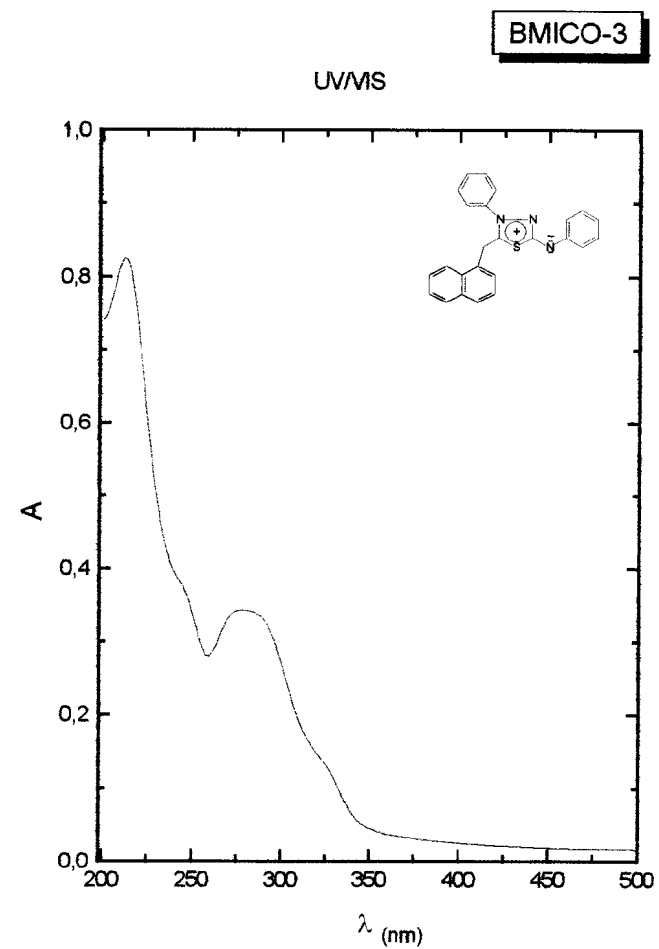
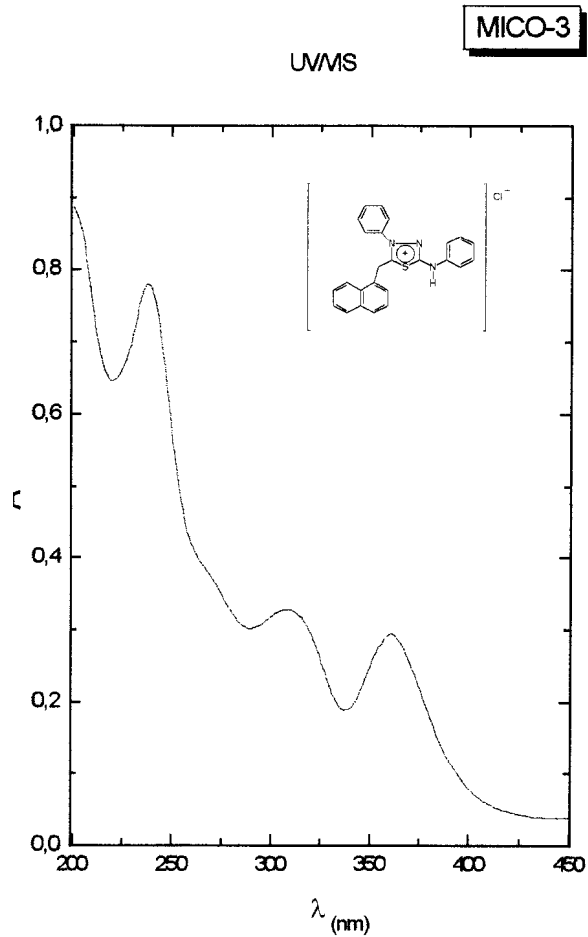


Figura 3.2.3 Espectros de absorção no UV/VIS de MICO-2 e BMICO-2 em acetonitrila à concentrações de 6.04×10^{-5} M e 1.70×10^{-5} M, respectivamente.

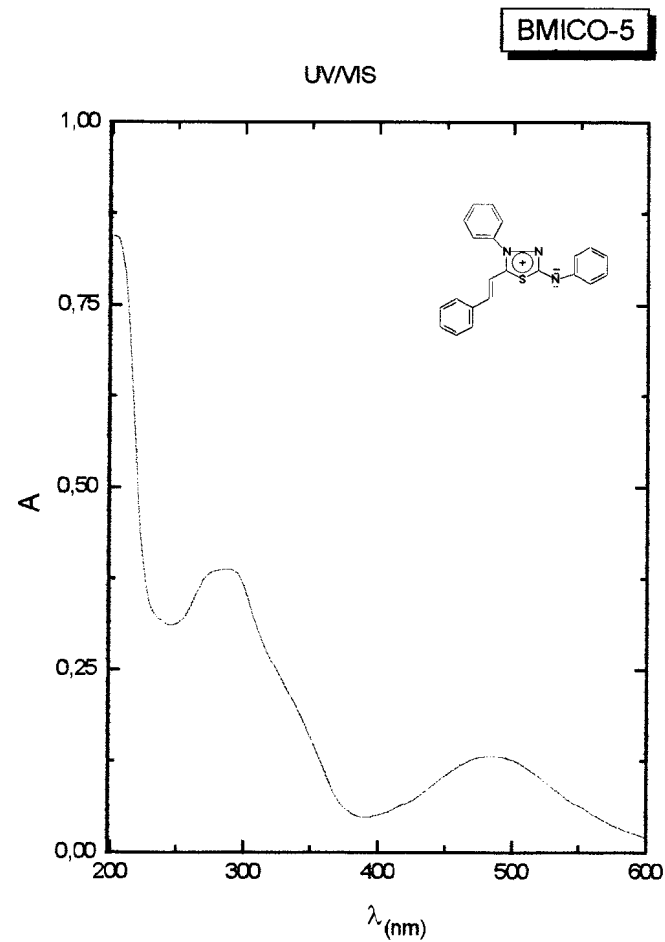
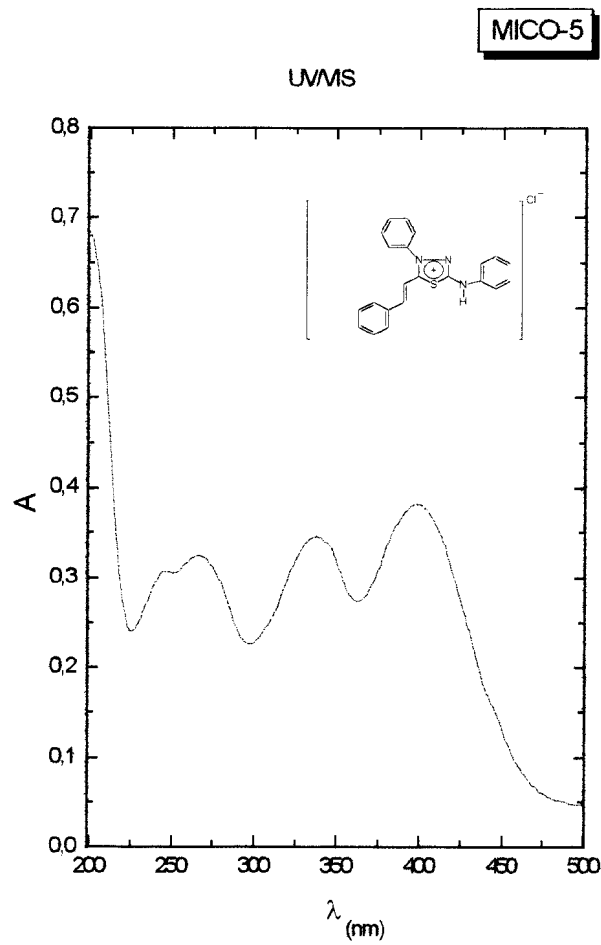


Figura 3.2.5 Espectros de absorção no UV/VIS de MICO-2 e BMICO-2 em acetonitrila à concentrações de $1,63 \times 10^{-5}$ M e $1,90 \times 10^{-5}$ M, respectivamente.

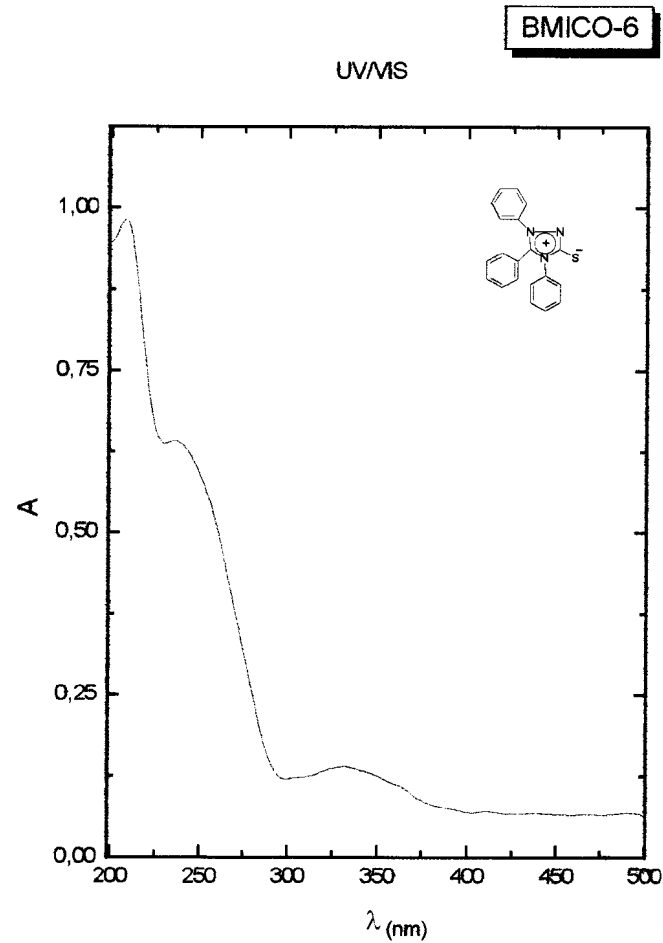
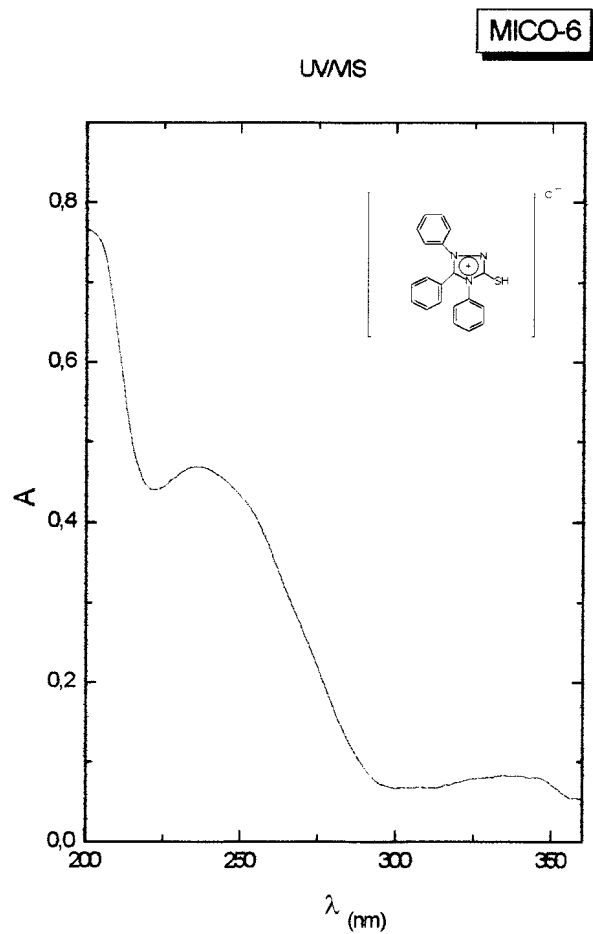


Figura 3.2.6 Espectros de absorção no UVVIS de MICO-6 e BMICO-6 em acetonitrila à concentrações de $5,47 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $2,01 \times 10^{-5} \text{ M}$, respectivamente.

3.2.2 Espectros de Emissão de Fluorescência

Os heterociclos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (sais precursores dos mesoiônicos) emitiram fluorescência quando excitados em 250 nm (MICO-2 e MICO-4) e 350 nm (MICO-1, MICO-3, MICO-5) em acetonitrila, sendo as emissões monitoradas em 290 e 390 nm, respectivamente.

Na presença de O₂, as excitações nos comprimentos de onda de 250 e 350 nm, podem ser observados os harmônicos em 500 e 700 nm respectivamente. Buscando contornar este problema as emissões registradas foram limitadas a valores onde os harmônicos não pudessem ser evidentes.

Considerando-se que os espectros foram obtidos na mesma faixa de concentração, podemos comparar qualitativamente a emissão de fluorescência dos compostos MICO-1, MICO-3 e MICO-5 (Figuras 3.2.7, 3.2.9 e 3.2.11, respectivamente), observando uma maior intensidade para o MICO-3 seguida de MICO-5 e MICO-1 quando excitados em 350 nm. É interessante observar que o perfil dos espectros de emissão assemelha-se à imagem especular dos de absorção, conforme comportamento geral sugerido na literatura ⁽²²⁾

Sabe-se, pela literatura (38), que a emissão de fluorescência para o benzeno e naftaleno encontra-se na faixa de 270 a 310 nm e 300 a 360 nm, respectivamente. Sugerimos, baseados nestes dados, que, para os compostos MICO-1 e MICO-3, a banda observada em 390 nm seja atribuída ao anel heterocíclico. Evidenciando esta hipótese, a análise do espectro de MICO-3, apresenta banda de emissão característica do naftaleno em 360 nm e a banda em 390 nm atribuída, por nós ao sistema 1,3,4-tiadiazólio. Estas emissões são discretamente separadas provavelmente devido à presença do grupo $-CH_2-$ intercalado entre os dois cromóforos.

O espectro de fluorescência do composto MICO-2 (Fig. 3.2.8) foi obtido com excitação em 250 nm. Foram observadas duas bandas de emissão próximas. Conforme citado anteriormente, o comportamento dos cromóforos benzeno e naftaleno não nos permitiu chegar a nenhuma conclusão concreta quanto à emissão do anel heterocíclico.

O composto MICO-4, quando excitado em 250 nm, apresenta emissões características do grupamento pireno ⁽³⁸⁾ (Fig. 3.2.10). Vale ressaltar que, em função da grande insolubilidade do MICO-4 em acetonitrila, a concentração da solução utilizada para obtenção do espectro foi baixíssima e indeterminada, permitindo no enteanto, emissão com grande intensidade.

O isômero estrutural do MICO-1, heterociclo do sistema 1,3,4-triazólio-2-tiol, MICO-6 (Fig. 3.2.11) não apresenta emissão de fluorescência, significativa, quando comparado aos derivados do sistema 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.

Destacamos como fato importante, a emissão de fluorescência observável pela simples exposição dos compostos MICO-2, MICO-3, MICO-4 e MICO-5 à lâmpada "Mineralight" com luz de $\lambda = 254$ e 360 nm. Esta propriedade nos permite vislumbrar a possível utilização destes derivados como sondas fluorescentes emitindo na região do visível.

MICO-1

FLUORESCÊNCIA

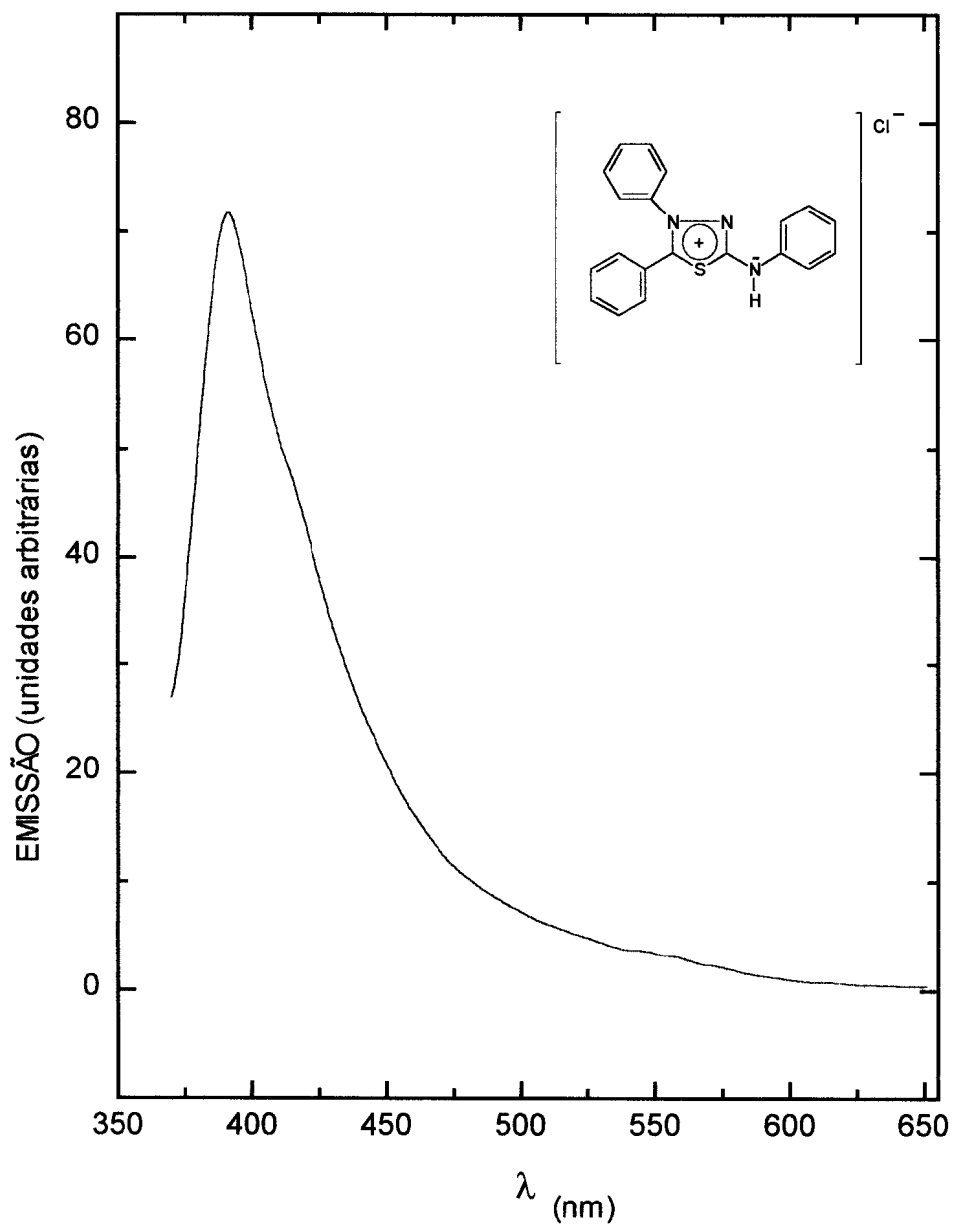


Figura 3.2.7 Espectro de emissão de fluorescência de MICO-1 em acetonitrila ($5,47 \times 10^{-5}$ M).

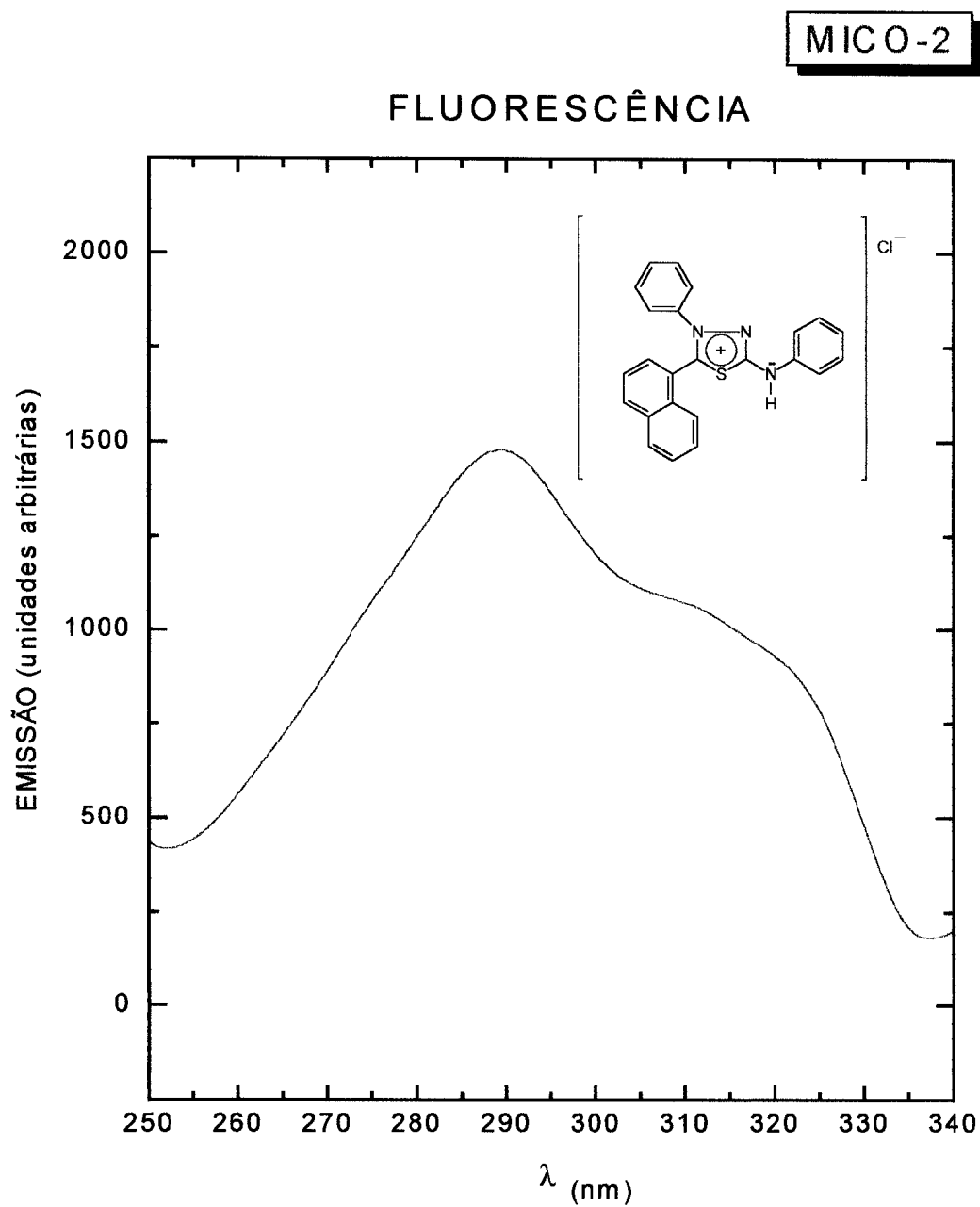


Figura 3.2.8 Espectro de emissão de fluorescência de MICO-2 em acetonitrila ($4,76 \times 10^{-5}$ M).

MICO-3

FLUORESCÊNCIA

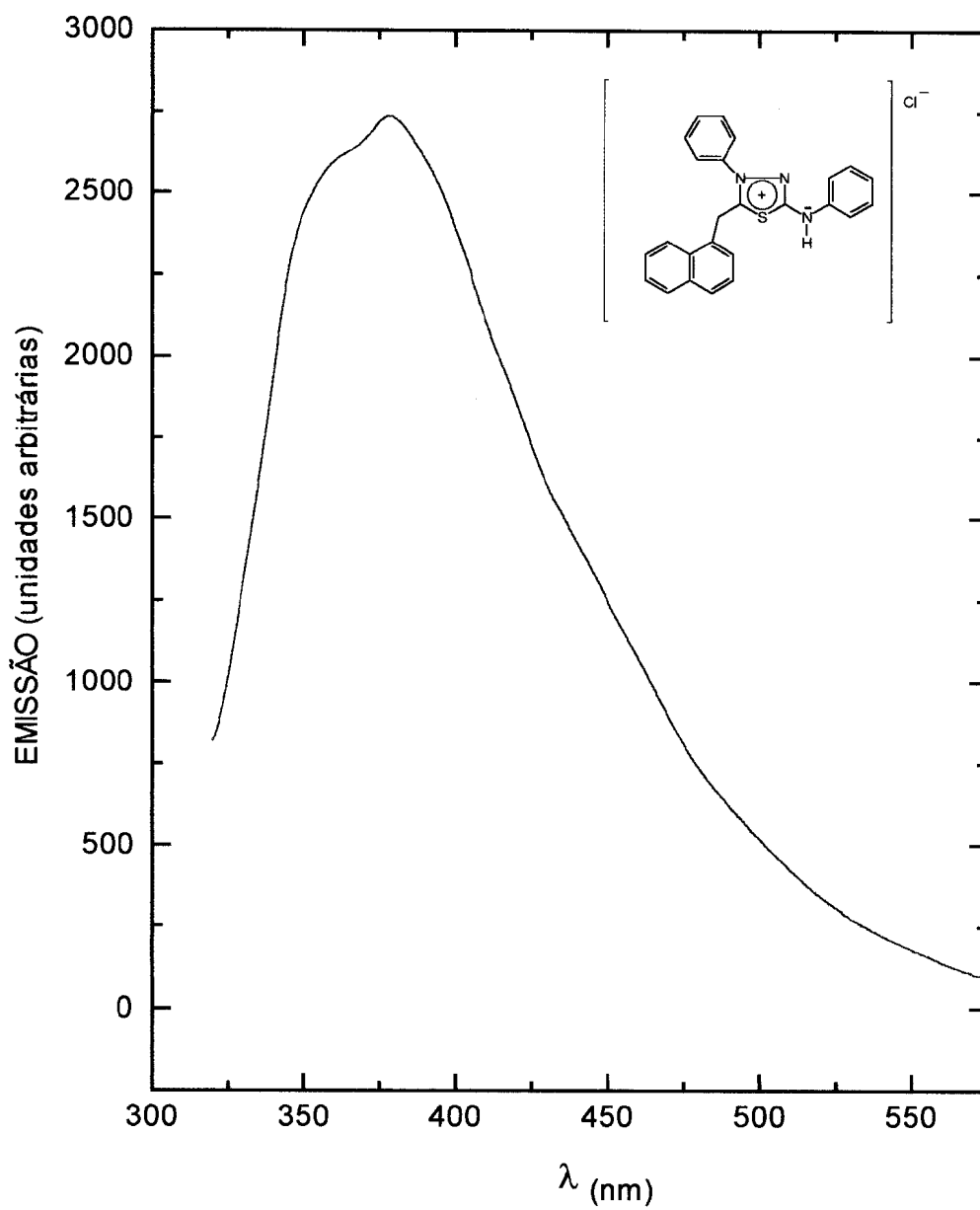


Figura 3.2.9 Espectro de emissão de fluorescência de MICO-3 em acetonitrila ($6,04 \times 10^{-5}$ M).

MICO-4

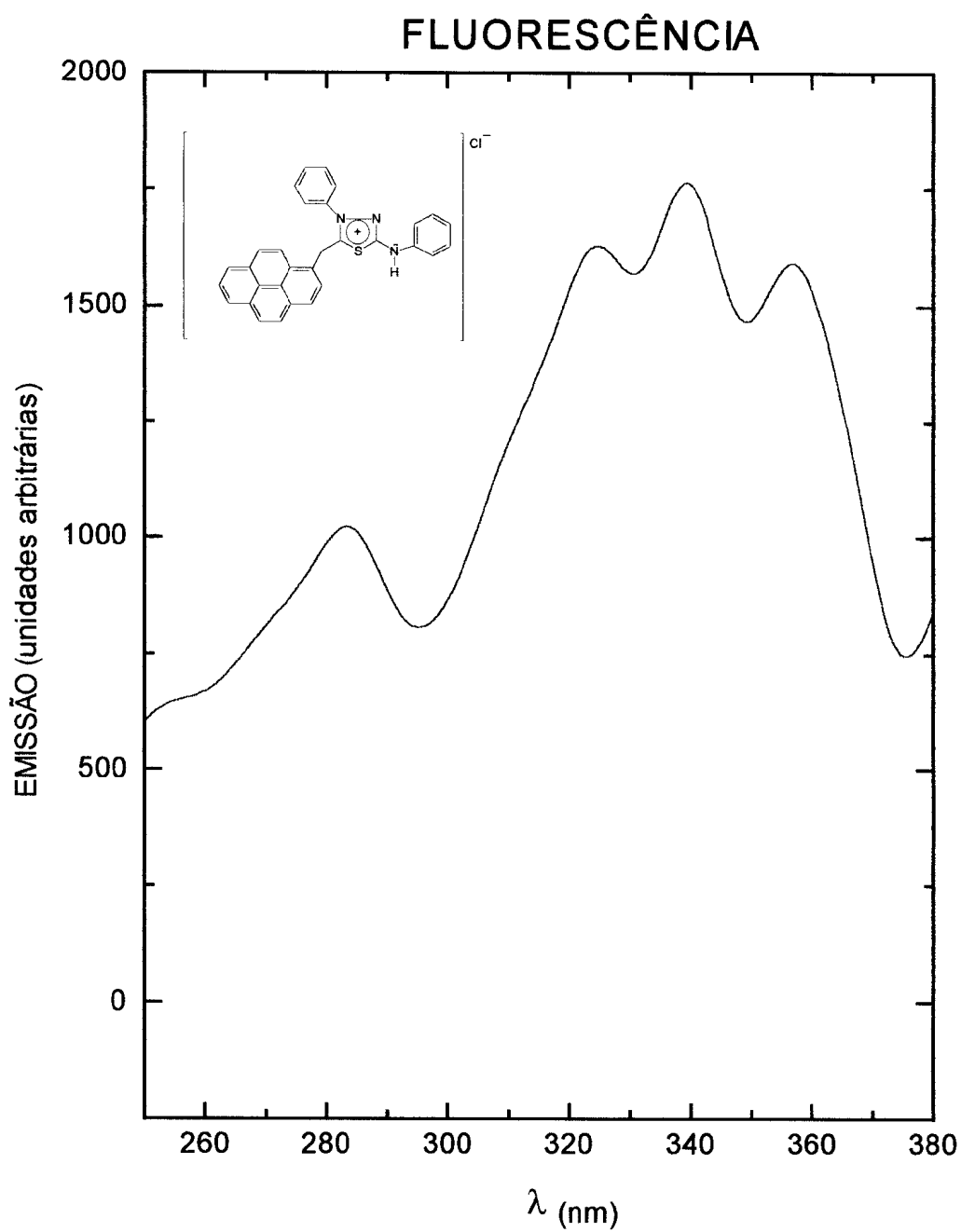


Figura 3.2.10 Espectro de emissão de fluorescência de MICO-4 em acetoneitrila.

MICO-5

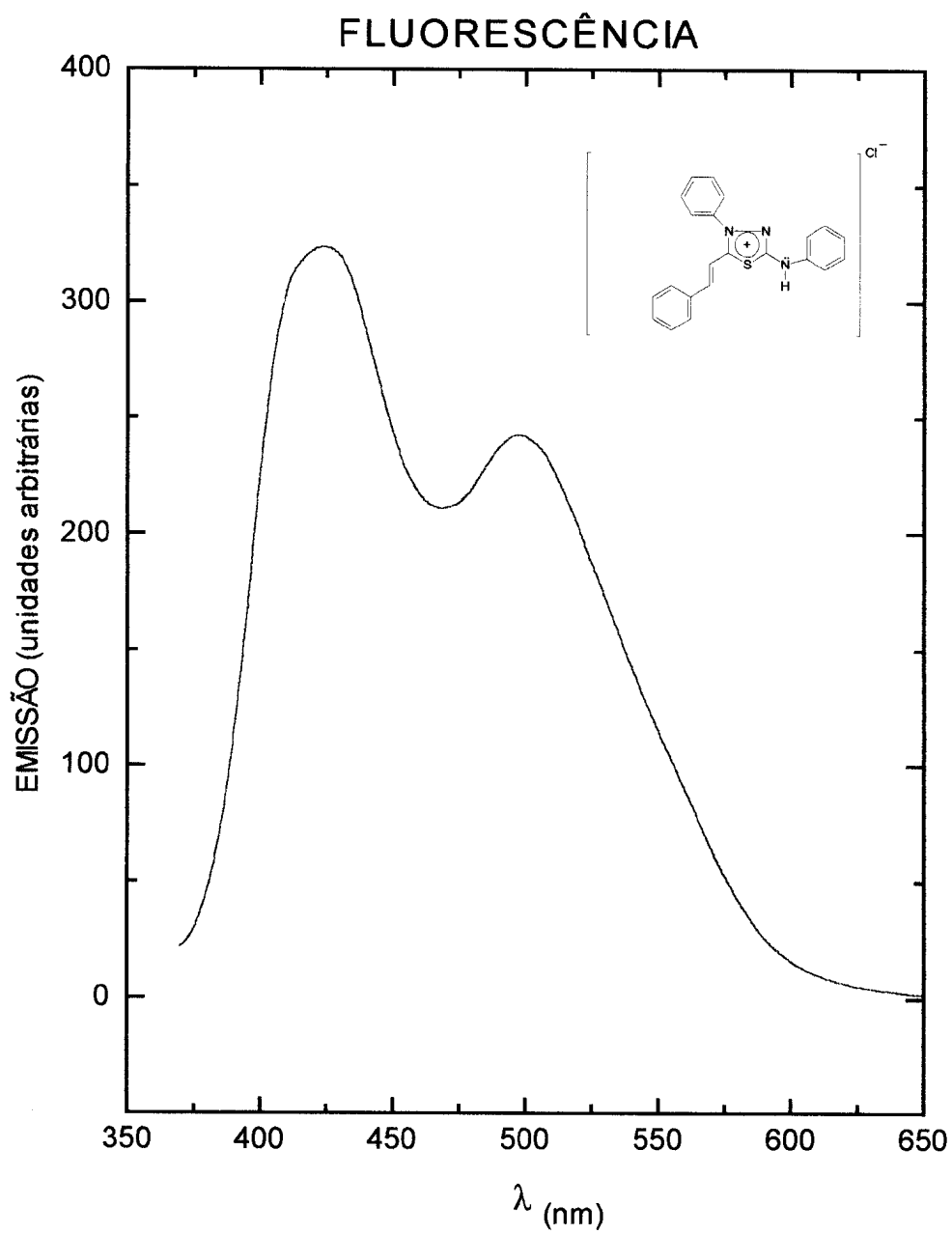


Figura 3.2.11 Espectro de emissão de fluorescência de MICO-5 em acetonitrila ($1,63 \times 10^{-5}$ M).

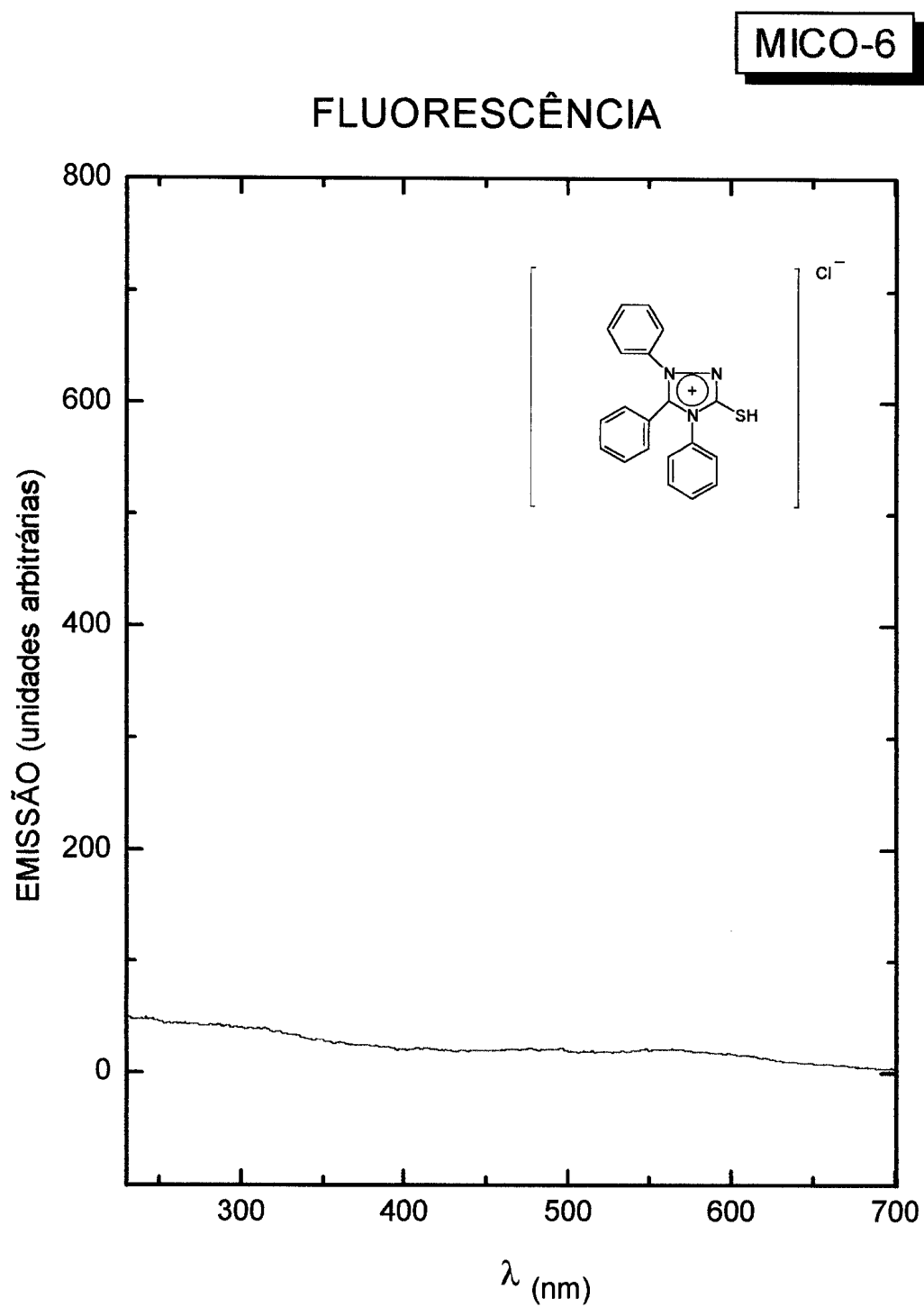


Figura 3.2.12 Espectro de emissão de fluorescência de MICO-6 em acetonitrila ($3,26 \times 10^{-5}$ M).

3.2.2.2 Estudo Qualitativo da Interação dos Heterociclos com DNA por Emissão de Fluorescência

O espectro de fluorescência do DNA (Fig. 3.2.13) de timo de bezerro foi obtido excitando-se em 630 nm sendo as emissões monitoradas entre 650 a 800 nm. Foi observado o surgimento de duas bandas sendo uma íntensa em 705 nm e outra de baixa intensidade em 760 nm.

A literatura relata que a interação de micromoléculas com macromoléculas biológicas, por exemplo o próprio DNA, resulta na alteração das bandas de emissão de fluorescência através de aumento⁽³⁹⁾ ou diminuição⁽⁴⁰⁾; deslocamento da banda de emissão⁽⁴¹⁾ e/ou alargamento da mesma⁽⁴¹⁾.

Os espectros de fluorescência obtidos com o DNA, em presença dos compostos MICO-1, MICO-2 e MICO-3 (Fig. 3.2.14, 3.2.15 e 3.2.16) a concentrações diferentes, mostraram uma intensificação da banda característica da macromolécula em 705 nm. Este comportamento nos leva a admitir a possibilidade destes compostos interagirem com a biomolécula.

Nos espectros obtidos com o DNA em presença do MICO-5 (Fig. 3.2.18) observamos uma pequena variação na intensidade da emissão em 705 nm a concentração mais diluída ($8,50 \times 10^{-6} \text{M}$), observando-se um desaparecimento do efeito com o aumento da concentração ($3,55 \times 10^{-5} \text{M}$). Tal comportamento indica, aparentemente, que a interação só é possível a baixas concentrações da micromolécula.

O espectro de fluorescência do MICO-4 com o DNA (Fig. 3.2.17) indica claramente interação do composto com o ácido nucleico, evidenciada pelo aumento da intensidade das emissões tanto a 705 quanto 760 nm, sendo a segunda bem mais acentuada. Tal efeito já era por nós esperado em função da intercalação do pireno com o DNA descrita na literatura⁽⁴²⁾.

Comportamento semelhante foi observado evidenciando a interação do MICO-6 com a biomolécula (Fig. 3.2.19). No entanto, para este composto, ocorreu uma diminuição gradual em função do aumento da concentração do heterociclo para a emissão a 705 nm, sendo o efeito observado de forma contrária para a banda de emissão em 760 nm.

Este comportamento evidencia a possível intercalação do MICO-6 com o DNA, o que pode ser associado à maior planaridade de sua estrutura⁽⁴³⁾.

Para a realização dos espectros de fluorescência do DNA na presença das base livres (BMICOS), inicialmente testou-se a solução de fosfato com DNA em presença de NaOH na concentração adequada à obtenção dos mesoiônicos, não sendo observada nenhuma alteração significativa para o espectro de emissão do ácido nucleico, que indicasse sua denaturação.

Comparando-se os espectros obtidos para os compostos BMICO-1 e BMICO-2 (Fig.3.2.20 e 3.2.21), observa-se comportamento similar para ambos, indicando aumento da intensidade da emissão característica do DNA em 705 nm, sendo maior o efeito para menor concentração do heterociclo. Sendo assim, considera-se a possibilidade de interação significativa com a biomolécula.

Os mesoiônicos BMICO-3 e BMICO-5 não apresentaram alterações significativas nos espectros de emissão quando adicionados à solução de DNA (Fig. 3.2.22 e 3.2.24). Tal comportamento não indica interação com a biomolécula.

O composto BMICO-4, derivado do pireno, apresentou forte evidência de intercalação com o DNA em função da intensa modificação nas bandas de 705 e particularmente 760 nm. Comparando-se tal comportamento com o de seu precursor MICO-4, frente ao DNA, podemos sugerir que a base livre causou uma alteração bem mais significativa (Fig. 3.2.23).

A análise do espectro de emissão do BMICO-6 com o DNA (Fig. 3.2.24), de forma distinta, comparando-se com o seu sal (MICO-6), apresenta alteração apenas na emissão em 705 nm reduzindo a intensidade da mesma. Da mesma forma, tal comportamento indica interação com o ácido nucleico.

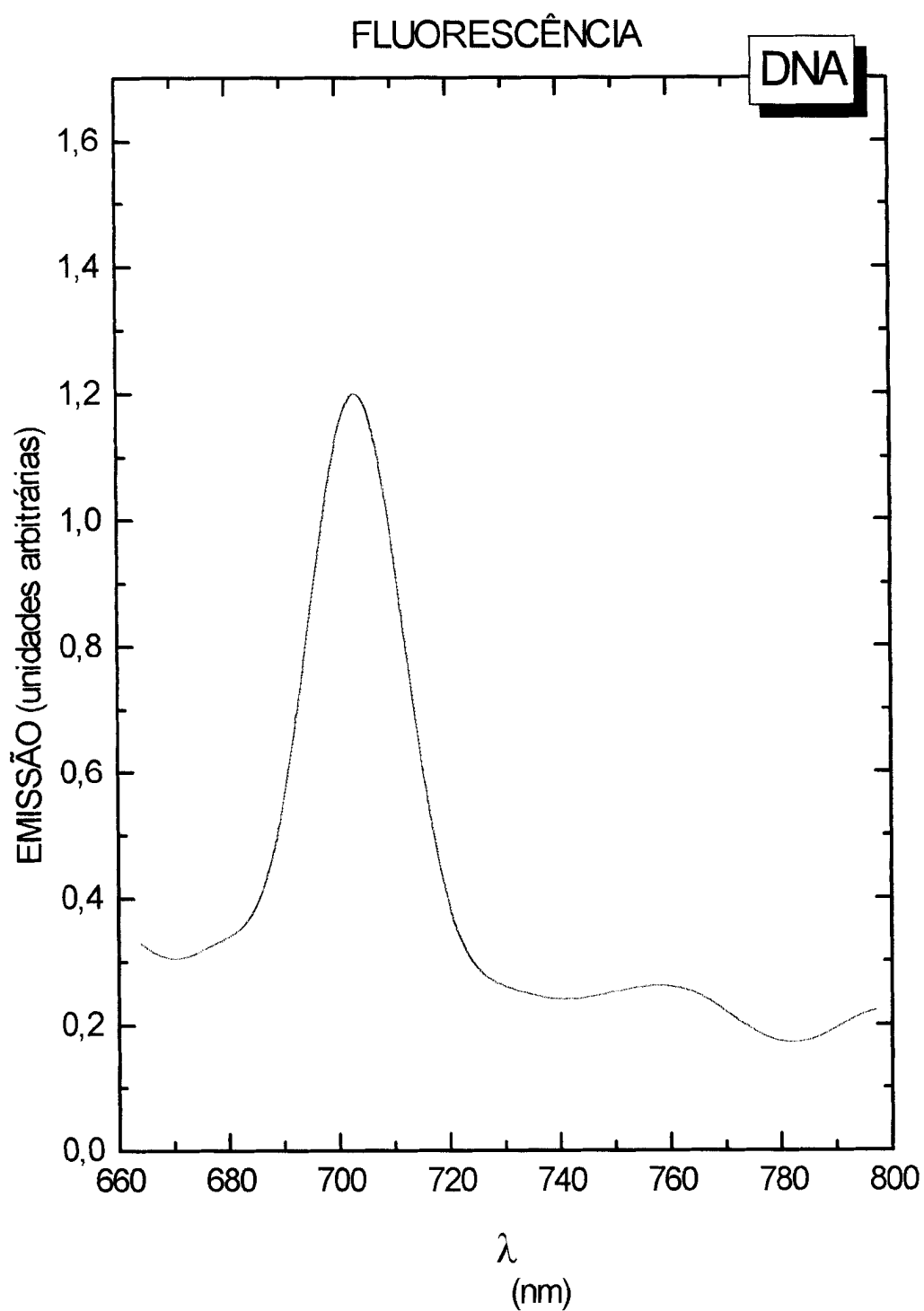


Figura 3.2.13 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro [$2,28 \times 10^{-5}$ M] em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na_2SO_4 (5mM).

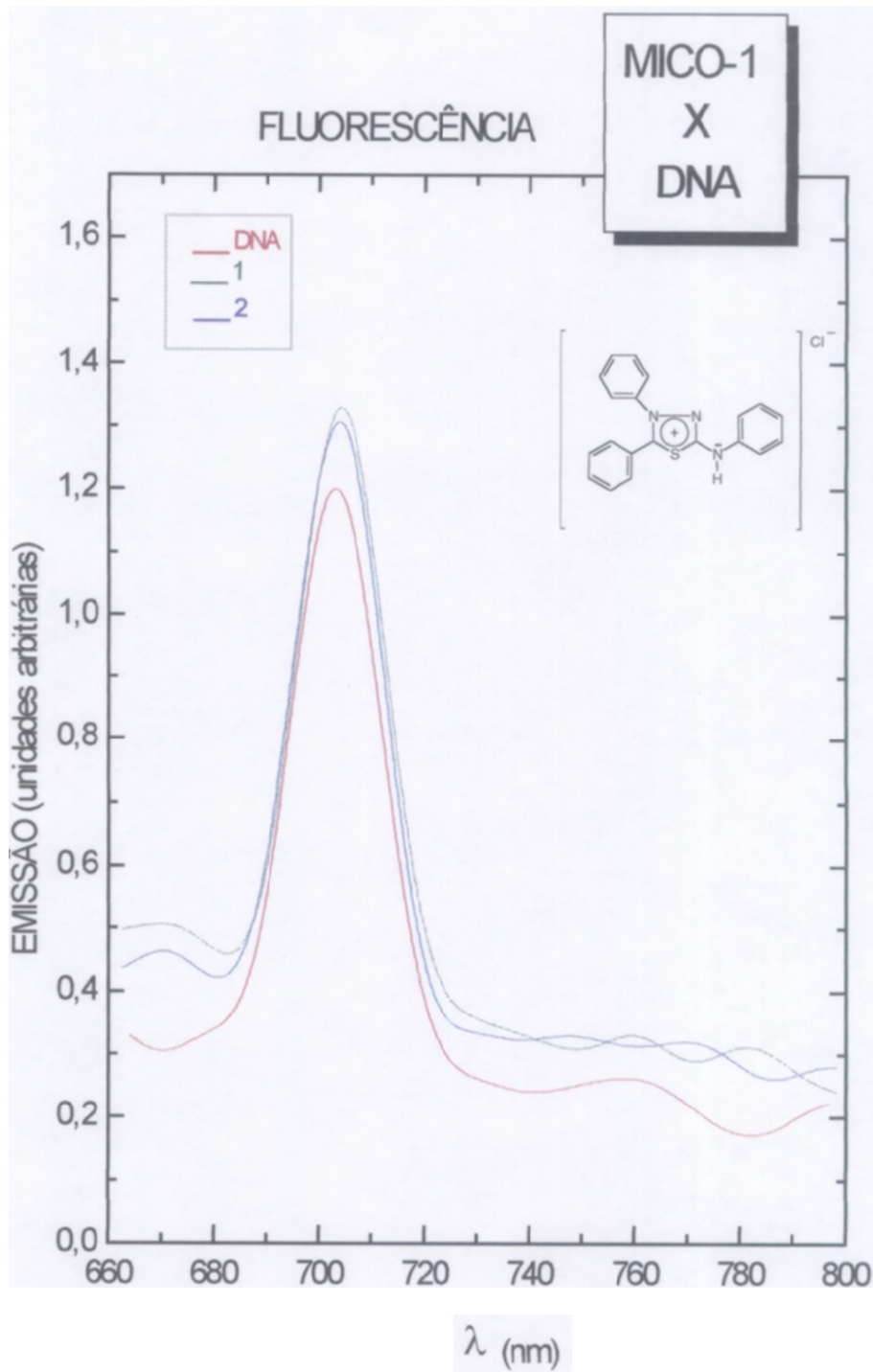


Figura 3.2.14 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na₂SO₄ (5mM) X MICO-1, em acetonitrila, a duas concentrações diferentes : 1 ($9,12 \times 10^{-6}$ M); 2 ($2,70 \times 10^{-5}$ M).

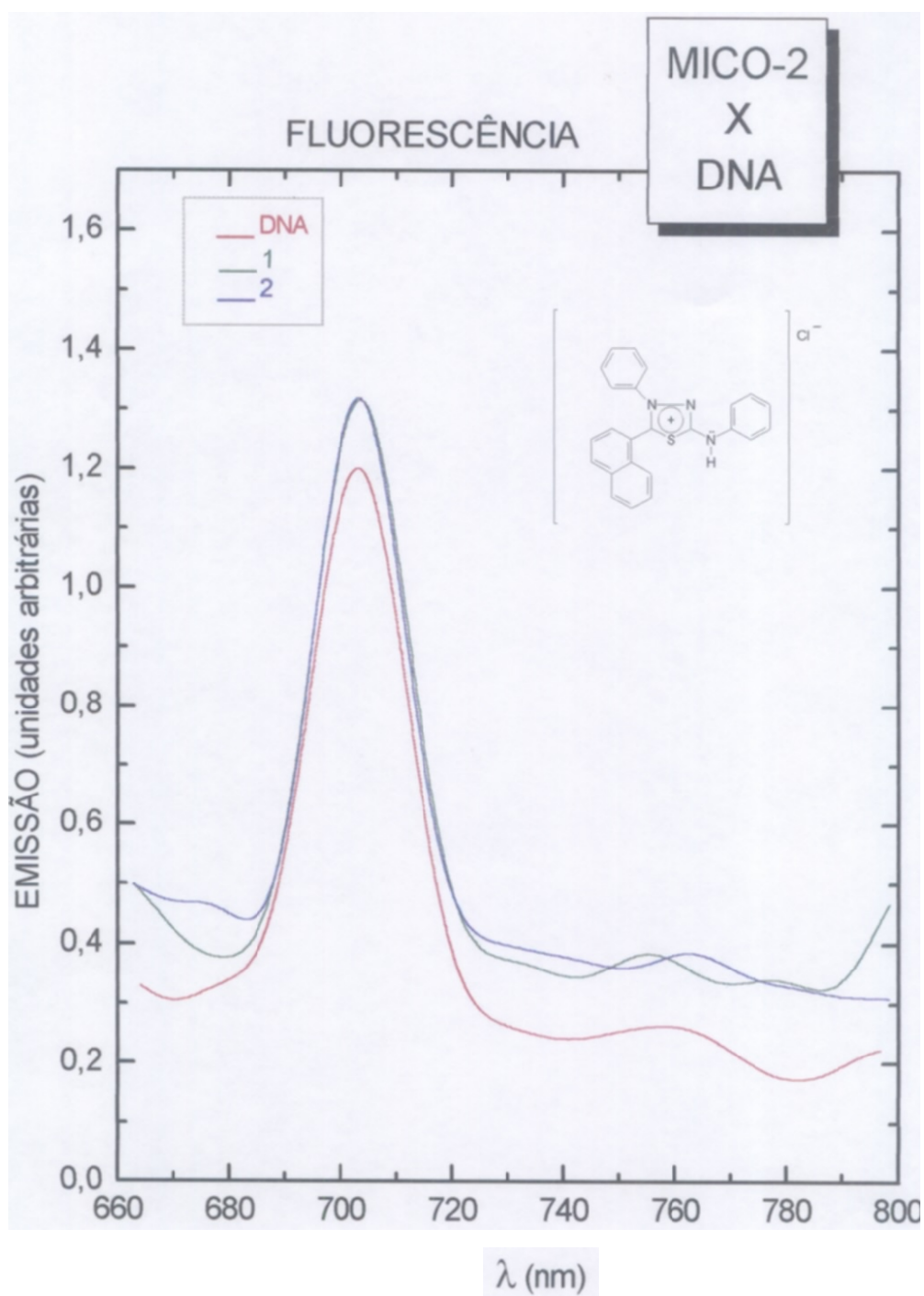


Figura 3.2.15 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na_2SO_4 (5mM) X MICO-2, em acetonitrila, a duas concentrações diferentes : 1. $(8,02 \times 10^{-6} \text{ M})$; 2. $(2,38 \times 10^{-5} \text{ M})$.

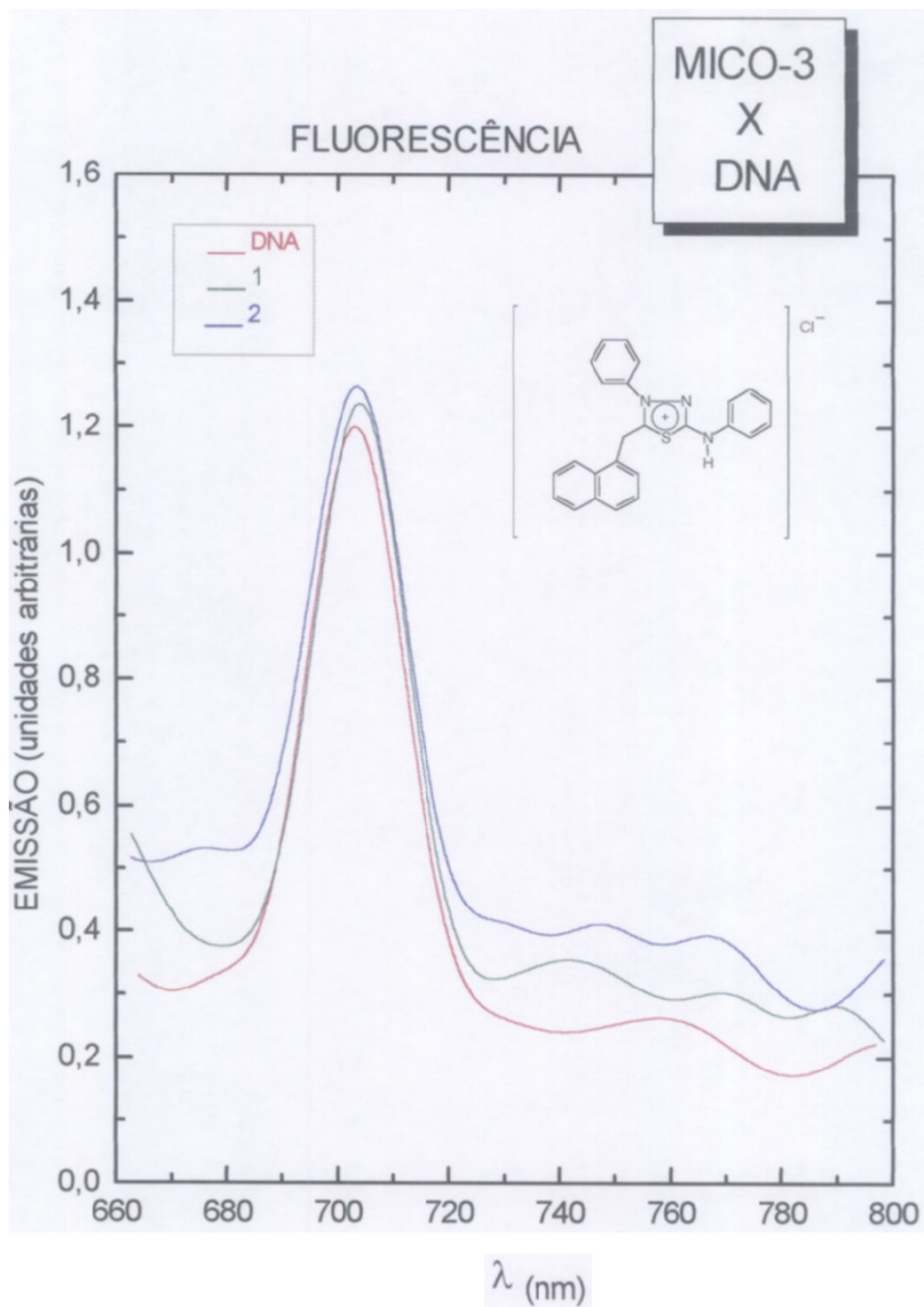


Figura 3.2.16 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na₂SO₄ (5mM) X MICO-3, em acetonitrila, a duas concentrações diferentes : 1 (7,75 x 10⁻⁶ M); 2 (2,32 x 10⁻⁵ M).

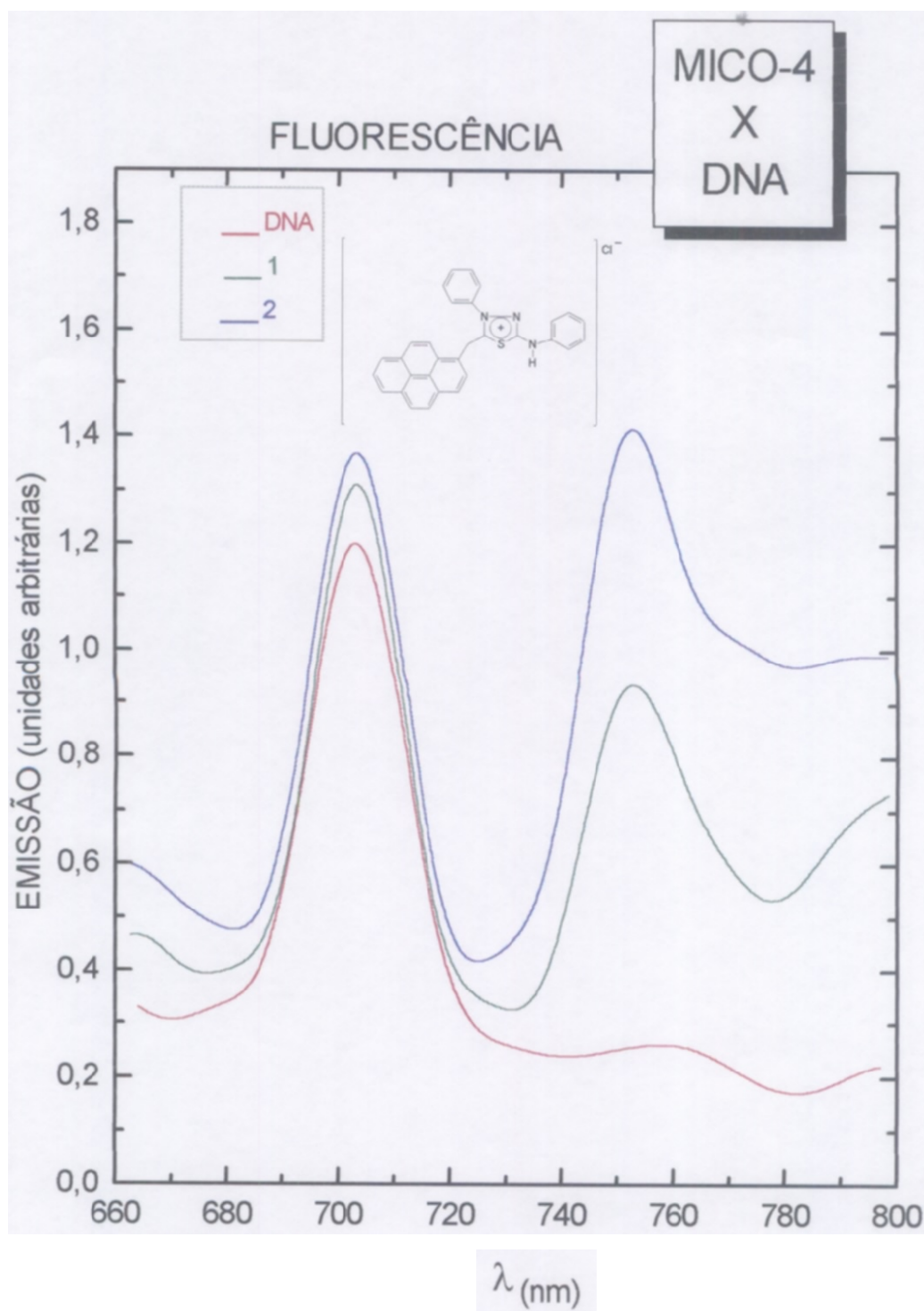


Figura 3.2.17 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na_2SO_4 (5mM) X MICO-4, em acetonitrila, a duas concentrações diferentes e desconhecidas : 1 (50 μl); 2 (150 μl).

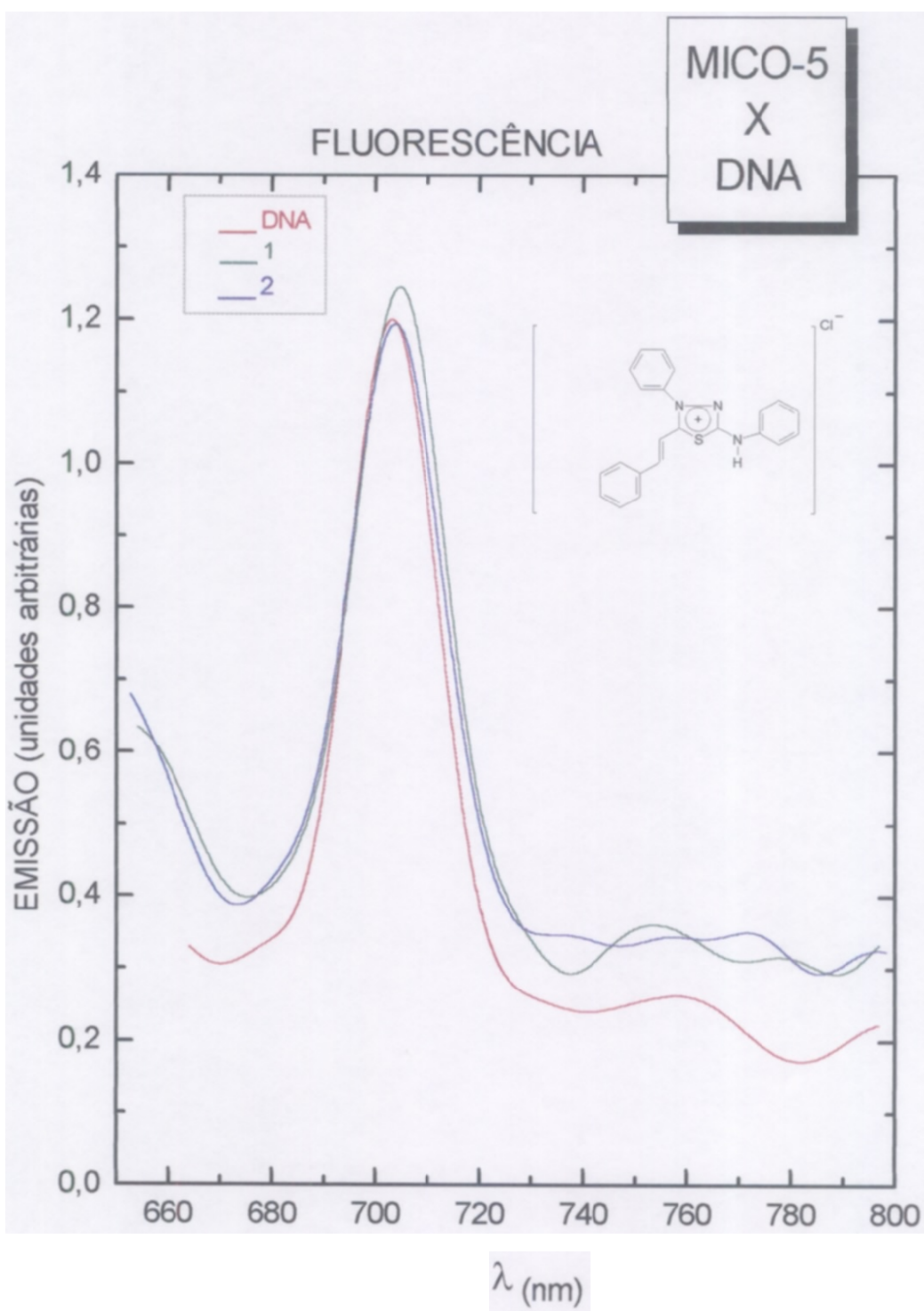


Figura 3.2.18 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na₂SO₄ (5mM) X MICO-5, em acetonitrila, a duas concentrações diferentes : 1 ($8,50 \times 10^{-6}$ M); 2 ($2,55 \times 10^{-5}$ M).

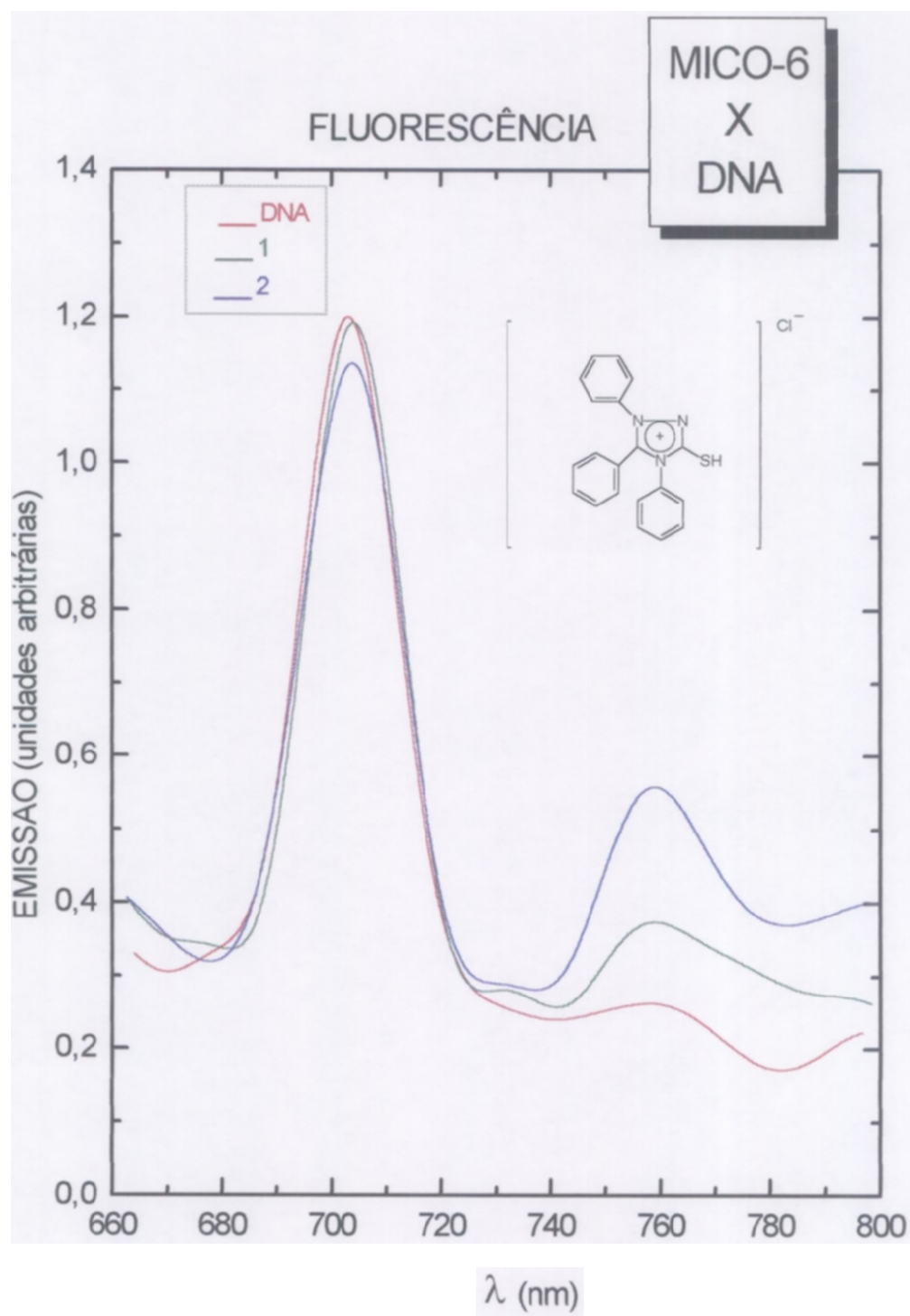


Figura 3.2.19 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na₂SO₄ (5mM) X MICO-6, em acetonitrila, a três concentrações diferentes : 1 ($9,12 \times 10^{-6}$ M); 2 ($2,70 \times 10^{-5}$ M).

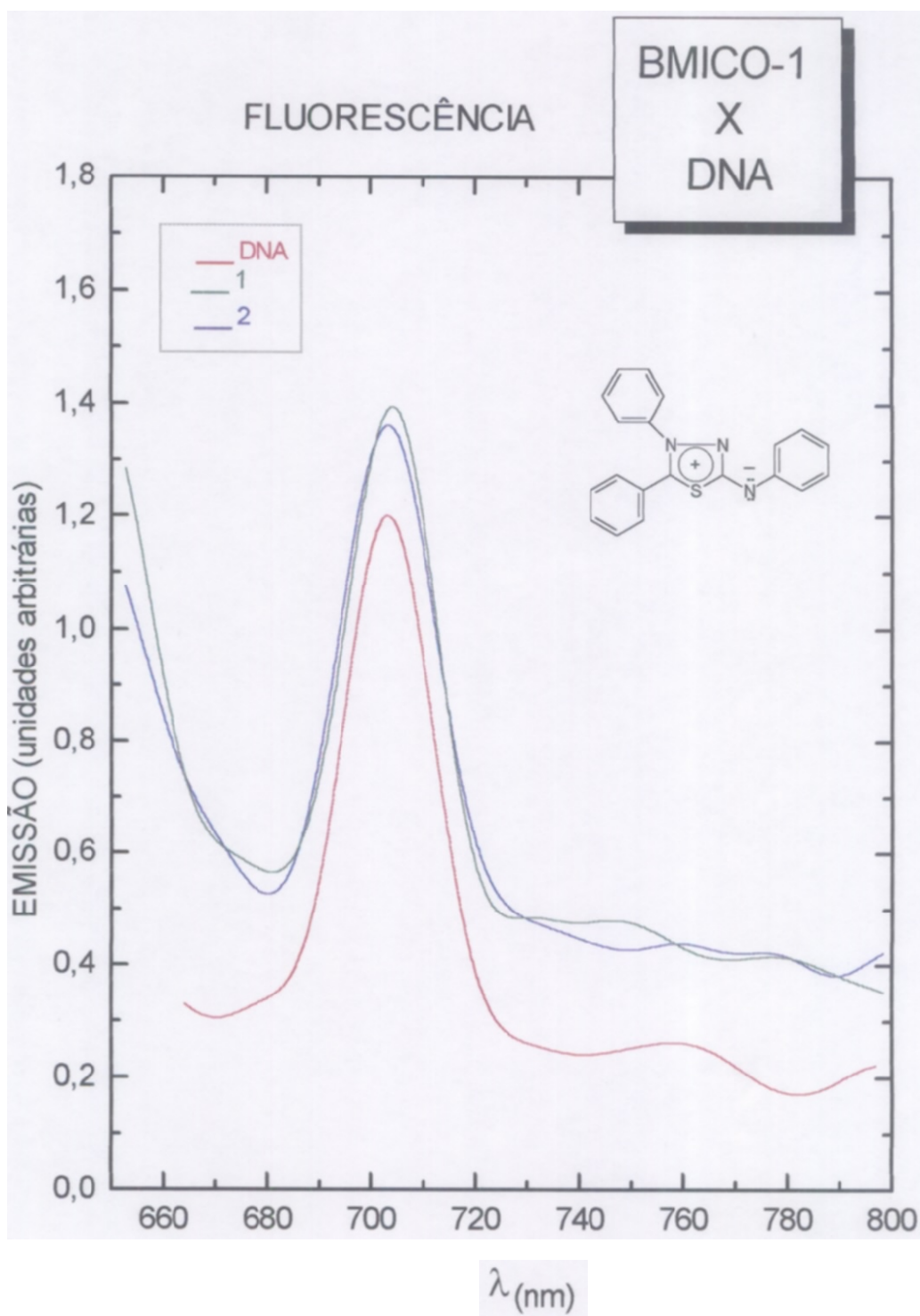


Figura 3.2.20 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na₂SO₄ (5mM) X BMICO-1, em acetonitrila, a duas concentrações diferentes : 1 ($9,12 \times 10^{-6}$ M); 2 ($2,70 \times 10^{-5}$ M).

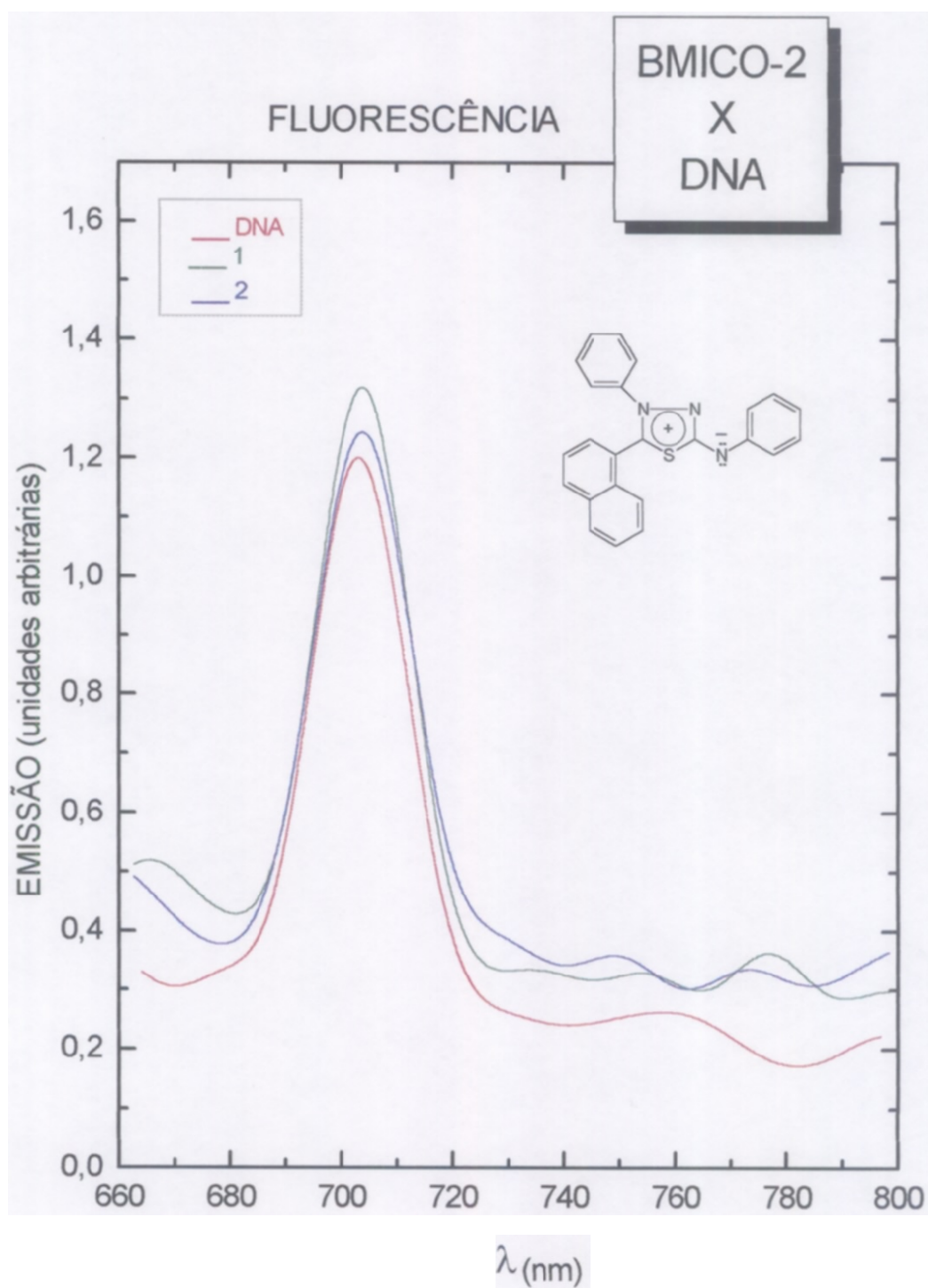


Figura 3.2.21 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na₂SO₄ (5mM) X BMICO-2, em acetonitrila, a duas concentrações diferentes : 1 ($8,73 \times 10^{-6}$ M); 2 ($2,62 \times 10^{-5}$ M).

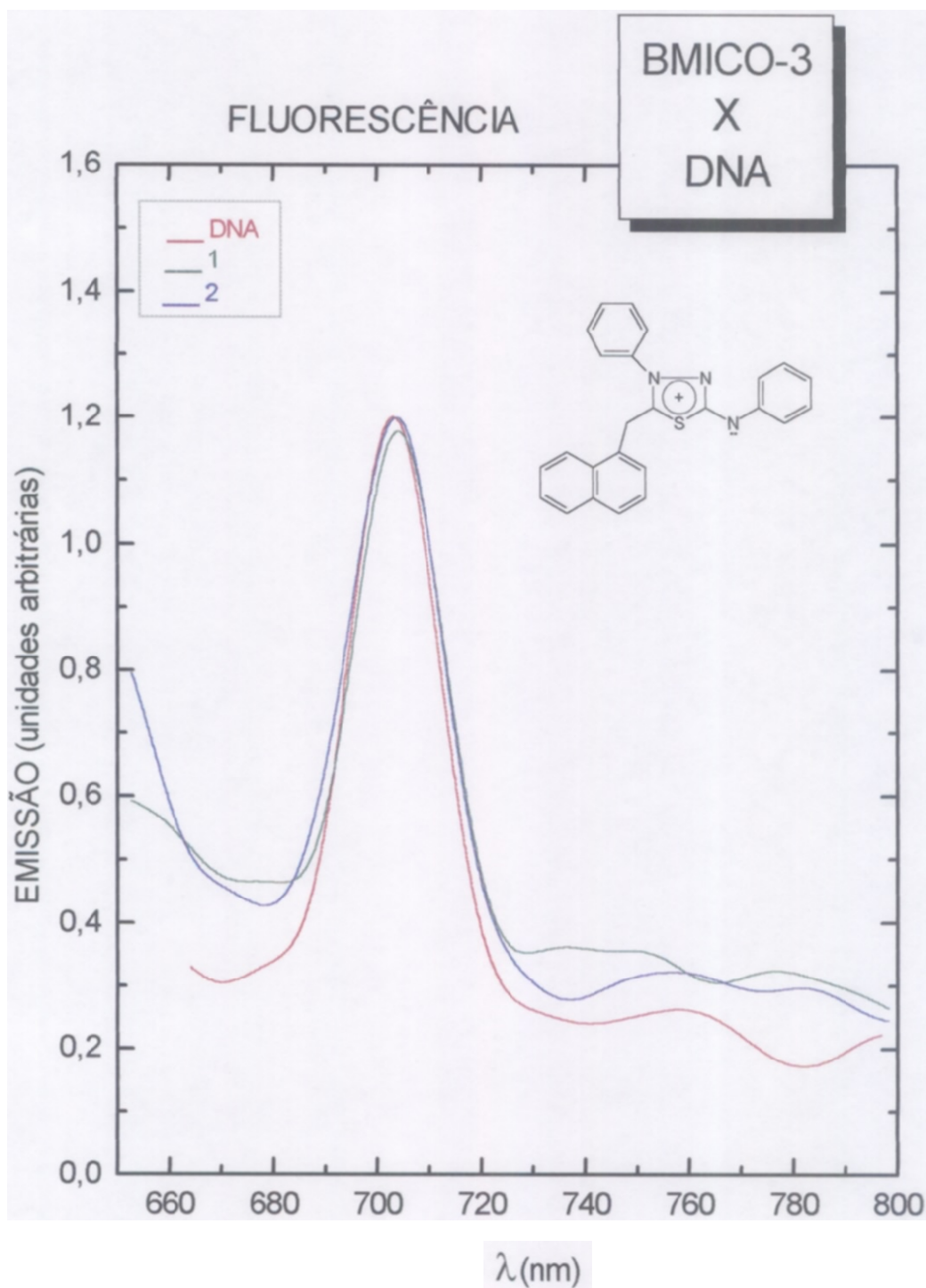


Figura 3.2.22 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na₂SO₄ (5mM) X BMICO-3, em acetonitrila, a duas concentrações diferentes : 1 ($8,47 \times 10^{-6}$ M); 2 ($2,54 \times 10^{-5}$ M).

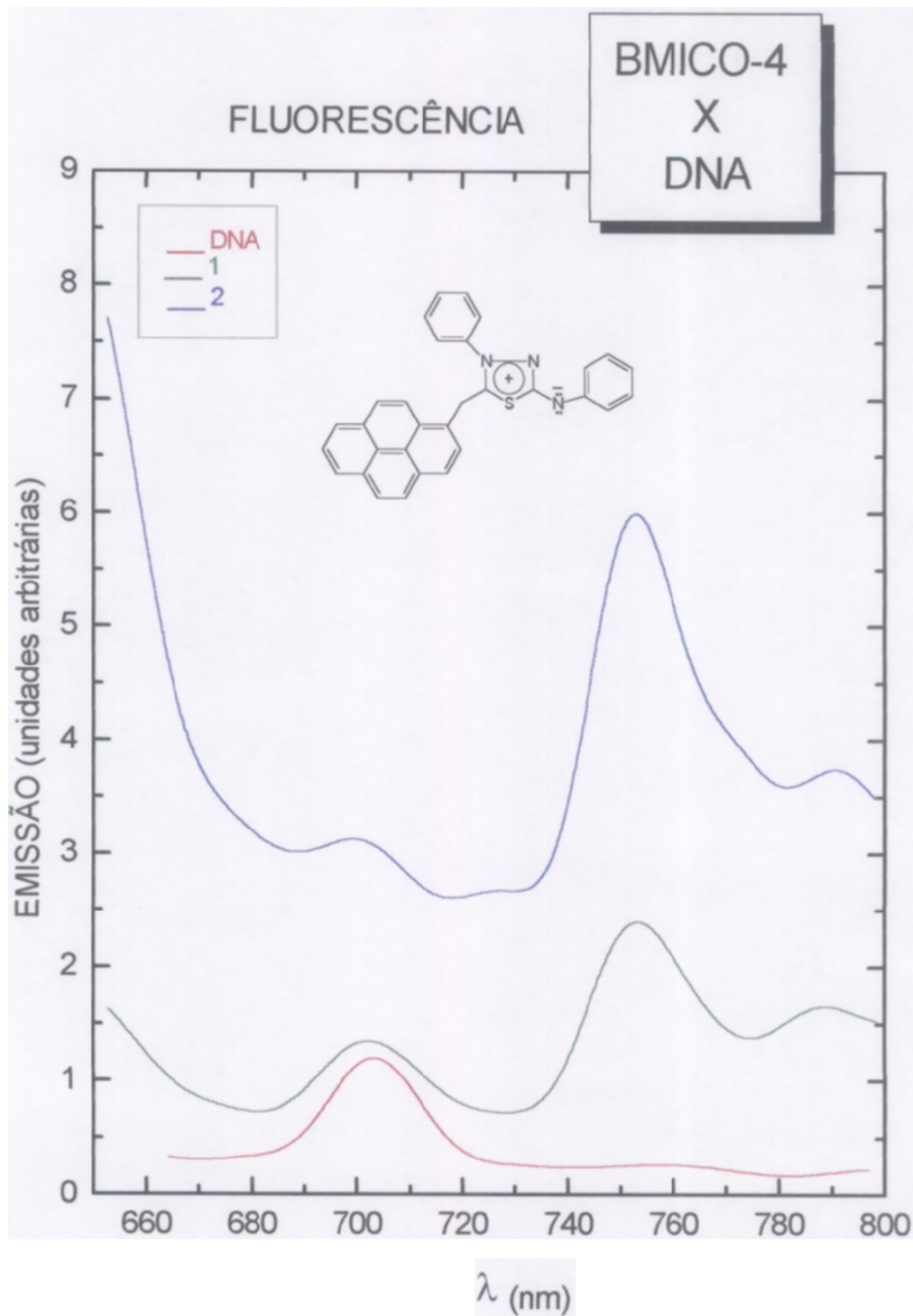


Figura 3.2.23 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na₂SO₄ (5mM) X MICO-4, em acetonitrila, a duas concentrações diferentes e desconhecidas : 1 (50 μ l); 2 (150 μ l).

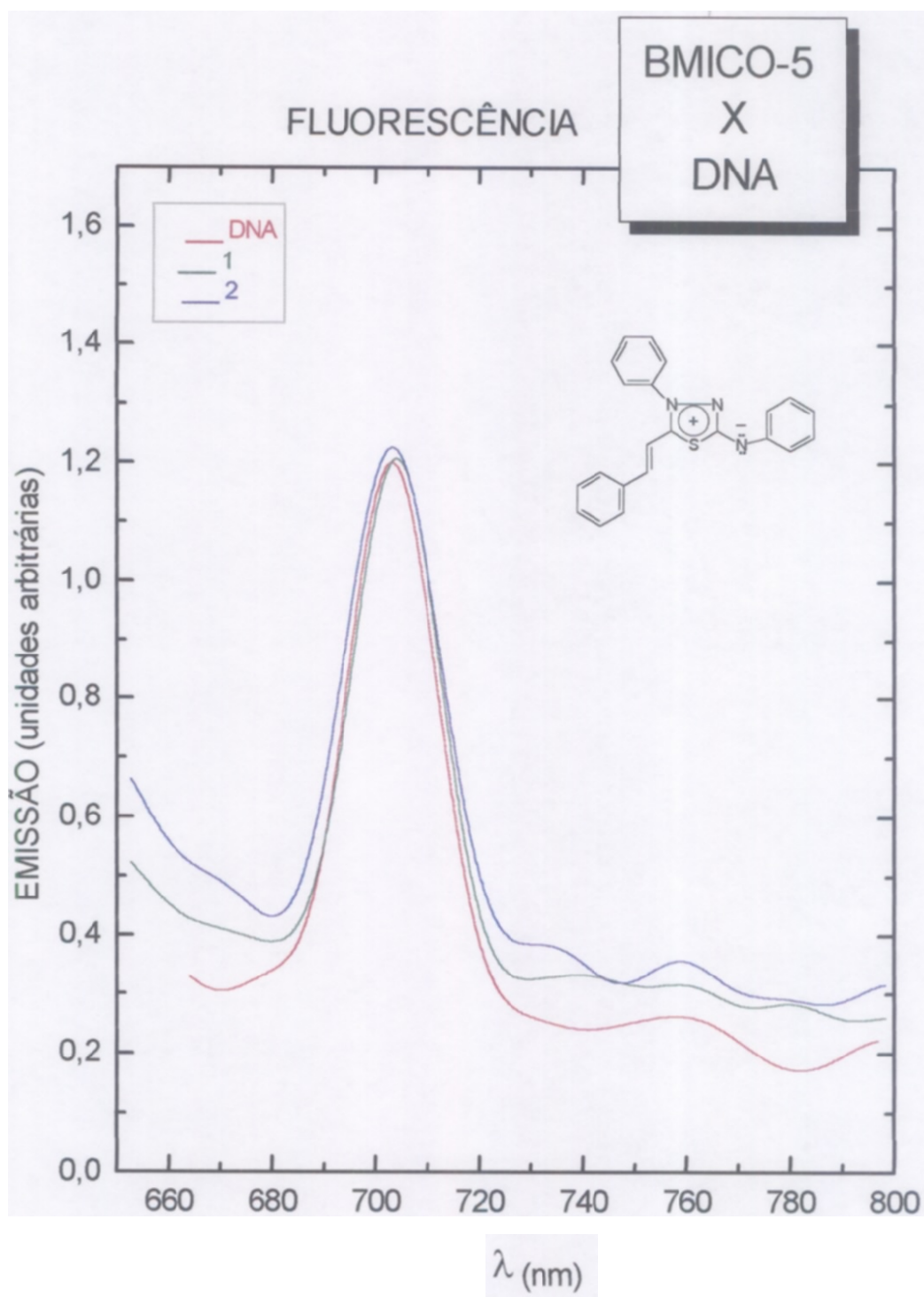


Figura 3.2.23 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na₂SO₄ (5mM) X BMICO-5, em acetonitrila, a duas concentrações diferentes : 1 ($9,30 \times 10^{-6}$ M); 2 ($2,80 \times 10^{-5}$ M).

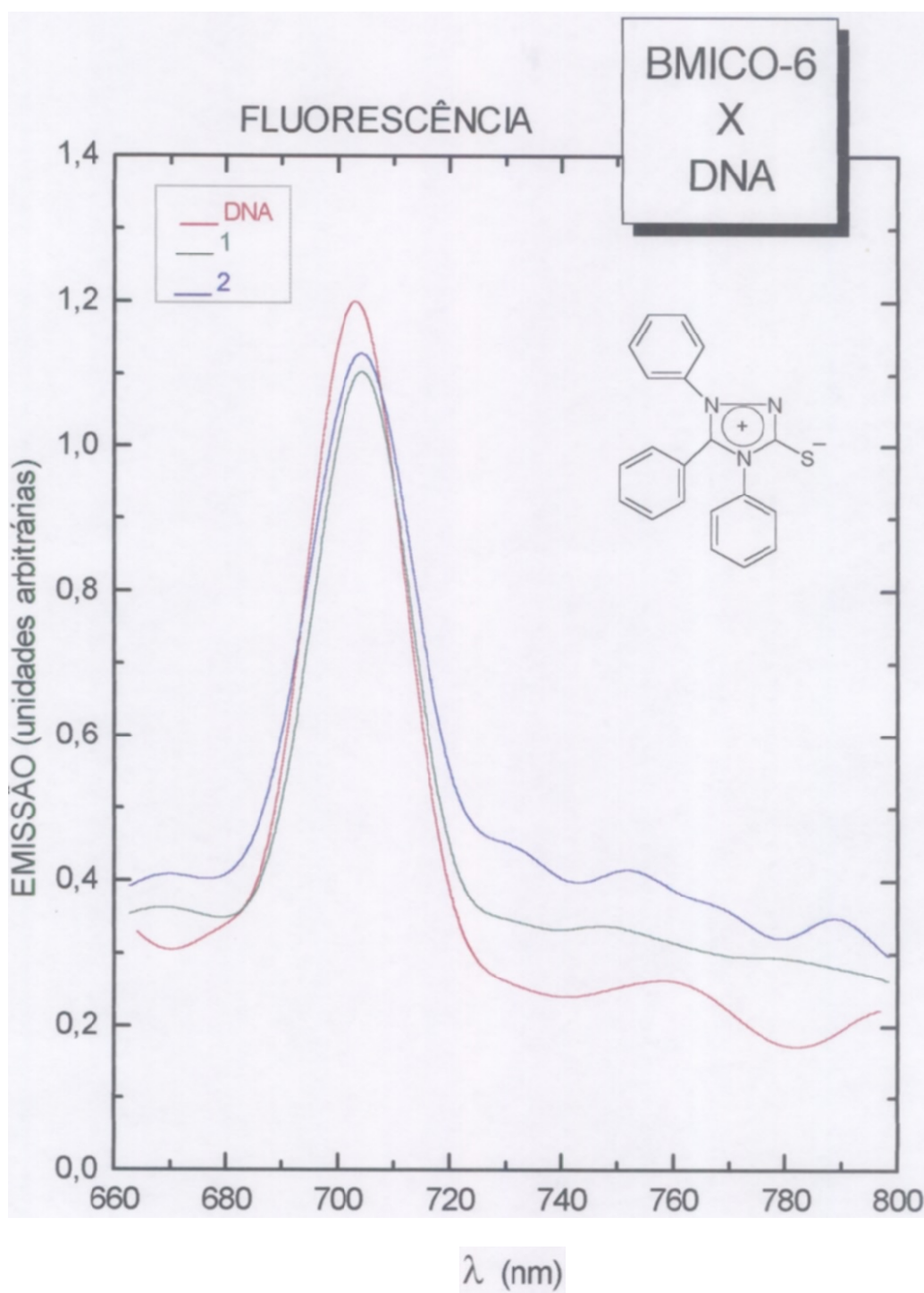


Figura 3.2.24 Espectro de emissão de fluorescência do DNA de timo de bezerro em solução tampão de fosfato (pH 7,0) + Na_2SO_4 (5mM) X BMICO-6, em acetonitrila, a duas concentrações diferentes: 1 (1,01 x 10⁻⁶ M); 2 (3,00 x 10⁻⁵ M).

3.3 RMN De ^{13}C Dos Compostos Heterocíclicos

As atribuições dos espectros de RMN de ^{13}C foram realizadas por etapas comparando-se os sinais dos carbonos presentes em cada derivado com seus respectivos ácidos carboxílicos precursores, dados de difração de raios-x e cálculos teóricos de vários trabalhos anteriores.

Os deslocamentos de C-2 e C-5 para o anel heterocíclico apresentaram os maiores valores quando comparados com os outros carbonos, sendo que para C-5 ficaram entre 161,7 e 169,7 ppm e para C-2 entre 158,62 e 161,57 ppm para os derivados do sistema 1,3,4-tiadiazólio. (Tabelas 3.4.1 a 3.4.4).

Estas atribuições basearam-se nos resultados de difração de Raio-X, cálculos teóricos⁽¹⁷⁾ e nos valores das constantes de acoplamento entre C-2 e N heterocíclico previamente enriquecido com ^{15}N ⁽⁴⁶⁾

No caso do composto MICO-6, do sistema 1,3,4-triazólio, o C-5 absorve em 148,22 ppm e C-2 em 168,99 ppm, de acordo com os resultados obtidos por difração de raio-x e cálculos teóricos⁽¹⁹⁾.

Os deslocamentos químicos dos carbonos nos anéis aromáticos ligados diretamente, ou através de um grupo $-\text{CH}_2-$ ou $-\text{CH}=\text{CH}-$ ao C-5 do anel heterocíclico, foram atribuídos por comparação aos correspondentes ácidos carboxílicos precursores. (Tabelas 3.4.1 a 3.4.5).

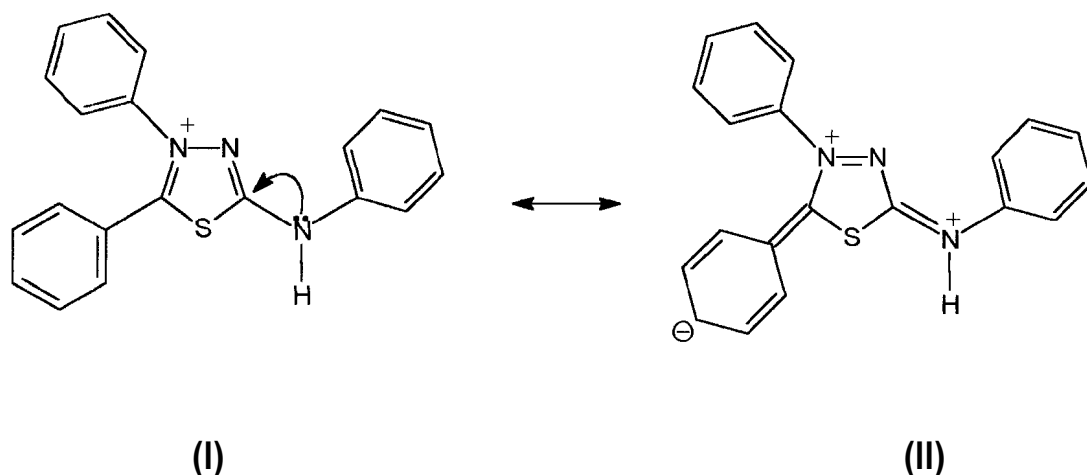
Os carbonos que sofreram variações mais significativas foram C- α do MICO-3 (66,78 ppm) comparando-se ao ácido α -naftilacético (30,68 ppm) devido ao grande efeito de desproteção do anel heterociclo, cuja capacidade retiradora de elétrons pôde ser avaliada pelo valor de seu σ (0,71⁽¹⁸⁾), comparável ao do grupo NO₂ (0,78⁽⁴⁶⁾).

No caso do C-1''', ligado ao C-5 do anel heterocíclico em MICO-2, observou-se um pequeno efeito de desproteção em relação ao C-1 do ácido naftóico.

Os átomos de carbono α e β do ácido cinâmico, quando comparados ao derivado MICO-5 apresentaram deslocamentos químicos variando de 144,02 para 149,10 ppm (C- α) e 119,29 para 109,88 ppm (C- β), respectivamente. A maior diferença para o C- β ($\Delta \approx 10$ ppm) é devida ao maior efeito retirador do anel heterocíclico π -deficiente, quando comparado ao grupo carboxila ($\sigma - = 0,451$ ⁽⁴⁴⁾),

A atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos dos anéis ligados diretamente aos heteroátomos N-4 e N_{exo} foi realizada utilizando-se os resultados da difração de Raios-X, cálculos teóricos e através de técnicas de RMN ¹⁵N. Foram considerados os valores de comprimento de ligação para N-4,C-1'' = 1,461 Å; N_{exo}, C-1'' = 1,408 Å; N_{exo}, C-2 = 1,343 Å e os valores da ordem de ligação $\sigma + \pi$ para N-4,C1'' = 0,88, N-3,C-2 = 1,27; N_{exo}, C-2 = 0,95.

A partir destes dados podemos sugerir uma maior contribuição da estrutura canônica II:



Conseqüentemente, comparando-se os sinais de mesma intensidade na faixa de 136 a 138 ppm atribuímos os maiores deslocamentos químicos aos carbonos C1'.

Os deslocamentos químicos referentes aos carbonos o, m e p do anel ligado ao N-4 foram atribuídos por comparação ao íon anilônio (46). Os carbonos correspondentes do anel ligado ao N_{exo} foram atribuídos comparando-se com a anilina.

O derivado MICO-4, em razão de sua grande insolubilidade nos solventes normalmente utilizados para espectroscopia, não foi caracterizado por RMN de ¹³C.

O composto MICO-6 teve seus sinais atribuídos segundo a mesma metodologia utilizada para os compostos anteriores, considerando-se os resultados obtidos por difração de Raios-X e cálculos teóricos e por RMN de ¹⁵N⁽¹⁷⁾.

Tabela 3,4,4 Dados de RMN de ^{13}C (50,3 MHz, CDCl_3) de MICO-5.

C	$\delta_c(\text{ppm})$
2 Het	158,62
5 Het	161,74
1'	137,82
2', 6'	118,85
3', 5'	129,15
4'	124,33
1''	136,45
2'', 6''	125,33
3'', 5''	128,85
4''	132,36
1'''	132,97
2''', 6'''	130,18
3''', 5'''	128,94
4'''	131,91
α	149,10
β	109,88

Tabela 3,4,5 Dados de RMN de ^{13}C (50,3 MHz, CDCl_3) de MICO-6.

C	$\delta_c(\text{ppm})$
2 Het	169,96
5 Het	148,22
1'	134,41
2', 6'	128,91
3', 5'	n.o.
4'	n.o.
1''	136,08
2'', 6''	125,64
3'', 5''	128,64
4''	131,59
1'''	122,37
2''', 6'''	129,41
3''', 5'''	129,84
4'''	130,53

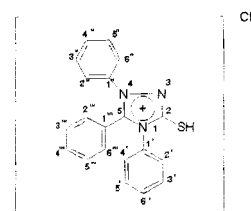
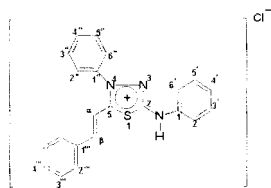


Tabela 3.4.6 Dados de RMN de ^{13}C (50,3 MHz, CDCl_3) do ácido α -naftóico.

C	$\delta_c(\text{ppm})$
1	127,15
2	129,70
3	123,99
4	132,45
5	127,86
6	125,43
7	126,85
8	n.o.
9	130,76
10	133,13
C=O	169,00

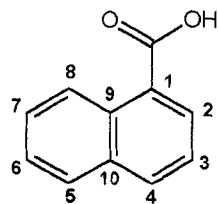


Tabela 3.4.7 Dados de RMN de ^{13}C (50,3 MHz, CDCl_3) do ácido α -nailacético.

C	$\delta_c(\text{ppm})$
1	127,98
2	128,56
3	124,02
4	131,71
5	128,44
6	127,47
7	128,05
8	125,64
9	131,95
10	133,40
α	30,68
C=O	172,81

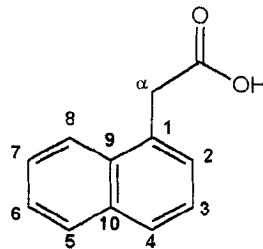
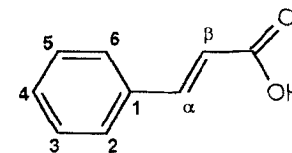


Tabela 3.4.8 Dados de RMN de ^{13}C (50,3 MHz, CDCl_3) do ácido cinâmico.

C	$\delta_c(\text{ppm})$
1	134,28
2-6	128,97
3-5	128,25
4	130,28
α	144,02
β	119,29
C=O	167,87



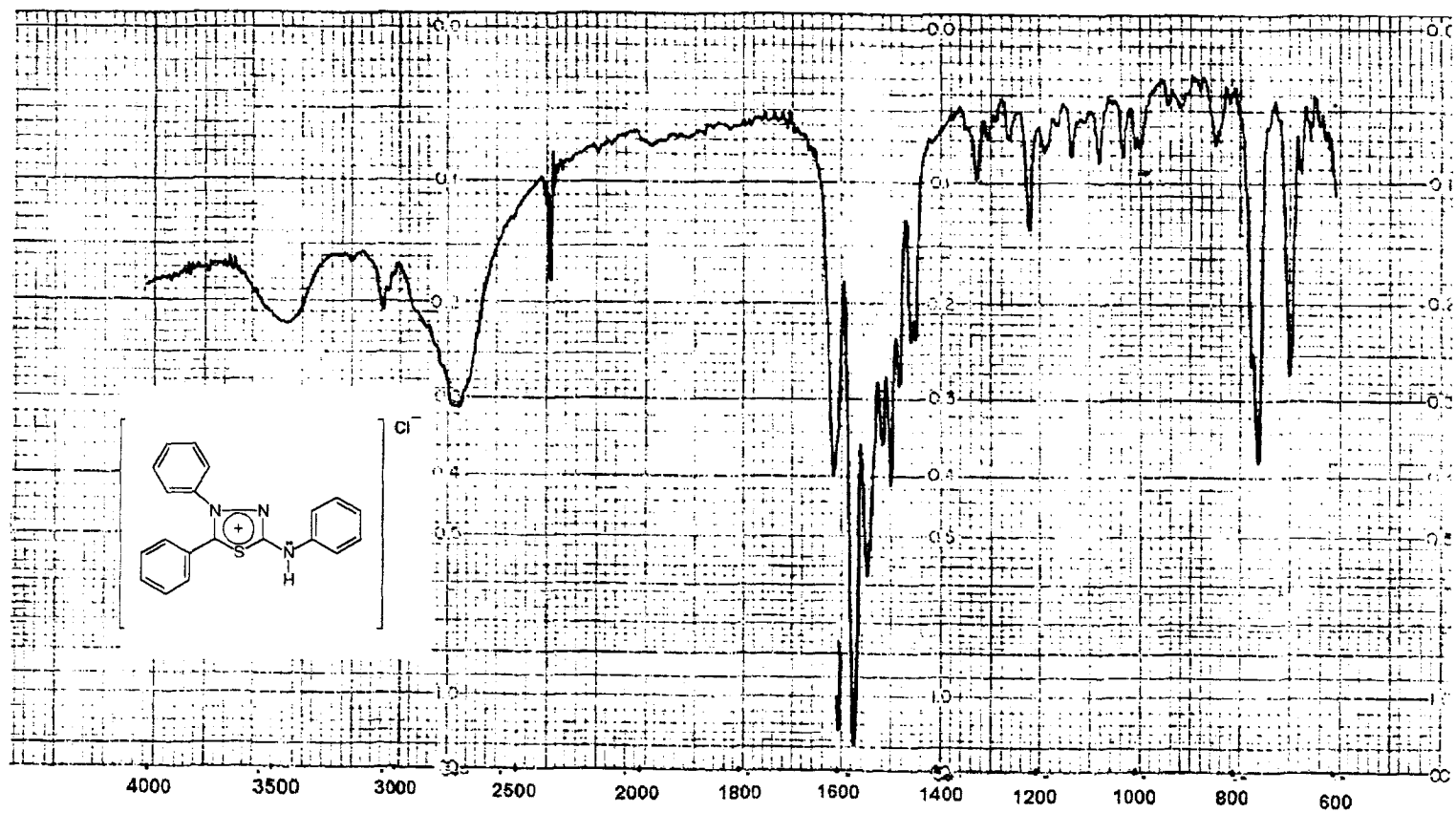


Figura. 3.2.26 Espectro de infravermelho para o composto MICO-1

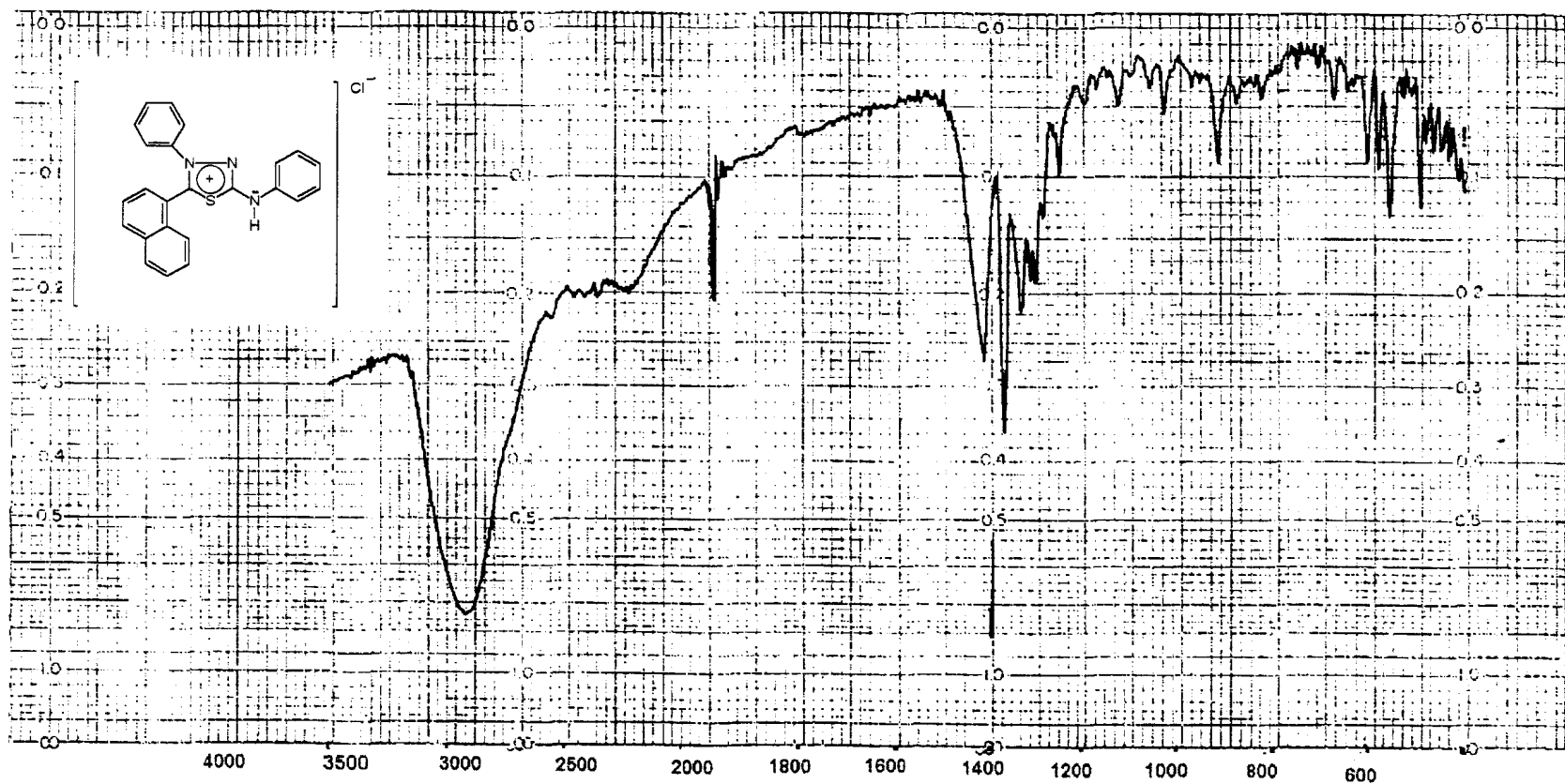


Figura 3.2.27 Espectro de infravermelho para o composto MICO-2.

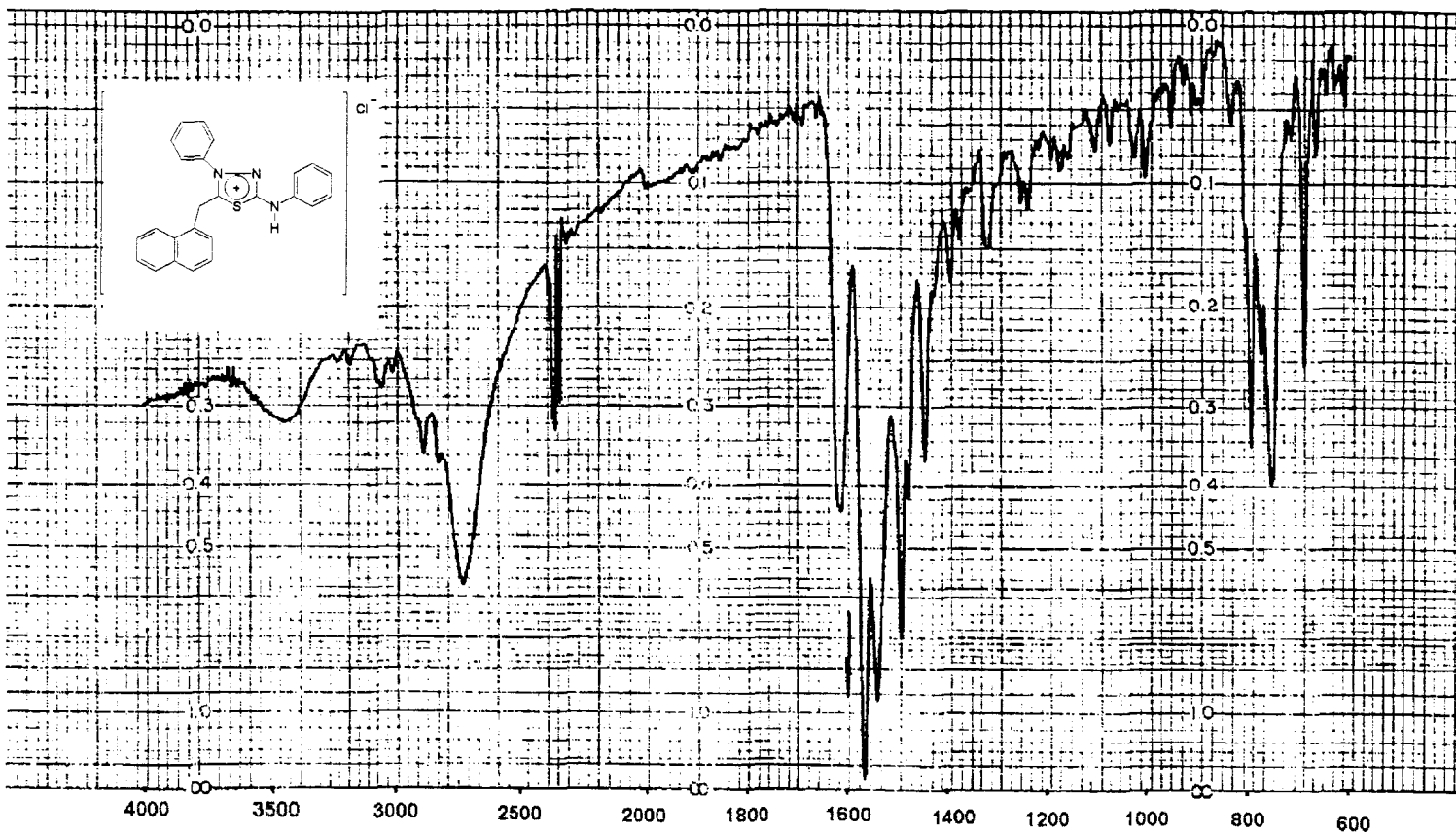


Figura 3.2.28 Espectro de infravermelho para o composto MICO-3

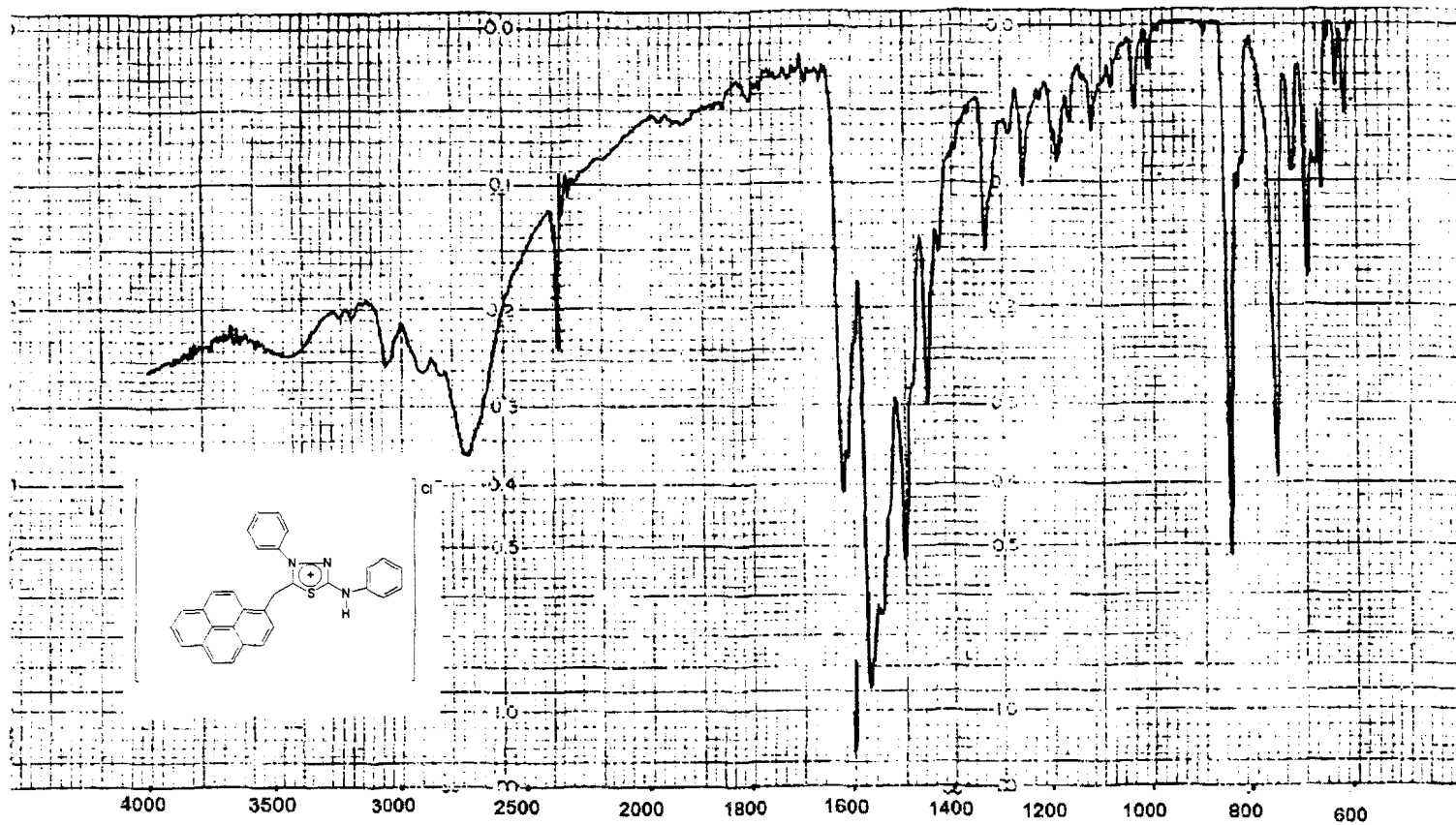


Figura3.2.29 Espectro de infravermelho para o composto MICO-4

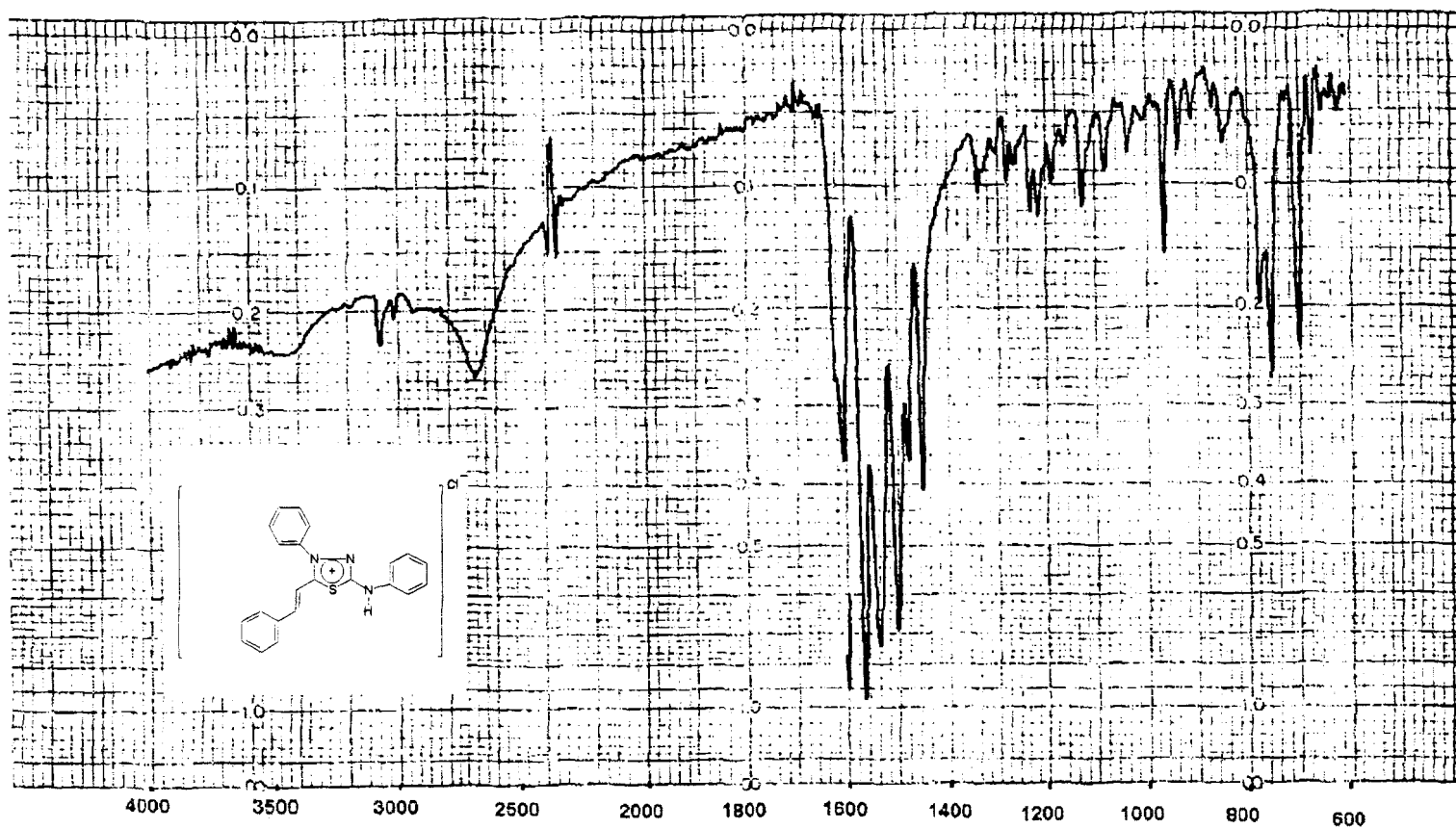


Figura 3.2.30 Espectro de infravermelho para o composto MICO-5

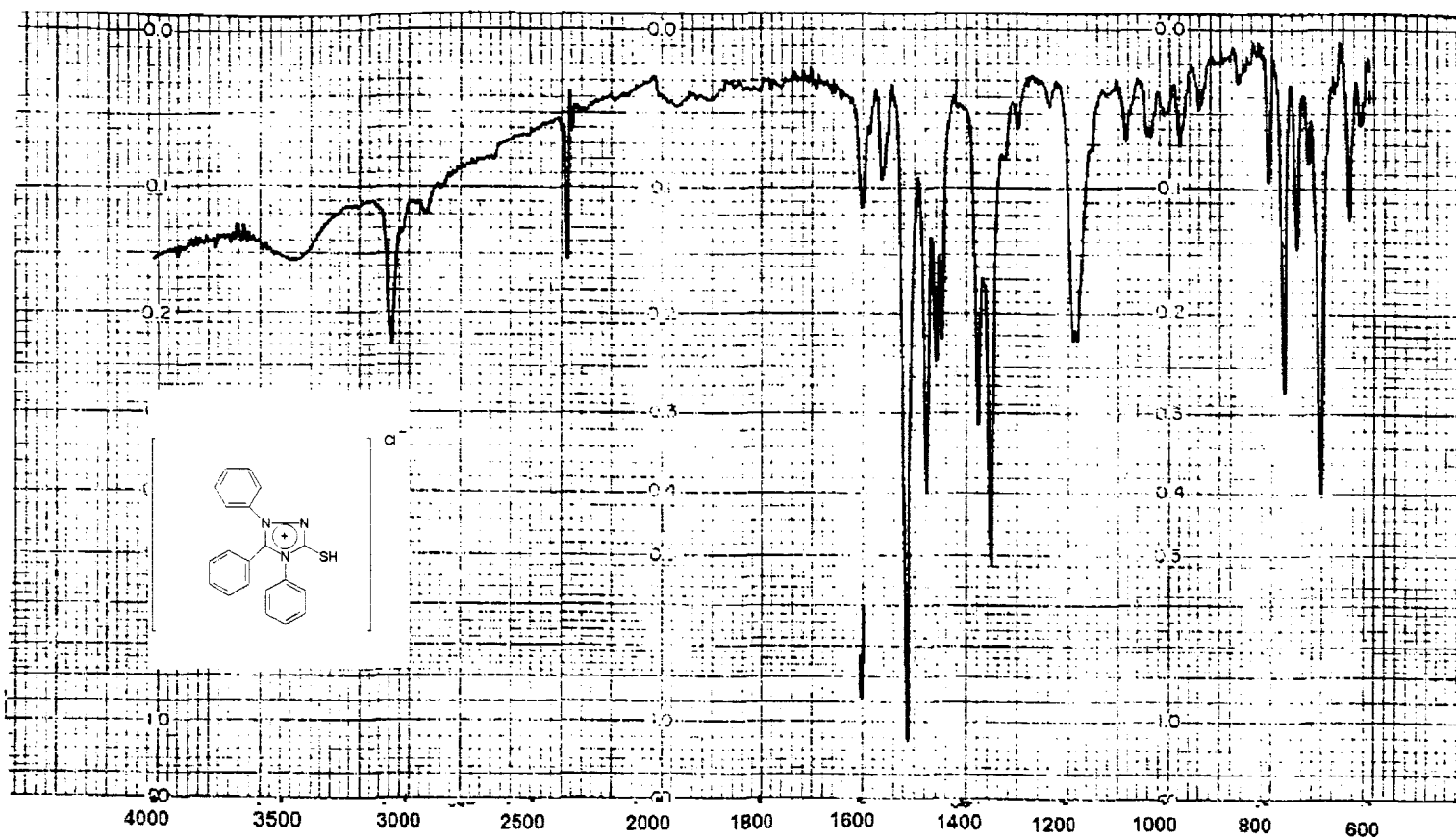


Figura 3.2.31 Espectro de infravermelho para o composto MICO-6

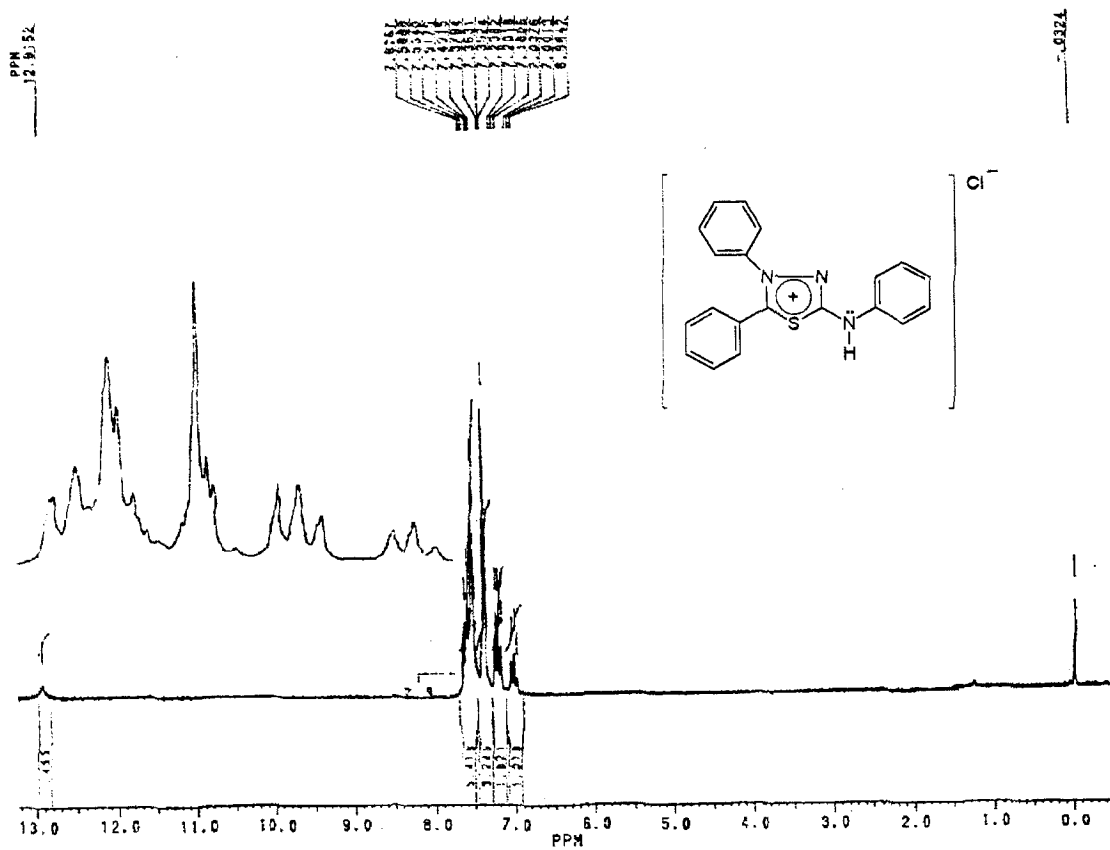


Figura 3.2.32 Espectro de RMN ^1H para o composto MICO-1

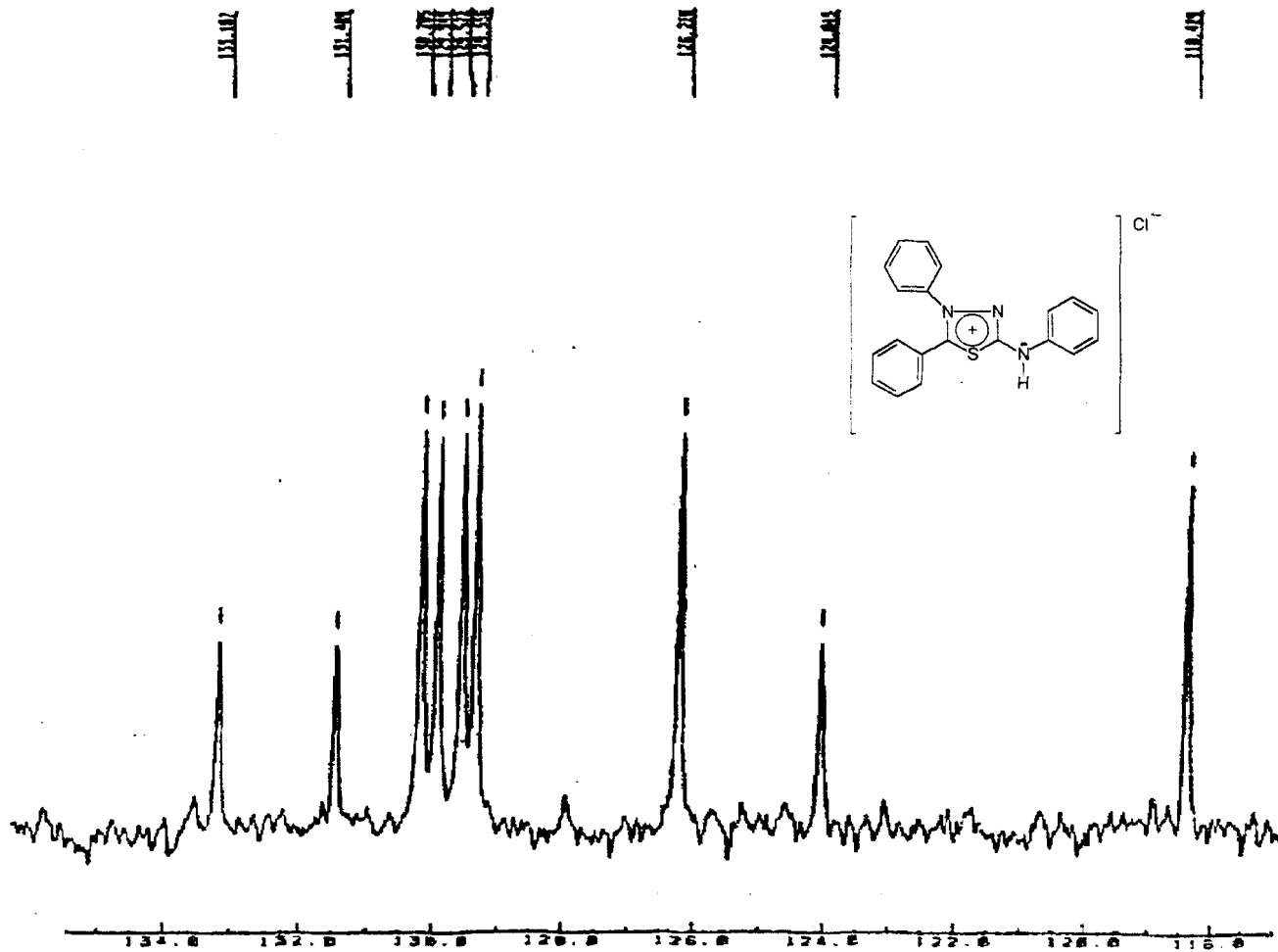


Figura 3.2.33 Espectro de RMN ^{13}C para o composto MICO-1

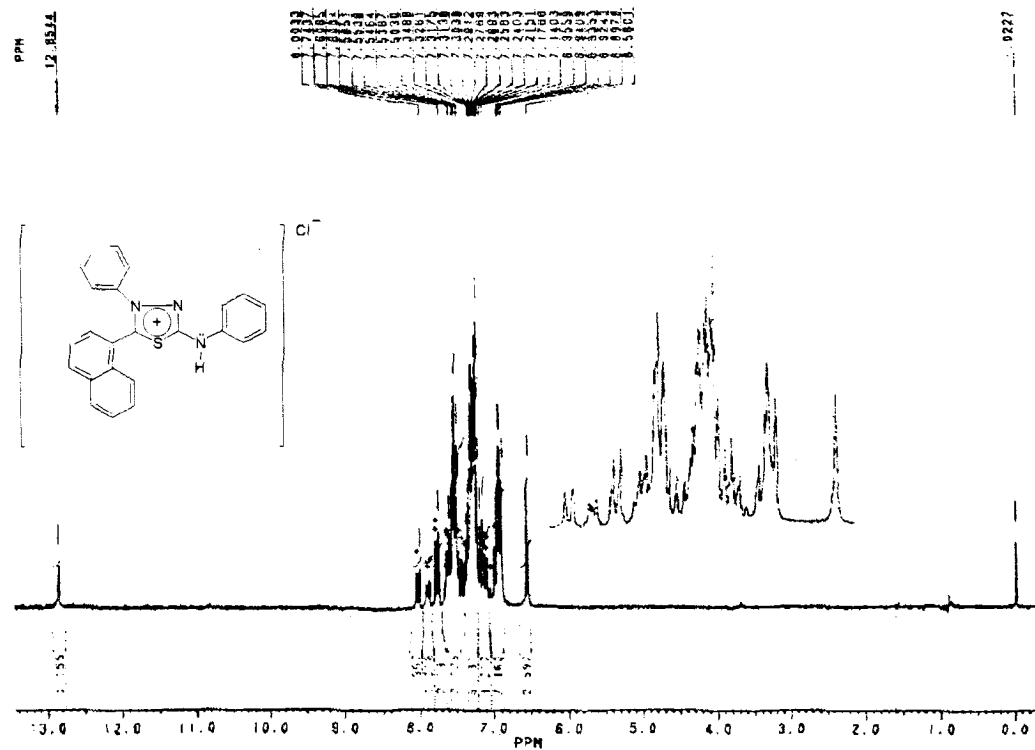


Figura 3.2.34 Espectro de RMN^1H para o composto MICO-2

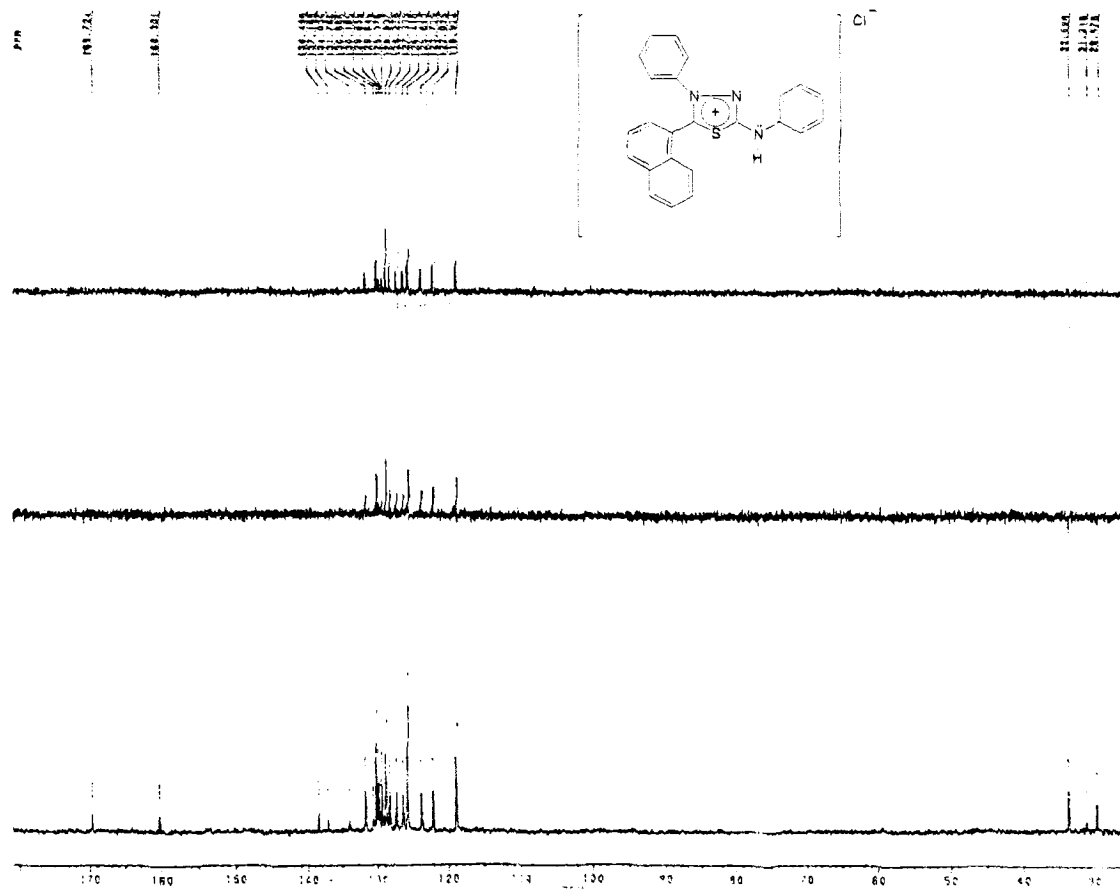


Figura 3.2.35 Espectro de RMN^{13}C para o composto MICO-2

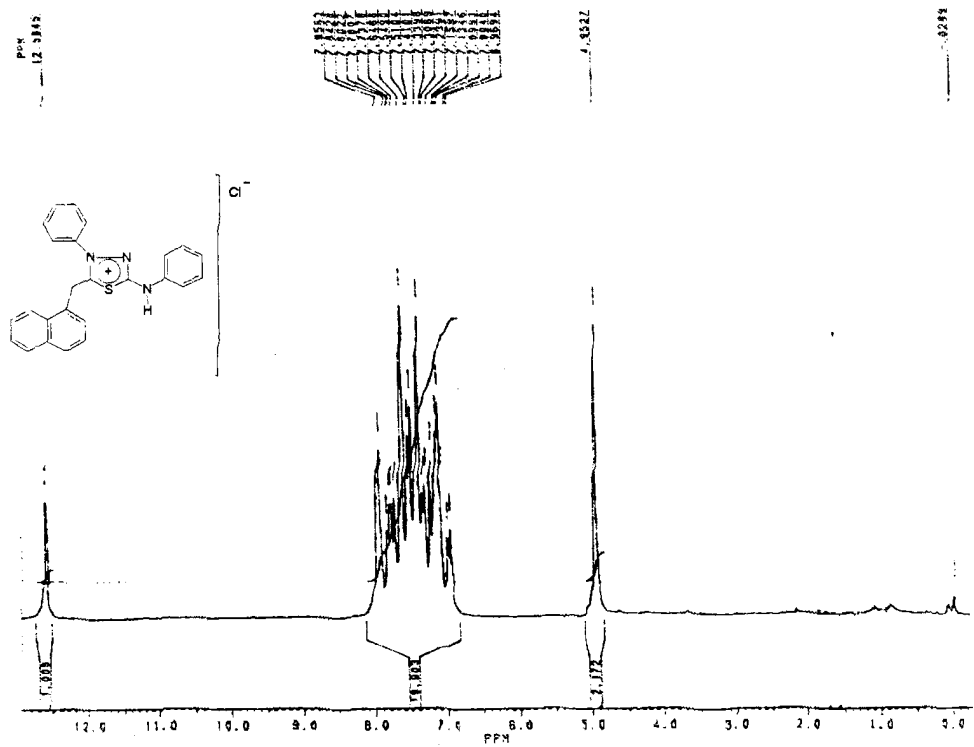


Figura 3.2.36 Espectro de RMN¹H para o composto MICO-3

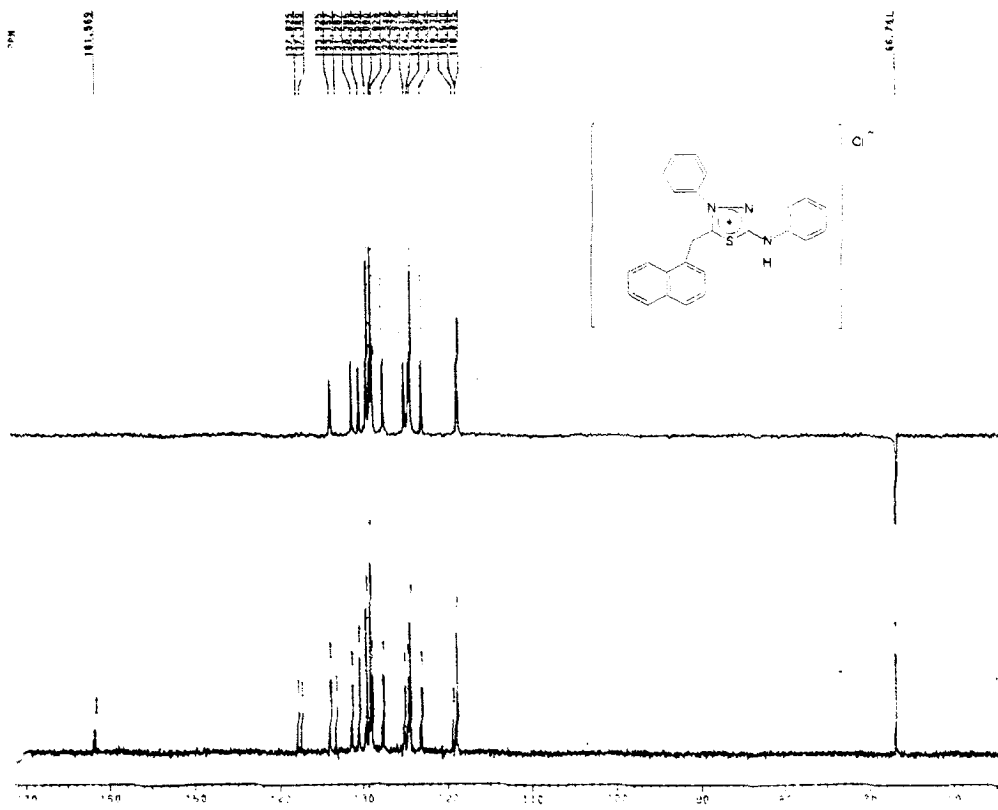


Figura 3.2.37 Espectro de RMN ^{13}C para o composto MICO-3

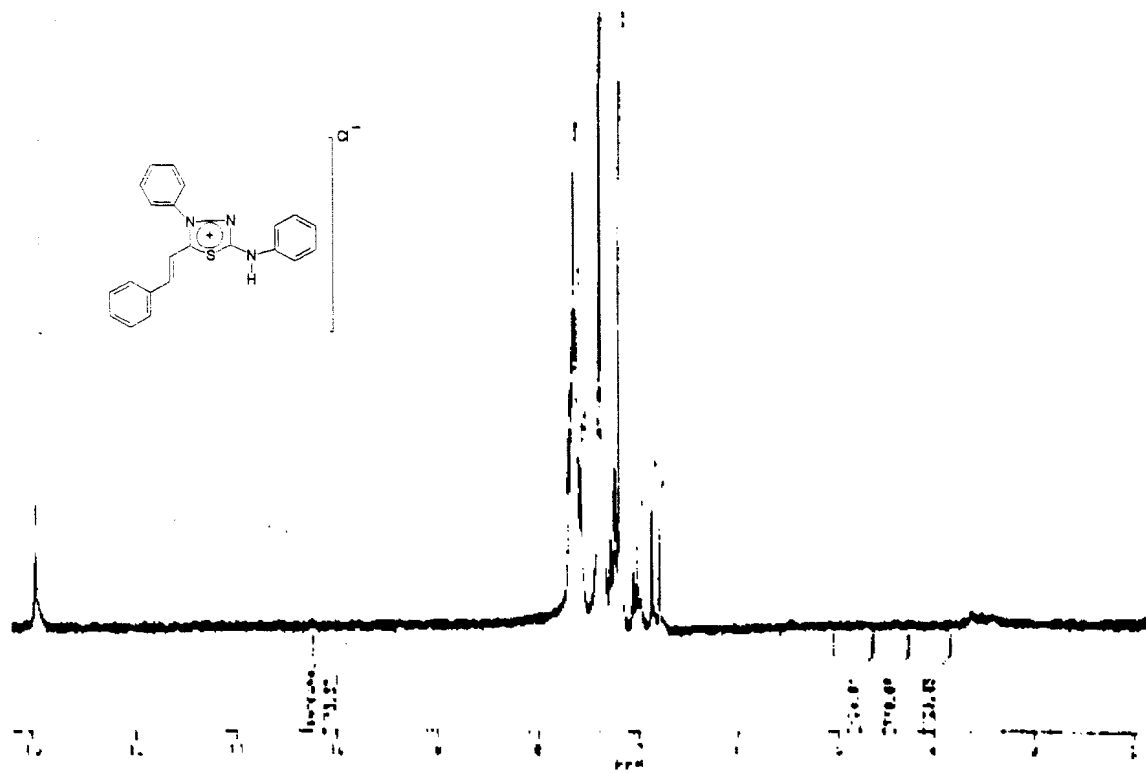


Figura 3.2.38 Espectro de RMN¹H para o composto MICO-5

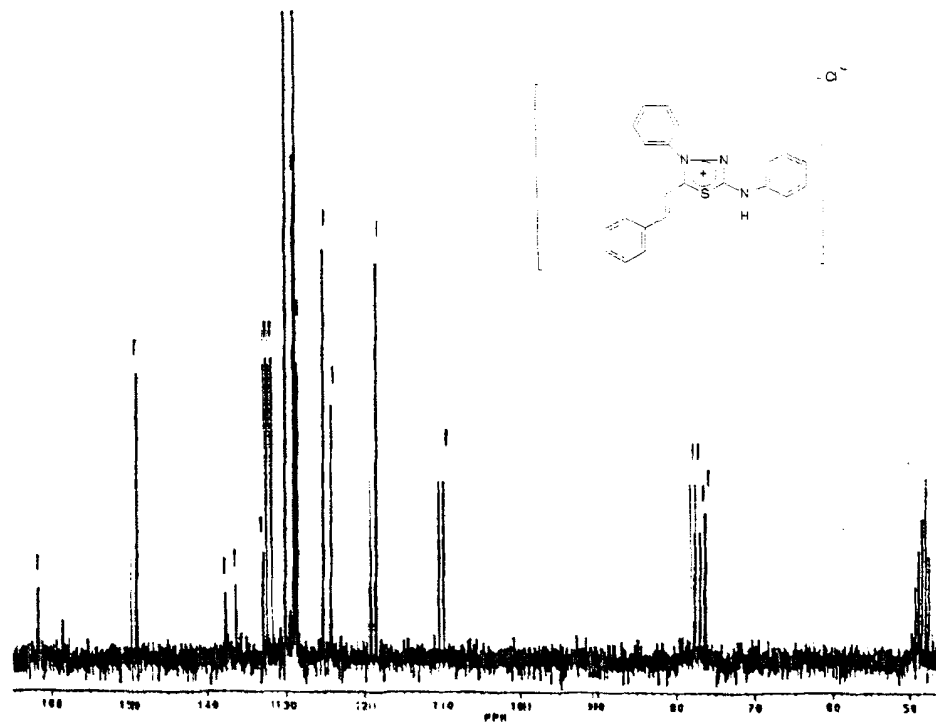


Figura 3.2.39 Espectro de RMN¹³C para o composto MICO-5

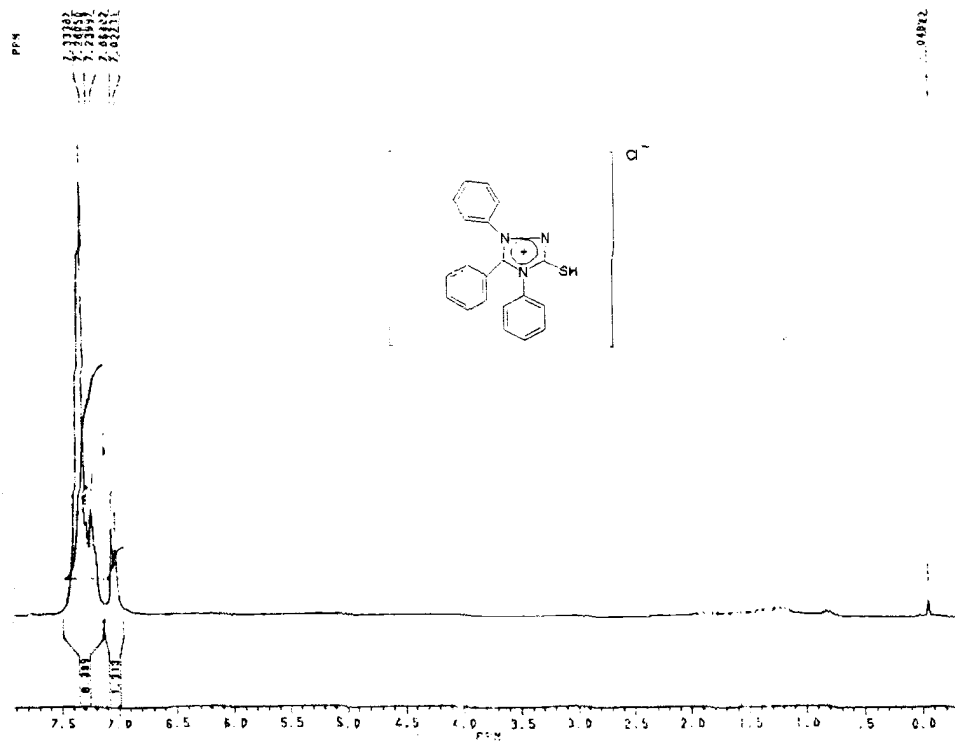


Figura 3.2.40 Espectro de RMN¹H para o composto MICO-6

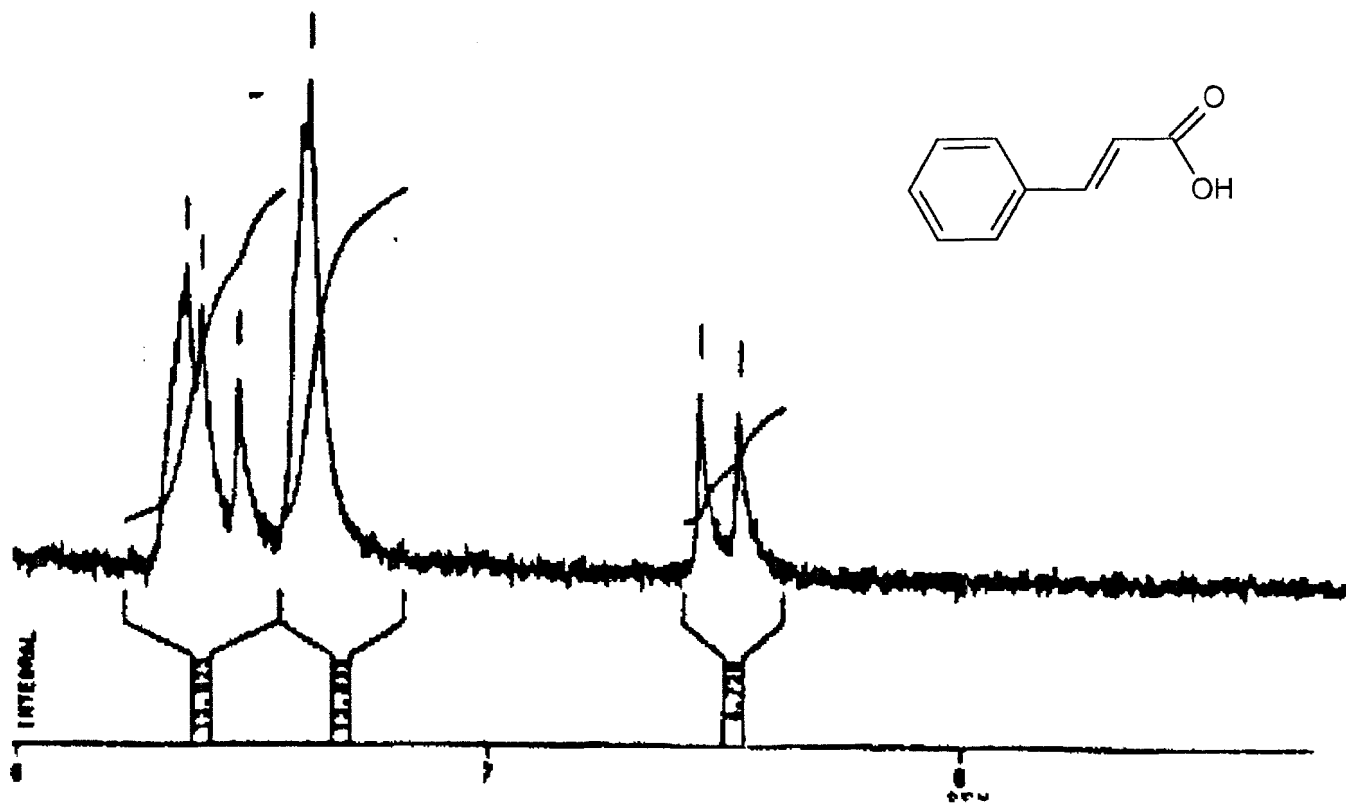


Figura 3.2.42 Espectro de RMN ^1H para o ácido cinâmico

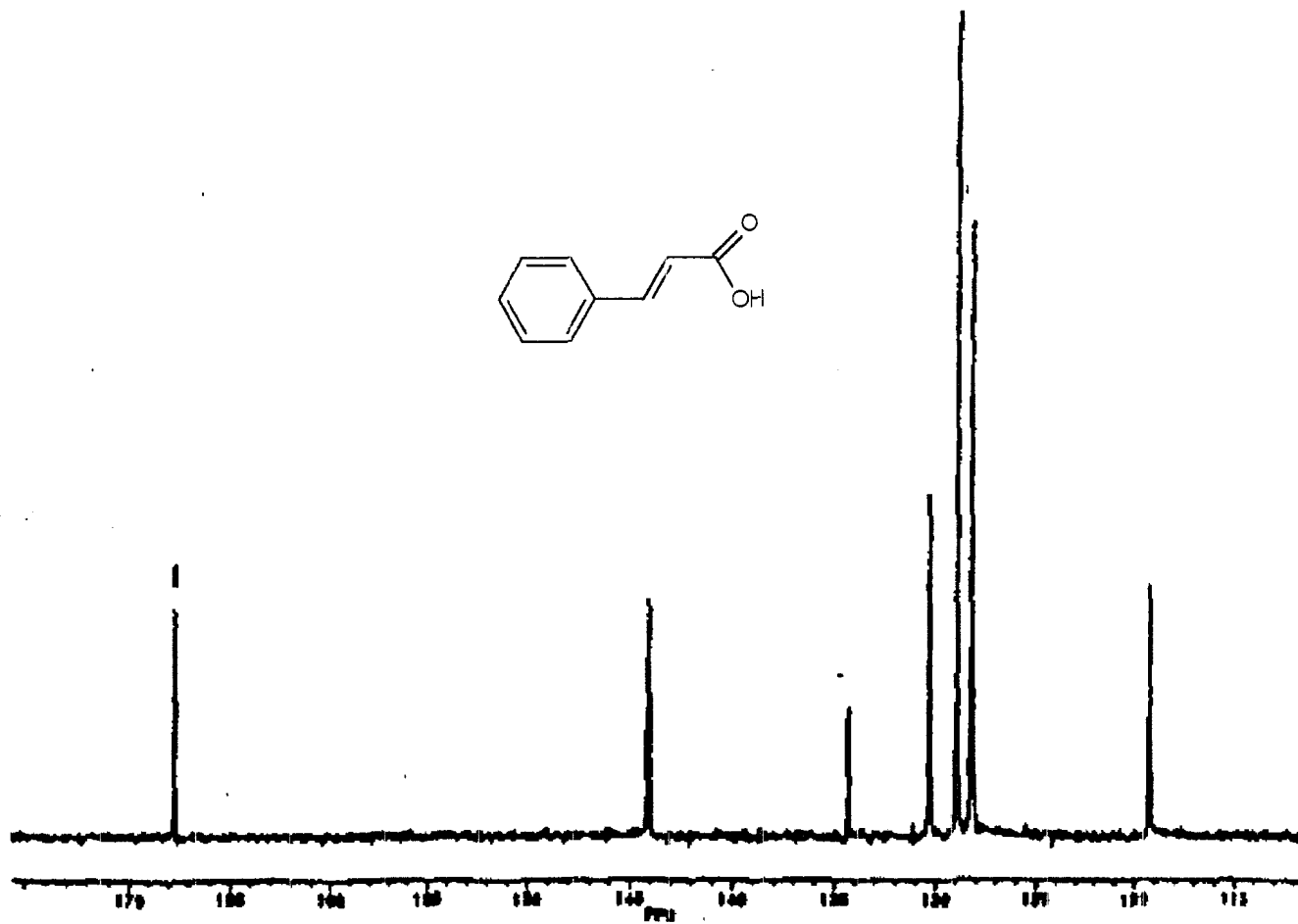


Figura 3.2.43 Espectro de RMN ^{13}C para o ácido cinâmico

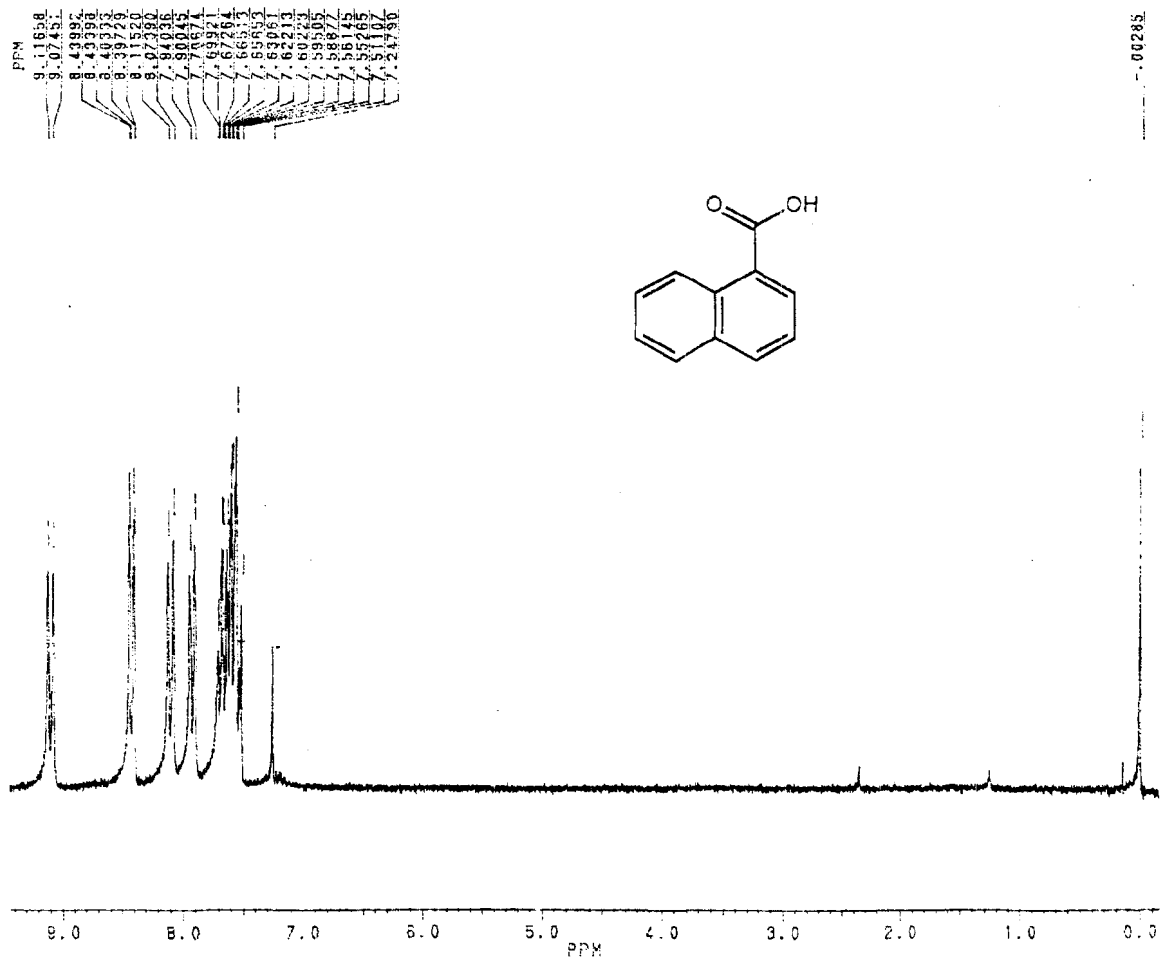


Figura 3.2.44 Espectro de RMN¹H para o ácido naftóico

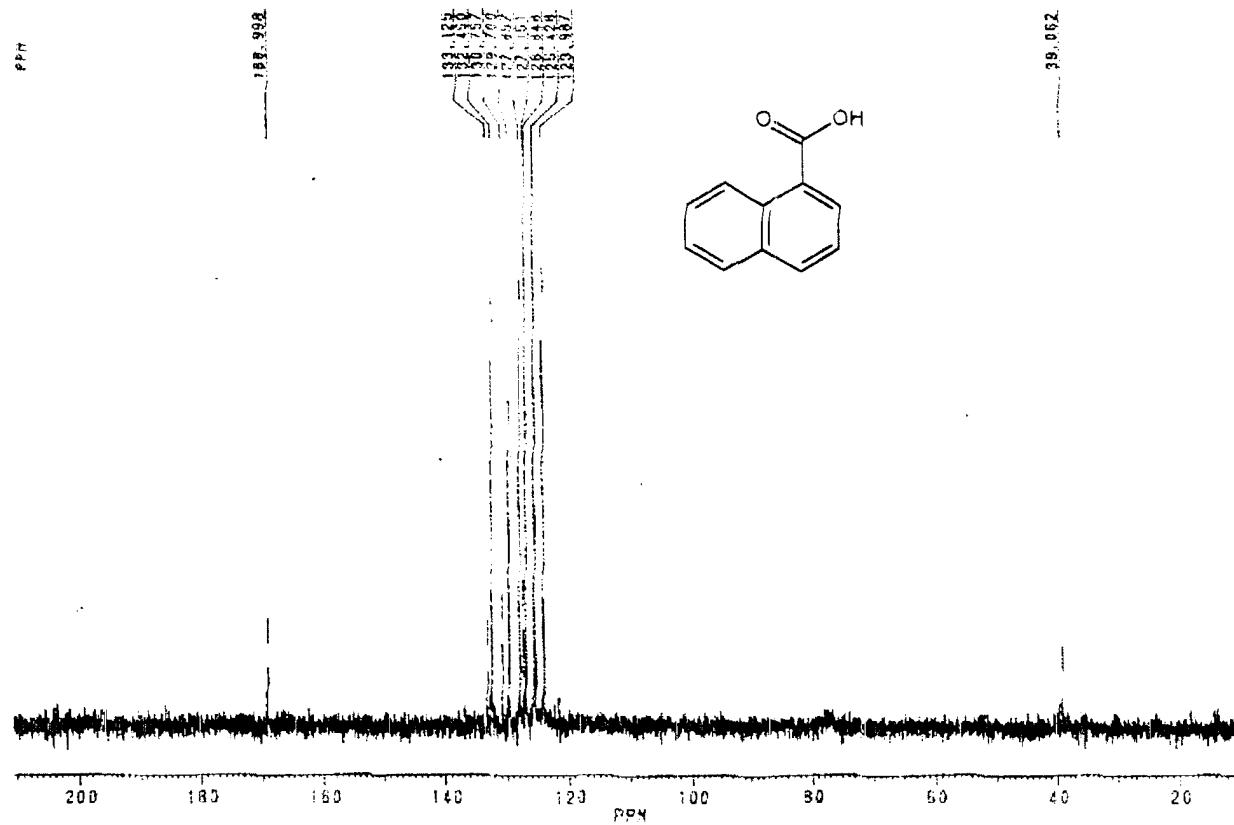


Figura 3.2.44 Espectro de RMN ^{13}C para o ácido naftóico

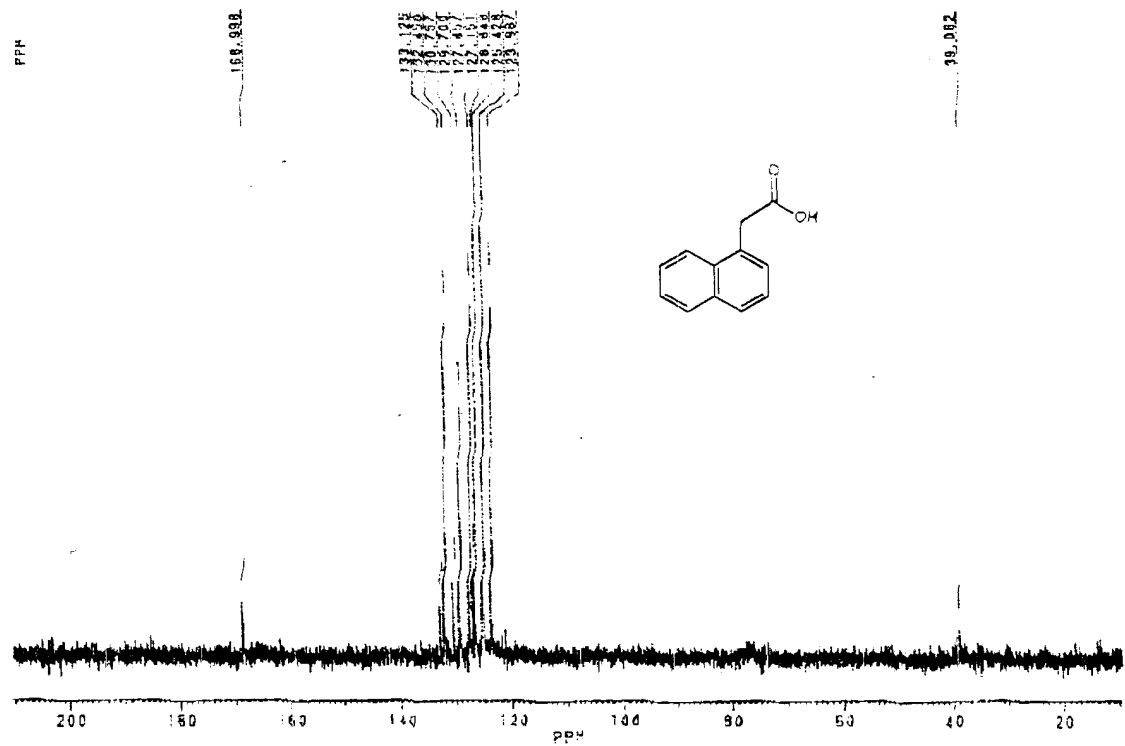


Figura 3.2.46 Espectro de RMN ^{13}C para o ácido α naftilacético

4. CONCLUSÃO

As metodologias sintéticas para obtenção dos compostos heterocíclicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina e o isômero estrutural 1,3,4-triazólio-2-tiol, baseados na reação de anidrocilação da 1,4-difeniltiossemicarbazida e rearranjo em presença de piridina, respectivamente, levaram ao isolamento dos produtos com bons rendimentos. As substâncias MICO-2, MICO-3 e MICO-4 ainda não foram descritas na literatura.

As análises dos espectros de fluorescência tanto para os sais heterocíclicos quanto suas respectivas bases livres, em ausência e em presença de DNA, constituem trabalho inédito na literatura.

A emissão de fluorescência observável a "olho nu", bem como sua provável intercalação com DNA, nos permite sugerir a utilização dos compostos MICO-2, MICO-3, MICO-4 e MICO-5 como sondas fluorescentes em trabalhos futuros.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- (1) FISHER, E. & BESTHORN, E.; *Ann.* 212, 316 (1882).
- (2) BAKER, W. & OLLIS, W. D., *Quart. Rev.*, 11, (1957).
- (3) EARL, J.C. & MACKENEY, A.W., *J. Chem. Soc.* 899 (1935).
- (4) SCHÖNBERG, A. *Ibid.* 824 (1938).
- (5) SIMPSON, J.C.E., *J. Chem. Soc.*, 95 (1946).
- (6) HUISGEN, R., *Chem. Soc. Spec. Publ.*, 21, 51 (1967).
- (7) OLLIS, W.D. & RAMSDEN, C.A. *Adv. Heterocycl. Chem.*, 19, 1 (1976);
RAMSDEN, C.A. , *Comprehensive Organic Chemistry* (Editado por Barton, D.H.R. & Ollis, W.D., vol **4**, p.1171. Pergamon Press, Oxford (1979).
- (8) BADACHIKAR, R.K. & PURANIK, G.S., *Indian Journal of Chemistry*, 25B, 444 (1986).
- (9) ECHEVARRIA, A.; SHINZATO, T.; GRINBERG, N.; e GOMES, R.M.; *Encontro Nacional de Pesquisa em Câncer - 1987 - Rio de Janeiro (RJ).*

- (10) WATANABE, N. ; KOJIMA, T.; *Japn. Kokai Tokyo Koho JP*, 04 , 130, 431 (1992).
- (11) LATTES, A., MARTI, M.J.; RICO, I.; PETIPAS, C.; AUVRAY, X.; *Surfactants Solution*, 11, 127 (1991).
- (12) GRYNBERG, N.; GOMES, R.; SHINZATO, T.; ECHEVARRIA, A.; MILLER, J.; *Anticancer Research* , 12, 1025-1028 (1992).
- (13) GRYNBERG, N.; MARTORELLI, R.A., CARVALHO, M.G.; BRAZ FILHO, R.; MOREIRA, I.C.; SANTOS, A.C.S.; ECHEVARRIA, A., *Proceedings of the XVI International Cancer Congress*, 63-66 (1994).
- (14) POTTS, K.T., *Lect. Heterocycl. Chem*, 4, 35 (1978).
- (15) NEWTON, C. & RAMSDEN, C.; *Tetrahedron*, 38 , (20) 2965 (1982).
- (16) MONTANARI, C. A.; *Tese de Doutorado*, Instituto de Química-USP (1991).
- (17) CHEUNG, K-K.; ECHEVARRIA A.; GALAMBECK S.E.; MACIEL M.A.; MILLER J., RUMJANEK V. M. AND A.M. SIMAS, *Acta Crystallographica*, C48, 1471 (1992).
- (18) ECHEVARRIA, A. & MILLER, J.; *J. Chem. Perkin Trans.* , 11, 1425 (1989).
- (19) CHEUNG, K-K.; ECHEVARRIA A.; GALAMBECK S.E.; MACIEL M.A.; MILLER J., RUMJANEK V. M. AND A.M. SIMAS, *Acta Crystallographica*, C49, 1092 (1993).
- (20) SUPPAN, P.; 'Chemistry and Light' ,The Royal Society of Chemistry, 1994.

- (21) C.N. RAO; *Espectroscopia Ultravioleta y Visible*, 2ª Ed., Editorial Alhambra, S.A., 1970.
- (22) TURRO, N.J.; 'Modern Molecular Photochemistry', Benjamin/Cummings, Menlo Park, 1978.
- (23) GILBERT, A. & BAGGOTT, J.; 'Essentials of Molecular Photochemistry' Blackwell Scientific Publications, 1991.
- (24) NEIDLE, S.; *Prog. Med. Chem.*, 16, 151 (1979).
- (25) LAVERY, R. , PULLMAN, B. ; *Int. J. Quantum. Chem.*, 20, 259 (1981).
- (26) KUMAR, C.V., BARTON, J.K., TURRO, N.J.; *J. Am. Chem. Soc.* , 107, 5518 (1985).
- (27) BARTON J.K., GOLDBERG, J.M.; KUMAR C.V.; TURRO N.J.; *J. Am. Chem. Soc.* , 108, 2081 (1986).
- (28) BARTON, J.; HOLMLIN, R.E.; *Inorg. Chem.*, 34, 7 (1995).
- (29) FROST, J.K.; TYRER, H.W.; PRESSMAN, N.J.; ALBRIGHT, M.H.; AND GILL, G.W.; *The Journal of Histochemistry and Citochemistry*, 27, 545, (1979).
- (30) SANTOS, A.C.S., *Tese de Mestrado*, Curso de Pós-graduação em Química Orgânica - UFRRJ (1992).
- (31) KATO, H. et al. ; *J.C.S. Chem. Comm.* , 498 (1972).
- (32) K. BHATTACHARYYA, P.K. DAS, M.V. GEORGE, *J. Photochem. Photobiol, A: Chemistry* (1991).
- (33) KELLY, J.M.; MURPHY, M.J.; MCCONNELL, D.J.; *Nucl. Acid Res.*, 113, 167 (1985).

- (34) PRASEUTH, D.; GAUDEMER, A.; VERLHAC, J.B.; KRALJIC, I.; SISOEFF, I.; GUILLÉ, E.; *Photochem. Photobiol.* , 1711 (1989).
- (35) VOGEL, A. I.; 'Análise Orgânica Qualitativa', Vol I, Ao Livro Técnico S.A., 1988.
- (36) MARCKWALD, W., *Chem. Ber.*, 25, 3098 (1892).
- (37) LIPPARD, S.J.; JENETTE, K.W.; VRASILIARDES, H.C.; BAUER, W.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 3839 (1974).
- (38) BERLMAN, I.B.; 'Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules', Academic Press Inc. , 1965.
- (39) URANO, S.; PRICE, H. L.; FETZER, S. M.; BRIEDIS, A. V.; MILLIMAN, A.; LEBRETON, P.R.; *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 3881 (1991).
- (40) KUMAR C.V., E.H. ASUNCION, *J. Am. Chem. Soc.* , 115, 8547 (1993).
- (41) BARTON, J. ; HOLMLIN, R.E.; *Inorg. Chem.*, 34, 7 (1995).
- (42) KIM, S. K.; BRENER, H.C.; SOH, B. J.; GEACINTOV, N.E.; *Photochemistry and Photobiology* , 50, 327 (1989).
- (43) LERMAN, L.S.; *J. Mol. Biol.* , 3, 18 (1961).
- (44) MARCH, J.; 'Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure', McGRAW-HILL KOGAKUSHA, LTDA, 1968.
- (45) GORDON, M.S. & SOJKA, S.A.; *J. Org. Chem.*, 49, 97 (1984).
- (46) ECHEVARRIA, A.; GALENBECK, S.E.; MACIEL, M.A.M.; MILER, J.; MONTANARI C.A.; RUMJANECK, V.M.; SIMAS, A.M.; SANDALL, J.P.; *J. Hetr. Comm.*, 1, 129 (1995).