

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

CAIO HENRIQUE THOMAZ

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA TOXICIDADE
DE DOIS NOVOS COMPOSTOS DA CLASSE TRIAZENOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2019

CAIO HENRIQUE THOMAZ

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA TOXICIDADE
DE DOIS NOVOS COMPOSTOS DA CLASSE TRIAZENOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Câmpus Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Estela dos Reis Crespan.

CAMPO MOURÃO

2019



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Câmpus Campo Mourão
Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Departamento Acadêmico de Química - DAQUI
Curso de Licenciatura em Química

TERMO DE APROVAÇÃO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA TOXICIDADE DE DOIS NOVOS COMPOSTOS DA CLASSE TRIAZENOS

por

CAIO HENRIQUE THOMAZ

Este trabalho foi apresentado em 09 de julho de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Química. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Profa. Dr Gustavo Pricinotto (UTFPR)

Profa. Dra. Daniela Aline Barancelli
(UTFPR)

Profa. Dra. Estela dos Reis Crespan
(UTFPR)
Orientadora

AGRADECIMENTOS

RESUMO

Os compostos da classe dos triazenos, são compostos promissores na indústria farmacêutica, tendo em vista que, eles apresentam ações antifúngicas, antibacterianas e antineoplásicas. Sendo assim, sabendo-se que o câncer é a segunda doença que mais mata, não só no Brasil, mas também no mundo todo, vê-se a necessidade de novos tratamentos que tenham efeitos antineoplásicos a fim de diminuir o índice de mortalidade causado pela doença. A partir de metodologias e pesquisas já realizadas, observa-se que já existem fármacos que apresentam efeitos antineoplásicos eficientes estando estes presentes dentro da classe triazenos. Desta forma, o presente trabalho envolve a síntese de dois novos compostos da classe dos triazenos: 1-(4-nitrofenil) -3-(2-benzimidazol) e 1-(4-nitrofenil) -3-(2-benzotiazol), bem como, a caracterização dos mesmos através do ensaio de desprotonação, da determinação do ponto de fusão e da espectroscopia no ultravioleta-visível e no infravermelho. Após a síntese dos compostos, realizou-se o teste de toxicidade frente a *Saccharomyces cerevisiae*, afim de determinar a DL₅₀ (Dose Letal 50), para que assim, se fizesse possível determinar a toxicidade dos compostos sintetizados, chegando à conclusão que os compostos sintetizados neste trabalho se aparentam, menos tóxicos do que outros fármacos antineoplásicos já existentes.

Palavras-chave: Triazenos, síntese, caracterização, toxicidade.

ABSTRACT

The triazenes compounds are promising compounds in the pharmaceutical industry, in view of which they are antifungal, antibacterial and antineoplastic actions.

Therefore, since it is known that cancer is a second-order disease, it no longer exists in Brazil, but also throughout the world, it is necessary that the new treatments be mitigated under the influence of antineoplastics. disease. Anti-inflammatory and arthroplasties were considered important considering the presence of these drugs within the triazenes class. Thus, the work should involve a number of new compounds of the triazenes class: 1- (4-nitrophenyl) -3- (2-benzimidazole) and 1- (4-nitrophenyl) -3- (2-benzothiazole), as well as such as their characterization by deprotonation test, measurement from the point of view of radiation and ultraviolet-visible and infrared spectroscopy.

After the synthesis of the compounds, a toxicity test against *Saccharomyces cerevisiae* was carried out to determine the LD50 (letal dose 50) so that, if possible, certain toxicity of the compounds synthesized in this work appear to be less toxic than other existing antineoplastic drugs.

Keywords: Triazenes, synthesis, characterization, toxicity

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Representação da estrutura do primeiro composto triazeno sintetizado..... | 4 |
| Figura 2: Representação genérica de triazenos monocatenados..... | 4 |
| Figura 3: Representação Estrutural dos fármacos <i>Dacarbazina</i> ® (a) e <i>Temozolomida</i> ® (b) | 6 |
| Figura 4: Esquema da rota de síntese a ser utilizada para obtenção dos compostos Triazenos..... | 10 |
| Figura 5: Representação das estruturas dos Triazenos assimétricos..... | 11 |
| Figura 6: Mecanismo para a síntese do sal de diazônio..... | 14 |
| Figura 7: Representação esquemática da reação de desprotonação de um composto triazeno genérico..... | 15 |
| Figura 8: Soluções das aminas precursoras 4-nitroanilina, 2-benzimidazol e do composto 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) sem hidróxido de potássio (a) e com hidróxido de potássio (b) | 16 |
| Figura 9: Soluções das aminas precursoras 4-nitroanilina, 2-aminobenzotiazol e do composto 1-(4-nitroanilina)-3-(2-aminobenzotiazol) sem hidróxido de potássio (a) e com hidróxido de potássio (b) | 16 |
| Figura 10: Espectros de absorção na região do infravermelho para os compostos 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) (a) e 1-(4-nitrofenil)-3-(2-aminobenzotiazol) (b) | 18 |
| Figura 11: Espectro na região ultravioleta-visível para o composto 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) (a) . | 22 |
| Figura 12: Espectro na região ultravioleta-visível para o composto e 1-(4-nitrofenil)-3-(2-aminobenzotiazol) (b) . | 22 |
| Figura 13: Gráfico da curva para obtenção do DL ₅₀ da substância (a) | 24 |
| Figura 14: Gráfico da curva para obtenção do DL ₅₀ da substância (b) | 24 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Ponto de fusão das aminas e dos compostos sintetizados. | 17 |
| Tabela 2: Principais bandas de absorção na região do infravermelho em cm^{-1} , para os compostos 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) (a) e 1-(4-nitrofenil)-3-(2-aminobenzotiazol) (b) . | 18 |
| Tabela 3: Transições eletrônicas e comprimentos de onda (λ em nm) dos compostos 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) (a) e 1-(4-nitrofenil)-3-(2-aminobenzotiazol) (b) | 21 |
| Tabela 4: Condutividade específica obtidas no teste de toxicidade. | 23 |
| Tabela 5: Diferença de condutividade, em comparação com o percentual morte frente a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . | 25 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 3 |
| 3 OBJETIVOS | 8 |
| 3.1 OBJETIVOS GERAIS | 8 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 8 |
| 4 METODOLOGIA | 9 |
| 4.1 REAGENTES E SOLVENTES | 10 |
| 4.2 SÍNTESE DE COMPOSTOS ASSIMÉTRICOS 1-(4-NITROANILINA)-3-(2-BENZIMIDAZOL) (1) E 1-(4-NITROANILINA)-3-(2-AMINOBENZOTIAZOL) (2) | 10 |
| 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS TRIAZENOS | 12 |
| 4.3.1 Teste de solubilidade | 12 |
| 4.3.2 Teste de desprotonação da molécula triazeno | 12 |
| 4.3.3 Determinação do Ponto de Fusão | 12 |
| 4.3.4 Espectroscopia vibracional da região infravermelho | 12 |
| 4.3.5 Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) | 12 |
| 4.3.6 Análise da toxicidade dos compostos da classe triazenos frente a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 13 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 15 |
| 5.1 MECANISMO ENVOLVIDO NA OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS DA CLASSE TRIAZENOS | 15 |
| 5.2 DESPROTONAÇÃO DOS COMPOSTOS DA CLASSE TRIAZENOS | 16 |
| 5.3 PONTOS DE FUSÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS | 17 |
| 5.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO | 18 |
| 5.5 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL | 20 |
| 5.6 ANÁLISE DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS DA CLASSE TRIAZENOS FRENTE A <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> | 23 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 27 |
| REFERÊNCIAS | 28 |

1 INTRODUÇÃO

Atualmente é possível verificar um grande avanço científico envolvendo estudos que visam a obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas. Porém, apesar da evolução científica, o processo que envolve o desenvolvimento de novos compostos biologicamente ativos ainda passa por um longo caminho, muitas vezes complexo e apresentando na maioria das vezes um custo bastante elevado, estando ligado à todas inovações científicas e tecnológicas (GUIDO et al, 2008).

Segundo Guido (2010), a síntese de compostos biologicamente ativos aliada a evolução expressiva da química e da biologia, e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo.

Apesar desta melhora, é possível observar que algumas doenças ainda se apresentam como causa de óbito mais comum do que se imagina. Entre estas doenças, o câncer representa a segunda causa de óbito na população adulta no Brasil, segundo uma pesquisa realizada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2017, apontando uma incidência de cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil em 2016 e 2017 (DIAGNÓSTICO, 2017). Apesar de ser um assunto muito tratado na atualidade, alguns estudos apontam que o câncer não é uma doença nova. O fato de ter sido detectado em múmias egípcias comprova que ele já comprometia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo (ABC do CÂNCER, 2011).

Conforme estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2012, houve 8,2 milhões de óbitos relacionados a doenças neoplásicas no mundo, sendo esperados para o ano 2025, aproximadamente 20 milhões de novos casos e 11,4 milhões de óbitos (FERLAY et al., 2015).

Sendo o câncer uma das doenças que mais atinge a população, tanto brasileira, como mundial, estudos sobre novos compostos com potencial farmacológico, são de extrema importância. Dentre esses compostos encontram-se os compostos da classe triazenos, que além das propriedades antibacterianas e antifúngicas (SHEALY *et al.*, 1966; GOSWAMI & PUROHIT, 2001; SANTOS, 2005; GIGLIO, 2006; PARAGINSKI, 2006; CHAUHAN et al, 2010) apresentam também

elevada atividade antineoplásica (BONMASSAR et al 2013; SHEALY, KRAUTH & MONTGOMERY, 1962; RACHID ET AL, 2003; CAPORALI, 2010; SHEALY & KRAUTH, 2010; FREIRAS et al, 2013).

Desta forma, as interações dos compostos de triazenos com o DNA, vêm sendo muito estudadas pelo fato de poderem interferir no processo de proliferação celular, resultando em novos fármacos antineoplásicos de grande importância. A descoberta de novos agentes quimioterápicos com toxicidade reduzida, máxima atividade contra células tumorais com mínima dosagem, assim como fármacos com propriedades antimicrobianas, são de fundamental importância para o combate a diversas doenças (KEMPFER 2013).

Para a obtenção de novos fármacos se faz necessário inicialmente um estudo envolvendo a citotoxicidade, buscando uma avaliação biológica de produtos destinados a saúde, sendo fundamental uma análise da biocompatibilidade dos mesmos. A descoberta de novos medicamentos tem suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas. (NASCIUTTI, 2012), e um dos principais testes a serem realizados, são os testes *in vitro*, por meio de ensaios de viabilidade celular (ARAUJO, et al. 2008). O teste *in vitro* e também o citotóxico, são uns dos primeiros testes a serem efetuados, principalmente devido aos resultados que estes apresentam, relacionados a avaliação da atividade destes compostas nas células a serem estudadas. Sendo assim esses testes são realizados com o intuito de identificar se os compostos analisados, são capazes de agir no sitio ativo desejado, ou não. Sendo assim, vê-se a grande importância destes testes para a obtenção de um possível novo fármaco.

Neste contexto o presente trabalho propõe estudar os efeitos toxicológicos de novos compostos de triazenos em um modelo *in vitro* frente a *Saccharomyces cerevisiae*, estudando os efeitos toxicológicos dos novos compostos de triazenos, sintetizados e caracterizados com o intuito de uma possível aplicação destes novos compostos como um fármaco em potencial.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os tumores malignos são responsáveis por um número expressivo e crescente de pacientes em todo o mundo, e representam a segunda causa de morte da população mundial. Segundo o Ministério da Saúde (2012), no ano de 2009 a estimativa foi de 500 mil novos casos de tumores malignos, representando uma mortalidade que atingiu aproximadamente mais de 250 mil portadores de câncer no Brasil. Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico contra o câncer, vários tumores ainda não dispõem de tratamento adequado.

O carcinoma de pulmão, que se encontra entre os mais frequentes em todo o mundo, não apresenta respostas imediatas aos tratamentos quimioterápicos disponíveis (COSTA-LOTUFO; *et al*, 2010). Segundo relatos, o primeiro fármaco antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, usado nas duas Guerras Mundiais como arma química. Observou-se então após a exposição a este agente, que os pacientes desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que levou ao seu uso no tratamento de linfomas malignos.

Os agentes conhecidos e utilizados no tratamento do câncer afetam tanto as células normais como as neoplásicas, porém acarretam maior dano às células malignas do que às dos tecidos normais, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos dessas duas populações celulares (INCA, 1993).

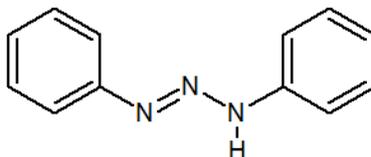
Os tipos mais comuns de câncer são os de pele, mama feminina, próstata, pulmão e estômago sendo que os últimos quatro são letais e compõem a segunda maior causa de mortes por doenças no Brasil (SIMPLICIO, MAIONCHI, HIOKA, 2002). Sendo assim, o desenvolvimento de novos fármacos é de extrema importância, levando em consideração que o câncer é a segunda doença que mais mata, não só no Brasil, mas também no mundo.

Desta forma, a busca por compostos com potencial farmacológico se torna frequente entre a maioria dos pesquisadores, visando uma maior eficiência e ampla atuação. Entre estes compostos, pode-se incluir os compostos da classe triazenos, extremamente promissores por apresentarem várias atividades biológicas (CARMO, 2013), possibilitando a sua utilização como fármacos eficientes no combate de diferentes tipos de câncer.

Em diversos estudos sobre os compostos de triazenos, tem-se comprovações de que os mesmos apresentam várias atividades biológicas. 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 o 1-*E*-1,3-difenil-1-Triazeno (Diazoaminobenzeno) (Figura 1) (CARMO 2013).

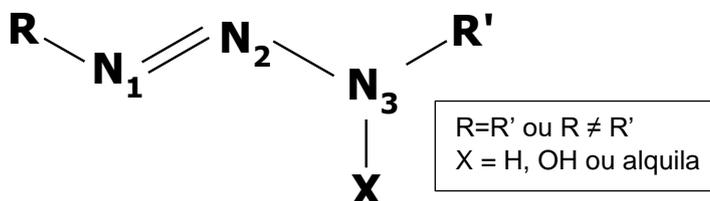
Figura 1: Representação da estrutura do primeiro composto triazeno sintetizado.



Fonte: Autoria Própria, 2019

A classe dos triazenos é formada por compostos que apresentam três átomos de nitrogênio em sequência ($-N=N-N(X)-$) com diferenciados substituintes terminais (Figura 2). É importante salientar que o substituinte X, pode ser tanto um hidrogênio quanto um grupamento hidroxila, que acaba levando a formação dos conhecidos hidróxitriazenos.

Figura 2: Representação genérica de triazenos monocatenados.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Ao observar-se alguns estudos, pode-se perceber que a cadeia nitrogenada presente na estrutura, apresenta uma configuração *trans* (MOORE & ROBISON, 1986) e observa-se também que a distância da ligação mais curta entre N1 e N2, se encontra próxima de 1,27 – 1,28 Å e a ligação mais longa está próxima de 1,32-1,33 Å. Nota-se também que os valores encontrados experimentalmente apresentam-se distintos dos valores padrões para uma ligação N–N, que apresentam uma distância de ligação de (1,44 Å) e para ligações N=N, podemos observar uma distância de (1,24 Å), que devido à deslocalização dos elétrons π na molécula, apresentam um caráter sp^2 para as ligações N1, N2 e N3 (CRESPAN, 2009). Nota-se também, que o hidrogênio ligado ao nitrogênio sp^2 da cadeia pode ainda ser substituído, por um grupo

hidroxila dando origem aos chamados grupos hidróxitriazenos, o que amplia as possibilidades de investigação das propriedades e dos complexos a partir deles formados.

Para os compostos da classe dos triazenos que apresentam uma alta densidade eletrônica concentrada sobre alguns átomos, observa-se que estes tendem a possuir uma baixa estabilidade, e a observa-se também, que a presença de substituintes (aromáticos ou alifáticos que apresentem grupamentos nitro, halogênios, carboxílicos, nas diferentes posições, orto, meta e para), nos nitrogênios terminais da cadeia acabam por contribuir para uma maior deslocalização eletrônica, que se a através dos efeitos indutivos, o que acaba por tornar estes compostos mais estáveis.

Existem três rotas sintéticas descritas na literatura, quando se trata da síntese de compostos triazenos. Uma delas envolve o acoplamento de um sal de diazônio com uma amina aromática livre (HARTMAN, 1943), sendo esta, onde a reação entre um sal de diazônio, ocorre com uma amina, sendo esta primária, ou secundária. Esta reação necessariamente deve ocorrer em um pH específico e a uma baixa temperatura, mais especificamente entre (0 – 7 °C), podendo dar origem a espécies monocatenadas simétricas e assimétricas. Uma outra rota sintética utilizada é a com nitrito isoamilico (VERNIN, et al 1977) (esta acontece a temperatura ambiente, com uma quantidade equivalente da amina em questão e de nitrito isoamilico, que devem ser dissolvidos em um solvente apolar, podendo dar origem a compostos triazenos simétricos. E a terceira rota possível, para se obter compostos de triazenos, é a partir de uma reação de Grignard (HÖRNER et al, 1996), neste caso a síntese ocorre entre azidas aromáticas e um reagente de Grignard, seguido de uma hidrólise, o que acaba por permitir a formação de triazenos biscatenados.

Entre as atividades relatadas na literatura para esta classe de compostos, observa-se comprovada atividade antimicrobiana frente a bactérias *gram-positivas*, *gram-negativas* e fungos (SHEALY; KRAUTH, 1966; GOSWAMI; PUROHIT, 2001; ZHOU et al, 2005; 2006; 2007; HÖRNER et al., 2008). No caso da atividade antimicrobiana, o mecanismo de ação dos Triazenos está relacionado com a influência destes compostos sobre a parede celular das bactérias (GOSWAMI; PUROHIT, 2001).

No entanto na maioria dos estudos o que mais prevalece é a pesquisa envolvendo as propriedades antitumorais que estes compostos têm apresentado (ÜNSALAN et al., 2011) podendo vir a ser utilizados como fármacos eficientes no

combate de diferentes tipos de câncer, auxiliando no combate desta doença que segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é a segunda principal causa de morte em todo o mundo e foi responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015.

Esta classe de compostos já está presente na composição de alguns fármacos com aplicações antineoplásicas, como a *Dacarbazina*® (SHEALY, KRAUTH, MONTGOMERY, 1962) e a *Temozolomida*® (RACHID *et al*; 2003) (Figura 3), mostrando-se ativos contra o sarcoma 180 (S180), o adenocarcinoma 755 (Ca 755) e a leucemia linfóide L1210 e contra tumores cerebrais, vindo a servir de inspiração para o desenvolvimento de novos fármacos.

Figura 3: Representação Estrutural dos fármacos *Dacarbazina*® (a) e *Temozolomida*® (b).



Fonte: autoria própria, 2019.

Segundo Guido (2010), sendo a síntese de compostos biologicamente ativos uma evolução expressiva da química e da biologia, a descoberta de inovações terapêuticas, proporciona uma notável melhoria significativa na qualidade de vida das populações no mundo. Devido a isso, a descoberta de novos agentes quimioterápicos com toxicidade reduzida e máxima atividade contra células tumorais com mínima dosagem (KEMPFER 2013), é de extrema importância para o desenvolvimento de novos fármacos, que tenham atividades biológicas em células neoplásicas.

A ciência que estuda os efeitos nocivos causados por substâncias químicas sobre organismos vivos é chamada toxicologia (COSTA *et al.*, 2008). Testes toxicológicos, são análises laboratoriais realizadas através de ensaios sob condições experimentais específicas e controladas. Esses testes são de extrema importância para determinar o risco que uma determinada amostra, pode causar a população humana.

A toxicologia tem como principais objetivos identificar os riscos associados a uma determinada substância e determinar em quais condições de exposição esses

riscos são induzidos (COSTA et al., 2008). Para que assim possam ser desenvolvidos agentes químicos que sejam menos nocivos a saúde humana. A esta ciência se dá o nome de toxicologia clínica, que no caso é a área que analisa os efeitos causados pelos fármacos em seres humanos.

Segundo a norma ISO 10993-5 (2009) existem três categorias de ensaios de citotoxicidade, a saber: contato direto, por extrato e difusão em ágar, os quais diferem quanto à forma pela qual as células são expostas ao material em análise (MASSON; LOMBELLO, 2016).

Segundo Tizotti; *et al.* (2016), é possível observar uma promissora atividade de um novo complexo de cobre(II) frente a linhagem celular tumoral B16F10, a qual apresenta alta habilidade de formar metástases. Neste composto o íon cobre(II) encontra-se coordenado a um ligante triazeno e a 1,10-fenantrolina, e o estudo envolveu a análise da citotoxicidade por meio do ensaio MTT, realizado através de uma cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium.

Segundo Dolezalova (2014), os testes toxicológicos utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, além de ser um teste simples, ele tem se mostrado muito eficiente e rápido em comparação com os testes padrão. Sendo a levedura *S. cerevisiae* um organismo modelo conveniente para avaliação do efeito tóxico em células e tecidos humanos. Alguns testes desenvolvidos a partir desta levedura, mostraram que o mesmo indica presença de sete em dez substâncias tóxicas testadas em concentrações significativamente menores do que as doses tóxicas ou letais para o homem.

Colombi et al (2017) estudaram a influência de vanilina, ácido acético, ácido vanílico e ácido 4-hidroxibenzoico na fermentação de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* JP1, buscando identificar o que ocorre com os açúcares fermentescíveis que não estão prontamente disponíveis em biomassas lignocelulósicas, como resíduos agrícolas e florestais, e que podem servir de matriz carbônica para a fermentação e obtenção do etanol de segunda geração (2G), e conseqüentemente precisam ser liberados por operações adicionais de pré-tratamento e hidrólise. Os autores observaram que as substâncias afetam o metabolismo da *Saccharomyces Cerevisiae* JP1 durante a fermentação de glicose em etanol., e o efeito tóxico depende da concentração desses no meio fermentativo, e os resultados indicaram que a vanilina e ácido vanílico inibem o crescimento da levedura em uma extensão diretamente proporcional à concentração inicial dessas moléculas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Este projeto tem por objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar a toxicidade dos compostos sintetizados frente a *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar novos compostos da classe triazenos utilizando a reação de diazotação de aminas com nitrito de sódio, com posterior autoacoplamento da mesma amina ou acoplamento de aminas diferentes.
- Caracterizar os compostos sintetizados, utilizando técnicas como a desprotonação, ponto de fusão, espectroscopia na região do infravermelho e na região do ultravioleta-visível.
- Avaliar a toxicidade dos compostos frente a *Saccharomyces cerevisiae*.

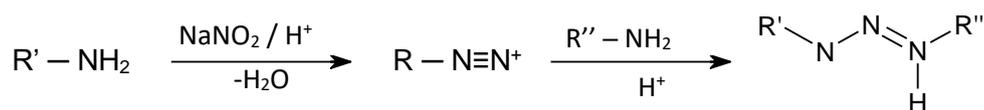
4 METODOLOGIA

A metodologia utilizada no presente trabalho para a obtenção dos novos compostos Triazenos foi adaptada dos trabalhos publicados por Carmo (2013) de Cao *et al* (2000), assim como a utilizada por Crespan (2009) para os compostos triazenos já existentes. A síntese dos compostos foi realizada por meio da diazotação das diferentes aminas com nitrito de sódio em soluções ácidas sob baixa temperatura (0°C) (Figura 4) (SOLOMONS, FRYHLE, 2006).

Quando o objetivo for um Triazeno simétrico, a proporção de amina para nitrito de sódio será de 2:1 ocorrendo posteriormente o acoplamento da amina. É importante que todas as reações de síntese dos Triazenos sejam mantidas constantemente a baixas temperaturas, a fim de evitar principalmente a decomposição do sal do intermediário, o sal de diazônio.

Já no caso dos compostos assimétricos, a proporção das amina para nitrito de sódio é de 1:1, 7 mmol, com o posterior acoplamento de uma outra amina distinta. É importante lembrar, que assim como a reação simétrica, a reação assimétrica, deve ocorrer à uma baixa temperatura e também à um pH, não muito baixa, pois estes são dois fatores que podem interferir no andamento da reação. Após a primeira etapa da síntese, que é onde ocorre a formação do sal de diazônio, adiciona-se a segunda 7 mmol, da segunda amina à reação, e assim ocorre o acoplamento da segunda amina, dando termino a síntese. A figura 4 representa uma esquema genérico da rota da síntese utilizada para a obtenção dos compostos aqui sintetizados, o esquema serve tanto para sínteses de compostos simétricos, quanto para sínteses de compostos assimétricos.

Figura 4: Esquema da rota de síntese a ser utilizada para obtenção dos compostos Triazenos.



Onde $R' = R'' =$ simétrico ou $R' \neq R'' =$ assimétrico e $R' = R'' =$ 4-nitroanilina, 3-nitroanilina, 4-fluoroanilina e 2-benzimidazol.

FONTE: Autoria própria (2018).

Após o término síntese, é necessário que ocorra a neutralização do produto da síntese, essa neutralização foi realizada com uma solução acetato de sódio 10%. A neutralização é de extrema importancia nesta síntese, pois é ela que ajuda na precipitação do composto sintetizado, ao final da síntese o pH encontra-se entre 2,5 e 3,0 e é importante fazer a neutralização até que o pH fique próximo a 6,0. Quando o pH esperado é obtido e o conteúdo da síntese é filtrado a vácuo, ao final da filtração, o produto apresentara uma coloração entre o amarelo e o laranja. Calculou-se então o rendimento dos compostos 1 e 2, onde o composto 1 apresentou um rendimento de 55% e o composto 2 um rendimento de 69%. A partir de então realizou-se a caracterização dos compostos, utilizando-se das técnicas de Ponto de Fusão, espectroscopia na região do infravermelho e na região do ultravioleta-visível.

A avaliação da toxicidade frente a *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada utilizando os métodos propostos por Dolezalova & Rumlova (2014).

Desta forma, o trabalho foi realizado foi dividido em três etapas, que correspondem a síntese dos compostos de triazenos, a caracterização dos mesmos e a análise da toxicidade, assim como das propriedades anti-inflamatória destes compostos.

4.1 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados foram da marca Sigma- Aldrich e os solventes da Dinâmica e Alphatec, listados a seguir:

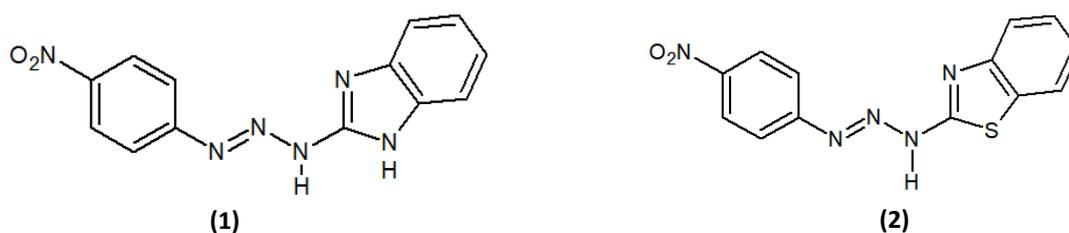
- 4-nitroanilina
- 2-benzimidazol
- 2-aminobenzotiazol
- Acetato de sódio
- Ácido acético
- Nitrito de sódio
- Sílica gel

4.2 Síntese de Compostos Assimétricos 1-(4-nitroanilina)-3-(2-benzimidazol) (a) e 1-(4-nitroanilina)-3-(2-aminobenzotiazol) (b)

No presente trabalho, os compostos sintetizados são assimétricos, então para

a síntese destes compostos foram pesados inicialmente 7 mmol o que equivale (0,97 gramas) de 4-nitroanilina e 7 mmol, (0,6 gramas) de nitrito de sódio. Inicialmente dissolveu-se a 4-nitroanilina em uma solução aquosa de ácido clorídrico 1:1 (20 mL de água, para 20 mL de ácido clorídrico), este sistema foi mantido em banho de gelo, há uma agitação vigorosa, até que chegasse à 0 °C. Após chegar a temperatura desejada, adicionou-se a solução de nitrito de sódio 7 mmol, e manteve-se o sistema em constante agitação e também há uma baixa temperatura, entre 0 e 7 °C, por 60 minutos. Esta etapa da reação é onde ocorre a formação do sal de diazônio e é de extrema importância que a temperatura fique baixa, pois um aumento na temperatura poderia causar a hidrólise do sal de diazônio, o que acarretaria na eliminação de um fenol e do nitrogênio molecular. Um outro ponto importante nesta etapa é evitar um pH muito baixo, pois isto acarretaria na protonação da amina, o que impediria o acontecimento da reação. Após os 60 minutos, adicionou-se 7 mmol (0,93 gramas) da segunda amina, a 2-aminobenzimidazol, para a obtenção do composto (1) (Figura 5 (1)) e para a obtenção do composto (2) (Figura 5 (2)), adicionou-se 7 mmol (1,05 gramas) da amina 2-aminobenzotiazol. Após a adição da segunda amina, o sistema manteve-se em constante agitação por mais 40 minutos e após este período de tempo, estes foram neutralizados com uma solução aquosa de acetato de potássio 10%, a fim de elevar o pH do produto sintetizado até próximo de 6,0 e também de ajudar na precipitação do produto da síntese. Após a neutralização os produtos finais foram filtrados a vácuo e um sólido com uma coloração que varia entre o amarelo e o laranja foi obtido, estes foram postos para secar e após a secagem calculou-se o rendimento, onde pode-se observar que o composto 1 apresentou um rendimento de 55% e o composto 2 apresentou um rendimento de 69% e em seguida, deu-se início aos processos de caracterização.

Figura 5: Representação das estruturas dos Triazenos assimétricos.



Fonte: Autoria própria (2019).

4.3 Caracterização dos Compostos 1 e 2

4.3.1 Teste de solubilidade dos compostos 1 e 2

O teste de solubilidade foi realizado para todos os compostos, buscando identificar o melhor solvente para a obtenção dos monocristais adequados. Os solventes testados foram, acetona, etanol e metanol.

4.3.2 Teste de desprotonação dos compostos 1 e 2

Um teste prévio e bastante simples, foi realizado para que fosse possível observar se o produto da reação apresentava características de uma molécula triazeno, ou se o composto obtido era apenas uma das aminas utilizadas como material de partida da reação. O teste envolveu a utilização de uma solução básica de hidróxido de potássio levou a uma alteração da coloração da solução, sendo que antes de desprotonada a solução do composto 1, apresentava uma coloração laranja e de pois de desprotonado passou a apresentar uma coloração avermelhada. E para o composto 2, que inicialmente apresentava uma coloração amarelo (ferrugem), depois da desprotonação ele passou a apresentar uma coloração roxa.

4.3.3 Determinação do Ponto de Fusão dos compostos 1 e 2

As análises do ponto de fusão dos compostos, foram realizadas utilizando-se um aparelho do tipo PF1500 FARMA da marca GEHAKA, localizado no Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão.

4.3.4 Espectroscopia de infravermelho IV dos compostos 1 e 2

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram realizados a partir de pastilhas de brometo de potássio (KBr). Para esta análise foi utilizado o Espectrofotômetro Bruker Tensor-27, com uma janela espectral entre 4000 e 400 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} , localizado no Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Campo Mourão.

4.3.5 Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) dos compostos 1 e 2

Os espectros nas regiões do ultravioleta visível foram realizados em um espectrofotômetro UV-Vis 1650-PC *Shimadzu*, localizado no Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Campo Mourão.

4.3.6 Análise da toxicidade dos compostos da classe triazenos frente a *Saccharomyces cerevisiae*

Seguindo a metodologia proposta por Dolezalova (2014), realizou-se a análise toxicológica dos compostos 1 e 2 frente a *Saccharomyces cerevisiae*, baseando-se no monitoramento da condutividade específica como resultado da atividade de fermentação da levedura. Para a realização do teste, preparou-se uma solução hidroalcoólica 2%, que foi utilizada para o preparo das soluções contendo os compostos 1 e 2 e também, para o preparo da solução controle. Para o preparo da solução controle adicionou-se ao beque 2 gramas de açúcar (sacarose), 2 gramas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e 20 mL da solução hidroalcoólica. E para as soluções dos compostos 1 e 2, foram pesados 0,148 gramas para o composto 1 e 0,149 gramas para o composto 2. As quantidades pesadas foram adicionadas a balões volumétricos de 50 mL, obtendo uma concentração de 10^{-3} , para cada um dos compostos. Em seguida foram preparadas mais três soluções do composto 1, por diluição, a fim de obter as concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} $\mu\text{g mL}^{-1}$, o mesmo foi feito para o composto 2. Após o preparo das soluções dos compostos 1 e 2, pesou-se 2 gramas de açúcar e duas gramas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em cada um dos 8 béqueres restantes, estes foram nomeados com o nome das soluções a serem adicionadas em cada um e suas respectivas concentrações. Em seguida adicionou-se 20 mL de cada uma das soluções dos compostos 1 e 2 em seus respectivos béqueres, antes nomeados. Esses béqueres foram adicionados ao banho maria, à uma temperatura constante de 30 °C, por 30 minutos. Após os 30 minutos, foram aferidas a condutividades específicas em cada um dos béqueres. Para que posteriormente, fossem obtidos a DL_{50} (Dose Letal 50), que é a dose necessária para matar a metade de uma população a ser estudada, neste caso, a *Saccharomyces*

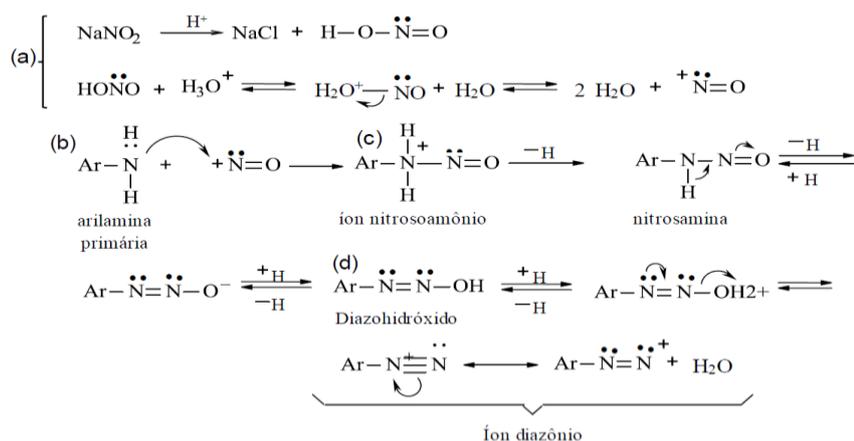
cerevisiae. A DL_{50} , foi determinada a partir de uma curva de calibração, obtida pelo Excel e partir dela, foi possível determinar a equação da reta, que possibilitou o cálculo da DL_{50} , dos compostos 1 e 2. Foram determinadas também a condutividade específica média em comparação com a porcentagem da taxa de mortalidade dos compostos 1 e 2. Para eliminar diferenças de condutividade da amostra e amostra de controle, é necessário ajustar o valor medido valores da condutividade específica. Isso significa que o valor apropriado da condutividade específica da solução de açúcar é subtraído da condutividade específica da suspensão de levedura. Então, a média da condutividade específica corrigida da suspensão testada e as suspensões de controle são calculadas Dolezalova (2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Mecanismo envolvido na obtenção dos compostos 1 e 2

A síntese para obtenção dos compostos 1-(4-nitrofenil) -3-(2-benzimidazol) (1) e 1-(4-nitrofenil) -3-(2-aminobenzotiazol) (2), foi baseada na metodologia descrita por Hartman *et al* (1943), iniciando-se com a formação do sal de diazônio, a qual é conhecida como reação de diazotação. Seguindo esta metodologia, adicionou-se 7 mmol (0,97 gramas), da amina 4-nitroanilina, que no caso foi utilizada como ponto de partida para a reação e em seguida adicionou-se uma solução aquosa de ácido clorídrico 1:1 (20 mL de água em 20 mL de ácido clorídrico) e adicionou-se o béquer à um banho de gelo, com uma agitação vigorosa, até que este chegasse à temperatura de 0 °C. Após, chegar a temperatura desejada, adicionou-se 7 mmol (0,6 gramas) de nitrito de sódio, a fim de obter o sal de diazônio, é importante ressaltar que a temperatura durante a reação de obtenção do sal de diazônio, deve estar entre 0 e 7 °C, para que não ocorra a hidrólise do sal de diazônio, pois isso acarretaria a perda de um grupamento fenol e também do nitrogênio molecular, o pH também deve ser levado em consideração, pois um pH muito baixo, acarretaria na protonação da amina, impedindo a reação de acontecer.

Figura 6: Mecanismo para a síntese do sal de diazônio.



Fonte: GIGLIO, 2011.

Após a obtenção do sal de diazônio, adicionou-se a segunda amina à reação, sendo 7 mmol (0,93 gramas) de 2-aminobenzimidazol, para a obtenção do composto 1 e 7 mmol (1,05 gramas) de 2-aminobenzotiazol, para a obtenção do composto 2. Após adicionar a segunda amina a reação, deixou-se está em banho de gele, em agitação constante e vigorosa, por mais cerca de 40 minutos. E em seguida realizou-

se a neutralização dos compostos, com acetato de sódio 10%, a neutralização foi realizada, até que um pH próximo a 6,0 fosse detectado. Em seguida, o produto da síntese, foi filtrado a vácuo e colocado em um dessecador, afim de secar as amostras, após a secagem, foram realizados os cálculos do rendimento onde pode-se observar um rendimento de 55% para o composto 1 e 69% para o composto 2. E em seguida seguiu-se para os testes de caracterização.

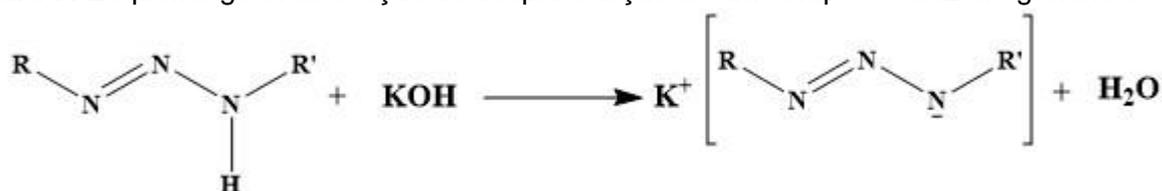
5.2 Desprotonação dos compostos 1 e 2

O teste de desprotonação dos compostos 1 e 2, foi realizado com o intuito de observar se realmente ocorreu a formação do produto esperado, ou se eram os mesmos materiais de partida.

Este teste é demasiado simples, porém de extrema importância para continuar os demais testes, propostos neste trabalho, pois a partir deste é possível saber se houve ou não a reação. Este teste consiste em dissolver o produto obtido, em um solvente, neste caso utilizou-se acetona. Em alguns tubos de ensaio, foram dissolvidos pequenos cristais, dos compostos 1 e 2, em acetona e posteriormente nesta solução foram adicionadas algumas gotas de hidróxido de potássio 0,1M.

Quando os compostos foram dissolvidos em acetona, eles apresentaram uma coloração amarela e após a adição de algumas gotas de hidróxido de potássio, se a mistura continuasse com a coloração amarelada significaria que o composto ali presente, era o material partida, porém apresentasse uma coloração avermelhada, seria o triazeno. A figura 7, apresenta a reação de desprotonação de compostos de triazenos.

Figura 7: Esquema geral de reação de desprotonação de um composto triazeno genérico.



Fonte: Autoria própria, 2019.

As Figuras 8 e 9, apresentam as soluções das aminas de partida, dos compostos triazenos, sem e com hidróxido de potássio, evidenciando a troca de cor oriunda da desprotonação da cadeia nitrogenada.

Figura 8: Soluções das aminas precursoras 4-nitroanilina, 2-benzimidazol e do composto 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) sem e com hidróxido de potássio.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 9: Soluções das aminas precursoras 4-nitroanilina, 2-aminobenzotiazol e do composto 1-(4-nitroanilina)-3-(2-aminobenzotiazol) com hidróxido de potássio.



Fonte: Autoria própria, 2019.

5.3 Pontos de fusão dos compostos 1 e 2

A análise do ponto de fusão ocorre pela comparação dos pontos de fusão das aminas utilizadas como reagentes de partida e os pontos de fusão que foram observados para os compostos obtidos.

Como pode-se comprovar na tabela abaixo os pontos de fusão das aminas utilizadas como ponto de partida, são distintos dos pontos de fusão observados para os novos compostos de triazenos obtidos.

Tabela 1: Ponto de fusão das aminas e dos compostos sintetizados.

| Composto / Amina | Ponto de Fusão (°C) |
|-------------------------------------|----------------------------|
| 4-nitroanilina | 147 °C |
| 2-aminobenzotiazol | 128 °C |
| 2-aminobenzimidazol | 228 °C |
| 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) | 164 °C |
| 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzotiazol) | 221 °C |

Fonte: Autoria própria, 2019.

5.4 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

Nas análises de infravermelho, os compostos da classe trizenos apresentam bandas de absorção na região entre (4000 a 400 cm^{-1}), e as cadeias diazoamínicas com os estiramentos N-H, N=N e N-N, são as principais bandas encontradas que caracterizam estes compostos. No entanto é importante destacar que os compostos de trizenos, apresentam frequências um pouco mais baixas dos estiramentos, devido a apresentarem um alto deslocamento eletrônico da cadeia diazoamínicas. Para caracterizar os compostos é necessário observar as cadeias terminais, pois são estas que apresentam as informações necessárias, relacionadas as bandas de absorção, que nos permitem caracterizar os compostos analisados.

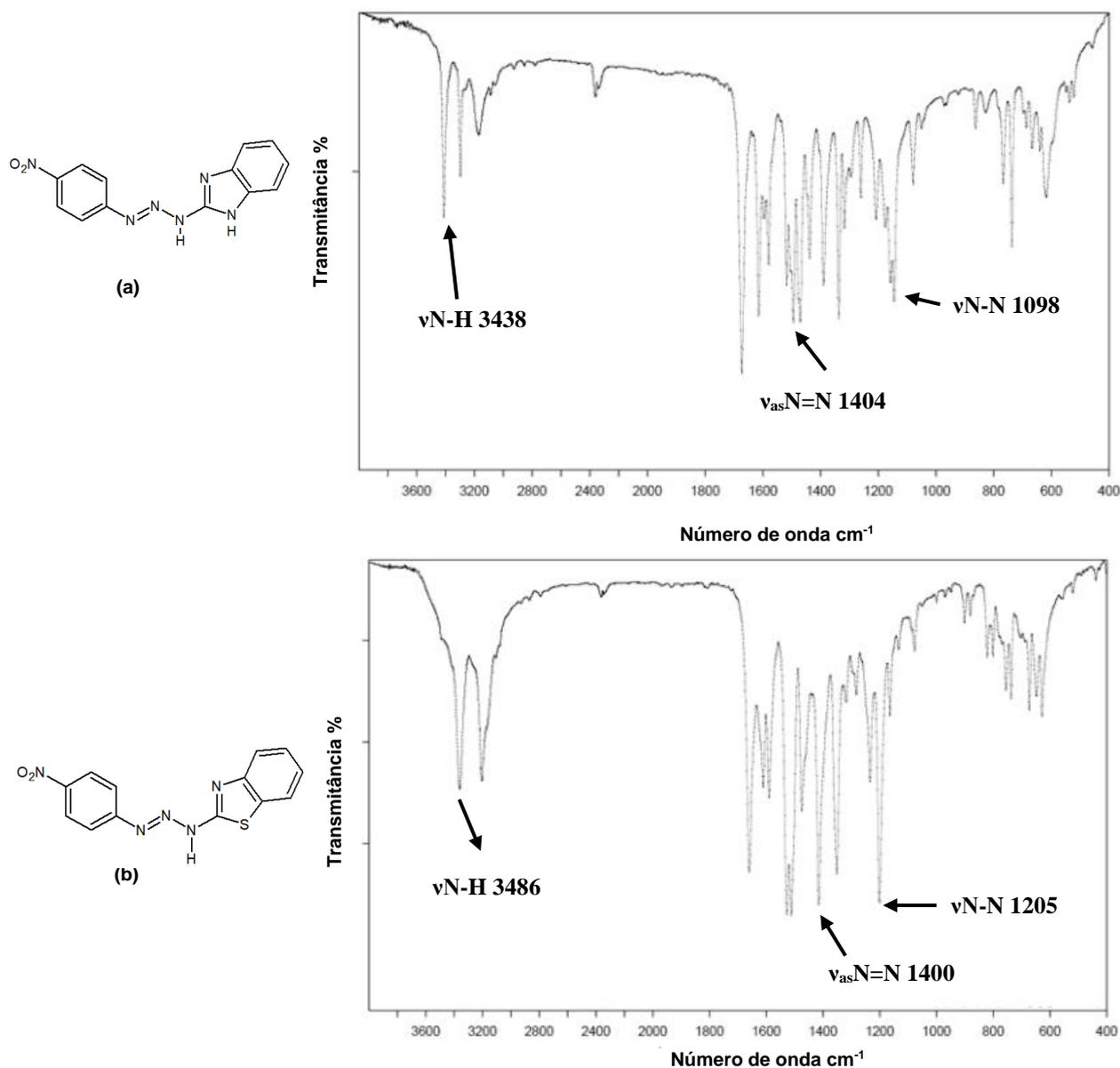
A partir da medida da frequência vibracional de uma molécula, ou seja, frequência, ou número de onda absorvido na região do infravermelho, é possível, determinar a força das ligações e sendo assim, a partir da equação 1 é possível determinar a frequência de vibração entre os átomos, onde K é a constante de força e μ a massa reduzida do grupo.

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1)$$

Para os compostos estudados 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) (a) e 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzotiazol) (b) as principais bandas de absorção, são características dos estiramentos assimétricos e das deformações apresentadas pelos grupos N=N, N-N, N-H, NO_2 , C=C, C-S e C-H. Na figura 10, encontram-se as bandas de absorção, consideradas características dos grupos funcionais que determinam estas espécies e estão condizentes com os dados apresentados na literatura (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1991) (NAKAMOTO, 1986). A Tabela 2 apresenta as principais bandas de absorção na região do infravermelho para os dois compostos sintetizados

e faz um comparativo com o composto 1,3-(bisfenil)triazeno utilizado como principal referência (GIGLIO, 2011).

Figura 10: Espectros de absorção na região do infravermelho para os compostos 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) **(a)** e 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzotiazol) **(b)**.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Tabela 2: Principais bandas de absorção na região do infravermelho em cm⁻¹, para os compostos 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) **(a)** e 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzotiazol) **(b)**.

| Composto | $\nu_{\text{asN=N}}$ | $\nu_{\text{N-N}}$ | $\nu_{\text{N-H}}$ | $\delta_{\text{N-H}}$ | $\nu_{\text{s NO}_2}$ | $\nu_{\text{s C-N}}$ | $\nu_{\text{C=C}}$ |
|------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|
| (a) | 1404 | 1098 | 3438 | 1473 | 1527 | 1283 | 1584 |
| (b) | 1400 | 1205 | 3486 | 1484 | 1540 | 1274 | 1593 |

Fonte: Autoria própria, 2019

Observando-se que para a cadeia diazoamínica, considera-se que o estiramento assimétrico da dupla ligação, formada entre os nitrogênios $\nu_{\text{as}}(\text{N=N})$ e o

estiramento simétrico da ligação simples entre os átomos de nitrogênio $\nu_s(\text{N-N})$, bem como o estiramento simétrico entre os nitrogênios periféricos da cadeia e os átomos de carbono dos anéis de fenila $\nu_s(\text{C-N})$, porém o estiramento mais importante a ser observado para que seja possível a caracterização dos compostos de triazenos é o da ligação entre o nitrogênio e o hidrogênio imínico [$\nu_s(\text{N-H})$].

Segundo Crespan (2009), os substituintes presentes na molécula, exercem efeitos indutivos (- I) e mesoméricos (- M) sobre os anéis fenílicos terminais, que acabam por remover parcialmente a densidade eletrônica da cadeia diazoamínica, o que acaba por aumentar a acidez do hidrogênio imínico, fazendo com que os estiramentos $\nu_s(\text{N=N})$ e $\nu_s(\text{N-N})$, se desloquem para uma região de menor frequência no espectro de absorção.

Sendo assim, pode-se comparar os espectros obtidos com o espectro do 1,3-(bisfenil)triazeno (GIGLIO, 20011), no qual pode-se observar estiramentos de banda nas regiões de 1412 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} , sendo estes referentes a $\nu_s(\text{N=N})$ e $\nu_s\text{ N-N}$. A partir de então, fazendo-se esta comparação é possível observar que há uma diminuição na região de absorção com relação ao composto sintetizado por (GIGLIO, 2011), o que provavelmente se deve a presença de um substituinte NO_2 na posição *para*, o que acaba por provocar uma diminuição do pH, aumentando-se assim a acidez da molécula diminuindo os valores esperados para os estiramentos acima citados.

5.5 Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

Uma técnica bastante utilizada na caracterização de vários compostos, é a espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), que permite que sejam analisados compostos capazes de absorver em um comprimento de onda na região do ultravioleta-visível e tendo em vista que os compostos da classe dos triazenos, são capazes de absorver em um comprimento de onda (λ) na faixa de 190 a 780 nm, esta se tornou viável na caracterização dos compostos aqui estudados.

Segundo CRESPLAN, 2009:

Grupamentos com ligações duplas entre carbonos, sistemas conjugados, grupos nitro, azo, entre outros, incrementam as absorções de moléculas compostas por estes cromóforos. Se os cromóforos forem conjugados com outros idênticos, ou de espécie diferente, a absorção será realçada, podendo surgir outra banda de

absorção em comprimento de onda maior, estas bandas acabam sobrepondo-se, causando então uma linha de absorção relativamente larga (Pag. 95).

O fragmento azo (-N=N-), pertencente a cadeia diazoamínica [-N=N-N(H)-], é cromóforo mais forte e apresenta uma absorção com um comprimento de onda entre 330 – 400 nm, a absorção desta radiação se dá devido ao fato de que os elétrons apresentam a característica de se promoverem a níveis energéticos mais elevados mediante a absorção de energia e sendo assim, cada vez que ocorre uma transição eletrônica, ocorre uma absorção específica, o que torna possível detectar a interferência dos grupamentos cromóforos nas regiões onde ocorrem essas absorções energéticas.

No caso dos compostos de trizenos é possível observar um deslocamento eletrônico para cada estrutura, devido ao fato de que estes são formados por grupamentos cromóforos fortes, o que gera a formação de bandas características e intensas, neste tipo de composto.

No ano de 2005, Masound publicou um estudo que envolve o efeito dos substituintes e dos solventes em derivados de 1,3-(bisfenil)triazeno, neste estudo ele utiliza a espectroscopia eletrônica no ultravioleta-visível, com o intuito de elucidar a estrutura destes compostos quando em solução, e ele pode observar as mudanças na região onde os cromóforos absorvem quando ocorre a troca de solventes e a mudança de ligante. Segundo (CRESPAN, 2009), “quando ocorre uma variação nas interações trizenos/solventes pode-se modificar a região de absorção dos cromóforos”.

A Teoria da Ligação de Valência (TLV), bem como a Teoria dos Orbitais Moleculares, é de extrema importância para que se possa entender os espectros eletrônicos porque para cada ligação prevista pela TLV, será proposta a formação de um orbital molecular ligante que serão preenchidos por elétrons (σ e π), porém este também é formado por um orbital antiligante, ou seja, que não é preenchido por nenhum elétron, este possui menor estabilidade e também está localizado em um nível energético maior (σ^* e π^*). Há também algumas restrições que controlam as intensidades das transições eletrônicas, sendo somente quatro destas observadas e permitidas. Estas ligações ocorrem entre os elétrons dos orbitais moleculares ligantes

e antiligantes, de mesma simetria ($\sigma \rightarrow \sigma^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$) e também dos orbitais atômicos (elétrons não ligados) para orbitais antiligantes ($n \rightarrow \sigma^*$ e $n \rightarrow \pi^*$).

“Os compostos trizenos apresentam absorções típicas relativas às transições $n \rightarrow \pi^*$ atribuídas ao grupo azoamínico (N=N), transições $n \rightarrow \sigma^*$ atribuídas à cadeia diazoamínica $-N=N(H)$ além de transições características aos anéis aromáticos do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ ” (CRESPAN, 2009).

Para que as análises dos trizenos sintetizados neste trabalho, fossem realizadas, utilizou-se uma cubeta de quartzo de 1 cm³, e como solvente utilizou-se acetona. A Tabela 3 apresenta os dados referentes às absorções eletrônicas, e ao analisá-la, é possível observar que os valores estão diferentes dos apresentados por Crespan (2009) onde N=N- ($n \rightarrow \pi^*$) 345nm e -N=N=N- ($n \rightarrow \sigma^*$) 232 nm para o composto 1-(3-nitrofenil)-3-(2-fluorofenil)triazeno e -N=N- ($n \rightarrow \pi^*$) 328nm e -N=N=N- ($n \rightarrow \sigma^*$) 227nm para o composto para o composto 1,3-bis(3-nitrofenil)triazeno. Porém, estão de acordo com o observado por Giglio (2011), já que nos oito compostos descritos por ele os valores de absorção máxima referente a transição ($n \rightarrow \pi^*$) atribuída ao grupo cromóforo -N=N- ficam na faixa de 355,5 à 408 nm, comparados também a absorção máxima observada para o 1,3-(bisfenil)triazeno que é de 354,nm.

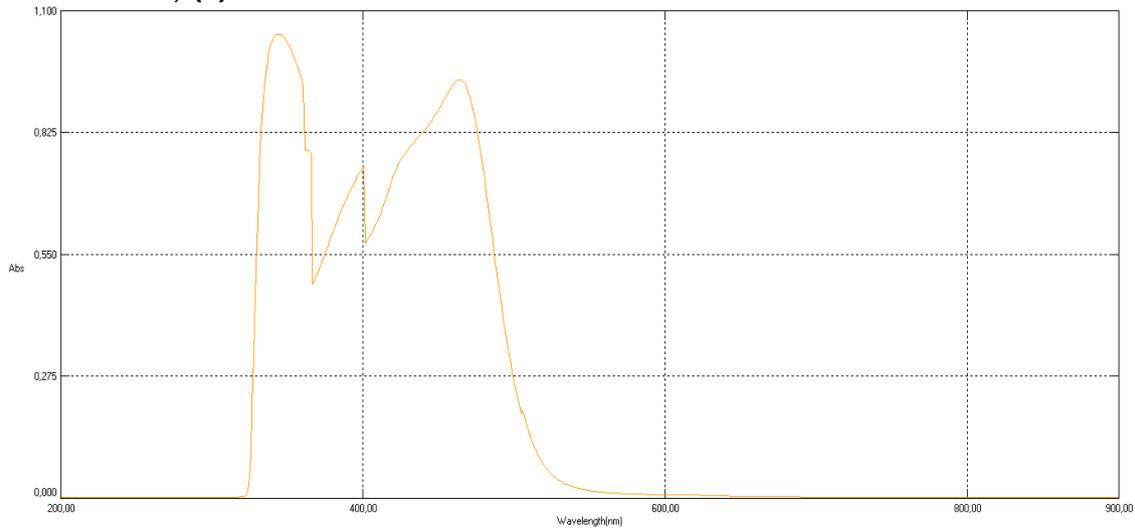
Tabela 3: Transições eletrônicas e comprimentos de onda (λ em nm) dos compostos 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) (a) e 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzotiazol) (b)

| Composto | -N=N- $n \rightarrow \pi^*$ | -N=N=N- $n \rightarrow \sigma^*$ | (C=C) _{ar} $\pi \rightarrow \pi^*$ |
|----------|--------------------------------|-------------------------------------|--|
| (a) | 492 | 396 | 347 |
| (b) | 434 | 403 | 349 |

Fonte: Autoria própria, 2019

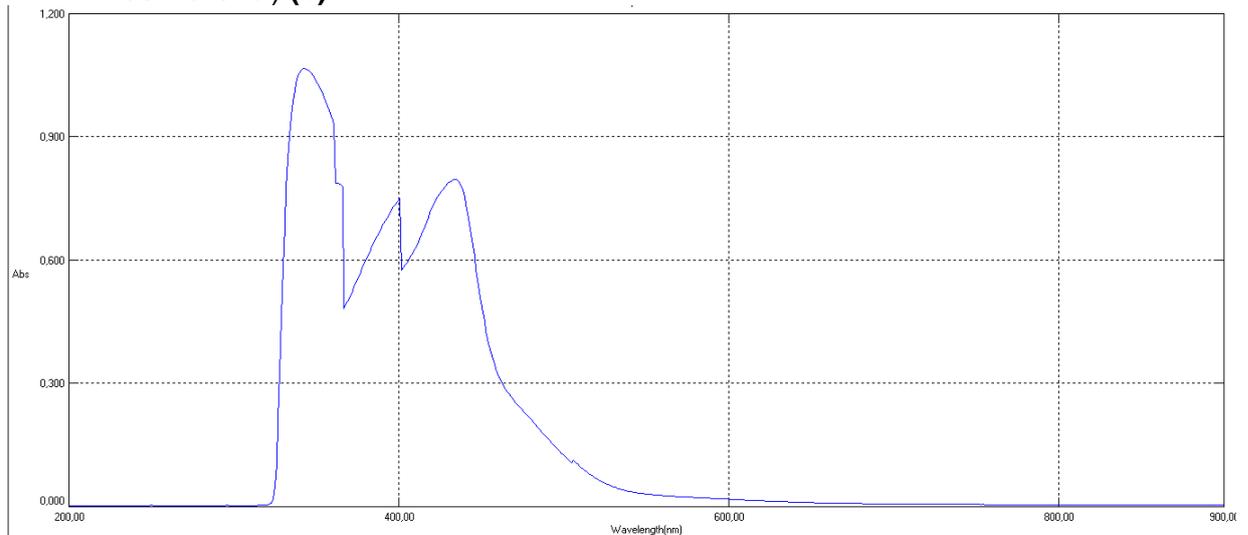
Esta diferença está relacionada com o tipo de solvente escolhido para fazer a leitura, neste trabalho utilizou-se acetona, e no trabalho de Crespan (2009) foi utilizado metanol, o que pode acarretar algumas mudanças na região onde os grupos cromóforos absorvem. As figuras 11 e 12 apresentam os espectros dos compostos.

Figura 11: Espectro na região ultravioleta-visível para o composto 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) (a).



Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 12: Espectro na região ultravioleta-visível para o composto e 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzotiazol) (b).



Fonte: Autoria própria, 2019.

5.6 Análise da toxicidade dos compostos da classe triazenos frente a *Saccharomyces cerevisiae*

Para a realização teste de toxicidade frente a *Saccharomyces cerevisiae*, foram preparadas quatro amostras de cada um dos compostos, sendo estes o 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) (1) e 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzotiazol) (2). Seguindo a proposta por Dolezalova & Rumlova (2014), preparou-se uma solução de Etanol 2%

(solução hidroalcoólica), que foi utilizada para o preparo das soluções contendo os compostos 1 e 2 e também, para o preparo da solução controle. Para o preparo da solução controle adicionou-se ao beque 2 gramas de açúcar (sacarose), 2 gramas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e 20 mL da solução hidroalcoólica. E para as soluções dos compostos 1 e 2, foram pesados 0,148 gramas para o composto 1 e 0,149 gramas para o composto 2. As quantidades pesadas foram adicionadas a balões volumétricos de 50 mL, obtendo uma concentração de 10^{-3} , para cada um dos compostos. Em seguida foram preparadas mais três soluções do composto 1, por diluição, a fim de obter as concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} $\mu\text{g mL}^{-1}$, o mesmo foi feito para o composto 2. Após o preparo das soluções dos compostos 1 e 2, pesou-se 2 gramas de açúcar e duas gramas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em cada um dos 8 béqueres restantes, estes foram nomeados com o nome das soluções a serem adicionadas em cada um e suas respectivas concentrações. Em seguida adicionou-se 20 mL de cada uma das soluções dos compostos 1 e 2 em seus respectivos béqueres, antes nomeados. Esses béqueres foram adicionados ao banho maria, à uma temperatura constante de 30 °C, por 30 minutos.

Após 30 min, a condutividade específica da solução controle e dos compostos 1 e 2 foram aferidas e estão dispostas na tabela 4.

Tabela 4: Condutividade específica obtidas no teste de toxicidade.

| Controle | 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol) | 1-(4-nitrofenil)-3-(2-aminibenzotiazol) |
|-------------------|--|--|
| 2.21 mS/cma 25 °C | 1785 $\mu\text{S/cma}$ 25 °C | 1977 $\mu\text{S/cma}$ 25 °C |
| | 1746 $\mu\text{S/cma}$ 25 °C | 1708 $\mu\text{S/cma}$ 25 °C |
| | 1598 $\mu\text{S/cma}$ 25 °C | 1699 $\mu\text{S/cma}$ 25 °C |
| | 1524 $\mu\text{S/cma}$ 25 °C | 1600 $\mu\text{S/cma}$ 25 °C |

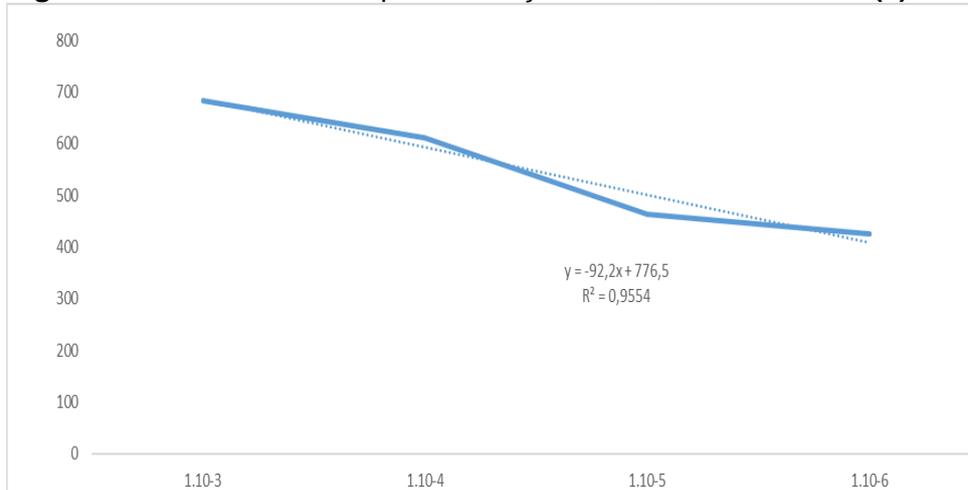
Fonte: Autoria própria, 2019.

A partir da análise dos dados obtidos na tabela pode-se construir um gráfico com os dados acima afim de obter os valores da DL_{50} (Dose Letal $_{50}$), dos compostos 1 e 2. A DL_{50} , é a dose necessária para matar a metade de uma população a ser estudada, neste caso, a *Saccharomyces cerevisiae*.

Para que fosse possível determinar a DL_{50} , dos compostos 1 e 2, fez-se necessário o desenvolvimento de uma curva de calibração no Excel. As curvas de

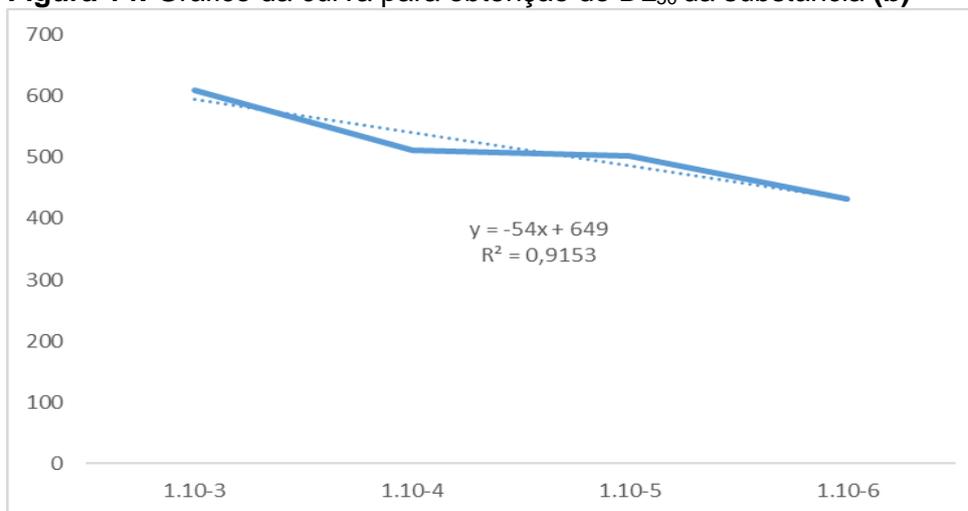
calibração estão representadas nas figuras 13 e 14, bem como a equação da reta de cada curva e o R^2 .

Figura 13: Gráfico da curva para obtenção do DL₅₀ da substância (a)



Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 14: Gráfico da curva para obtenção do DL₅₀ da substância (b)



Fonte: Autoria própria, 2019.

Tabela 5: Diferença de condutividade, em comparação ao percentual morte frente a *Saccharomyces cerevisiae*.

| Diferença de condutividade A | Percentual de morte | Diferença de condutividade B | Percentual de morte |
|------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|
| 683 | 30,9 | 610 | 27,6 |
| 612 | 27,7 | 511 | 23,1 |
| 464 | 21,0 | 502 | 22,7 |
| 425 | 19,2 | 433 | 19,6 |

Fonte: Autoria própria, 2019.

A partir dos gráficos representados nas figuras 13, composto **(1)** e 14 composto **(2)**, foi possível observar que, conforme há um aumento na condutividade, há uma diminuição na quantidade de *Saccharomyces cerevisiae*, pois conforme a levedura vai consumindo a sacarose, ela vai liberando CO₂, o que provoca o aumento da condutividade e também indica um aumento no índice de mortalidade da levedura, pois conforme ela consome o açúcar, ela vai morrendo e liberando CO₂. Esses dados de condutividade específica média, que é a média da condutividade específica encontrada inicialmente, versus, o percentual de morte, que é a porcentagem de levedura que morre de acordo com o aumento da condutividade, se encontram na tabela 5.

A partir dos da equação das equações das retas dos compostos 1 e 2, obtidos nos gráficos das figuras 13 e 14, foi possível calcular a DL₅₀, dos compostos. Os valores DL₅₀ encontrados foram, o de 3,56 µg mL⁻¹ para o 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol), composto (1) e 8,44 µg mL⁻¹ para o 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzotiazol), composto (2).

Esses valores, comparados ao valor de DL₅₀ encontrado para a Dacarbazina®, que segundo EUROFARMA LABORATÓRIOS LTDA, 2010., é de 2147 mg/Kg, que em uma conversão, considerando que a densidade da Dacarbazina® em solução é de 1,007 mg/ml, apresentaria um valor próximo a 2,147 µg mL⁻¹. O que aparentemente nos leva a crer, que os compostos 1 e 2, são menos tóxicos, do que a Dacarbazina®, levando em consideração que os valores de DL₅₀ encontrados para os compostos 1 e 2 são mais altos do que o valor da DL₅₀ encontrado para a Dacarbazina®. Em uma análise toxicológica, quanto maior a DL₅₀, significa que menos tóxico é o composto estudado, pois quanto menor for a DL₅₀, mais tóxico é o produto analisado, pois este precisa de uma dose bem menor para matar uma população média, do que um composto que apresente uma DL₅₀ maior.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados analisados, pode-se concluir que os compostos que sintetizados neste trabalho, composto (1), 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzimidazol), e composto (2) 1-(4-nitrofenil)-3-(2-benzotiazol), são compostos da classe dos triazenos e podemos observar isso de acordo com os resultados obtidos nos testes de caracterização dos compostos acima citados.

Na desprotonação observou-se que ao adicionar o hidróxido de potássio, nas soluções dos triazenos sintetizados, as soluções mudavam de coloração tornando-se vermelhas/roxas, o que indicava que o produto final não era o mesmo do material de partida. Em seguida realizou-se o teste do ponto de fusão, observando que os pontos de fusão, dos compostos sintetizados eram distintos dos pontos de fusão das aminas utilizadas como material de partida e então realizou-se os testes de absorção no ultravioleta-visível e infravermelho, observando-se que as bandas de absorção estão de acordo com a literatura.

Os triazenos sintetizados passaram por um teste de toxicidade frente a *Saccharomyces cerevisiae*, levando a conclusão de que os compostos sintetizados possuem uma toxicidade menor do que a da *Dacarbazina*®, que é um fármaco comercializado já existente, a base de compostos triazenos. Quando comparadas às DL_{50} , dos compostos obtidos, à DL_{50} *Dacarbazina*®, pode-se observar que as DL_{50} dos compostos triazenos deste trabalho apresentam valores maiores do que a da *Dacarbazina*® e sendo assim, a partir deste teste pode-se observar que aparentemente, os compostos 1 e 2 sintetizados neste trabalho, são menos tóxicos do que o da *Dacarbazina*® e isso se dá, devido ao fato de que os valores de DL_{50} , encontrados para os compostos 1 e 2, são maiores do que o da *Dacarbazina*®, pois, quanto menor a dose, mais tóxico se torna o produto.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO S. A. C. et al. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica e drogas antivirais em fibroblastos caprinos, **Ciência Animal**, 18(1):25-31,2008

BANERJEE S.; CHAANDA A.; ADHIKARI A.¹; Adhikari,¹; DAS K.¹; and BISWAS S.², Ann. Med. Health Sci Res. 2014 Jul-Aug; 4(4): 532–536.

BRUKER. *APEX2* (Version 1.0.22). *COSMO* (Version 1.48), *SAINT* (Version 7.06A). Bruker AXS Inc. Madison, Wisconsin, USA, 2004.

CAPORALI, S et al.; The cyclin-dependent kinase inhibitor PHA-848125 suppresses the in vitro growth of human melanomas sensitive or resistant to temozolomide, and shows synergistic effects in combination with this triazene compound, **Pharmacology Research**, 61(5) 437-448, 2010.

Câncer no Brasil: Presente e Futuro, **Rev Assoc Med Bras**, 50(1): 1-20, 2004.

CÂNCER; O que é Câncer?, Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 10 de junho de 2018.

CAPORASO, P. et al. **DNA Repair**, 1179-1186, 2007.

CARMO, E. *Síntese e Avaliação de Propriedades de Triazenos Orgânicos*. 2013. 23f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do ABC, Santo André – SP, 2013.

COSTA, C.R. et al. 2008. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. **Quim. Nova**, Ribeirão Preto – SP. Vol. 31, No. 7, 1820-1830, 09/08.

COSTA, I. S. *Nucleação e Crescimento Cristalino: Experimentos Didáticos de Cristalização*. Dissertação (Mestrado em Mineralogia e Petrologia). Instituto de Geociência. USP. São Paulo. 2012.

COSTA-LOTUFO L. V.; et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental, **Rev. Virtual Quim**, 2 (1), 47-58, 2010.

CRESPAN, E. R.; **Síntese, Propriedades e Avaliação da Autoassociação molecular de 1,3-Diariltriazenos e complexos triazenidos Cu(I), Cu(II), Ni(II) e Pd(II)**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS, 192f, 2009.

DIAGNÓSTICO; Dia Mundial do Câncer (4) alerta para prevenção da doença, Governo do Brasil, 2017. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/editoria/saude/2017/02/dia-mundial-do-cancer-4-alerta-para-prevencao-da-doenca>. Acesso em: 18 de junho de 2018.>

DOLEZAVA J.; RUMLOVA I, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 38, 977–981, 2014.

COLOMBI B, L; et al. Efeito de compostos inibidores na bioconversão de glicose em etanol por levedura *Saccharomyces cerevisiae*: ENGEVISTA, V. 19, n.2 , p. 339-352, Maio 2017

MINISTÉRIOS DA SAÚDE; ESTIMATIVA 2012 INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012. Disponível em:
<http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/estimativas-de-incidencia-de-cancer-2012/estimativas_incidencia_cancer_2012.pdf. Acesso em 11 de julho de 2019>.

EUROFARMA LABORATÓRIOS LTDA; FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO, 2010. Disponível em:
<http://www.ipsemg.mg.gov.br/ipsemg/ecp/files.do?evento=download&urlArqPlc=FIS PQ_Dacarbazina_Eurofarma.pdf. Acesso em 02 de julho de 2019>

FERLAY et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, **INT. J CANCER**, 136, E359 – E386, 2015.

FINNEY, D. J., **Probit Analysis**, 3th ed., Cambridge University: Cambridge, 1971, p. 76-80.

FREITAS, A.G.O. *et al.*, Film/contact loading method improves the encapsulated amount of triazene anticancer compounds in polymeric micelles, **Materials Science and Engineering in press 2013**.

GIGLIO, V. F.; *Dissertação de Mestrado*, UFSM, 2006.

GIGLIO, V.F., **Síntese e caracterização de trizenos e complexos de Hg(II) incluindo arranjos supramoleculares. Tese de Doutorado**. Centro de Ciências Naturais e Exatas – Universidade Federal de Santa Maria do Rio Grande do Sul, 2011. Disponível em:
<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/4210/GIGLIO%2c%20VINICIUS%20FELTRIN.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 01 de julho de 2019.

GOSWAMI, A. K.; PUROHIT, D. N. Synthesis and Antimicrobial Activities of some Hydroxytriazenes : A New Class of Biologically Active Compounds. **Analytical Sciences**. v. 17, p. 789-791, 2001.

GUIDO, R. V. C. et al. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Curr. Med. Chem.**, v.15, n.1, p.37-46, 2008.

GUIDO, V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados* 24 (70) p. 81-95, 2010.

HARTMAN, W.W.; DICKEY, J.B.; *Org. Synth; Coll:* 2, 163, 1943.

HEALY, Y.F.; KRAUTH, C. A.; MONTGOMERY, J.A.; Imidazoles. I. Coupling Reactions of 5 Diazoimidazole-4-carboxamide; **J. Org. Chem.**; vol 27: 2150-2154, 1962.

HÖRNER, M. et al. Trizenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

HÖRNER, M.; PEDROSO, A.G.; BORDINHAO, J.; BECK, J.; STRÄHLE, J.; Z. *Anorg. Allg. Chem.*; 622: 1177, **1996**.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER – INCA, **Quimioterapia**, Rio de Janeiro, 1993.

MOORE, D. S. & ROBINSON, S. D.; *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.*, 30, 1, **1986**.

KEMPFER, C. B. *Avaliação da Atividade Biológica de Trizenos Inéditos Complexados com Au(I)*. 2013. 85f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2013.

MASSON A. O; LOMBELLO C. B. Metodologias de avaliação citotóxica: estudo comparativo segundo tempo de exposição, 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais – COLAOB, Foz do Iguaçu – PR.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **ABC do Câncer 2º ed.**, Rio de Janeiro, 2012
INSTITUTO NACIONAL DO CANCER – INCA, **Quimioterapia**, Rio de Janeiro, 1993.

NAKAMOTO, K.; *Infrared and Raman Spectra of Inorg. and Coord. Comp*; 4th Edition, John Wiley & Sons, Inc., USA, **1986**.

NASCIUTTI P. R. *Desenvolvimento de Novos Fármacos*. 2012. 33f. Seminário do Mestrado – Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Administração da OMS. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 06.06.2018.

RACHID, Z. et al; Synthesis of pyrimidinopyridine–triazene conjugates targeted to abl tyrosine kinase, **Bioorg. & Med. Chem. Lett.**; 13, 3297-3300, 2003.

SHEALY, Y.F.; KRAUTH, C. A.; MONTGOMERY, J.A.; Imidazoles. I. Coupling Reactions of 5-Diazoimidazole-4-carboxamide; **J. Org. Chem.**; vol 27: 2150-2154, 1962.

SHEALY, F Y; KRAUTH, C. A. Imidazoles. II. 5(or-4)-(monosubstituted triazeno)imidazole-4(or-5)-carboxamides. **Journal Medicinal Chemistry**. v. 9, p. 34-38, 1966.

SILVERSTEIN, R.M; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C.; *Ident. Espect. de Comp. Organ.*; 5ªEd.; Edt LTC, São Paulo-SP; **1991**.

SIMPLICIO F. I., MAIONCHI F., HIOKA N., Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicaentos, **Quim. Nova**, Vol. 25, No. 5, 801-807, 2002.

SOLOMONS, T. W. Graham; FRYHLE, Craig. **Química Orgânica**. v. 2. São Paulo: LTC, 2006.

TIZOTTI, M.K; SERAFIN, M.B.; WERGUTZ, J.; BOTTEGA, A.; HÖRNER M.; HÖRNER, R.; Atividade citotóxica *in vitro* de três complexos triazenidos de cobre(II) frente a linhagem tumoral B16F10, Anais do VII Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão – Universidade Federal do Pampa, Alegrete, 2016.

ÜNSALAN, S. et al. Synthesis and characterization of triazenes derived from sulfonamides. **Marmara Pharmaceutical Journal**. N.15, p. 11-17, 2011.

VERNIN, G.;SIV,C.;METEZGER,J.; *Synthesis*; 691, **1977**.

ZHOU, Y. et al. Structure-Guided Discovery of Novel Aminoglycoside Mimetics as Antibacterial Translation Inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 12, p. 4942–4949, 2005

ZHOU, Y. et al. Structure-activity relationships of novel antibacterial translation inhibitors; 3,5-Diamino-piperidinyl triazines. **Bioorg. Med. Chem. Lett**. v. 16, p. 5451-5456, 2006.

ZHOU, Y. et al. Synthesis and SAR of 3,5-diamino-piperidine derivatives: Novel antibacterial translation inhibitors as aminoglycoside mimetics. **Bioorg Med Chem Lett**. v. 17, n. 5, p. 1206–1210, 2007.