

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

ERIK DO CARMO

Síntese e Avaliação de Propriedades de Triazenos.

Santo André

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

ERIK DO CARMO

Síntese e Avaliação de Propriedades de Triazenos Orgânicos.

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Química apresentado junto à Disciplina NH-3201 – Trabalho de Conclusão de Curso em Química como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo L. O. R. Cunha

Erik do Carmo

Rodrigo L. O. R. Cunha

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me fortalece a cada dia para continuar lutando pelos meus ideais e conseguir mais esta conquista em minha vida. A minha família que por várias vezes durante esta jornada sentiu minha ausência, porém sabem que o amor que tenho por cada um deles é muito maior que qualquer outra coisa. Aos amigos que sempre estão por perto para ajudar e dar aquela força necessária que só eles têm para nos oferecer, em especial a Fernanda de Mendonça, companheira deste o início desta jornada. Aos amigos do Laboratório de Biologia Química L-407-3, em especial Gabriela Dias e Glaucia França que de forma carinhosa contribuíram diversas vezes para a execução deste trabalho. Ao Prof. Dr. Diogo Oliveira-Silva (Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Ciências Exatas e da Terra) pelo suporte oferecido. Ao Prof. Dr. Tiago Rodrigues e sua doutoranda Priscila dos Santos Pazini, pelo interesse na avaliação biológica dos trizenos. A Prof. Dra. Iseli Lourenço Nantes pelo conhecimento compartilhado e muito apreciado. Agradeço em especial ao Prof. Dr. Rodrigo L. O. R. Cunha, pela oportunidade de executar este trabalho e compartilhar uma parte do vasto conhecimento que possui em sua área de pesquisa. E por fim, agradeço a UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC, por todo aprendizado durante todos estes anos e por me mostrar que “SEM SUOR E SEM TRABALHO NENHUMA OBRA É TERMINADA”.

RESUMO

O presente trabalho propõe a síntese e avaliação de triazenos orgânicos para serem utilizados no estudo de algumas propriedades fotofísicas e biológicas como no efeito sobre a viabilidade de células tumorais.

A rota de preparação dos triazenos se deu a partir de aminas aromáticas que foram convertidas nos correspondentes sais de diazônio, e este foi condensado com uma segunda amina (*Esquema 1*).



Esquema 1. Rota de síntese de triazenos à partir da diazotação de aminas aromáticas ($\text{R}_1 = \text{CO}_2$, NO_2 e $\text{R}_2 = \text{aril}$).

A identidade dos compostos foi confirmada por análises de espectroscopia no infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução. Através da obtenção de espectros eletrônicos de absorção (UV-Vis) em diferentes valores de pH foi possível estimar os valores de pKa dos grupos ionizáveis dos triazenos sintetizados. Estudou-se também a emissão de luz destes compostos onde se observou que para ambos os triazenos há emissão de luz em meio ácido. Encontra-se em andamento a avaliação da viabilidade destes compostos frente a células tumorais que está sendo realizado com linhagens de tumor de mama (MCF-7), melanoma murinho (B16F10-Nex-2) e leucêmico humano (K562).

Palavras Chave: Triazeno, Diazônio, Propriedades ácido-básicas, Tratamento antitumoral.

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução | 2 |
| 1.1. Triazenos Orgânicos - Descoberta. | 2 |
| 1.2. Triazenos Orgânicos - Síntese. | 3 |
| 1.3. Triazenos Orgânicos - Aplicação. | 5 |
| 1.4. Triazenos Orgânicos - Outras Aplicações Seleccionadas. | 7 |
| 1.4.1. Proteção e Geração de Aminas. | 7 |
| 1.4.2. Triazenos e Química de Coordenação. | 7 |
| 2. Objetivos | 8 |
| 3. Materiais e Métodos | 8 |
| 3.1. Espectroscopia de Massas de Alta Resolução. | 8 |
| 3.2. Espectroscopia na Região do Infra-Vermelho por Transformada de Fourier (FTIR). | 9 |
| 3.3. Espectroscopia Eletrônica de UV-Visível (UV-Vis) e Fluorescência Atômica (AFS). | 9 |
| 4. Procedimentos Experimentais | 9 |
| 4.1 Síntese de Triazenos Orgânicos. | 11 |
| 4.2 Avaliação da solubilidade (Turbidimetria). | 11 |
| 4.3 Avaliação Fotofísica – Espectroscopia UV-Vis e Emissão de Luz. | 11 |
| 4.4 Avaliação da Viabilidade Celular – Citotoxicidade. | 11 |
| 5. Resultados e Discussão. | 12 |
| 5.1 Rendimento Experimental. | 12 |
| 5.2 Espectroscopia de Massas de Alta Resolução. | 12 |
| 5.2.1 Análise do Triazeno Paba. | 12 |
| 5.2.2 Análise do Triazeno Nitro. | 13 |
| 5.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier. | 13 |
| 5.4 Avaliação da Solubilidade (Turbidimetria). | 14 |
| 5.5 Avaliação Fotofísica – Espectroscopia UV-Vis e Emissão de Luz. | 15 |
| 5.6 Avaliação da viabilidade celular - CITOTOXICIDADE | 18 |
| 6. Conclusões | 18 |
| 7. Referências Bibliográficas | 19 |
| 8. Anexos | 20 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRIAZENOS ORGÂNICOS – DESCOBERTA

Triazenos são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura uma sequência de três átomos de nitrogênio ligados compondo o grupo funcional denominado triazenila (N=N-NH). Sua descoberta se deve aos estudos realizados pelo químico industrial Peter Griess (1829-1888) na preparação de sais de diazônio, que em 1859 sintetizou o primeiro triazeno orgânico (1*E*)-1,3-difenil-1-triazeno (Diazoaminobenzeno).¹ Quando não *N*-substituídos, o grupo triazenila pode ser desprotonado levando a formação do ânion triazenido, análogo isoeletrônico do ânion nitrito (*Figura 1*).²

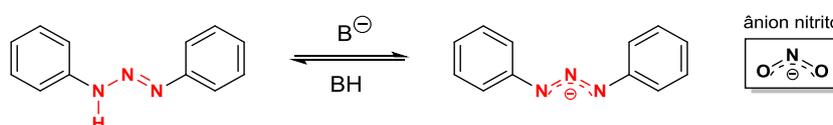
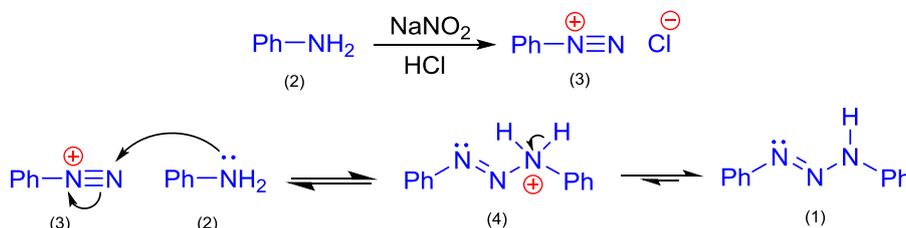


Figura 1. Estrutura molecular do Diazoaminobenzeno e de sua base conjugada, o ânion triazenido, em destaque a estrutura molecular do ânion nitrito.

A síntese do diazoaminobenzeno (1) pode ser preparada a partir da diazotação da anilina (2), seguida da condensação com anilina livre como mostra o mecanismo (*Esquema 2*).²

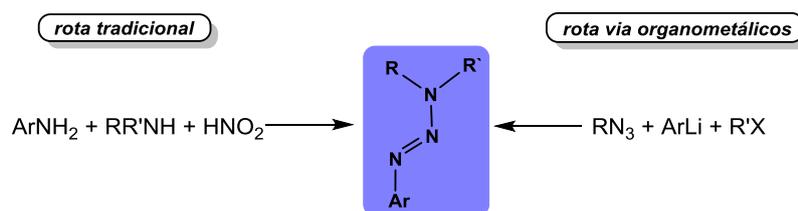


Esquema 2. Rota de síntese do Diazoaminobenzeno.

O diazoaminobenzeno (1) é um dos principais representantes comerciais dos sais de diazônio e um excelente exemplo na versatilidade de aplicações que os triazenos possuem, sendo utilizado como intermediário químico, aditivo polimérico, agente complexante, na fabricação de corantes, inseticidas e também empregado em síntese orgânica. Entretanto, outros estudos mostraram que o diazoaminobenzeno tem efeito carcinogênico em humanos, sendo metabolizado a benzeno, e este, ao ser transformado no fígado gera produtos oxidados altamente reativos por seus efeitos deletérios celulares. A via de metabolização sugerida é a clivagem por enzimas do fígado ou, ainda, por bactérias do trato intestinal. Os metabólitos são anilina, benzeno e nitrogênio. Tanto o benzeno quanto a anilina podem vir a ser oxidados pelo citocromo P450 e enzimas conjugadoras desencadeando sua ação tóxica.³

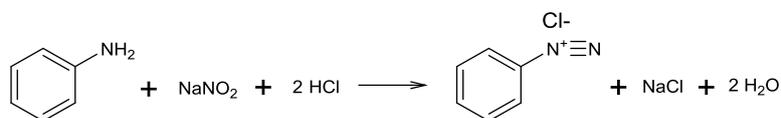
1.2. TRIAZENOS ORGÂNICOS – SÍNTESE

Duas rotas para síntese dos triazenos orgânicos são geralmente empregadas. O *Esquema 3* mostra que é possível obter triazenos a partir de anilinas ou alquil azidas. Anilinas são tipicamente tratadas com íons nitrito em condições ácidas para formar um sal de diazônio que reage com uma amina primária ou secundária para formar o triazeno desejado com alto rendimento, enquanto que di-alkil triazenos podem ser obtidos através da reação com um reagente de Grignard ou alquil lítio.³



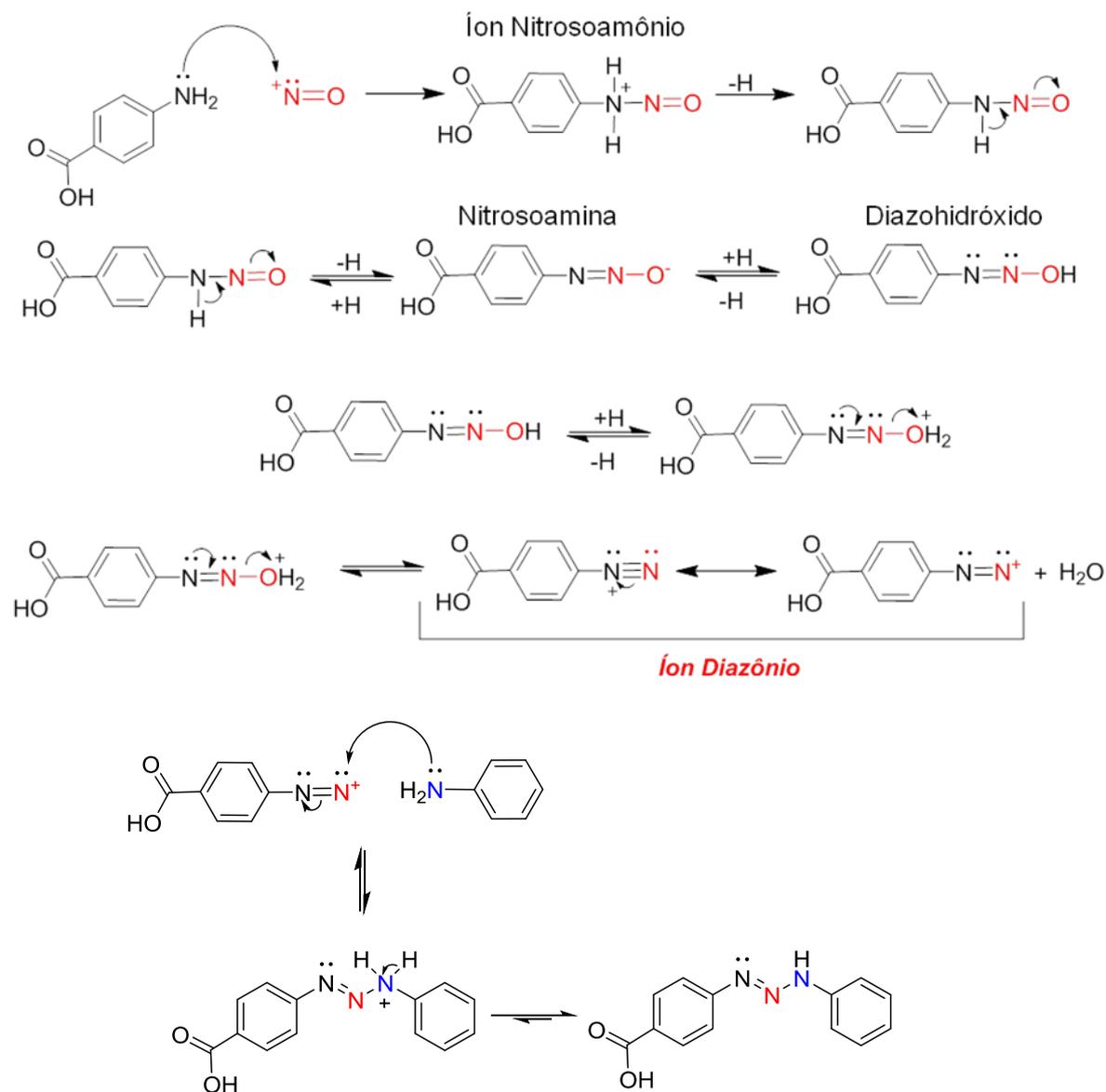
Esquema 3. Rotas sintéticas gerais para triazenos

Os sais de diazônio são compostos derivados da reação entre aminas primárias com ácido nítrico na presença de ácido clorídrico (ou outro ácido mineral) em torno de 0°C (*Esquema 4*).



Esquema 4. Reação de formação de sais de diazônio.

O excesso de ácido mantém a estabilização do sal de diazônio e assim minimiza reações secundárias e interações com aminas não modificadas. Uma vez formados, os sais de diazônio são uma ferramenta importante na síntese de triazenos. O *Esquema 5* mostra o mecanismo que leva a formação do triazeno.⁴



Esquema 5. Síntese de um Triazeno Aromático a partir de um sal de diazônio (R= aril, alquil).

Na presença de ácido forte, o ácido nitroso se dissocia e produz íons nitrosônios (NO^+). Estes íons, então reagem com nitrogênio da amina para formar íons nitrosoamônio instáveis como intermediários. Este intermediário perde um próton e forma uma nitrosoamina que, por sua vez, tautomeriza-se num diazohidróxido. Então, na presença de ácido, o diazohidróxido perde água para formar o íon diazônio. A adição de outra amina (anilina) promove a reação com o íon diazônio e então forma-se o triazeno.

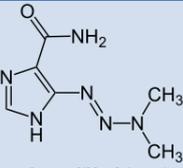
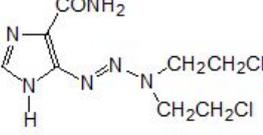
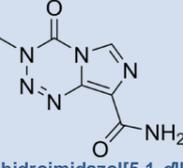
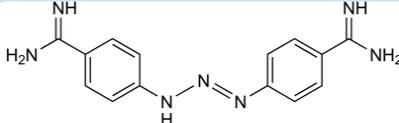
1.3. TRIAZENOS ORGÂNICOS – APLICAÇÕES

Embora estes compostos tenham sido extensivamente estudados antes de 1950, a sua versatilidade em síntese orgânica foi bastante expandida durante os últimos 30 anos. Desde sua descoberta para uso na indústria de corantes, muitos pesquisadores passaram a dedicar suas pesquisas aos triazenos orgânicos.

Diversas áreas tornaram possível que este composto se tornasse uma molécula com grande versatilidade de aplicações na química. Suas aplicações têm sido avaliadas desde seu potencial antitumoral, tanto como grupos protetores em síntese de produtos naturais e química combinatória, incorporação em síntese de polímeros e oligômeros e para formar novos heterociclos.³ Apresentam ainda atividade biológica frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas e atividade antifúngica.⁵

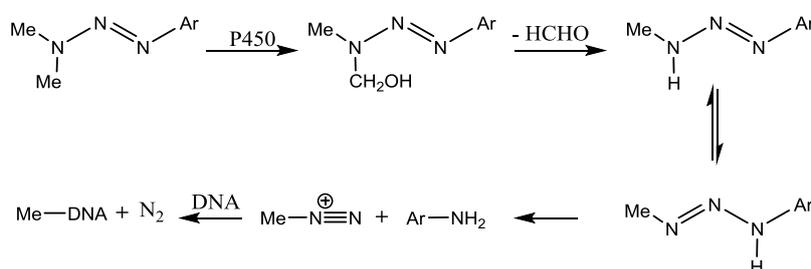
Um dos usos predominantes dos triazenos está na área da medicina no desenvolvimento de fármacos, atuando como agente mutagênico, antineoplásicos, teratogênico, antitumorais (antilinfomas) e antitripanossômicos.⁶ A tabela 1 lista alguns triazenos utilizados como fármacos e suas propriedades.

Tabela 1 - Alguns triazenos que possuem aplicação como fármacos.^{7,8}

| Nome e estrutura molecular | Nome Comercial | Propriedades |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|
|  <p>5-(3,3-dimetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida</p> | Dacarbazina® (DTIC) | ANTINEOPLÁSICOS |
|  <p>5-[3,3-bis(2-cloroetil)-1-triazenil]imidazol-4-carboxamida</p> | Dacarbazina® (BTIC) | ANTINEOPLÁSICOS |
|  <p>3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazol[5,1-d][1,2,3,5]Tetrazina-8-carboxiamida</p> | Termozolomida® (TEM) | ANTINEOPLÁSICOS |
|  <p>[bis(4-amidinofenil)-1,3-triazeno]</p> | Berenil® | ANTITRIPANOSSÔMICOS |

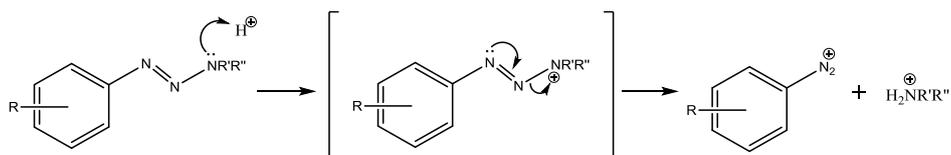
A conversão da Dacarbazina® (DTIC) em compostos alquilantes depende da ativação hepática. Este triazeno é indicado para o tratamento de: melanoma maligno metastático, adenocarcinoma renal, sarcomas de tecidos moles, fibrossarcomas, carcinoma medular da tireóide, neuroblastoma, tumores sólidos, linfoma maligno e doença de Hodgkin. Já o Temozolomida® (TEM) não necessita de ativação metabólica para gerar as espécies alquilantes, pois é convertida espontaneamente em metabólico ativo em pH fisiológico e pode ser administrada por via oral. Este triazeno é utilizado no tratamento contra tumores cerebrais como glioblastoma multiforme e astrocitoma anaplásico, novas pesquisas mostram que pode ser também eficaz nos casos de leucemia aguda. Os efeitos citotóxicos e mutagênicos destes fármacos são baseados na capacidade de alquilar as bases do DNA, prevenindo a multiplicação e o crescimento das células tumorais, além de dificultar a síntese de proteínas necessárias à sobrevivência destas células.⁹

Para aril e alquil triazenos, decomposições proteolíticas ocorrem sob condições fisiológicas para dar compostos alquil diazônio capazes de alquilar o DNA (Esquema 6).¹⁰ Possuem ainda a propriedade de nuclease, sendo capaz de clivar o DNA tanto genômico como o plasmidial.⁵ Nos últimos 20 anos o papel do metabolismo nos mecanismos da carcinogenicidade e citotoxicidade de arildialquiltriazenos tem sido extensivamente estudada.



Esquema 6 Via metabólica para dimetiltriazenos: ativação e mecanismo de ação.

No entanto, muitos aspectos importantes destes mecanismos permanecem enigmáticos. Alguns triazenos são moderadamente estáveis em solução aquosa a pH fisiológico ou levemente básico. Em contraste, ambientes ácidos causam a rápida reversão da reação de síntese resultando no respectivo sal de diazônio e a amina protonada conforme é mostrado no *Esquema 7*.¹¹



Esquema 7 Mecanismo de degradação química catalisada por ácido do 1-aryl-3,3-dialquiltriazeno.

O triazeno mais conhecido em estudos para tratamento antitumoral é o 1-fenil-3,3-dimetiltriazeno (Figura 2), este triazeno foi reportado por Clark et al., em 1955 tendo inibido o crescimento tumoral do sarcoma 180 (S-180) *in vivo*. No mesmo ano mais outros dois trizenos também apresentaram inibição de crescimento tumoral: 3,3-dimetil-1-*p*-nitrofeniltriazeno e 3,3-dimetil-1-*p*-toluiltriazeno (Figura 2).¹²

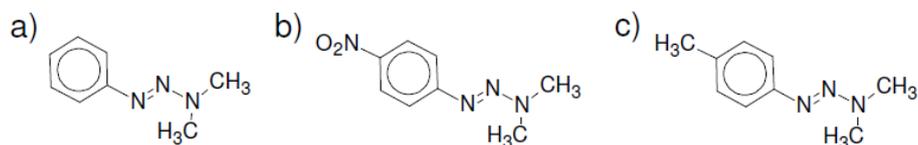
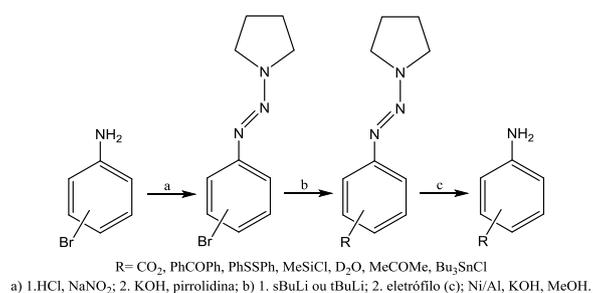


Figura 2 – Estrutura dos compostos: a) 3,3-dimetil-1-feniltriazeno; b) 3,3-dimetil-1-*p*-nitrofeniltriazeno; c) 3,3-dimetil-1-*p*-toluiltriazeno.

1.4. TRIAZENOS ORGÂNICOS – OUTRAS APLICAÇÕES SELECIONADAS

1.4.1. PROTEÇÃO E GERAÇÃO DE AMINAS

Trizenos podem ser utilizados em sínteses orgânicas para proteger ou gerar aminas. Embora a formação de anilinas a partir da decomposição induzida por ácido de arilo trizenos já ser conhecida há algum tempo, esta utilização particular, é rara devido muitos outros grupos protetores estarem disponíveis. Trizenos são estáveis a uma variedade de condições e a sua conversão na amina correspondente é fácil e eficiente. O Esquema 8 mostra a aplicação do triazeno como grupo protetor na substituição de um halogênio numa anilina.³



Esquema 8 – Substituição Nucleofílica Aromática de um Halogênio utilizando triazeno como grupo protetor.

1.4.2. TRIAZENOS E QUÍMICA DE COORDENAÇÃO

Outra aplicação bem difundida de trizenos orgânicos está na química de coordenação, muitos compostos de trizenos têm sido avaliados para esta finalidade e diversos estudos de Difração de Raio-X revelam diferentes formas de complexação no estado sólido. A presença de substituintes terminais arila (Ar-N=N-NH-Ar) afetam diretamente na estabilidade da estrutura do triazeno, seja por efeito indutivo ou

mesomérico e viabilizam a reação de complexação com diversos íons metálicos. Os principais modos de coordenação estão ilustrados na Figura 4.⁶

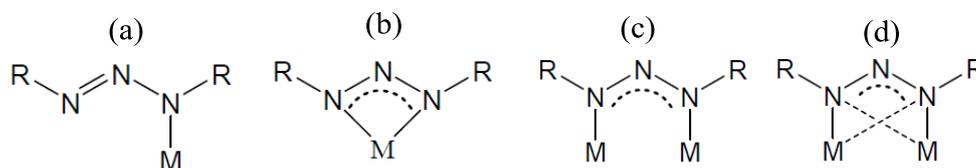


Figura 4 – Principais modos de coordenação:

Monodentada (a); Bidentada (b); em ponte entre dois centros metálicos em (c) e (d). (R=Aril).

Illey et al. relatou a interação de triazenos dissustituídos com percloratos de metal, onde observou produtos de decomposição análogo aos dos processos de catálise ácida quando alquil ou aril triazenos são tratados com fontes Fe^{2+} Zn^{2+} ou Cu^{2+} . Estas descobertas são importantes pois muitos triazenos utilizados para aplicações antitumorais são instáveis in vivo, estas descobertas são significantes considerando-se que estes íons são abundantes na corrente sanguínea e em todo o corpo.³

2. OBJETIVOS

Observados os aspectos biológicos envolvidos na aplicação de triazenos orgânicos, o presente projeto tem por objetivo principal sintetizar e avaliar propriedades fotofísicas e biológicas. Sendo assim serão avaliados os seguintes aspectos:

- Sintetizar e Caracterizar Triazenos Orgânicos.
- Avaliar Propriedades Fotofísicas (Espectroscopia de UV-Vís e Emissão de Luz).
- Avaliar efeito na viabilidade de células tumorais (Citotoxicidade).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Após a síntese dos compostos, foi realizada a caracterização dos triazenos orgânicos através de Espectrometria de Massas de alta resolução e Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

3.1 Espectrometria de Massas de Alta Resolução.

A caracterização por espectrometria de massas foi realizada num espectrômetro de massa com detector triplo quadrupolo-LCMS-8030 equipado com ionização por eletropulverização e acoplado a um

sistema de cromatografia líquida de proeminência UFLC-XR (Shimadzu). Os espectros obtidos encontram-se no Anexo I.

3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR.

A caracterização por espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier foi realizada no espectrômetro da marca PerkinElmer, modelo Spectrum two - UATR two. Os espectros obtidos encontram-se no Anexo II.

3.3 Espectroscopia Eletrônica de UV-Visível (UV-Vis) e Fluorescência Atômica (AFS).

Os espectros eletrônicos na região do visível e ultravioleta foram obtidos em um Espectrômetro Varian Cary 50 e os espectros eletrônicos de fluorescência foram obtidos em um Fluorímetro Hitachi F-2500. Todas as leituras foram realizadas em cubetas de quartzo de caminho ótico de 1 cm.

Nas leituras para determinação da solubilidade (Turbidimetria) dos triazenos orgânicos utilizou-se uma solução 20 mM em Dimetilsulfóxido (DMSO) de cada triazeno em solução tampão Tris-HCl (Tris(hidroximetil)aminometano)-Hidroclorato de pH 6,8.

Nas leituras para avaliação fotofísica (UV-vís e fluorescência) avaliou-se os compostos triazenídicos em uma faixa de pH 2 até pH 13.

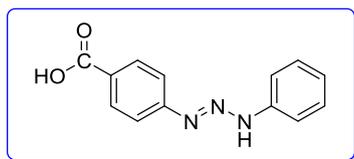
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1. SÍNTESE DOS TRIAZENOS ORGÂNICO.¹

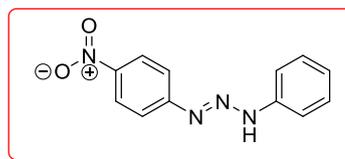
O procedimento adotado na síntese dos triazenos orgânicos é o descrito por VILLIS em sua tese de doutorado.⁶

Foram sintetizados dois triazenos orgânicos assimétricos: o Ácido(p-feniltriazeno)benzóico (*Triazeno Paba*) e o 1-(4-Nitrofenil)-3-feniltriazeno (*Triazeno Nitro*), a Figura 3 mostra a estrutura dos triazenos sintetizados.

ⁱ A princípio, a proposta inicial deste trabalho era sintetizar triazenos assimétricos com aminas primárias alifáticas. Porém, devido à dificuldade de reproduzir a rota de síntese e obtenção de rendimentos muito baixos, tornaram inviável a continuidade do trabalho. Partiu-se então para outra rota de síntese onde se decidiu sintetizar triazenos com anilina.



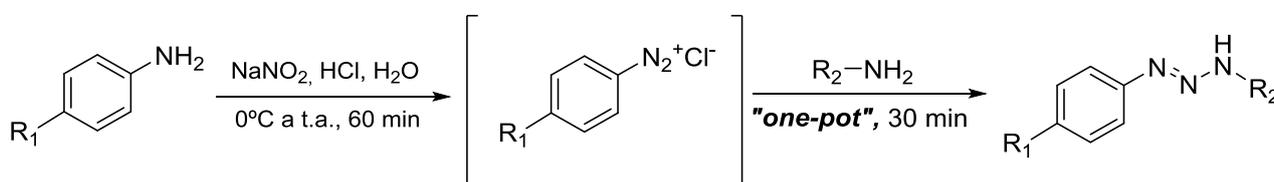
Ácido(p-feniltriazeno)benzóico (*Triazeno Paba*)



1-(4-Nitrofenil)-3-feniltriazeno (*Triazeno Nitro*)

Figura 3 – Estrutura dos triazenos sintetizados.

A síntese foi realizada através da diazotação do Ácido p-Aminobenzóico e da 4-Nitroanilina respectivamente, com nitrito de sódio em ácido clorídrico diluído, na proporção 1:1 com água, seguido do acoplamento com a anilina ($C_6H_5NH_2$). O Esquema 9 mostra a reação de síntese dos triazenos e o procedimento está descrito a seguir.



Esquema 9. Rota de síntese de triazenos à partir da diazotação de amins aromáticas ($R_1 = CO_2$, NO_2 e $R_2 = aril$).

Em um copo berzelius (forma alta) de 600 mL foi adicionado 40 mL de uma solução de HCl/ H_2O 1:1. Sob agitação adicionou-se o ácido p-aminobenzóico (0,9 g, 7 mmol) e manteve-se o sistema sempre em banho de gelo para garantir que a temperatura fique em torno de 0 °C. Após manter sob agitação por 5 minutos e verificar que a temperatura estava em torno de 0 °C, foi adicionado 5 mL de uma solução aquosa de $NaNO_2$ (0,6g, 7 mmol + 10% em excesso). Decorridos os 60 minutos sob agitação, adicionou-se rapidamente ainda sob agitação e em banho de gelo uma solução contendo 0,6g (7 mmol, 0,6 mL) de anilina ($D=1,02 \text{ g/cm}^3$) em 1 mL de uma solução aquosa de ácido acético 25%. Após 30 minutos, retirou-se o sistema do banho de gelo e ainda sob agitação, o meio de reação foi neutralizado com uma solução de Na_2CO_3 10% até pH próximo a 7. Forma-se um precipitado amarelo (quando se utiliza o ácido p-aminobenzóico como material de partida) e um precipitado vermelho (quando se utiliza a nitroanilina como material de partida) quando se atingi a neutralidade do meio que foi avaliada com papel indicador universal de pH. Separou-se o produto por filtração a vácuo lavando repetidas vezes com água gelada. Após a filtração o produto foi seco em estufa à 80 °C e foi calculado o rendimento.

O mesmo procedimento foi utilizado na síntese do triazeno com a 4-nitroanilina (1g, 7 mmol) e anilina (7 mmol, 0,6 mL). O produto obtido tem coloração vermelho escuro e também foi filtrado a vácuo lavando

repetidas vezes com água gelada. Após a filtração o produto foi seco em estufa à 80 °C e foi calculado o rendimento.

4.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE (TURBIDIMETRIA).

A solubilidade dos compostos de triazenos sintetizados foi avaliada num espectrofotômetro de UV-Vís, adicionando a uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm 700 µL de solução tampão Tris-HCl pH 6,8. Realizou-se a leitura no comprimento de onda de 750 nm, onde o composto não apresenta absorção, mas detecta-se o espalhamento de luz promovido pelas partículas de material insolúvel.

4.2 AVALIAÇÃO FOTOFÍSICA - ESPECTROSCOPIA UV-VÍS E EMISSÃO DE LUZ.

A avaliação fotofísica foi realizada através da obtenção dos espectros eletrônicos e de fluorescência nos seguintes valores de pH: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Estas soluções foram preparadas à partir de uma solução estoque com a seguinte composição: 75 mM (tris(hidroximetil)aminometano), 25 mM (Glicina), 25 mM (Ácido 2-(N-Morfolino)etanolamina), 25 mM (Ácido Acético). Partindo desta solução que após o preparo apresentou pH 8,00, ajustou-se o pH para os valores já citados com adição de solução concentrada de HCl (4 M) e NaOH (4 M). A concentração dos triazenos utilizada na leituras foi de 0,040 mM.

4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR - CITOTOXICIDADE.

A avaliação da viabilidade celular está sendo realizada com linhagens de tumor de mama (MCF-7), melanoma murinho (B16F10-Nex-2) e leucêmico humano (K562).

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Com o intuito de facilitar a leitura e entendimento dos resultados referenciaremos os triazenos sintetizados da seguinte forma: Ácido(p-feniltriazeno)benzóico (Triazeno Paba - referindo-se ao composto de partida Ácido p-Aminobenzóico) e o 1-(4-Nitrofenil)-3-feniltriazeno (Triazeno Nitro - referindo-se ao composto de partir 4-Nitroanilina).

5.1 Rendimento Experimental

Realizada a síntese dos triazenos, pesou-se a massa obtida e calculou-se o rendimento experimental. A Tabela 2 apresenta os rendimentos obtidos.

Tabela 2 - Resultados dos Rendimentos Experimentais.

| | Triazeno Paba | Triazeno Nitro |
|--------------------------------|---------------|----------------|
| Rendimento Teórico | 1,7 g | 1,7 g |
| Rendimento Experimental | 1,2 g | 1,3 g |
| Rendimento (%) | 72 % | 76 % |

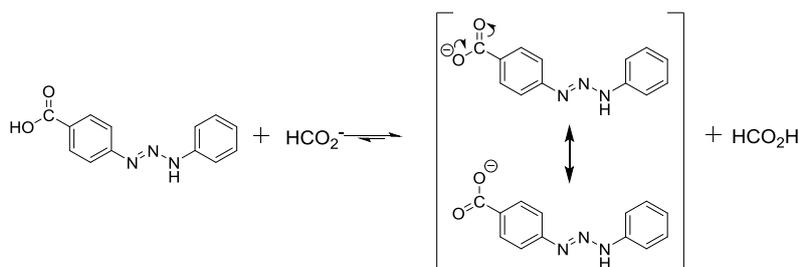
Observa-se através dos resultados que se obteve um bom rendimento experimental para ambos os triazenos sintetizados, o que corrobora com o descrito na literatura.^{3,6}

5.2 ESPECTROSCOPIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO.

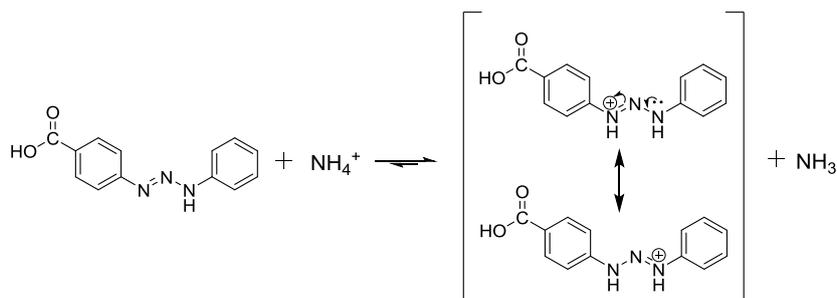
Os espectros de massas obtidos encontram-se no Anexo I. Foi possível detectar tanto os ácidos quanto as bases conjugadas dos triazenos sintetizados.

5.2.1 ANÁLISE TRIAZENO PABA.

Através da avaliação dos espectros obtidos utilizando como solventes MeCN / HCO₂H, observou-se a presença do pico correspondente ao íon molecular do composto modo negativo com M/Z = 240,1 (*Esquema 10*) e no modo positivo com M/Z = 242,1 (*Esquema 11*). Também observa-se um pico com M/Z = 286,1 no modo negativo que corresponde a soma da massa do íon triazeno (MM = 241,1 g/mol) mais o ânion formiato (MM = 45 g/mol).



Esquema 10 - Estruturas de Ressonância da base conjugada do Triazeno Paba como ácido fórmico.



Esquema 11 - Estrutura de Ressonância do ácido conjugado do Triazeno Paba com a amônia.

5.2.2 ANÁLISE TRIAZENO NITRO.

Através da avaliação dos espectros obtidos utilizando como solventes $\text{NH}_4\text{HCO}_2 / \text{H}_2\text{O}$ / MeCN, observou-se a presença do pico correspondente ao íon molecular do composto no modo positivo ($M/Z = 243,1$) e no modo negativo ($M/Z = 242,1$).

5.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANFORMADA DE FOURIER.

Através da análise dos espectros vibracionais no infravermelho (ANEXO II), realizou-se a atribuição tentativa de frequências vibracionais observadas (*Tabela 3*).

Triazeno Nitro: $\nu(\text{C-H}) = 2950 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{C=C}) = 1600 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{N-N}) = 1300 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{N=N}) = 1225 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{NO}_2) = 1150 \text{ cm}^{-1}$.

Triazeno Paba: $\nu(\text{N-H}) = \text{indefinido}$, $\nu(\text{O-H}) = \text{indefinido}$, $\nu(\text{C-H}) = \text{indefinido}$, $(\text{C=C} / \text{C=O}) = 1700$ e 1600 cm^{-1} , $\nu(\text{N-N}) = 1400 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{N=N}) = 1250 \text{ cm}^{-1}$.

5.4 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE (TURBIDIMETRIA).

Através dos dados de leitura de absorvância ($\lambda=750$ nm) versus concentração, foi possível plotar o Gráfico 1 que mostra a solubilidade dos Triazenos em solução tampão Tris-HCl de pH 6,8.

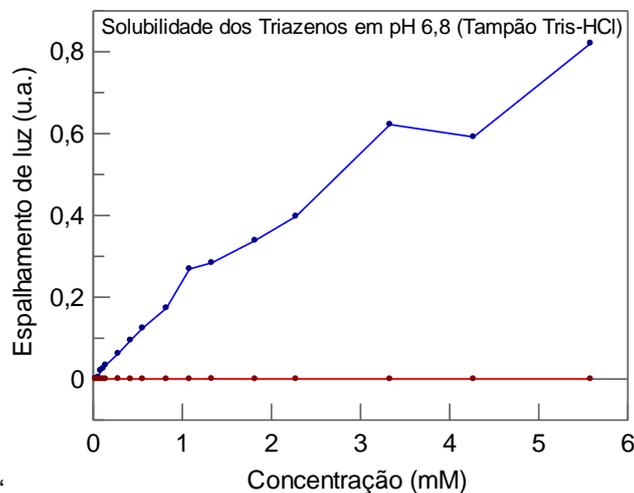


Gráfico 1 - Avaliação da solubilidade dos Triazenos em solução tampão Tris-HCl de pH 6,8. (Linha vermelha: triazeno paba; linha azul: triazeno Nitro.)

Observa-se através destes resultados que na faixa de concentração avaliada o Triazeno Paba é totalmente solúvel enquanto que o Triazeno Nitro mostra-se insolúvel no meio em concentrações à partir de 0,057 mM. Esta avaliação se faz necessário para os testes de viabilidade celular (citotoxicidade) e para determinar o limite máximo de concentração para a avaliação fotofísica (UV-Vis e Emissão de Luz).

5.5 AVALIAÇÃO FOTOFÍSICA - ESPECTROSCOPIA UV-VÍS E EMISSÃO DE LUZ.

O Gráfico 2 mostra os espectros de absorção obtidos para o triazeno nitro para cada valor de pH. O gráfico foi dividido em duas partes (A) e (B) para aperfeiçoar a visualização das bandas de absorção.

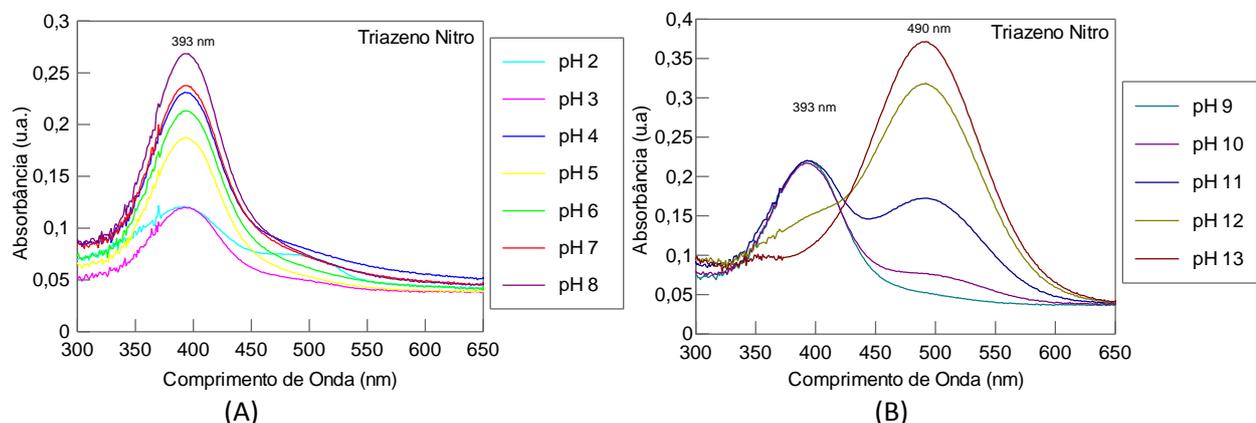


Gráfico 2 – Espectros eletrônicos de absorção obtidos para o triazeno Nitro (0,4 mM): (A) pH 2 a 8 e (B) pH 9 a 13.

A análise dos espectros mostra que a partir do pH 10 uma nova banda de absorção (490 nm) começa a aparecer, o que demonstra que o composto (triazeno nitro) está em equilíbrio com sua base conjugada devido a desprotonação do hidrogênio da cadeia triazenítica. O deslocamento do equilíbrio no sentido da formação da base conjugada aumenta a medida que o meio fica mais alcalino, como se pode observar em pH 13 a predominância da base conjugada.

Baseado na intensidade máxima de absorvância obtidas nas bandas de 393 nm e 490 nm, foi possível plotar o Gráfico 3 e determinar o valor do pKa para o triazeno nitro, que está em torno de 11,25.

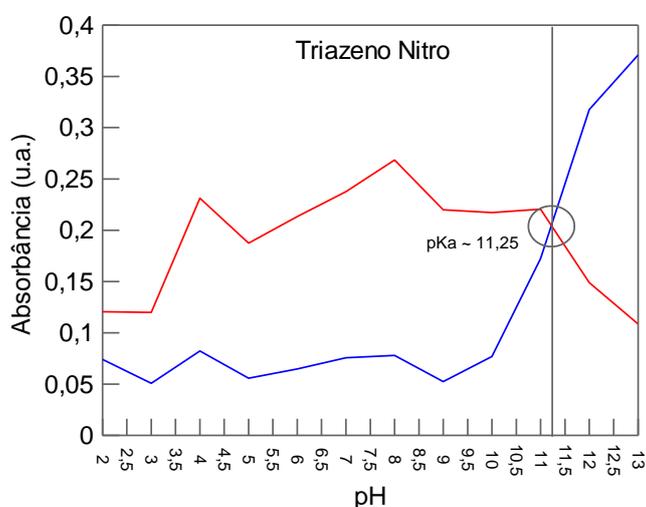


Gráfico 3 – Determinação do pKa para o Triazeno Nitro.

(linha vermelha: Intensidade de absorção a 393 nm; linha azul: intensidade de absorção a 490 nm)

O Gráfico 4 mostra os espectros de absorção obtidos para o triazeno paba para cada valor de pH. O gráfico foi dividido em duas partes (C) e (D) para otimizar a visualização das bandas de absorção.

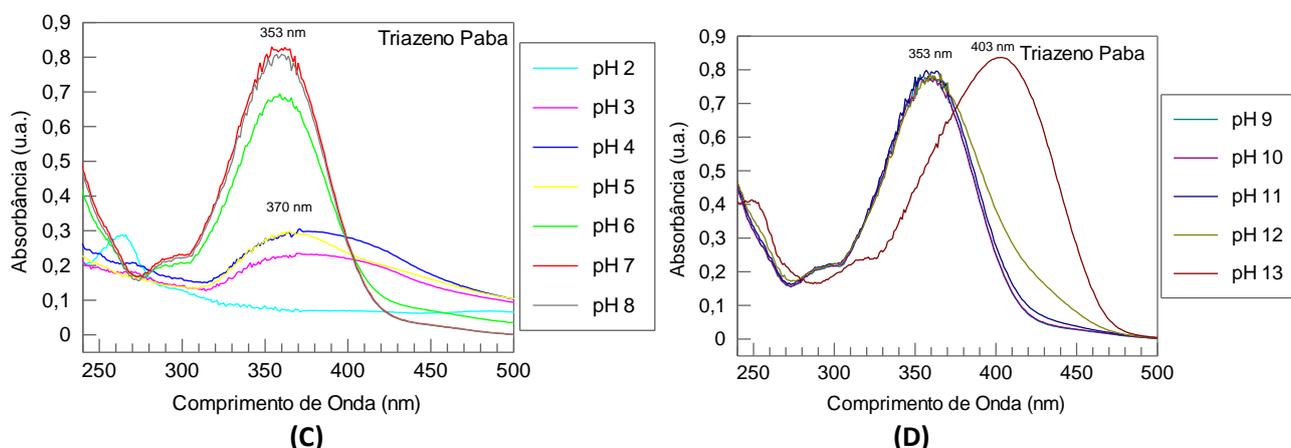


Gráfico 4 - Espectros eletrônicos de absorção obtidos para o triazeno Paba (0,4 mM): (C) pH 2 a 8 e (D) pH 9 a 13.

A análise dos espectros mostra que existem dois pKa's para este composto, sendo que em pH ácido entre 2 e 5 a espécie predominante é o triazeno paba protonado, e a partir do pH 6 começa a existir um equilíbrio entre o ácido e a base conjugada do triazeno paba. No entanto a partir do pH 12 nota-se um outro deslocamento que remete a formação de um di-ânion que fica em equilíbrio com a base conjugada. Este di-ânion trata-se da perda do hidrogênio da cadeia triazenídica.

Baseado na intensidade máxima de absorbância obtidas nas bandas de 370 nm, 353 nm e 403 nm, foi possível plotar o Gráfico 5 e determinar os valores do pKa para o triazeno paba, que são $pK_{a1} = 5$ e $pK_{a2} = 12,5$.

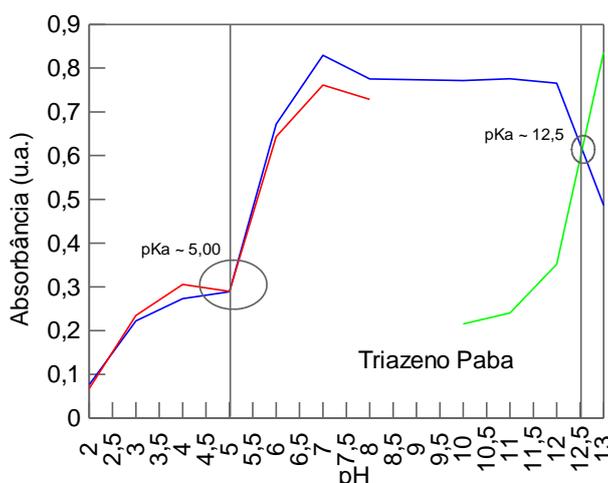


Gráfico 5 – Determinação dos pKa's para o triazeno paba.

(linha azul: Intensidade de absorção a 353 nm; linha vermelha: intensidade de absorção a 370 nm;
linha verde: intensidade de absorção a 403 nm)

Tendo em vista que o ácido *p*-aminobenzóico é um fluoróforo, decidiu-se investigar se os triazenos também apresentam alguma emissão de luz. Avaliou-se a emissão de luz adotando-se como valores de comprimento de onda de excitação aqueles onde se obteve as bandas de absorção. A voltagem do detector utilizada foi de 700v e a abertura da fenda de 2,5 nm.

Observou-se que há somente emissão de luz apreciável em pH 4 para ambos os triazenos. No caso do Triazeno Nitro no comprimento de onda de excitação 260 nm houve emissão de fluorescência em 300 nm, já para o comprimento de onda de excitação 222 nm houve uma discreta emissão de fluorescência em 300 nm também e uma emissão em 450 nm (Gráfico 6). Para o Triazeno Paba houve dois picos de emissão no comprimento de onda de excitação de 267 nm, um em 300 nm e outro em 340 nm sendo que estas duas bandas se interceptam. No comprimento de onda de excitação de 290 nm a emissão de fluorescência se deu em 345 nm (Gráfico 7).

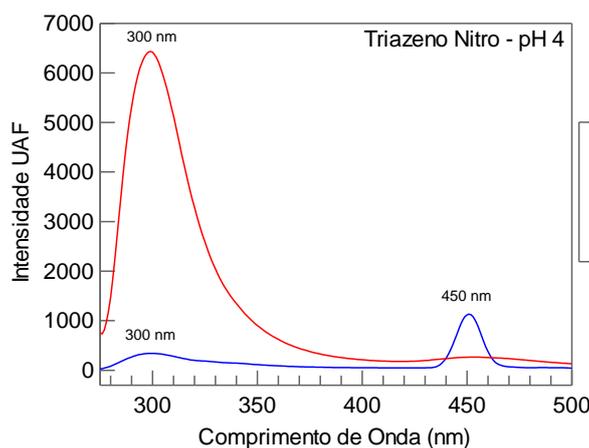


Gráfico 6 – Espectro de emissão de fluorescência para o Triazeno Nitro em pH 4.

(linha azul: espectro de emissão com excitação a 222nm; linha vermelha: espectro de emissão com excitação a 260 nm)

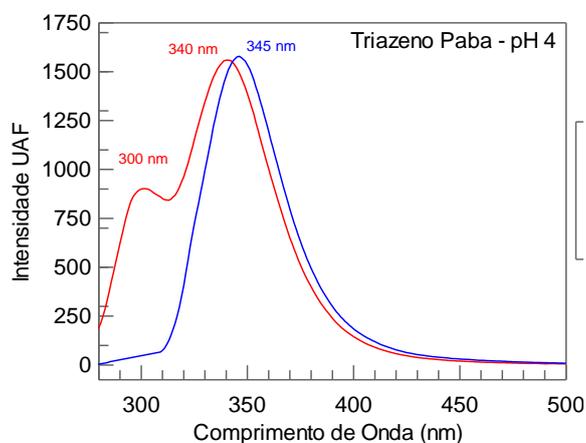


Gráfico 7 – Espectro de emissão de fluorescência para o Triazeno Paba em pH 4.

(linha vermelha: espectro de emissão com excitação a 267nm; linha azul: espectro de emissão com excitação a 290 nm)

5.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR - CITOTOXICIDADE.

A avaliação da viabilidade celular está sendo realizada com linhagens de tumor de mama (MCF-7), melanoma murinho (B16F10-Nex-2) e leucêmico humano (K562). Foi possível analisar a toxicidade somente para células de linhagem de tumor leucêmico humano (K562), onde observou-se que para o triazeno paba em concentrações até 200 μM não houve morte celular. Já para o triazeno nitro em concentrações de 120 μM houve um máximo de 40% de morte celular.

6. CONCLUSÕES

Através do presente trabalho foi possível estabelecer no grupo de pesquisas o acesso à triazenos orgânicos utilizando uma rota de síntese reprodutível e com bons rendimentos, esta experiência permitirá a síntese de novos compostos análogos adotando-se a mesma metodologia. Com o uso da espectroscopia eletrônica, foi possível estimar os valores de pK_a dos grupos ionizáveis destes – estes dados serão úteis para a exploração da reatividade destas moléculas.

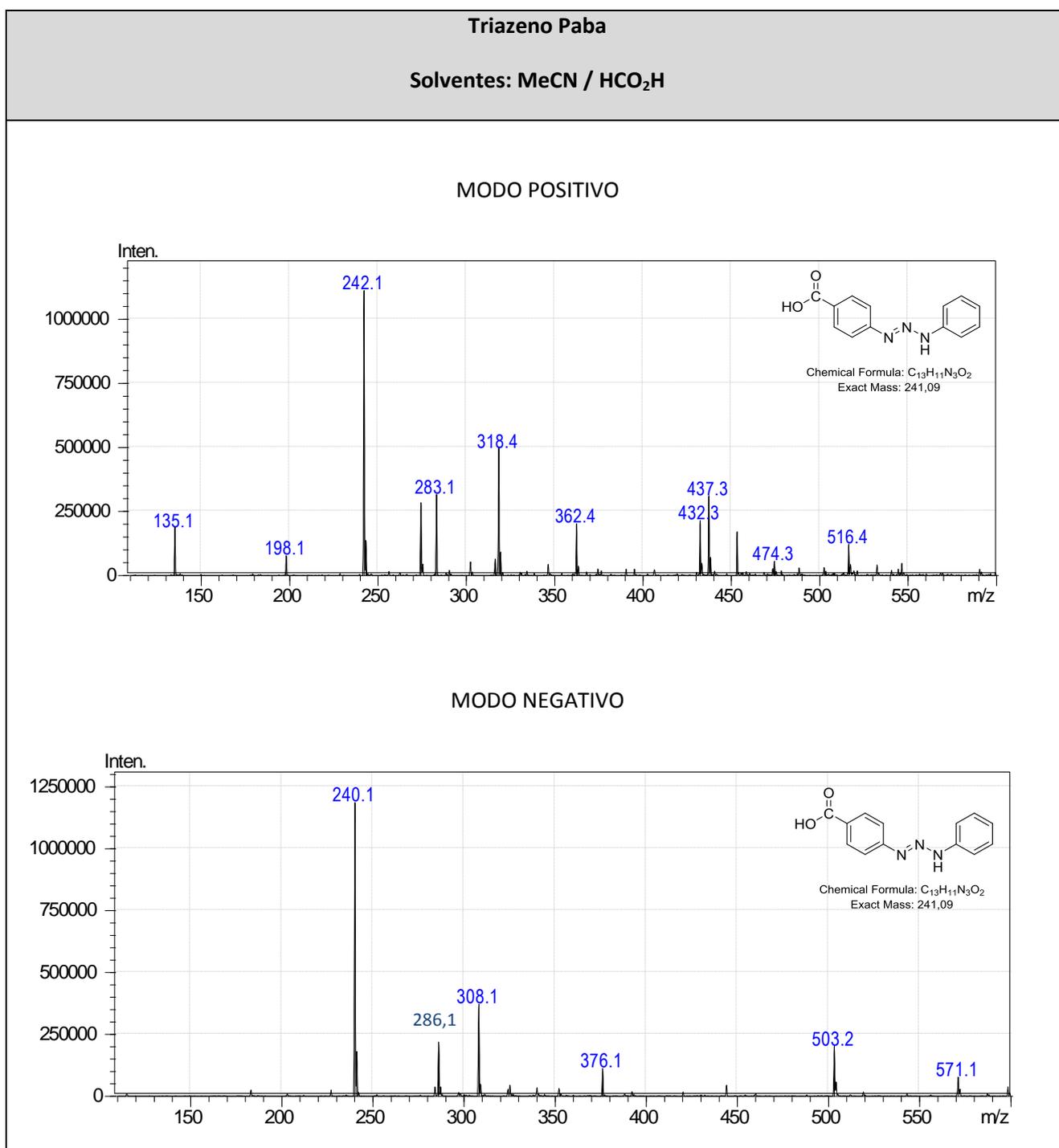
Além disso, pretende-se expandir a série de triazenos aromáticos para serem utilizados em um estudo mais aprofundado a respeito dos parâmetros eletrônicos importantes na reação de decomposição, visando seu uso para a modificação de suportes sólidos poliméricos para síntese em fase sólida; bem como o uso destes para a síntese de novos complexos inorgânicos para posteriores estudos de propriedades fotofísicas e biológicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

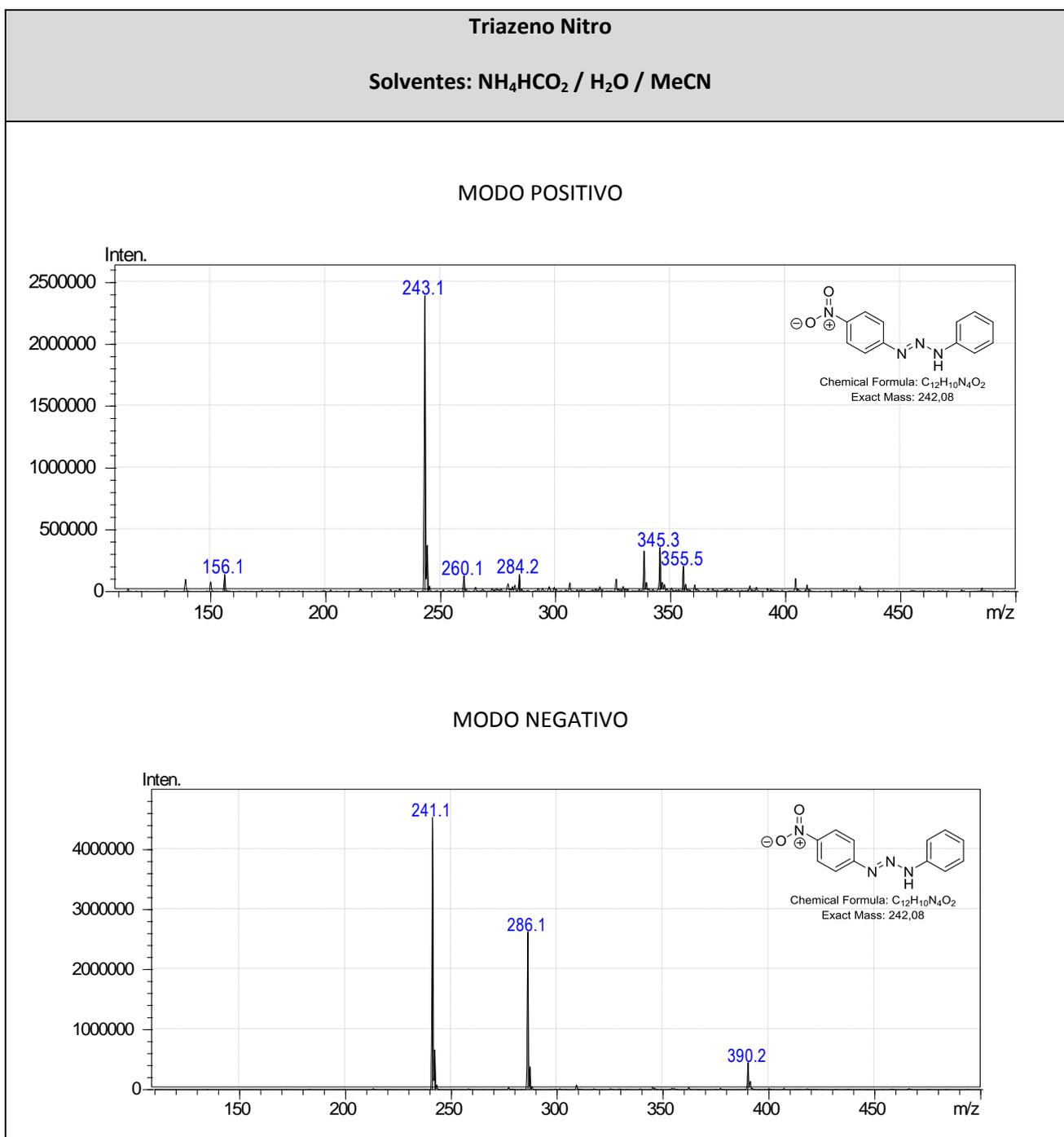
- 1 <http://qnint.s bq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=Zf5MbwrTkBlyOguT3L2wLX5-MbVTMRhTpxr4XMw-2bZ-vPnyRmOnwEJlwhsl6_S5hNzcGbmOLSRoEoSvVrzW-Q==> Acessado em 14/01/13.
- 2 <<http://www.orgsyn.org/orgsyn/orgsyn/prepContent.asp?prep=cv2p0163>> Acessado em 15/01/13.
- 3 David B. Kimball, Michael M. Haley Prof. Dr., Triazenes: A Versatile Tool in Organic Synthesis, *Angewandte Chemie International Edition*, v. 41, Issue 18, pages 3338–3351, September 16, 2002.
- 4 FURNISS, B. S.; HANNAFORD A.J.; SMITH, P.W.C.; TATCHEL, A.R. "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry", 5th. edition, Longman Scientific & Technical, UK, 1989, p.920-922.
- 5 Manfredo Hörner, Vinícius Feltrin Giglio, Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves dos Santos, André Bilibio Westphalen, Bernardo Almeida Iglesias, Paulo Roberto Martins, Carlos Henrique do Amaral, Tiago Mozaquatro Michelot, Luiz Gustavo Brenner Reetz, Cláudia de Mello Bertoncheli, Gustavo Luiz Paraginski, Rosmari Horner, Triazenos e atividade antibacteriana, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 44, n. 3, jul./set., 2008.
- 6 VILLIS, P. C. M. Avaliação da auto-associação molecular de complexos metálicos com ligantes triazenidos derivados do 1,3-Bis(Fenil)Triazeno. 2007. 370 f. Tese (Doutorado em Química). Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande Sul. 2007.
- 7 ALMEIDA, V. L.; *Química Nova*; 28;118-129; 2005.
- 8 RACHID, Z. et al.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13: 2297-3300, 2003.
- 9 BROCH, F. Supramolecularidade de triazenos assimétricos dissustituídos 4-(Etoxicarbonilfenil)-2-(Halofenil) e complexo de Níquel(II), Cobre(II) e Mercúrio(II). 2008. 141 f. Tese (Mestrado em Química). Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande Sul. 2008.
- 10 Verónica Capucha, Eduarda Mendes, Ana Paula Francisco, M. Jesus Perry, Development of triazene prodrugs for ADEPT strategy: New insights into drugs delivery system based on caborxypeptidase G2 activation, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (2012) 6903–6908, September 18, 2012.
- 11 Andreas Gescher, Michael D. Threadgill, The metabolism of triazene antitumor drugs, *Pharmac. Ther.* Vol. 32, pp. 191 to 205, 1987.
- 12 PARAGINSKI, G.L. Triazenos: Clivagem do DNA, atividade antibacteriana e toxicidade frente à *Artemia Salina* LEACH. 2007. 93 f. Tese (Mestrado em Química). Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande Sul. 2007.

8. Anexos

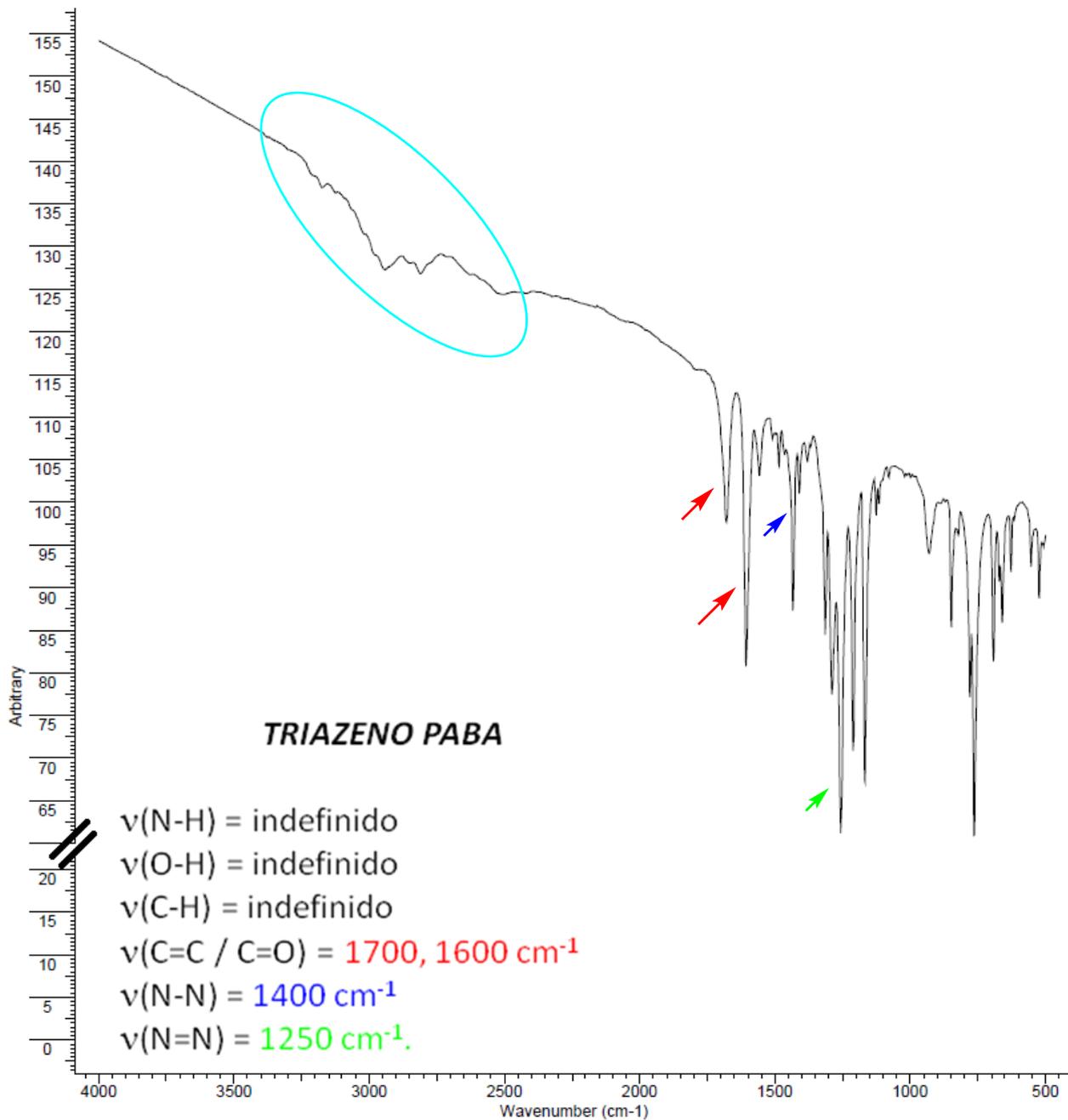
Anexo I – Espectros de Massas de Alta Resolução.



Anexo I – Espectros de Massas de Alta Resolução. (Continuação)



ANEXO II – Espectros na Região do Infra-Vermelho por Transformada de Fourier.



ANEXO II – Espectros na Região do Infra-Vermelho por Transformada de Fourier. (Continuação)

