



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Preparação e Estudo por *STD-NMR* de Sais Quaternários de Amónio

Sérgio Barata Garcia

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof.º Doutor Renato Boto
Co-orientador: Prof.ª Doutora Carla Cruz

Covilhã, outubro de 2014

Agradecimento

“O tempo é o presente mais precioso que temos porque é limitado. Podemos ganhar mais dinheiro, mas não podemos ganhar mais tempo. Quando dedicamos tempo a uma pessoa, estamos a oferecer uma porção da nossa vida que nunca mais iremos recuperar. O nosso tempo é a nossa vida. O melhor que podemos oferecer a alguém é o nosso tempo.”

Adaptado de “*Os 3 últimos desejos de Alexandre, o Grande*”

Um grande e sincero obrigado a todos aqueles
que de alguma forma partilharam
um pouco da sua vida comigo.

Resumo

Os sais quaternários de amónio são compostos cuja fórmula geral é $R_4N^+X^-$, onde R pode ser um grupo alquilo, arilo ou arilalquilo em que X representa qualquer anião. Contrariamente aos catiões de amónio primários, secundários e terciários, os catiões de amónio quaternários encontram-se permanentemente carregados, independentemente do pH das suas soluções. Os sais quaternários de amónio são assim obtidos por alquilação de uma amina terciária.

Apesar de todos os sais sintetizados neste trabalho serem sais quaternários de amónio, essa designação será apenas usada para os compostos com um único anel heterocíclico. Os sais de vinilnilina e acetanilidina serão designados como sais intermediários e os outros compostos que apresentam um sistema linear de conjugação - π de três átomos de carbono e dois anéis heterocíclicos contendo dois átomos de azoto nas suas extremidades serão designados como carbocianinas.

Os sais quaternários de amónio são os precursores das carbocianinas, isto é, a ligação de dois sais quaternários de amónio por uma cadeia de ligações duplas conjugadas com três átomos de carbono formam uma carbocianina.

Este trabalho consistiu na síntese de doze sais quaternários de amónio, quatro sais intermediários e duas carbocianinas, utilizando métodos de síntese já descritos na literatura. O conjunto dos compostos sintetizados apresenta características estruturais únicas, podendo assim estabelecer diferentes interações com proteínas padrão. Todos os compostos obtidos foram caracterizados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (de 1H e de ^{13}C) e por espectroscopia de infravermelho.

O mecanismo de interação estabelecido entre cinco dos sais quaternários de amónio sintetizados e duas proteínas padrão (Lisozima e Ribonuclease (RNase)) foi avaliado pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação (RMN-STD). Os resultados obtidos demonstraram a existência de interações específicas das proteínas padrão com todos os sais quaternários de amónio estudados. Os melhores resultados obtidos foram para os sais quaternários de amónio, derivados da quinolina, que apresentaram excelentes percentagens de interação em diversos locais da sua estrutura. Demonstrou-se também que o principal local de interação sal-proteína não é o mesmo para todos os sais quaternários de amónio, muito possivelmente consequência das suas diferentes características estruturais.

Palavras-chave

Sais quaternários de amónio; Carbocianinas; Ressonância magnética nuclear - Diferença de transferência de saturação (RMN-STD); Interações moleculares.

Abstract

Quaternary ammonium salts are compounds whose general formula is $R_4N^+X^-$, where R can be an alkyl, aryl or arylalkyl and X represents any anion. Contrary to primary, secondary and tertiary ammonium cations, the quaternary ones are permanently charged regardless the pH of their solutions. Quaternary ammonium salts are thus obtained by alkylation of the tertiary amine. Despite all the synthesized salts in this work are quaternary ammonium salts, this designation will only be used for compounds with a single heterocyclic ring. The vinyl aniline and acetanilide salts will be designated as intermediary salts. Compounds having a linear system of π -conjugation with three carbon atoms and two heterocyclic rings containing two nitrogen atoms on their ends will be designated as carbocyanines

The quaternary ammonium salts are the precursors of carbocyanines, i.e., the connection of two quaternary ammonium salts by a chain of conjugated double bonds with an odd number of carbon atoms forms a carbocyanine. In this way, carbocyanines are organic compounds containing chains formed by methine groups at the extremities of the heterocyclic compound can be found substituents able to donating or receiving electrons.

This dissertation presents the synthesis of twelve quaternary ammonium salts, four intermediary salts and two carbocyanines, all the synthesis methods have already been described in the literature. All the synthesized compounds present unique structural characteristics, allowing different interactions with standard proteins. All the products were fully characterized by NMR spectroscopy (1H e ^{13}C) and infra-red spectroscopy.

The mechanism of interaction established between five quaternary ammonium salts synthesized and two standard proteins (lysozyme and RNase) were evaluated by *Saturation Transfer Difference (STD) - NMR*. The obtained results showed the existence of specific interaction between the standard proteins and all the quaternary ammonium salts studied. The best results were obtained for the quaternary ammonium salts, quinoline derivatives, which showed excellent rates of interactions in several places of its structure. It was also demonstrated that the main site of salt-protein interaction would not be the same for all the quaternary ammonium salts, quite possibly a result of their differing structural features.

Keywords

Quaternary ammonium salts; Carbocyanines; Saturation Transfer Difference - NMR; Molecular interactions.

Índice

Resumo	v
Abstract	vii
Índice	ix
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Esquemas	xvii
Lista de Acrónimos	xx
Objetivos	xxiii

Capítulo I. Introdução

1.1 Sais quaternários de amônio	2
1.1.1 Aspectos gerais e síntese	2
1.1.2 Como precursores de cianinas	4
1.2 Cianinas	5
1.2.1 Aspectos gerais e nomenclatura	5
1.2.2 Métodos de síntese	7
1.2.3.1 Método do tioalquilo	7
1.2.3.2 Método do orto éster	8
1.2.3.3 Método geral de síntese de cianinas assimétricas	8
1.2.4 Aplicação e características das cianinas	9
1.2.4.1 Aplicações gerais e características	9
1.2.4.2 Cianinas em cromatografia de afinidade	9
1.2.4.3 Sais quaternários de amônio como potenciais ligandos de afinidade de proteínas	10
1.3 Ressonância magnética nuclear	10
1.3.1 Ressonância magnética nuclear - Diferença de transferência de saturação (RMN-STD)	11

Capítulo II. Parte Experimental

2.1 Materiais, solventes e reagentes	13
2.2 Equipamentos	13
2.3 Síntese de sais quaternários de amônio e carbocianinas	14
2.3.1 Síntese de sais quaternários de amônio por refluxo em acetonitrilo	14
2.3.2 Síntese de sais quaternários de amônio por fusão	17
2.3.3 Síntese de sais intermediários com cadeias alquílicas	19
2.3.4 Síntese de sais intermediários com cadeias carboxi-alquílicas	20

2.3.5 Síntese de carbocianinas simétricas	22
2.4 Espectroscopia de STD - NMR	23
2.4.1 Preparação das amostras	23
2.4.2 Método	23
Capítulo III. Resultados e Discussão	
3.1 Preâmbulo	25
3.2 Síntese dos sais quaternários de amônio e carbocianinas	25
3.2.1 Síntese de sais quaternários de amônio por refluxo em acetonitrilo	25
3.2.2 Síntese de sais quaternários de amônio por fusão	37
3.2.3 Síntese de sais intermediários com cadeias alquílicas	46
3.2.4 Síntese de sais intermediários com cadeias carboxi-alquílicas	49
3.2.5 Síntese de carbocianinas simétricas	54
3.3 RMN-STD	58
3.3.1 Espectro RMN-STD do brometo de 1-(10-carboxidecil)-4-metilquinolin-1- io (1)	59
3.3.2 Espectro RMN-STD do iodeto de 1-etil-2-metilquinolin-1-io (2)	61
3.3.2 Espectro RMN-STD do iodeto de 1-etil-4-metilquinolin-1-io (3)	63
3.3.3 Espectro RMN-STD do iodeto de 3-etil-2-metilnafto[2,1- d][1,3]tiazol-3-io (6)	65
3.3.3 Espectro RMN-STD do 6-acetamida-3-etil-2-metil-benzo[d]tiazol-3-io (7)	67
Conclusões	69
Perspetivas Futuras	72
Bibliografia	74

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura geral dos sais quaternários de amónio.	2
Figura 2. Bases heterocíclicas precursoras de sais quaternários de amónio.	5
Figura 3. Estrutura geral das cianinas.	6
Figura 4. Espectros RMN-STD do sal quaternário de amónio (1) com as proteínas.	61
Figura 5. Espectros RMN-STD do sal quaternário de amónio (2) com as proteínas.	63
Figura 6. Espectros RMN-STD do sal quaternário de amónio (3) com as proteínas.	65
Figura 7. Espectros RMN-STD do sal quaternário de amónio (4) com as proteínas.	67
Figura 8. Espectros RMN-STD do sal quaternário de amónio (5) com as proteínas.	69

Lista de Tabelas

Tabela 1. Caracterização física e espectroscópica do brometo de 1-(10-carboxidecil)-4-metilquinolin-1- <i>io</i> (1).	28
Tabela 2. Caracterização física e espectroscópica do iodeto de 1-etil-2-metilquinolin-1- <i>io</i> (2).	29
Tabela 3. Caracterização física e espectroscópica do iodeto de 1-etil-4-metilquinolin-1- <i>io</i> (3).	31
Tabela 4. Caracterização física e espectroscópica do iodeto de 1-etil-2,3,3-trimetil-3H-indol-1- <i>io</i> (4).	32
Tabela 5. Caracterização física e espectroscópica do iodeto de 1-etil-2,3,3-trimetil-3H-indol-1- <i>io</i> (5).	34
Tabela 6. Caracterização física e espectroscópica do iodeto de 3-etil-2-metilnafto[2,1- <i>d</i>][1,3]tiazol-3- <i>io</i> (6).	36
Tabela 7. Caracterização física e espectroscópica do iodeto de 6-acetamido-3-etil-2-metil-benzo[<i>d</i>]tiazol-3- <i>io</i> (7).	37
Tabela 8. Caracterização física e espectroscópica do brometo de 1-(carboximetil)-4-metilquinolin-1- <i>io</i> (8).	39
Tabela 9. Caracterização física e espectroscópica do 4-metilbenzenossulfonato de 6-acetamida-1-etil-2-metilbenzo[<i>d</i>]tiazol-3- <i>io</i> (9).	41
Tabela 10. Caracterização física e espectroscópica do 4-metil-1-(2-sulfoetil)quinolin-1- <i>io</i> (10).	43
Tabela 11. Caracterização física e espectroscópica do 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)indol-1- <i>io</i> (11).	44
Tabela 12. Caracterização física e espectroscópica do 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)-3H-indol-1- <i>io</i> (12).	46

Tabela 13. Caracterização física e espectroscópica do iodeto (<i>E</i>)-1-etil-2-(2-(<i>N</i> -fenilacetamida)vinil)quinolin-1- <i>io</i> (13).	48
Tabela 14. Caracterização física e espectroscópica do iodeto de (<i>Z</i>)-1-etil-4-(2-(<i>N</i> -fenilacetamida)vinil)quinolin-1- <i>io</i> (14).	50
Tabela 15. Caracterização física e espectroscópica do brometo de (<i>Z</i>)-1-(10-carboximetil)-4-(2-(fenilamina)vinil)quinolin-1- <i>io</i> (15).	52
Tabela 16. Caracterização física e espectroscópica brometo de (<i>Z</i>)-1-(10-carboxidecil)-4-(2-(fenilamina)vinil)quinolin-1- <i>io</i> (16).	53
Tabela 17. Caracterização física e espectroscópica do brometo de (<i>E</i>)-3-(10-carboxidecil)-2-(2-(fenilamina)vinil)benzo[<i>d</i>]tiazol-3- <i>io</i> (17).	55
Tabela 18. Caracterização física e espectroscópica do iodeto de 1-etil-2-((1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-3-(1-etilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilidene)prop-1-en-1-il)quinolin-1- <i>io</i> (18).	57
Tabela 19. Caracterização física e espectroscópica do brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-(3-(3-(10-carboxidecil)-3 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]tiazol-2-ilideno)prop-1-en-1-il)benzo[<i>d</i>]tiazol-3- <i>io</i> (19).	58

Lista de Esquemas

Esquema 1. Fórmula geral da reacção de Menschutkin para a formação de um sal quaternário de amónio.	2
Esquema 2. Alquilação exaustiva do amoníaco, amins primárias e secundárias por um agente alquilante na presença de uma base (orgânica ou inorgânica).	3
Esquema 3. Reacção de decomposição de um sal quaternário de amónio.	4
Esquema 4. Síntese de uma cianina pelo método do tioalquilo.	7
Esquema 5. Síntese de uma carbocianina pelo método do orto éster.	8
Esquema 6. Síntese geral de carbocianinas assimétricas.	8
Esquema 7. Síntese do brometo de 1-(10-carboxidecil)-4-metilquinolin-1-io (1).	27
Esquema 8. Síntese do iodeto de 1-etil-2-metilquinolin-1-io (2) por alquilação com iodoetano.	29
Esquema 9. Síntese do iodeto de 1-etil-4-metilquinolin-1-io (3).	30
Esquema 10. Síntese do iodeto de 1-etil-2,3,3-trimetil-3H-indol-1-io (4).	32
Esquema 11. Síntese do iodeto de 3-etil-1,1,2-trimetil-1H-benzo[e]indol-3-io (5).	33
Esquema 12. Síntese do iodeto de 3-etil-2-metilnafto[2,1-d][1,3]tiazol-3-io (6).	35
Esquema 13. Síntese do iodeto de 6-acetamida-3-etil-2-metil-benzo[d]tiazol-3-io (7).	37
Esquema 14. Síntese do brometo de 1-(carboximetil)-4-metilquinolin-1-io (8).	39
Esquema 15. Síntese do 4-metilbenzenosulfonato de 5-acetamida-1-etil-2-metilbenzo[d]tiazol-1-io (9).	40

Esquema 16. Síntese do 4-metil-1-(2-sulfoetil)quinolin-1-io (10).	42
Esquema 17. Síntese do do 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)indol-1-io (11).	44
Esquema 18. Síntese do 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)-3H-indol-1-io (12).	45
Esquema 19. Síntese do iodeto de (<i>E</i>)-1-etil-2-(2-(<i>N</i> -fenilacetamida)vinil)quinolin-1-io (13).	48
Esquema 20. Síntese do iodeto de (<i>Z</i>)-1-etil-4-(2-(<i>N</i> -fenilacetamida)vinil)quinolin-1-io (14).	49
Esquema 21. Síntese do brometo de (<i>Z</i>)-1-(10-carboximetil)-4-(2 (fenilamina)vinil)quinolin-1-io (15).	51
Esquema 22. Síntese do brometo de (<i>Z</i>)-1-(10-carboxidecil)-4-(2-(fenilamina)vinil)quinolin-1-io (16).	53
Esquema 23. Síntese do brometo de (<i>Z</i>)-1-(10-carboxidecil)-4-(2-(fenilamina)vinil)quinolin-1-io (17).	54
Esquema 24. Síntese do iodeto de 1-etil-2-((<i>1E,3E</i>)-3-(1-etilquinolin-2(1H)-ilidene)prop-1-en-1-il)quinolin-1-io (18).	56
Esquema 25. Síntese do brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-(3-(3-(10-carboxidecil)-3H-benzo[<i>d</i>]tiazol-2-ilideno)prop-1-en-1-il)benzo[<i>d</i>]tiazol-3-io (19).	58
Esquema 26. Esquema da técnica RMN-STD.	60

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATR	Attenuated Total Reflectance (Refletância Total Atenuada)
c.c.f	Cromatografia em camada fina
CD	Compact Disc (Disco compacto)
CDCL ₃	Clorofórmio deuterado
c.d.o	Comprimento de onda
COSY	Correlation Spectroscopy (Espectroscopia de correlação)
d	Dupleto em RMN de ¹ H
dec.	Decomposição do sal quaternário de amónio
DEPT90	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer where pulse with ϕ_3 has flip angle of 90°
DEPT135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer where pulse with ϕ_3 has flip angle of 135°
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DVD	Digital Versatile Disc (Disco Digital Versátil)
EUA	Estados Unidos da América
h	Horas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
IV	Infravermelho
m	Multipeto em RMN de ¹ H
mbs	4-metilbenzenossulfonato
MHz	Mega-Hertz
pH	Potencial de Hidrogénio
p.f.	Ponto de fusão
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de protão
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN-STD	Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de transferência de saturação
RNase	Ribonuclease
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrónica
s	Singleto em RMN de ¹ H
t	Tripleto em RMN de ¹ H
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TSP	Trimetilsilil propionato

UV/Vis	Ultravioleta/Visível
δ	Desvio químico em relação ao TMS (ppm)
J	Constante de acoplamento (Hz)
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda do máximo de absorção (cm^{-1})
ν_{max}	Frequência do máximo de absorção de uma banda (cm^{-1})
$\eta \%$	Rendimento em porcentagem

Objetivos

O principal objectivo deste trabalho foi a síntese de um conjunto de sais quaternários de amónio, sais intermediários e carbocianinas, para sua posterior avaliação das interacções moleculares com proteínas padrão por *RMN - STD*. Os sais quaternários avaliados por esta técnica foram escolhidos com base nas suas diferentes propriedades estruturais, as quais podem potenciar diferentes interacções com proteínas.

Este estudo permite ainda avaliar a potencialidade destes compostos, como ligandos em cromatografia de afinidade, na purificação de proteínas.

CAPÍTULO I.

INTRODUÇÃO

1.1 Sais quaternários de amónio

1.1.1 Aspectos gerais e síntese

Os sais quaternários de amónio são compostos em que o átomo de azoto se encontra tetra substituído. A fórmula geral destes compostos quaternários de amónio é $R_4N^+X^-$, onde (R) podem ser grupos alquilo, arilo ou arilalquilo, iguais ou diferentes, podendo, ou não, estar ligados entre si. Onde o X representa qualquer anião (Cl^- , Br^- , I^- , etc...), tal como representado na figura 1.

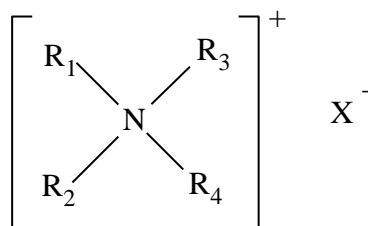
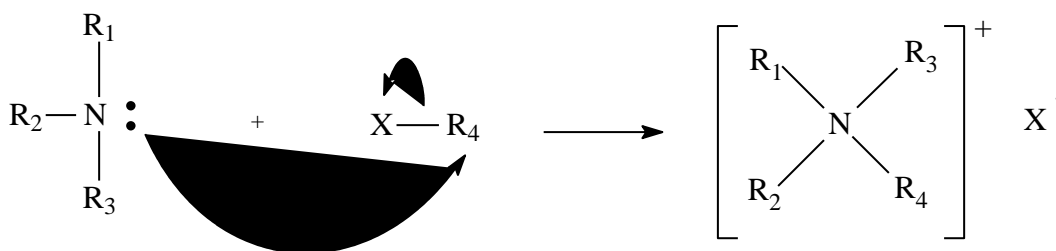


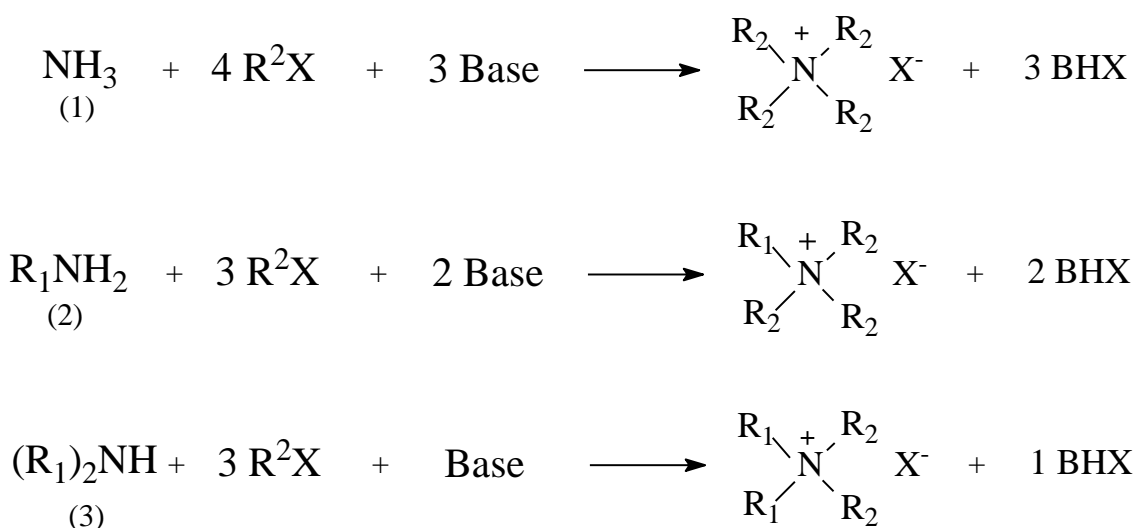
Figura 1 - Estrutura geral dos sais quaternários de amónio

Os sais quaternários de amónio são geralmente obtidos pela reacção de Menshutkin (Sasson and Neumann, 1997), onde o nucleófilo da amina terciária substitui um grupo de saída num composto alifático ou por uma reacção de substituição nucleofílica (Esquema 1). Os agentes mais reactivos na reacção de Menshutkin são os iodetos e brometos.



Esquema 1 - Fórmula geral da reacção de Menshutkin para a formação de um sal quaternário de amónio

A alquilação exhaustiva é uma abordagem ligeiramente diferente, onde o amoníaco (1) ou aminas primárias (2) ou secundárias (3) reagem com quatro, três ou dois equivalentes, respectivamente, de um agente alquilante na presença de uma base inorgânica ou orgânica (Esquema 2) (Vollhardt and Schore, 2003).



Esquema 2 - Alquilação exaustiva do amoníaco, aminas primárias e secundárias por um agente alquilante na presença de uma base (orgânica ou inorgânica)

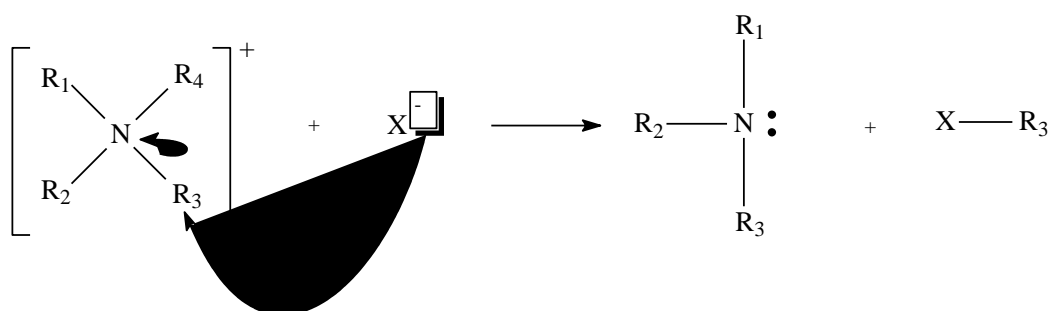
Os agentes alquilantes mais reactivos são os grupos alquílicos fluorossilfonatos, tosilatos ou iodetos, mas por motivos práticos os brometos são os mais populares. Solventes polares são usualmente recomendados e o acetonitrilo é o mais usado (Johnson et al., 1970).

Tradicionalmente a síntese orgânica, como a síntese de sais quaternários de amónio, é realizada pelo aquecimento da mistura reacional através de uma fonte externa de aquecimento. Este método é aplicado nas duas vias de síntese mais utilizadas. A via da fusão, que recorre à fusão *in situ* de uma base heterocíclica com um reagente alquilante. Na outra via procede-se ao refluxo da base heterocíclica com o reagente alquilante na presença de um solvente polar (Kappe et al, 2009).

Nos últimos anos, surgiram novas abordagens à síntese destes sais, nomeadamente o uso de micro-ondas, transformando-se assim numa alternativa aos processos de síntese que pelos métodos mais tradicionais não resultavam (De la Hoz et al., 2005). Esta nova técnica utiliza como base a combinação de efeitos térmicos, resultantes da taxa de aquecimento, superaquecimento ou “Hot Spots” e a absorção seletiva da radiação, pelas substâncias polares para o processo de síntese orgânica (Lidström et al., 2001). Esta nova abordagem apresenta grandes vantagens, como por exemplo, elevadas velocidades o que leva à diminuição do tempo reacional, melhores rendimentos, produtos de elevada pureza aliada ao facto da reação se poder desenvolver na ausência de solvente (Winstead et al., 2008).

Os sais quaternários de amónio são geralmente estáveis em condições neutras ou ácidas até temperaturas de 150 °C, mas a sua decomposição pode ocorrer se o ião quaternário de

amónio actuar com agente alquilante na presença de aniões (Esquema 3) (Jones, 2001). Em condições básicas, os sais quaternários de amónio são ainda mais susceptíveis à decomposição, mas mais estáveis que os correspondentes sais quaternários de fosfónio (Landini et al., 1986). Os catiões dos sais quaternários de amónio encontram-se permanentemente carregados, independentemente do pH das suas soluções.



Esquema 3 - Reação de decomposição de um sal quaternário de amónio

A maioria destes sais são sólidos cristalinos à temperatura ambiente e estáveis nos seus pontos de fusão. Estes sais apresentam, geralmente, elevada solubilidade numa grande variedade de solventes orgânicos polares, sendo geralmente estáveis.

1.1.2 Como precursores de cianinas

Os sais quaternários de amónio são os precursores das cianinas, isto é, a ligação de dois sais quaternários de amónio por uma cadeia de ligações duplas conjugadas com um número ímpar de átomos de carbono formam uma cianina. A cianina formada pode apresentar uma estrutura simétrica ou assimétrica consoante os aneis heterocíclicos do composto heterocíclico ou grupos substituintes ligados aos átomos de azoto sejam idênticos ou diferentes.

Os sais quaternários de amónio apresentam uma grande variedade de bases heterocíclicas precursoras, tais como o (a) benzoxazole, (b) benzotiazole, (c) benzosselenazole, (d) benzimidazole, (e) quinolina, (f) 3-H-indole, (g) naftoxazole, (h) naftotiazole (Strekowski, 2008) (Figura 2).

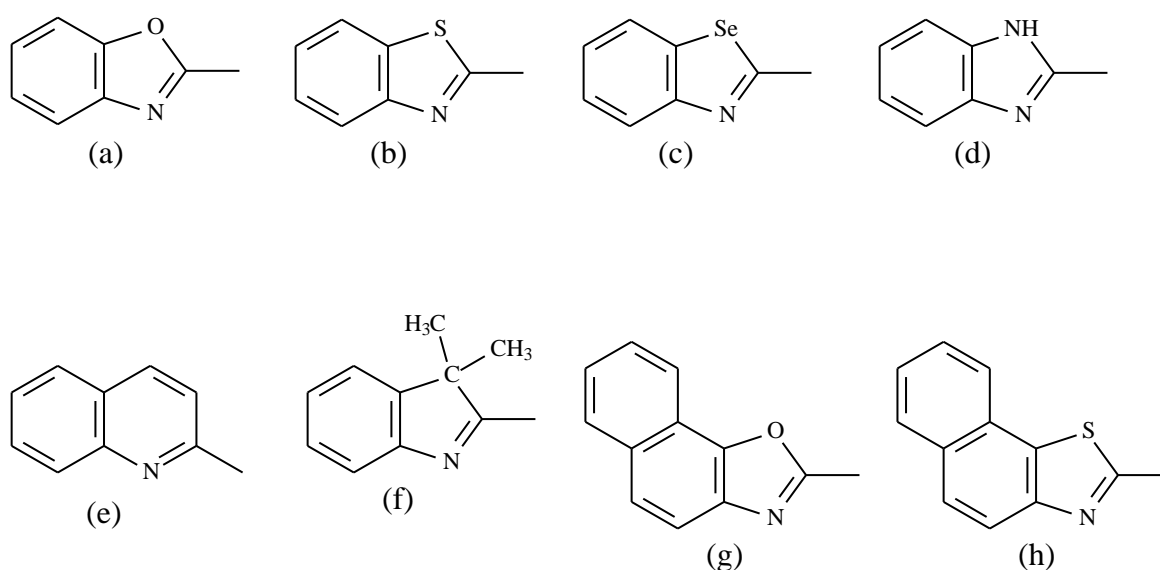


Figura 2 - Bases heterocíclicas precursoras de sais quaternários de amônio

1.2 Cianinas

1.2.1 Aspectos gerais e Nomenclatura

Desde o início da civilização, que o homem começou a tentar reproduzir as cores da natureza. Para isso, desenvolveu métodos para isolar os corantes e pigmentos de fontes naturais, principalmente as de origem animal ou vegetal. No entanto, com a crescente procura ao longo dos tempos, as propriedades de muitas destas substâncias estavam longe de serem ideais para as aplicações pretendidas, problema que se somava à sua indisponibilidade comercial e à dificuldade em se reproduzirem as cores. Tal conjunto de problemas potenciou a tentativa de produzir corantes sintéticos com propriedades tecnicamente superiores, de baixo custo e rápida obtenção. Somente em 1856, o químico britânico William Henry Perkin descobriu, acidentalmente, uma via sintética para a produção de um corante orgânico, a Mauveína. A partir dessa descoberta, em poucos anos, os corantes sintéticos substituíram grande parte dos antigos corantes naturais (Christie, 2001).

Atualmente, quase todos os corantes disponíveis são substâncias orgânicas sintéticas, com a exceção de alguns pigmentos inorgânicos importantes. Todos os anos centenas de novos compostos corados são descritos na literatura, para uma multiplicidade de aplicações. Existem numerosas estruturas químicas de corantes, sendo a sua classificação detalhada feita no Color Index, publicação que divide os corantes em 25 classes estruturais (AATCC, 1999).

As cores dos corantes são devidas à absorção de radiação electromagnética pelos compostos na faixa da luz visível (400-700 nm). A formação da cor deriva da deslocalização de electrões através de sistemas de ligações duplas conjugadas. Isto implica que as moléculas do corante sejam insaturadas, sendo na sua maioria conjuntos com anéis aromáticos ligados entre si por grupos designados por cromóforos, que fornecem a conjugação necessária ao aparecimento da cor (Broadbent, 2001).

As cianinas constituem uma classe da família dos corantes polimetínicos, cuja estrutura geral se apresenta na Figura 3 (Hamer, 1964). Estes compostos podem ser obtidos por métodos de síntese simples, e numa larga variedade estrutural podendo exibir uma ampla diversidade de cores dependendo do meio em que se encontram. São compostos que apresentam bandas de absorção estreitas com coeficientes de extinção molar no visível ($\approx 1350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Mustroph, et al., 2009). Contudo, estes corantes em solução perdem a sua cor sob acção da luz (fotólise) ou em meio ácido. Como grupo, as cianinas absorvem numa larga zona espectral compreendida entre o ultravioleta e o infravermelho próximo (Fabian, et al., 1992). A intensa cor deste tipo de compostos está associada à interacção de ressonância entre os átomos de azoto nos dois extremos da cadeia conjugada, envolvendo a deslocalização da carga positiva (Weissberger, 1964).

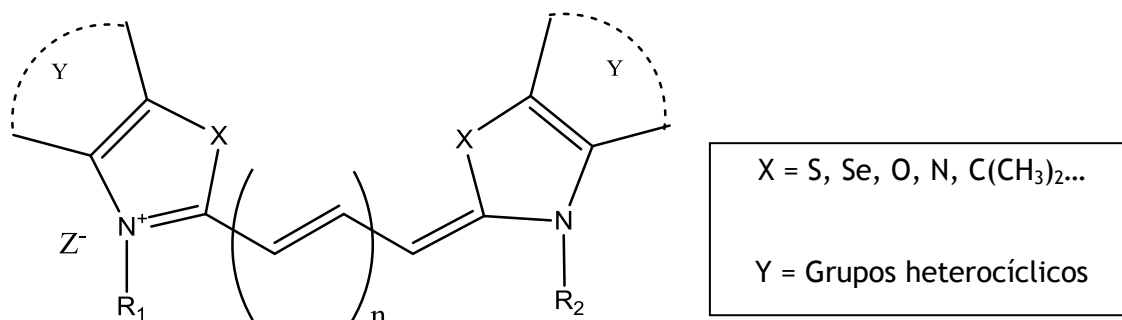


Figura 3 - Estrutura geral das cianinas.

Os corantes cianínicos apresentam um cromóforo que inclui um sistema linear de conjugação- π com número ímpar de átomos de carbono e dois anéis heterocíclicos contendo dois átomos de azoto nas suas extremidades. Um dos anéis heterocíclicos funciona como dador e outro como aceitador de electrões. Geralmente estes corantes apresentam geometria trans na sua forma mais estável e ocasionalmente podem sofrer fotoisomerização (Mishra, et al., 2000).

As cianinas classificam-se com base no comprimento da cadeia cromófora, o qual está relacionado com o número de grupos metino (-CH=) entre os anéis heterocíclicos terminais. Denomina-se cianina, aquela que tem um único grupo metino entre os anéis heterocíclicos

($n=0$) e carbocianina a que apresenta três grupos metino em posição idêntica ($n=1$). Dicarbocianina e tricarbocianina são cianinas que contêm cinco ($n=2$) e sete ($n=3$) grupos metino, respectivamente, entre os anéis heterocíclicos terminais (Strekowsk, 2008). O limite do comprimento da cadeia é controlado pelas possibilidades sintéticas e pela estabilidade química dos corantes sintetizados, que normalmente diminui à medida que se aumenta o comprimento da cadeia (Strekowsk, 2008). O R_1 e o R_2 podem ser cadeias alquílicas ou cadeias alquílicas substituídas, podendo ser iguais ou diferentes.

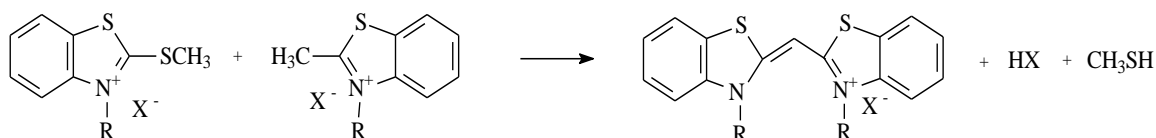
Os grupos de anéis heterocíclicos terminais, são designados pelos prefixos identificadores de cada núcleo (figura 2). É normal indicar a posição e o tipo de substituinte ligado ao heteroátomo e os substituintes da cadeia cromófora, caso existam, antes do nome do heterocíclico. A posição da substituição é indicada numerando cada núcleo separadamente, sendo que o segundo núcleo distingue-se do primeiro através de um apóstrofo.

1.2.2. Métodos de Síntese

De uma maneira geral, a síntese de cianinas envolve várias etapas, que são simples sequências de adições de reagentes nucleofílicos e electrofílicos, precedidas ou seguidas por desprotonações e remoções de grupos de saída.

1.2.3.1. Método do tioalquilo

Um dos principais métodos de síntese de metinocianinas é o método do tioalquilo (Venkataraman, 1952). Este método baseia-se na condensação de dois sais heterocíclicos quaternários. Para tal, aquece-se conjuntamente uma base heterocíclica contendo um grupo tioalquilo com outra base contendo um grupo metilo reactivo e dois equivalentes de um *p*-toluenosulfonato de alquilo. Os dois sais formados conjuntamente e não processados são refluxados numa solução de acetato de sódio em álcool, na presença de uma base orgânica forte ou refluxado simplesmente em piridina (que actua como base e solvente). O Esquema 4 mostra um exemplo da síntese.

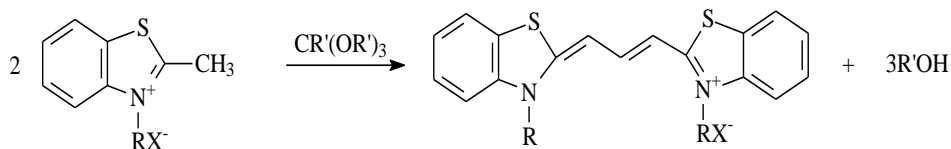


Esquema 4 – Síntese de uma cianina pelo método do tioalquilo

Este método tem como principais vantagens poder ser aplicado tanto na síntese de cianinas simétricas como assimétricas, com óptimos rendimentos. O principal inconveniente reside no cheiro a tióis que liberta.

1.2.3.2. Método do orto éster

Para a síntese de carbocianinas simétricas, o método mais usado é o método do orto éster (Matsuoka, 1990). Este método baseia-se no refluxo de dois equivalentes de um sal quaternário, contendo um grupo metilo reactivo, com um ortoéster que actua como agente electrofílico, em piridina ou em álcool e trietilamina (Esquema 5).

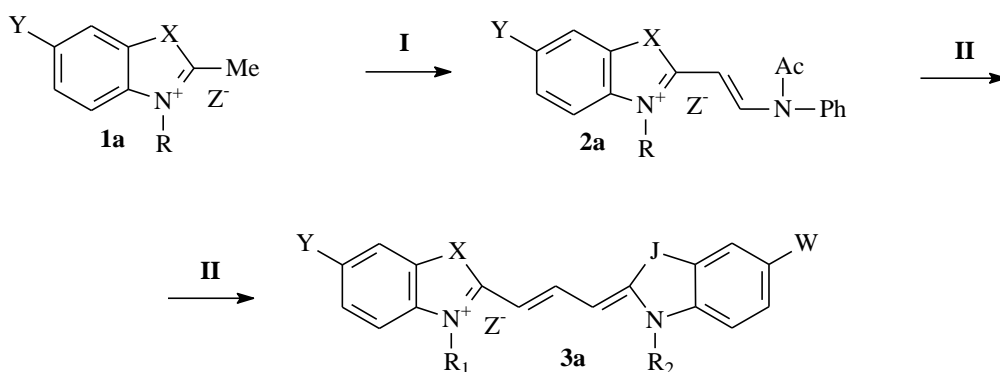


Esquema 5 – Síntese de uma carbocianina pelo método do orto éster

Os métodos de síntese de carbocianinas assimétricas e do restante tipo de cianinas baseiam-se, essencialmente, em variações dos métodos acima referidos.

1.2.3.3. Método geral de síntese de cianinas assimétricas

A reacção do sal quaternário de amónio (1a) com *N,N'*-difetilformamidina e anidrido acético (passo I) vai dar origem ao derivado (2a). A carbocianina assimétrica (3a) é obtida no passo II, que consiste na reacção entre o derivado (2a) com um outro sal quaternário de amónio na presença de trietilortoformiato em piridina (refluxo) (Esquema 6).



X e J = S, Se, O, N, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$...

Y e W = (N_2O , SO_3 ...)

Z = Cl^- , Br^- , I^- ...

R_1 e R_2 = Cadeias alquílicas ou alquílicas substituídas

Esquema 6 - Síntese geral de carbocianinas assimétricas.

1.2.4 Aplicação e características das cianinas

1.2.4.1 Aplicações gerais e características

Devido à sua cor, chegou-se a pensar que a principal aplicação das cianinas seria a indústria têxtil. Contudo, devido à sua instabilidade fotoquímica, estes corantes não tiveram grande sucesso nesta indústria, tendo desempenhado um papel muito importante na indústria fotográfica como sensibilizadores fotográficos.

Nos últimos anos, tem havido uma procura de novas utilizações para este tipo de corantes. Devido às suas propriedades químicas, como a sua estabilidade, elevados coeficientes de extinção molar no visível, elevada intensidade de fluorescência, começaram a ser utilizados em várias áreas, tais como corantes laser no infravermelho próximo (Ebert et al., 2011), marcadores fluorescentes para proteínas (Park et al., 2012), marcadores fluorescentes para sequenciamento de ADN (Agbavwe and Somoza, 2011), marcadores fluorescentes para imunoensaios (Guirgis et al., 2012), marcadores fluorescentes para citometria de fluxo (Franzini and Kool, 2011), no fabrico de alguns meios de gravação óptica (CD, DVD, etc.) (Borisenko et al., 2003), em terapia fotodinâmica (Henderson and Gollnick, 2003) e mais recentemente começou-se a estudar a sua utilização como ligandos bioespecíficos em cromatografia de afinidade (Pardal et al., 2002; Boto *et al.*, 2008, 2009).

1.2.4.2 Cianinas em cromatografia de afinidade

Nos últimos anos, e devido as suas características, as cianinas começaram a ser estudadas como ligandos em cromatografia de afinidade. A sua utilização está relacionada com o facto das cianinas uma vez ligadas a um suporte cromatográfico, poderem estabelecer interações específicas (hidrofóbicas, hidrofílicas, iónicas, etc.). Já foi demonstrada a interacção selectiva de afinidade entre os corantes cianínicos e diferentes proteínas, resultado de múltiplas interações electroestáticas, ligações de hidrogénio, hidrofóbicas, interações de van der Waals e π - π .

O sítio de ligação de uma proteína é um arranjo estereoquímico único de grupos iónicos, polares e hidrofóbicos na sua estrutura tridimensional, onde as cadeias polipeptídicas provavelmente exibem maior flexibilidade. As moléculas de corante, usadas como ligando, participam na interacção não covalente com a proteína para alcançar uma ligação forte e específica (Denizli and Piskin, 2001). Várias técnicas de espectrometria de UV/Vis, IV, RMN, Ressonância Paramagnética Eletrónica (RPE) e dicroísmo circular têm sido utilizados para explicar as interações cianina-proteína (Skotland, 1981; Federici et al., 1985). Estes estudos

vieram confirmar que tanto a estrutura da cianina como da biomolécula são importantes e que as interações podem resultar de uma combinação de vários tipos de forças eletrostáticas (Cruz et al., 2011).

A utilização de ligandos cianínicos (sintéticos) apresenta grandes vantagens, a facilidade de imobilização a uma variedade de matrizes através dos seus grupos funcionais, da resistência à degradação química e biológica o que possibilita o seu armazenamento e sua reutilização (Labrou, 2003).

1.2.4.3 Sais quaternários de amónio como potenciais ligandos de afinidade de proteínas

Os sais quaternários de amónio são os precursores de praticamente todas as cianinas. Como já foi referido, foi anteriormente demonstrado o potencial dos corantes cianínicos como ligandos de afinidade (Pardal et al., 2002; Boto *et al.*, 2008, 2009). Mais recentemente, demonstrado o potencial do sal quaternário brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzotiazol-3-*io* como ligando de afinidade para a separação e purificação de proteínas (Alves, 2014). No entanto, desconhece-se ainda totalmente a contribuição dos diferentes constituintes dos sais quaternário de amónio na ligação a proteínas.

1.3. Ressonância magnética nuclear

Existem vários métodos para a determinação e identificação da estrutura de compostos orgânicos, e a ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das principais e mais usada. Esta técnica baseia-se na energia absorvida na gama das radiofrequências pelos núcleos da amostra na presença de campo magnético forte, permitindo assim o estudo da estrutura molecular do composto (Macomber, 1998).

Uma das principais vantagens desta técnica é a utilização de uma pequena quantidade de amostra e de solvente. O solvente usado não pode possuir átomos que absorvam na frequência em estudo, alguns dos solventes mais utilizados são o dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) e o clorofórmio deuterado (CDCl_3).

No espectro de RMN a posição do pico de ressonância é descrito pelo desvio químico (δ em ppm). A posição do pico de ressonância no espectro de RMN é influenciada pela densidade electrónica a que o átomo está sujeito, isto é, a ressonância aparece a menor ou a maior

desvio químico dependendo, respectivamente, da sua maior ou menor densidade electrónica (Macomber, 1998).

Os espectros mais usados são os dos núcleos de ^1H e ^{13}C . Nos espectros de ^1H , através integração das ressonâncias obtidas é possível determinar o número de prótons a que corresponde o sinal. Os espectros de ^{13}C , não só permitem determinar o número total de carbonos presentes na amostra como também diferencia-los em carbonos quaternários, terciários, secundários ou primários.

Para uma caracterização mais pormenorizada da molécula recorre-se a espectros bidimensionais como o HMQC e o HMBC, que permitem identificar a correlação e a interação entre os sinais obtidos nos espectros de ^1H e ^{13}C .

1.3.1 Ressonância magnética nuclear - Diferença de transferência de saturação (RMN-STD)

O RMN-STD tem surgido como uma das técnicas mais populares no estudo das interações proteína-ligando por RMN. O sucesso desta técnica é consequência do seu rigor, de se centrar apenas nos sinais de RMN do ligando, sem qualquer necessidade de processar a informação RMN da proteína/receptor e ao facto de necessitar pequenas quantidades desta.

O RMN-STD baseia-se no facto de que, para uma ligação fraca, existe uma ressonância entre um ligando ligado e um ligando livre. Basicamente, uma experiência STD envolve subtrair um espectro em que a proteína foi selectivamente saturada (*on-ressonance* - espectro de ressonância obtida por irradiação numa região que contém apenas as ressonâncias do receptor/proteína), com o espectro da proteína sem saturação (*off-ressonance*). Obtendo-se o espectro da diferença ao subtrair o espectro *on-ressonance* ao espectro *off-ressonance* (Mayer and Meyer, 1999).

No espectro de diferença obteríamos assim apenas os sinais dos ligandos que receberam transferência da magnetização proveniente da saturação da proteína (chamado de efeito nuclear de Overhauser).

CAPÍTULO II.

PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais, solventes e reagentes

Todos os reagentes cuja síntese não se encontra descrita foram adquiridos à Sigma-Aldrich Company (St. Louis, Missouri, EUA) e eram analiticamente puros. Os solventes utilizados, sempre que necessário, foram secos sobre peneiros moleculares 4Å. A lisozima (*from chicken egg white, Biochemika 62970*) foi também adquirida à Sigma-Aldrich Company (St. Louis, Missouri, EUA) enquanto que a RNase (*from Bovine Pancreas, 27033002*) foi adquirida à USB Corp (Cleveland, Ohio, EUA). Todos os outros produtos químicos eram de grau analítico ou superior e foram utilizados como recebidos.

Todas as reações foram acompanhadas por cromatografia em camada fina (c.c.f.) utilizando placas de sílica Merck Kieselgel GF₂₅₄ com 0,2 mm de espessura. O eluente consistiu numa mistura de 10% de metanol em diclorometano. Após a eluição e secagem das placas, estas foram visualizadas à luz ultravioleta de comprimento de onda (c.d.o) de 254 nm e/ou 365 nm.

2.2 Equipamentos

Os pontos de fusão foram determinados em tubos capilares abertos, num aparelho medidor de ponto de fusão Büchi 530 e não foram corrigidos.

Os espectros de IV por refletância total atenuada (ATR) foram efetuados num espectrofotómetro Thermoscientific Nicolet iS10: smart iTR equipado com diamante. Para a aquisição dos dados de ATR, foi colocada uma amostra sobre o diamante e o espectro foi registado. No espectro de IV são indicadas a frequência do máximo de uma banda de absorção (ν_{\max} em cm^{-1}) e, caso se justifique, a atribuição dessa banda a um grupo de átomos relevante na molécula.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram efetuados num espetrómetro Bruker Avance III de 400 ou 600 MHz operando a 14.09 T (^1H a 400 ou 600 MHz e RMN de ^{13}C a 150.91 MHz) e processados com o software TOPSPIN 3.1 (Fitchburg, Wisconsin, EUA), utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e DMSO- d_6 como solvente à temperatura de 298 K. Na descrição de cada espectro os dados espectroscópicos são descritos da seguinte maneira: solvente; δ em ppm e apresentado relativamente ao sinal de TMS ou a sinais residuais dos solventes usados, o número de prótons a que corresponde o sinal, a multiplicidade do sinal [singleto (s), duplete (d), tripleto (t), multiplete (m)], o valor da constante de acoplamento, J , (Hz) e a atribuição do sinal aos prótons correspondentes. Nos dados de RMN de ^{13}C são apresentados o δ (ppm) igualmente apresentado relativamente ao

sinhal TMS ou a sinais residuais dos solventes usados e a atribuição do tipo de carbono na molécula.

2.3 Síntese de sais quaternários de amónio e carbocianinas

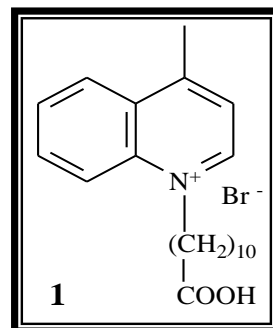
2.3.1 Síntese de sais quaternários de amónio por refluxo em acetonitrilo

Processo geral: Aquece-se em refluxo de acetonitrilo (10mL/ g. de sal) uma mistura de uma base heterocíclica com um agente alquilante durante um determinado período de tempo (em horas (h)), tendo as reacções sido acompanhadas por c.c.f.. Após arrefecimento da mistura reaccional até à temperatura ambiente, adiciona-se éter dietílico fazendo-se assim precipitar o sal quaternário de amónio sintetizado. A mistura é então filtrada sob pressão reduzida, o sólido obtido é então triturado num almofariz de porcelana. Lava-se novamente o pó assim obtido com éter dietílico e recolhe-se o sal por filtração sob pressão reduzida. Recristaliza-se de acetonitrilo seco.

Síntese do brometo de 1-(10-carboxidecil)-4-metilquinolin-1-íio (1)

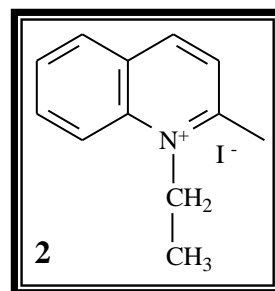
Uma mistura de 5,00 mL de lepidina (1,0 equivalente) e 11,7214 g de ácido 11-bromoundecanóico (1,1 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 48 h. Rendimento (η) : 67 %. P.f. 100.1 -102.5 °C; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1366 (-CH_{alq}); 1529, 1587 (C=C_{arom}); 1738 (C=O); 2919

(CH_{alq}); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.41 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, CH), 8.59 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, CH), 8.57 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, CH), 8.29 - 8.23 (1H, m, CH), 8.09 - 8.03 (2H, m, 2xCH), 5.00 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, NCH₂), 3.01 (3H, s, 4-CH₃), 1.39 - 1.20 (6H, m, (CH₂)₃), 1.14 (12H, s, (CH₂)₆). ¹³C NMR (150.91 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20.41 (CH₃), 24.54 (CH₂), 26.28 (CH₂), 28.52 (3xCH₂), 28.52 (CH₂), 28.66 (CH₂), 30.17 (CH₂), 34.00 (NCH₂COOH), 50.20 (NCH₂), 118.81 (CH), 123.89 (CH), 126.86 (CH), 129.49 (CH), 129.81 (CH), 135,22 (C), 137.03 (CH), 149.88 (C), 157.69 (C), 177.14 (C=O).

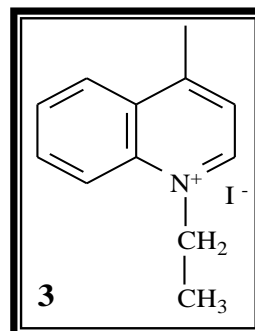


Síntese do iodeto de 1-etil-2-metilquinolin-1-íio (2)

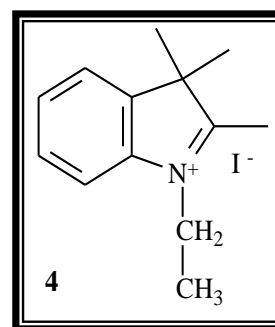
Uma mistura de 1,00 mL de quinaldina (1,0 equivalente) e 1,77 mL de iodoetano (3,0 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 144 h. η : 76 %. P.f. 228.3 - 232.3 °C; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1435 (-CH_{alq}); 1520 (C=C_{arom}); 2980 (CH_{alq}); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.11 (1H, d, J = 8.6 Hz, CH), 8.62 (1H, d, J = 9.0 Hz, CH), 8.42 (1H, d, J = 8.1 Hz, CH), 8.24 (1H, t, J = 8.8 Hz, CH), 8.13 (1H, d, J = 8.6 Hz, CH), 8.00 (1H, t, J = 7.4 Hz, CH), 5.01 (2H, q, J = 7.3 Hz, NCH₂), 3.12 (3H, s, 2-CH₃), 1.54 (3H, t, J = 7.3 Hz, NCH₂CH₃). ¹³C NMR (150.91 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 14.02 (NCH₂CH₃), 24.33 (CH₃), 49.13 (NCH₂), 118.65 (CH), 125.97 (CH), 128.85 (CH), 129.64 (CH), 131.01 (CH), 136.15 (CH), 138.80 (C), 146.03 (C), 159.82 (C).

**Síntese do iodeto de 1-etil-4-metilquinolin-1-íio (3)**

Uma mistura de 8,00 mL de lepidina (1,0 equivalente) e 13,8657 g de iodoetano (3,0 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 144 h. η : 79 %. P.f. 130.4 - 131.5 °C; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1418 (-CH_{alq}); 1525, 1595 (C=C_{arom}); 2980 (CH_{alq}); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.43 (1H, d, J = 8.3 Hz, CH), 8.61 (1H, d, J = 8.8 Hz, CH), 8.55 (1H, d, J = 8.0 Hz, CH), 8.28 (1H, t, J = 8.6 Hz, CH), 8.09 - 8.07 (2H, m, CH), 5.06 (2H, q, J = 6.3 Hz, NCH₂), 3.05 (3H, s, 4-CH₃), 1.59 (3H, t, J = 6.2 Hz, NCH₂CH₃). ¹³C NMR (150.91 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.70 (NCH₂CH₃), 23.12 (CH₃), 54.68 (NCH₂), 115.40 (CH), 123.49 (CH), 125.37 (CH), 127.64 (CH), 129.58 (CH), 130.19 (CH), 140.54 (C), 141.64 (C), 158.21 (C).

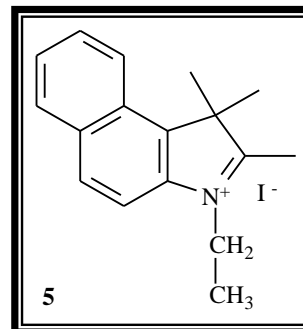
**Síntese do iodeto de 1-etil-2,3,3-trimetil-3H-indol-1-íio (4)**

Uma mistura de 5,0102 g de 2,3,3-trimetilindolenina (1 equivalente) e 7,57 mL de iodoetano (3 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 72 h. η : 58 %. P.f. 211.9 - 216.7 °C; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1469 (C=C_{arom}); 2969 (CH_{alq}); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.98 (1H, d, J = 8.88 Hz, CH), 7.85 (1H, d, J = 8.34 Hz, CH), 7.64 (2H, t, J = 7.4 Hz, 2xCH), 4,51 (2H, q, J = 6.4 Hz, NCH₂), 2.84 (3H, s, CH₃), 1.54 (6H, s, 2xCH₃), 1.47 (3H, t, J = 6.9 Hz, NCH₂CH₃). ¹³C NMR (150.91 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.22 (2xCH₃), 15.96 (NCH₂CH₃), 20.72 (CH₃), 53.66 (NCH₂), 119.24 (CH), 127.03 (CH), 129.45 (C), 130.17 (CH), 133.82 (CH), 136.86 (C), 148.30 (C), 195.21 (C).



Síntese do iodeto de 3-etil-1,1,2-trimetil-1H-benzo[e]indol-3-io (5)

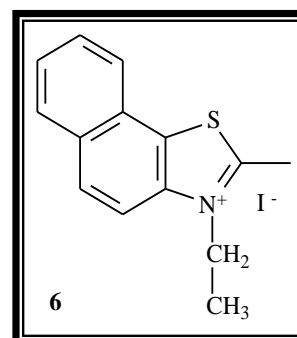
Uma mistura de 5,095 g de 1,1,2-trimetil-benz(o)indol (1,0 equivalente) e 5,77 mL de iodoetano (3,0 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 72 h. η : 51 %. P.f. 218.5 - 223.7 °C; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1520 (C=C_{arom}); 2929 (CH_{alq}); RMN de ¹H (400 MHz,



DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.38 (1H, d, J = 8.4 Hz, CH), 8.31 (1H, d, J = 8.4 Hz, CH), 8.24 - 8.16 (2H, m, 2xCH), 7.79 - 7.73 (2H, m, 2xCH), 4.63 (2H, q, J = 6.4 Hz, NCH₂), 2.95 (3H, s, CH₃), 1.77 (6H, s, 2xCH₃), 1.52 (3H, t, J = 6.6 Hz, NCH₂CH₃). ¹³C NMR (150.91 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.82 (CH₃), 16.75 (NCH₂CH₃), 22.66 (2xCH₃), 45.72 (NCH₂), 55.93 (C) 112.52 (CH), 122.89 (CH), 127.66 (CH), 127.87 (C), 128.70 (CH), 131.58 (CH), 133.72 (C), 136.63 (CH), 137.91 (C), 142.28 (C), 195.00 (C).

Síntese do iodeto de 3-etil-2-metilnafto[2,1-*d*][1,3]tiazol-3-io (6)

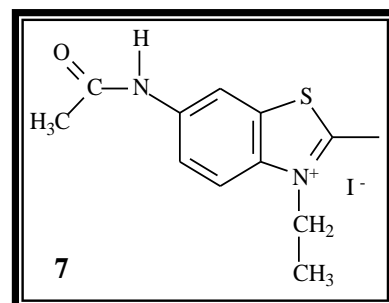
Uma mistura de 0,9993 g de 2-metilnafto[2,1-*d*]thiazol (1,0 equivalente) e 1,20 mL de iodoetano (3,0 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 48 h. η : 38 %. P.f. 200.1 - 201.5 °C; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1474 ,1505 (C=C_{arom}); 2918 (CH_{alq}); RMN de ¹H (600



MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.43 (2H, t, J = 7.4 Hz, 2xCH), 8.39 (1H, d, J = 9.2 Hz, CH), 8.30 (1H, d, J = 8.0 Hz, CH), 7.91 - 7.87 (1H, m, CH), 7.87 - 7.82 (1H, m, CH), 4.88 (2H, q, J = 7.3 Hz, NCH₂), 3.31 (3H, s, 2-CH₃), 1.52 (3H, t, J = 7.3 Hz, NCH₂CH₃). ¹³C NMR (150.91 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.60 (NCH₂CH₃), 16.83 (CH₃), 45.39 (NCH₂), 114.44 (CH), 124.14 (CH), 126.17 (CH), 127.36 (2xC), 128.77 (CH), 129.44 (2xCH), 139.32 (2xC), 173.73 (C).

Síntese do iodeto de 6-acetamido-3-etil-2-metilbenzo[*d*]tiazol-3-io (7)

Uma mistura de 0,3010 g de *N*-(2-metilbenzo[*d*]tiazol-6-il)acetamida (1,0 equivalente) e 0,36 mL de iodoetano (3,0 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 264 h. η : 38 %. P.f. 203.6 - 207.9 °C; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1482, 1537, 1586



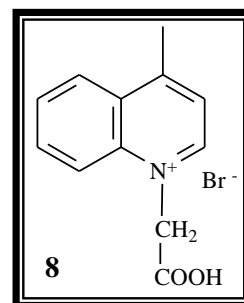
(C=C_{arom}); 1691 (C=O); 2922,3033 (CH_{alq}); 3451 (NH); RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10.42 (1H, s, NH), 8.75 (1H, s, CH), 8.17 (1H, d, J = 13.8 Hz, CH), 7.73 (1H, d, J = 10.7 Hz, CH), 4.70 (2H, q, J = 10.9 Hz, NCH₂CH₃), 3.06 (3H, s, CH₃), 2.04 (3H, s, COCH₃), 1.45 (3H, t, J = 11 Hz, NCH₂CH₃). ¹³C NMR (150.91 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.25 (CH₃), 16.44 (NCH₂CH₃),

24.10 (COCH₃), 44.67 (NCH₂), 112.96 (CH), 116.92 (CH), 121.04 (CH), 130.20 (C), 136.03 (C), 139,07 (C), 169.07 (C), 174.92 (COCH₃).

2.3.2 Síntese de sais quaternários de amônio por fusão

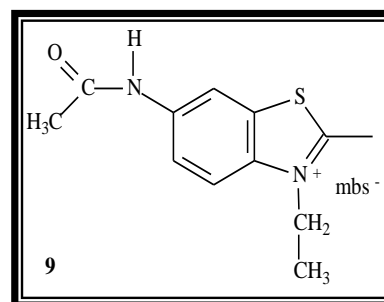
Processo geral: Aquece-se a aproximadamente 140 °C uma mistura de uma base heterocíclica com um agente alquilante durante um determinado período de tempo (em h). Após arrefecimento da mistura reaccional até à temperatura ambiente, o sólido é triturado num almofariz de porcelana e lavado com éter dietílico. O sal é recolhido por filtração a pressão reduzida e recristalizado de acetonitrilo seco.

Síntese do brometo de 1-(carboximetil)-4-metilquinolin-1-íon (8)



Uma mistura de 0,50 mL de lepidina (1,0 equivalente) e 0,5782 g de ácido bromoacético (1,1 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 24 h. η % : 63 %. P.f. 201.6 - 205.5 °C; IV (v_{\max}/cm^{-1}): 1585,1532,1603 (C=C_{arom}); 1731 (C=O); 2981 (CH_{alq}); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.42 (1H, d, *J* = 6.7 Hz, CH), 8.58 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, CH), 8.41 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, CH), 8.30 (1H, t, *J* = 8.6 Hz, CH), 8.16 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, CH), 8.10 (1H, t, *J* = 8.3 Hz, CH), 6.01 (2H, s, NCH₂), 3.06 (3H, s, 4-CH₃). ¹³C NMR (150.91 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23.74 (CH₃), 61.37 (NCH₂), 122.47 (CH), 126.67 (CH), 130.92 (CH), 133.33 (CH), 134.02 (CH), 139,85 (CH), 142.05 (C), 153.11 (C), 164.79 (C), 170.85 (C=O).

Síntese do 4-metilbenzenossulfonato de 6-acetamida-3-etil-2-metilbenzo[*d*]tiazol-1-íon (9)

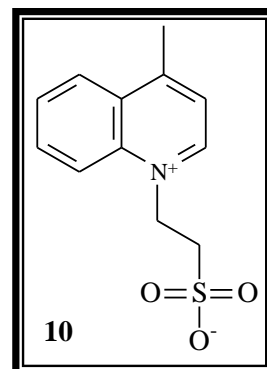


Uma mistura de 0,9988 g de *N*-(2-metilbenzo[*d*]tiazol-5-il)acetamida (1,0 equivalente) e 1,022 g de *p*-toluenossulfonato de etilo (1,2 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 8 h. η % : 61 %. P.f. 174.8 - 175.9 °C; IV (v_{\max}/cm^{-1}): 1206 (S=O); 1484, 1547, 1588 (C=C_{arom}); 1691 (C=O); 3026, 3111 (CH_{alq}); 3492 (NH); RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10.53 (1H, s, NH), 8.84 (1H, s, CH), 8.24 (1H, d, *J* = 12.9 Hz, CH), 7.83 (1H, d, *J* = 10.4 Hz, CH), 7.48 (2H, d, *J* = 11.4 Hz, 2xCH), 7.11 (2H, d, *J* = 11.3 Hz, 2xCH), 4.69 (2H, q, *J* = 9.4 Hz, NCH₂CH₃), 3.16 (3H, s, CH₃), 2.29 (3H, s, CH₃), 2.11 (3H, s, COCH₃), 1.45 (3H, t, *J* = 8.6 Hz, NCH₂CH₃). ¹³C NMR (150.91 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.18 (2-CH₃), 16.32 (NCH₂CH₃), 21.21 (CH₃), 24.04 (COCH₃), 45.09 (NCH₂), 109.56

(2xCH), 113.37 (CH), 117.36 (CH), 121.51 (CH), 130.16 (C), 135.99 (C), 137,58 (2xC), 139,06 (C), 170.43 (C), 176.72 (COCH₃).

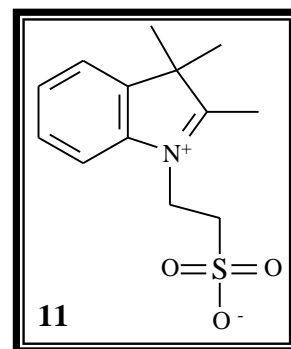
Síntese do 4-metil-1-(2-sulfoetil)quinolin-1-íon (10)

Uma mistura de 2,36 mL de lepidina e 1,136 g de ácido 2-bromoetanossulfônico (sal de sódio) reagiu durante aproximadamente 48 h. η : 42 %. P.f. dec.; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1320 (S=O); 1575 (C=C_{arom}); 2963 (CH_{alq}); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.32 (2H, d, *J* = 6.1 Hz, 2xCH), 8.56 - 8.48 (1H, m, CH), 8.30 - 8.22 (1H, m, CH), 8.03 (2H, d, *J* = 10.2 Hz, 2xCH), 5.24 (2H, t, *J* = 8.1 Hz, NCH₂), 3.41 (2H, t, *J* = 7.9 Hz, NCH₂CH₂SO₃⁻) 2.99 (3H, s, CH₃). ¹³C NMR (150.91 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 21.38 (CH₃), 55.19 (CH₂), 55.67 (CH₂), 124.03 (CH), 126.23 (CH), 128.78 (CH), 129.95 (CH), 132.48 (CH), 135.77 (C), 143.61 (C), 147.93 (CH), 152.85 (C).



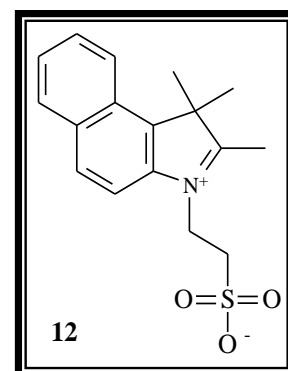
Síntese do 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)indol-1-íon (11)

Uma mistura de 1,50 mL de 2,3,3-trimetilindolenina (1,0 equivalente) e 2,0917 g de ácido 2-bromoetanossulfônico (sal de sódio) (1,1 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 120 horas. η % : 61 %. P.f. dec. ; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1346 (S=O); 1581 (C=C_{arom}); 2970 (CH_{alq}); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.84 - 7.77 (1H, m, CH), 7.75 - 7.69 (1H, m, CH), 7.57 - 7.48 (2H, m, 2xCH), 4.61 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, NCH₂), 2.81 (3H, s, CH₃), 2.54 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, NCH₂CH₂SO₃⁻), 1.48 - 1.36 (6H, m, 2xCH₃). ¹³C NMR (150.91 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13.68 (CH₃), 23.77 (2xCH₃), 48.73 (CH₂), 50.06 (CH₂), 113.75 (CH), 117.68 (C), 124.85 (CH), 125.51 (CH), 128.79 (CH), 138.91 (C), 140.34 (C), 203.47 (C).



Síntese do 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)-1H-benzo[e]indol-1-íon (12)

Uma mistura de 2,014 g de 1,1,2-trimetil-1H-benzo(e)indol (1,0 equivalente) e 2,2237 g de ácido 2-bromoetanossulfônico (sal de sódio) (1,1 equivalentes) reagiu durante aproximadamente cinco dias. η : 56 %. P.f. dec. ; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1226 (S=O); 1521,1552 (C=C_{arom}); 2918 (CH_{alq}); RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.43 - 1.41 (6H, m, 2xCH₃), 1.96 (3H, s, CH₃), 2.09 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, NCH₂CH₂SO₃⁻), 4.4 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, NCH₂), 6.82 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, CH), 7.05 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, CH), 7.14 (1H, t, *J* = 7.9

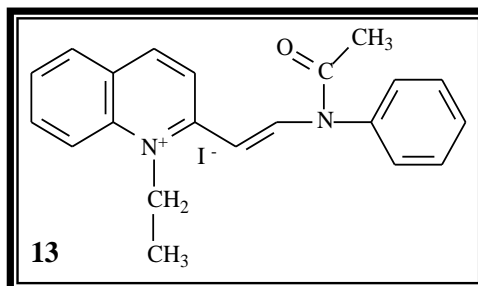


Hz, CH), 7.18 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, CH), 7.25 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, CH), 7.68 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, CH). ^{13}C NMR (150.91 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 13.78 (CH_3), 26.37 ($2\times\text{CH}_3$), 35.67 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$), 51.19 (NCH_2), 61.21 (C) 106.14 (CH), 124.68 (CH), 125.21 (CH), 125.93 (CH), 128.41 (CH), 131.33 (C), 132.48 (C), 137.12 (CH), 138.81 (C), 143.26 (C), 195.00 (C).

2.3.3 Síntese de sais intermediários com cadeias alquílicas

Processo geral: Aquece-se em refluxo de anidrido acético (10mL/ g. de sal) uma mistura de um sal quaternário de amônio com a *N,N'*-difetilformamidina durante um determinado período de tempo (em h). Após arrefecimento da mistura reaccional até à temperatura ambiente, adiciona-se éter dietílico fazendo-se assim precipitar o produto sintetizado. A mistura é então filtrada sob pressão reduzida, o sólido obtido é então triturado num almofariz de porcelana. Lava-se novamente o pó assim obtido com éter dietílico ao pó assim obtido e recolhe-se o sal por filtração sob pressão reduzida. Recristaliza-se de acetonitrilo seco.

Síntese do iodeto de (*E*)-1-etil-2-(2-(*N*-fenilacetamida)vinil)quinolin-1-íio (**13**)

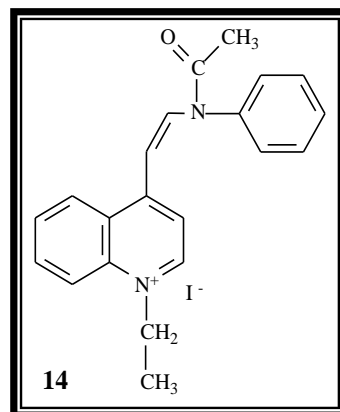


Uma mistura de 3,083 g do sal (**2**) (1,0 equivalente) e 6,404 g de *N,N'*-difetilformamidina (2,0 equivalentes) reagiu durante aproximadamente

três quartos de h. η : 63 %. P.f. 200.5 - 204.7 °C; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 8.97 (1H, d, $J = 13.7$ Hz, CH), 8.90 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, CH), 8.51 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, CH), 8.38 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, CH), 8.31 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, CH), 8.09 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, CH), 7.90 - 7.83 (1H, m, CH), 7.74 - 7.68 (2H, m, $2\times\text{CH}$), 7.65 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, CH), 7.58 - 7.52 (2H, m, $2\times\text{CH}$), 5.55 (1H, t, $J = 9.9$ Hz, CH), 4.52 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, NCH_2CH_3), 2.15 (3H, s, CH_3), 1.19 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3). ^{13}C NMR (150.91 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 13.43 (NCH_2CH_3), 23.71 (COCH_3), 48.02 (NCH_2), 101.62 (CH), 118.81 (CH), 127.03 (CH), 127.41 (C), 127.62 (CH), 128.19 (CH), 128.89 (CH), 130.23 (C), 130.60 (CH), 131.27 (CH), 135.57 (CH), 137.20 (CH), 138.33 (CH), 144.36 (C), 155.26 (C), 169.94 (COCH_3).

Síntese do iodeto de (Z)-1-etil-4-(2-(*N*-fenilacetamida)vinil)quinolin-1-íon (14)

Uma mistura de 3,061 g do sal (3) (1,0 equivalente) e 6,5376 g de *N,N'*-difetilformamidina (2,0 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 96 h. η : 24 %. P.f. 214.7 - 217.3 °C; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 9.22 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, CH), 8.90 (1H, d, $J = 13.9$ Hz, CH), 8.47 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, CH), 8.39 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, CH), 8.20 - 8.14 (1H, m, CH), 7.94 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, CH), 7.90 - 7.86 (1H, m, CH), 7.71 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, 2xCH), 7.65 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, CH), 7.54 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, 2xCH), 6.05 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, CH), 4.95 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3), 2.09 (3H, s, CH_3), 1.54 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_3). ^{13}C NMR (150.91 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 15.72 (NCH_2CH_3), 23.61 (CH_3), 52.84 (NCH_2), 103.57 (CH), 115.39 (CH), 118.82 (CH), 125.75 (CH), 126.51 (C), 128.33 (CH), 129.18 (CH), 130.31 (CH), 131.09 (CH), 135.54 (CH), 137.62 (CH), 137.81 (CH), 140.60 (C), 146.92 (C), 153.90 (C), 169.85 (COCH_3).

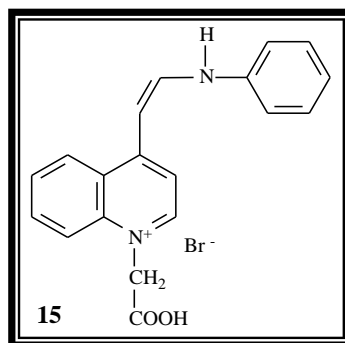


2.3.4 Síntese de sais intermediários com cadeias carboxi-alquílicas

Processo geral: Aquece-se a aproximadamente 120°C uma mistura de um sal quaternário de amônio com o trietilortoformiato e a anilina durante um determinado período de tempo (em h). Após arrefecimento da mistura reaccional até à temperatura ambiente, adiciona-se éter dietílico fazendo-se assim precipitar o produto sintetizado. A mistura é então filtrada sob pressão reduzida, o sólido obtido é então triturado num almofariz de porcelana. Lava-se novamente o pó assim obtido com éter dietílico e recolhe-se o sal por filtração sob pressão reduzida. Recristaliza-se de acetonitrilo seco.

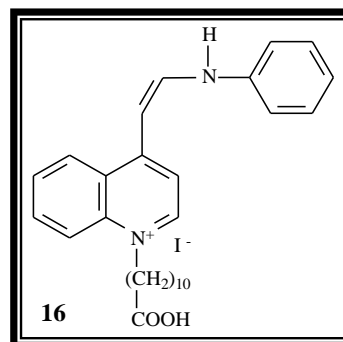
Síntese do brometo (Z)-1-(10-carboximetil)-4-(2-(fenilamino)vinil)quinolin-1-íon (15)

Uma mistura de 4,3325 g do sal (8) (1,0 equivalente), 3,77 mL de trietilortoformiato (1,05 equivalentes) e 2,17 mL de anilina (1,1 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 1 h. η : 76 %. Óleo avermelhado; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 9.53 (1H, s, NH), 8.78 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, CH), 8.48 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, CH), 8.22 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, CH), 8.15 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, CH), 8.11 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, CH), 8.07 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, CH), 7.75 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, CH), 7.20 - 7.34 (4H, m, 4xCH), 7.18



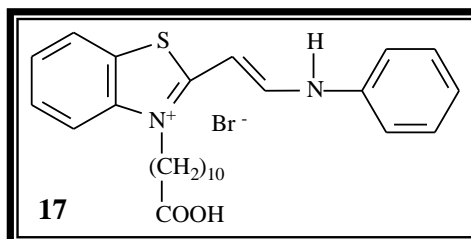
(1H, t, $J = 7.1$ Hz, CH), 6.87 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, CH), 4.58 (2H, s, $J = 7.1$ Hz, NCH_2COOH). ^{13}C NMR (150.91 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 67.71 (NCH_2), 118.38 (CH), 122.61 (2xCH), 129.63 (C), 130.89 (2xCH), 130.27 (CH), 130.67 (2xCH), 131.67 (CH), 132.41 (2xCH), 138.39 (CH), 141.88 (C), 142.09 (C), 142.73 (CH), 143.97 (C), 166.40 (COOH).

Síntese do brometo (Z)-1-(10-carboxidecil)-4-(2-(fenilamino)vinil)quinolin-1-íon (16)



Uma mistura de 3,4172 g do sal (1) (1,0 equivalente), 3,20 mL de trietilortoformiato (1,2 equivalentes) e 1,60 mL de anilina (1,1 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 1 h. η : 81 %. Óleo avermelhado; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 9.69 (1H, s, NH), 8.91 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, CH), 8.65 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, CH), 8.32 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, CH), 8.20 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, CH), 8.12 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, CH), 8.04 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, CH), 7.82 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, CH), 7.44 - 7.31 (4H, m, 4xCH), 7.14 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, CH), 6.77 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, CH), 4.63 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, NCH_2COOH), 1.48 - 1.32 (6H, m, $(\text{CH}_2)_3$), 1.23 (12H, s, $(\text{CH}_2)_6$). ^{13}C NMR (150.91 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 14.06 (CH_2), 14.24 (CH_2), 14.76 (CH_2), 15.06 (2x CH_2), 15.28 (2x CH_2), 22.99 (CH_2), 23.75 (CH_2), 65.87 (NCH_2), 117.38 (2xCH), 123.48 (2xCH), 128.81 (C), 129.63 (2xCH), 131.21 (4xCH), 133.68 (CH), 139.21 (CH), 141.28 (C), 141.96 (C), 142.68 (CH), 144.27 (C), 167.78 (COOH).

Síntese do brometo de (Z)-3-(10-carboxidecil)-2-(2-(fenilamino)vinil)benzo[d]tiazol-3-íon (17)

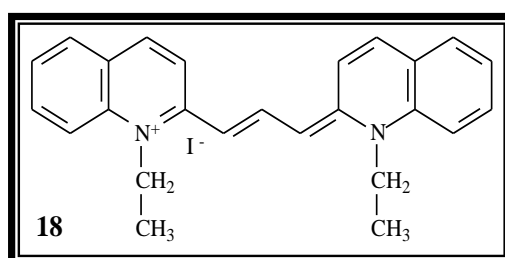


Uma mistura de 1,7070 g de brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzo[d]tiazol-3-íon (1,0 equivalente), 0,83 mL de trietilortoformiato (1,2 equivalentes) e 0,34 mL de anilina (1,1 equivalentes) reagiu durante aproximadamente 1 h. η % : 38%. P.f. 142.2 - 144.1 °C; RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 11.96 (1H, s, NH), 8.67 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, CH), 8.15 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, CH), 7.94 (1H, t, $J = 10.2$ Hz, CH), 7.66 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, CH), 7.53 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, CH), 7.51 - 7.42 (4H, m, 4xCH), 7.22 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, CH), 6.43 (1H, d, $J = 11.9$ Hz, CH), 4.41 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, NCH_2), 1.49 - 1.42 (6H, m, $(\text{CH}_2)_3$), 1.17 (12H, s, $(\text{CH}_2)_6$). ^{13}C NMR (150.91 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 23.76 (CH_2), 26.48 (CH_2), 28.87 (4x CH_2), 30.95 (2x CH_2), 34.64 (CH_2), 43.66 (NCH_2), 89.14 (CH), 118.38 (2xCH), 121.81 (CH), 123.29 (CH), 126.31 (CH), 126.91 (CH), 127.58 (CH), 130.27 (2xCH), 133.88 (C), 138.96 (C), 141.61 (C), 148.67 (C), 164.58 (CH), 178.11 (COOH).

2.3.5 Síntese de carbocianinas simétricas

Processo geral: Aquece-se em refluxo de piridina uma mistura de um sal quaternário de amônio (10mL / g. de sal) com o trietilortoformiato durante um determinado período de tempo (em h). Após arrefecimento da mistura reaccional à temperatura ambiente, adiciona-se éter dietílico por forma a precipitar o produto sintetizado. A mistura é então filtrada a pressão reduzida e o sólido obtido é triturado num almofariz de porcelana. Adiciona-se novamente éter dietílico ao pó assim obtido, recolhe-se o sal por filtração sob pressão reduzida e recristaliza-se de acetonitrilo seco.

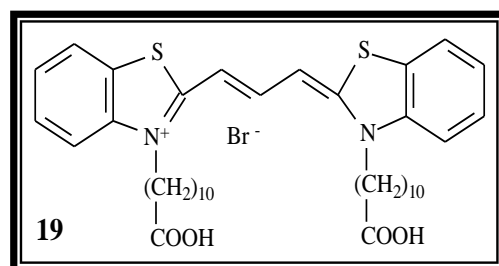
Síntese do iodeto de 1-etil-2-((1E,3Z)-3-(1-etilquinolin-2(1H)-ilideno)prop-1-en-1-il)quinolin-1-íio (18)



Uma mistura de 0,2163 g do sal (2) (1,0 equivalente) e 0,21 mL de trietilortoformiato (2,0

equivalentes) reagiu durante aproximadamente 18 h. η % : 63%. P.f. 284.8 - 287.4 °C; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 8.69 (1H, t, $J = 12.7$ Hz, CH), 8.30 (2H, d, $J = 9.6$ Hz, 2xCH), 7.99 (2H, d, $J = 9.5$ Hz, 2xCH), 7.90 - 7.80 (4H, m, 4xCH), 7.79 - 7.69 (2H, m, 2xCH), 7.44 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, 2xCH), 6.58 (2H, d, $J = 12.7$ Hz, 2xCH), 4.10 (4H, q, $J = 5.2$ Hz, 2xNCH₂), 1.43 (6H, t, $J = 7.0$ Hz, 2xNCH₂CH₃). ^{13}C NMR (150.91 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 12.95 (NCH₂CH₃), 17.10 (NCH₂CH₃), 29.72 (NCH₂), 43.84 (NCH₂), 105.72 (2xCH), 115.24 (2xCH), 121.01 (4xCH), 124.83 (2xCH), 128.51 (4xCH), 129.23 (CH), 132.17 (2xC), 139.05 (C), 144.88 (2xC), 152.26 (C).

Síntese do brometo 3-(10-carboxidecil)-2-(3-(3-(10-carboxidecil)-3H-benzo[d]tiazol-2ilideno)prop-1-en-1-il)benzo[d]tiazol-3-íio (19)



Uma mistura de 0,5208 g de brometo de 3-(10-

carboxidecil)-2-metilbenzo[d]tiazol-3-íio (1,0 equivalente) e 0,50 mL de trietilortoformiato (2 equivalentes) reagiu durante aproximadamente uma hora. η : 58 %. P.f. 133.9 - 135 .1 °C; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 8.01 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, 2xCH), 7.78 (4H, d, $J = 8.4$ Hz, 4xCH), 7.58 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, CH), 7.43 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, 2xCH), 6.63 (2H, d, $J = 12.6$ Hz, 2xCH), 4.34 (4H,s, 2xNCH₂), 1.44 - 1.39 (12H, m, (CH₂)₆), 1.36 (24H, s, (CH₂)₁₂). ^{13}C NMR

(150.91 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24.2 (2xCH₂), 25.7 (2xCH₂), 26.7 (2xCH₂), 27.1 (2xCH₂), 28.2 (2xCH₂), 28.4 (4xCH₂), 28.5 (4xCH₂), 33.5 (NCH₂), 47.12 (NCH₂), 102.3 (CH), 111.3 (2xCH), 115.24 (2xCH), 122.2 (2xCH), 124.9 (2xCH), 128.4 (CH), 140.5 (2xC), 141.8 (C), 144.88 (2xC), 149.5 (CH), 173.7 (C), 174.5 (2xCOOH).

2.4 Espectroscopia de RMN-STD

2.4.1 Preparação das amostras

Para as proteínas lisozima e RNase, foram preparadas soluções padrão com uma concentração de 100 μ M em tampão fosfato com H₂O: D₂O (9:1) a pH 7.0. Para todos os sais quaternários de amónio (1), (2), (3), (6) e (7) foram preparadas soluções padrão em DMSO- d_6 de 1 mM e conservadas no escuro a 4°C. As amostras para análise de RMN-STD foram preparadas do seguinte modo: 240 μ L de sal quaternário de amónio, 250 μ L de solução padrão de proteína e 10 μ L de trimetilsilil propionato (TSP).

2.4.2 Método

As ressonâncias para os sais quaternários de amónio foram adquiridos por ¹H, ¹³C, DEPT90, DEPT135, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹³C HSQC and ¹H-¹³C HMBC. O espectro RMN-STD foi adquirido com 512 scans e foi feita uma saturação selectiva da proteína em diferentes desvios químicos (on-ressonance e off-ressonance) usando um pulso (Eburp2.1000) durante dois segundos. O espectro da diferença é obtido directamente pela subtracção do on-ressonance ao off-ressonance. O espectro final de STD é obtido ao dividirmos a intensidade dos sinais do STD pelas intensidades dos sinais do espectro de referência $[(I_0 - I_{STD})/I_0]$ (Mayer and Meyer, 2001). O sinal do STD com maior intensidade é definido como 100% e as percentagens dos outros sinais são calculadas de acordo com esta percentagem. Foram realizadas experiências usando apenas os sais quaternários de amónio, para comprovar se a interacção ligando-proteína seria verdadeira. Nenhum sinal foi observado, assim todos os efeitos observados na presença das proteínas são devido unicamente à transferência da saturação da proteína para o ligando.

CAPÍTULO III.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Preâmbulo

Este estudo teve como principal objectivo a síntese de um conjunto de compostos e sua avaliação das interacções moleculares com proteínas padrão por RMN - STD. Os sais quaternários avaliados por esta técnica foram escolhidos com base na sua solubilidade em água e nas suas diferentes propriedades estruturais, as quais podem potenciar diferentes interacções com proteínas. Alguns sais quaternários e as carbocianinas não foram estudados por esta técnica devido a serem bastante insolúveis em água e DMSO.

No início deste capítulo, são descritos e discutidos os métodos de síntese utilizados bem como os resultados obtidos na caracterização de todos os compostos sintetizados. É discutido, para cada um dos compostos sempre que possível/realizado, rendimento, p.f., caracterização espectroscópica de IV, RMN de ^1H e de ^{13}C .

No final do capítulo, é analisado o estudo da interação dos sais quaternários de amónio (1), (2), (3), (6) e (7) com as proteínas padrão (lisozima e RNase) por RMN-STD. São apresentados e discutidos os principais locais de interação de cada um dos sais com as proteínas, bem como a comparação dos resultados entre as duas proteínas.

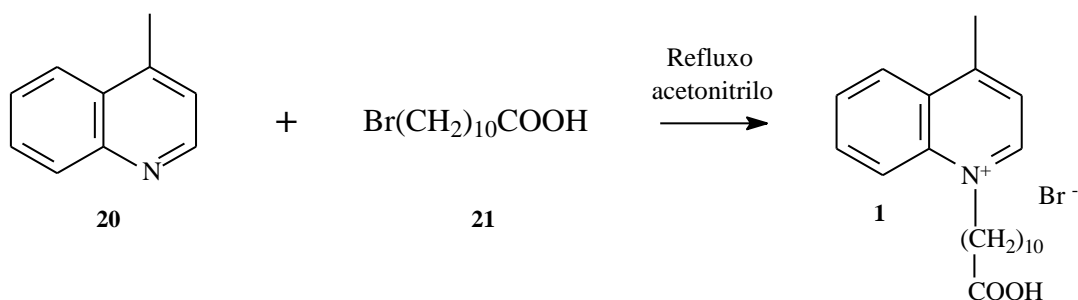
3.2 Síntese de sais quaternários de amónio e carbocianinas

3.2.1 Síntese de sais quaternários de amónio por refluxo em acetonitrilo

O método escolhido para a síntese destes sais quaternários de amónio foi o método de refluxo em acetonitrilo da mistura reaccional, uma vez que permite a síntese dos sais sem a decomposição dos materiais de partida com rendimentos razoáveis. O processo geral encontra-se já descrito no ponto (2.3.1).

Síntese do brometo de 1-(10-carboxidecil)-4-metilquinolin-1-íolo (1)

O sal 1 foi obtido a partir da reacção de alquilação da base heterocíclica lepidina (20) com o reagente alquilante ácido 11-bromoundecanoico (21) (Esquema 7).



Esquema 7. Síntese do brometo de 1-(10-carboxidecil)-4-metilquinolin-1-io (1).

Este método de síntese foi utilizado em alternativa ao método de fusão, que é o método tradicional para este tipo de reacção (presença de um ácido carboxílico), pois permitiu a obtenção do produto desejado. Uma das possíveis justificações para o seu sucesso, seria que a utilização do solvente polar (acetoneitrilo) preveniu a decomposição do material de partida pelo calor. O rendimento da reacção foi de 67%, um valor razoavelmente bom, tendo em conta que a utilização do solvente faz com que os materiais de partida se encontrem dispersos, dificultando assim a reacção. Não existe p.f. de referência, no entanto o intervalo de fusão é pequeno (1.4 °C) o que indica um bom grau de pureza. Quanto ao espectro de IV, apresenta bandas características de ligações C=C aromáticos a 1529 e 1587 cm^{-1} e a ligação C=O a 1738 cm^{-1} . O espectro de RMN de ^1H apresenta o número de prótons, obtido por integração, esperado teoricamente. Destacando-se a presença dos prótons dos grupos CH_2 referentes à cadeia alquímica entre 1.14 e 1.39 ppm, o tripleto do grupo N- CH_2 a 5.00 ppm, os prótons do grupo metilo a 3.01 ppm e os prótons do anel aromático entre 8.09 e 9.41 ppm. O RMN de ^{13}C vem confirmar também a presença do composto desejado, com o sinal característico da ligação N- CH_2 a 50.20 ppm, a presença dos sinais dos CH aromáticos a 115 - 140 ppm e a ligação C=O a 177.14 ppm.

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a presença do produto desejado e a sua caracterização encontra-se resumida na tabela 1.

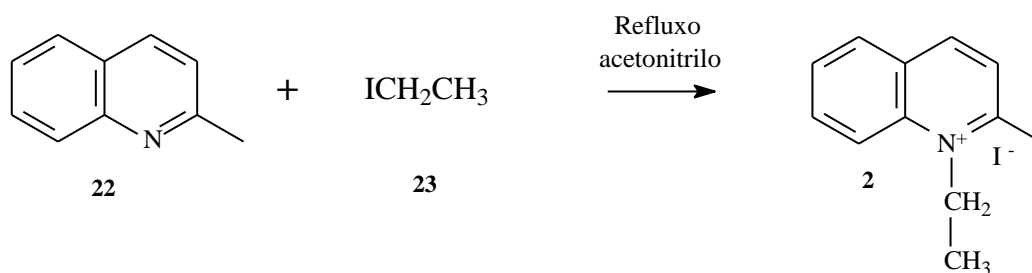
Tabela 1 - Caracterização física e espectroscópica do brometo de 1-(10-carboxidecil)-4-metilquinolin-1-io (1).

Composto	<p style="text-align: center;">1</p>
----------	--------------------------------------

η (%)	67
P.f (°C)	100.1 - 102.5
IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$):	1366 (-CH _{alq}); 1529,1587 (C=C _{arom});1738 (C=O);2919 (CH _{alq})
RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) J (Hz)	9.41 (1H, d, <i>J</i> = 6.0 Hz, CH); 8.59 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz, CH); 8.57 (1H, d, <i>J</i> = 4.2 Hz, CH); 8.29 - 8.23 (1H, m, CH); 8.09 - 8.03 (2H, m, 2xCH); 5.00 (2H, t, <i>J</i> = 7.5 Hz, NCH ₂); 3.01 (3H, s, 4-CH ₃); 1.39 - 1.20 (6H, m, (CH ₂) ₃); 1.14 (12H, s, (CH ₂) ₆)
RMN de ¹³ C (150.91 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	20.41 (CH ₃); 24.54 (CH ₂); 26.28 (CH ₂); 28.52 (3xCH ₂); 28.52 (CH ₂); 28.66 (CH ₂); 30.17 (CH ₂); 34.00 (N(CH ₂) ₁₀ COOH); 50.20 (NCH ₂); 118.81 (CH); 123.89 (CH); 126.86 (CH); 129.49 (CH); 129.81 (CH); 135,22 (C); 137.03 (CH); 149.88 (C); 157.69 (C); 177.14 (C=O)

Síntese do iodeto de 1-etil-2-metilquinolin-1-íon (2)

A síntese do iodeto de 1-etil-2-metilquinolin-1-íon (2) foi realizada com o objectivo de alquilar o azoto da quinaldina (22) com um grupo etilo. Utilizou-se o iodoetano (23) como reagente alquilante (Esquema 8).

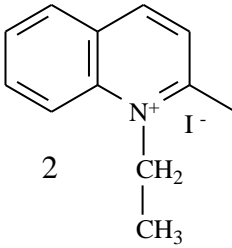


Esquema 8- Síntese do iodeto de 1-etil-2-metilquinolin-1-íon (2) por alquilação com iodoetano.

Os dados espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 2.

O composto apresenta bandas características de um sal quaternário de amônio: bandas características de ligações C=C aromáticas a 1520cm^{-1} e dos CH da cadeia alquílica a 2980cm^{-1} . O espectro de RMN de ^1H apresenta os prótons aromáticos a 8-9 ppm, o quarteto do N-CH₂ a 5.01 ppm, e os prótons do grupo metilo da cadeia alquílica a 1.54 ppm. Apresenta todos os sinais teoricamente esperados. Os valores obtidos no RMN de ^{13}C apresentam o sinal característico do grupo metilo da cadeia alquílica a 14.02 ppm, do grupo metilo a 24.33 ppm, dos prótons da ligação N-CH₂ a 49.13 e dos carbonos terciários aromáticos entre 115-140 ppm. Apresenta um bom rendimento (76%), sabendo que a presença do grupo metilo na posição 2 pode provocar impedimento estereoquímico, dificultado a entrada e ligação do grupo alquílico ao azoto. O p.f. determinado para o composto apresenta um intervalo de 4 ° C, um valor aceitável em termos de possível pureza.

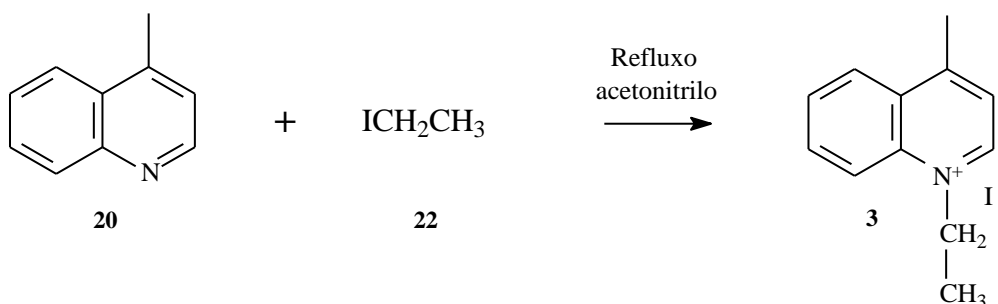
Tabela 2 - Caracterização física e espectroscópica do iodeto de 1-etil-2-metilquinolin-1-íio (2).

Composto	
η (%)	76
P.f (°C)	228.3 - 232.3
IV ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$):	1435 (-CH _{alq}); 1520 (C=C _{arom}); 2980 (CH _{alq});
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	9.11 (1H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz, CH); 8.62 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz, CH); 8.42 (1H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz, CH); 8.24 (1H, t, <i>J</i> = 8.8 Hz, CH); 8.13 (1H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz, CH); 8.00 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, CH); 5.01 (2H, q, <i>J</i> = 7.3 Hz, NCH ₂); 3.12 (3H, s, 2-CH ₃); 1.54 (3H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz, NCH ₂ CH ₃);

RMN de ^{13}C (150.91 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm)	14.02 (NCH ₂ CH ₃); 24.33 (CH ₃); 49.13 (NCH ₂); 118.65 (CH); 125.97 (CH); 128.85 (CH); 129.64 (CH); 131.01 (CH); 136.15 (CH); 138.80 (C); 146.03 (C); 158.21 (C);
--	--

Síntese do iodeto de 1-etil-4-metilquinolin-1-íon (3)

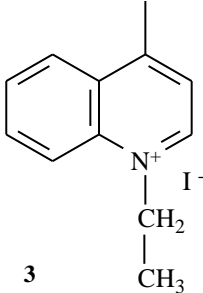
A síntese do sal 3 consistiu na reação da base heterocíclica lepidina (20) com o reagente alquilante adequado, o iodoetano (23) (Esquema 9).



Esquema 9- Síntese do iodeto de 1-etil-4-metilquinolin-1-íon (3).

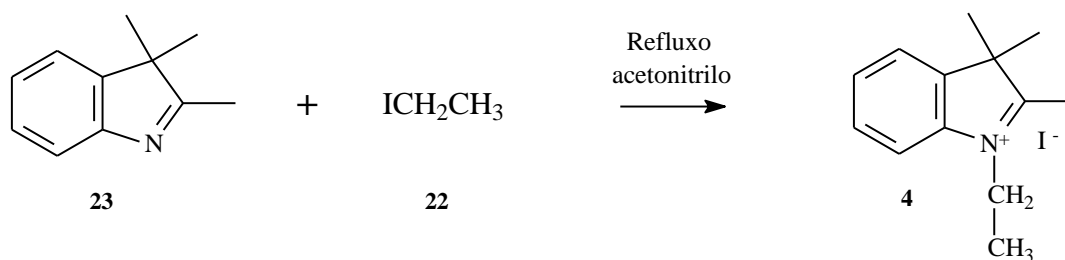
O rendimento é bom, foi um pouco melhor (+3%) que para o sal (2), o grupo metilo estar localizado na posição 4, e não na 2, pode ser a razão para este ligeiro aumento. Quanto ao seu p.f., encontra-se um pouco abaixo dos 143 - 146 °C valor de referência da literatura, e foi de 130.4 - 131.5 °C. Os dados espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 3. No espectro de IV observam-se bandas características do composto pretendido. Apresenta as vibrações da ligação C=C aromática a 1525 e 1595 cm^{-1} e a vibração da ligação C-H alifática a 2980 cm^{-1} . O espectro de RMN de ^1H apresenta a integração dos seis prótons aromáticos entre 8 - 9.5 ppm, dos prótons do N-CH₂ a 5.06 ppm, os prótons do grupo metilo a 3.05 ppm e o quarteto do metilo da cadeia alquílica a 1.59 ppm. O RMN de ^{13}C apresenta o sinal do grupo metilo da cadeia alquílica a 13.70 ppm, o sinal do grupo metilo a 23.12 ppm, da ligação N-CH₂ a 54.68 ppm e a presença dos três carbonos quaternários a 140.54, 141.64 e 195.41 ppm. Apesar do p.f. não coincidir com o de referência, os restantes dados estão de acordo com a estrutura do produto desejado.

Tabela 3 - Caracterização física e espectroscópica do iodeto de 1-etil-4-metilquinolin-1-íio (3).

Composto	
η (%)	79
Pf (°C)	130.4 - 131.5
IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$):	1418 (-CH _{alq}); 1525, 1595 (C=C _{arom}); 2980 (CH _{alq})
RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) J (Hz)	9.43 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, CH); 8.61 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz, CH); 8.55 (1H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz, CH); 8.28 (1H, t, <i>J</i> = 8.6 Hz, CH); 8.09 - 8.07 (2H, m, CH); 5.06 (2H, q, <i>J</i> = 6.3 Hz, NCH ₂); 3.05 (3H, s, 4-CH ₃); 1.59 (3H, q, <i>J</i> = 6.2 Hz, NCH ₂ CH ₃)
RMN de ¹³ C (150.91 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	13.70 (NCH ₂ CH ₃); 23.12 (CH ₃); 54.68 (NCH ₂); 115.40 (CH); 123.49 (CH); 125.37 (CH); 127.64 (CH); 129.58 (CH); 130.19 (CH); 140.54 (C); 141.64 (C); 195.41 (C)

Síntese do iodeto de 1-etil-2,3,3-trimetil-3H-indol-1-íio (4)

O sal quaternário de amônio 4 foi obtido após se fazer reagir a base 2,3,3-trimetilindolenina (23) com um excesso do agente alquilante iodoetano (22) (Esquema 10).



Esquema 10- Síntese do iodeto de 1-etil-2,3,3-trimetil-3H-indol-1-io (4).

Na tabela 4 encontram-se resumidos os dados obtidos na caracterização do sal 4.

O composto apresenta as bandas características de IV do produto pretendido: a vibração da ligação dos C=C aromáticos a 1469 cm^{-1} e a vibração dos CH da cadeia alquílica a 2996 cm^{-1} . O espectro de RMN de ^1H apresenta o número de prótons, obtido por integração, esperado teoricamente. Destacando-se a presença de todos os prótons aromáticos a 7.5 - 8 ppm, do quarteto do N-CH₂ a 4.51 ppm, os prótons dos dois grupos metilo da posição três a 1.54, o metilo da posição dois a 2.84 ppm e o quarteto do grupo metilo da cadeia alquílica a 1.47 ppm. O RMN de ^{13}C apresenta também todos os sinais esperados, apresentando o sinal característico da presença dos oito carbonos aromáticos (quatro CH e quatro C) a campo baixo (115- 195 ppm), os sinais dos carbonos dos dois grupos metilo da posição três a 13.22 ppm, do grupo metilo da cadeia alquílica a 15.96 ppm, do grupo metilo da posição 2 a 23.12 ppm e da ligação N-CH₂ a 53.66 ppm. Apresentou um rendimento médio, de 58 %. O p.f. apresenta um intervalo de fusão de cerca de 5 °C, o que pode indicar a presença de uma pequena contaminação

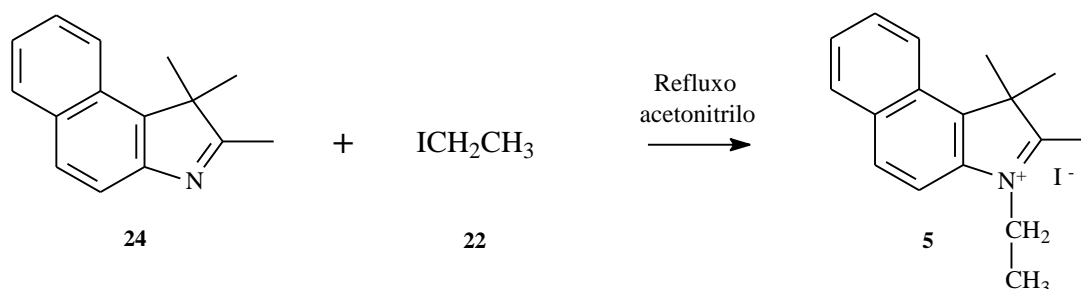
Tabela 4 - Caracterização física e espectroscópica do iodeto de 1-etil-2,3,3-trimetil-3H-indol-1-io (4).

Composto	<p style="text-align: center;">4</p>
η (%)	58

Pf (°C)	211.9 - 216.7
IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$):	1469 (C=C _{arom}); 2969 (CH _{alq})
RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	7.98 (1H, d, <i>J</i> = 8.88 Hz, CH); 7.85 (1H, d, <i>J</i> = 8.34 Hz, CH); 7.64 (2H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2xCH); 4,51 (2H, q, <i>J</i> = 6.4 Hz, NCH ₂); 2.84 (3H, s, CH ₃); 1.54 (6H, s, 2xCH ₃); 1.47 (3H, t, <i>J</i> = 6.9 Hz, NCH ₂ CH ₃)
RMN de ¹³ C (150.91 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	13.22 (2xCH ₃); 15.96 (NCH ₂ CH ₃); 20.72 (CH ₃); 53.66 (NCH ₂); 119.24 (CH); 127.03 (CH); 129.45 (C); 130.17 (CH); 133.82 (CH); 136.86 (C); 148.30 (C); 195.21 (C)

Síntese do iodeto de 3-etil-1,1,2-trimetil-1H-benzo[e]indol-3-io (5)

A síntese do sal 5 consistiu na reação da base heterocíclica 1,1,2-trimetil-benz(o)indole (24) com o reagente alquilante iodoetano (22) (Esquema 11).



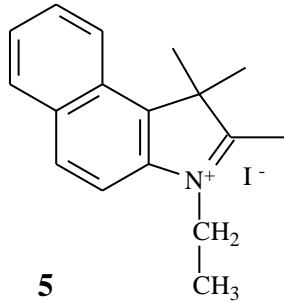
Esquema 11- Síntese do iodeto 3-etil-1,1,2-trimetil-1H-benzo[e]indol-3-io (5).

O rendimento da reação do sal 5 foi médio, e ronda os 50%, tal como no sal (4) a presença dos grupos metilo nas posições adjacentes ao azoto podem afetar a sua basicidade. O espectro de IV apresenta bandas características de ligações C=C aromaticos a 1520 cm^{-1} e dos CH da cadeia alquica a 2929 cm^{-1} , estando assim de acordo com o nosso produto. O espectro

de RMN de ^1H apresenta os seis sinais dos prótons aromáticos a 7.5 - 8.5 ppm, o quarteto dos prótons da ligação N-CH₂ a 4.63 ppm, os prótons dos três grupos metilo a 1.77 - 2.95 ppm e o tripleto dos prótons do grupo metilo da cadeia alquilar a 1.52 ppm. O espectro do RMN de ^{13}C apresenta todos sinais pretendidos, destacando-se o sinal do grupo metilo da cadeia alquilar a 16.75 ppm, os prótons do N-CH₂ a 45.72 ppm e os seis carbonos quaternários aromáticos.

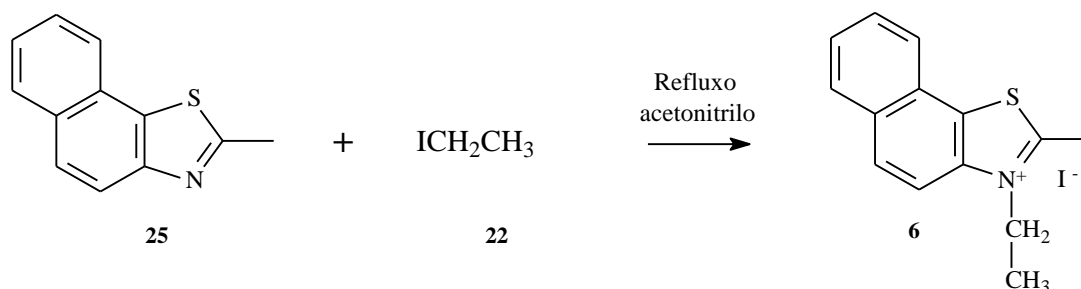
Todos os dados obtidos na caracterização deste composto encontram-se descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Caracterização física e espectroscópica do iodeto de 1-etil-2,3,3-trimetil-3H-indol-1-íio (5).

Composto	
η (%)	51
Pf (°C)	211.9 - 216.7
IV ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$):	1520 (C=C _{arom}); 2929 (CH _{alq})
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	8.38 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, CH); 8.31 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, CH); 8.24 - 8.16 (2H, m, 2xCH); 7.79 - 7.73 (2H, m, 2xCH); 4.63 (2H, q, <i>J</i> = 6.4 Hz, NCH ₂); 2.95 (3H, s, CH ₃); 1.77 (6H, s, 2xCH ₃); 1.52 (3H, t, <i>J</i> = 6.6 Hz, NCH ₂ CH ₃)
RMN de ^{13}C (150.91 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	13.82 (CH ₃); 16.75 (NCH ₂ CH ₃); 22.66 (2xCH ₃); 45.72 (NCH ₂); 55.93 (C); 112.52 (CH); 122.89 (CH); 127.66 (CH); 127.87 (C); 128.70 (CH); 131.58 (CH); 133.72 (C); 136.63 (CH); 137.91 (C); 142.28 (C); 195.00 (C)

Síntese do iodeto de 3-etil-2-metilnafto[2,1-*d*][1,3]tiazol-3-io (6)

A síntese do sal 6 foi realizada com o objectivo de alquilar o azoto da base heterocíclica 2-metilnafto[2,1-*d*]tiazol (25) com o reagente alquilante iodoetano (22) (Esquema 12).



Esquema 12 - Síntese do iodeto de 3-etil-2-metilnafto[2,1-*d*][1,3]tiazol-3-io (6).

O rendimento e os restantes dados espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 6.

O composto apresenta bandas características de um sal quaternário de amônio: bandas características de ligações C=C aromáticos a 1477 e 1505 cm^{-1} e dos CH da cadeia alquilar a 2918 cm^{-1} . No espectro de RMN de ^1H destaca-se a presença dos protões da zona aromática de 7.5 - 8.5 ppm, o quarteto do N-CH₂ a 4.88 ppm, os protões do grupo metilo a 3.31 ppm e o tripleto dos protões do grupo metilo da cadeia alquilar a 1.52 ppm. O RMN de ^{13}C apresenta o sinal característico da presença do grupo metilo da cadeia alquilar a 13.60 ppm, do grupo metilo a 16.83 ppm, a ligação N-CH₂ a 45.39 ppm e os carbonos aromáticos a 110 - 175 ppm. Os espectros de RMN apresentam todos os protões e carbonos esperados teoricamente. O intervalo de fusão do composto é pequeno, apenas de 1.4 °C, indicativo de uma boa pureza.

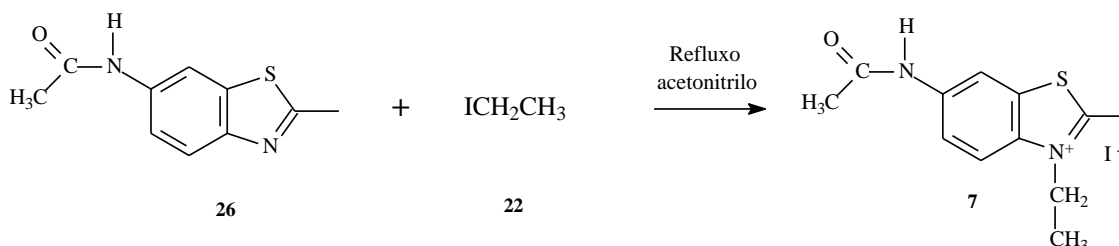
Tabela 6 - Caracterização física e espectroscópica do iodeto de 3-etil-2-metilnafto[2,1-*d*][1,3]tiazol-3-io

Composto	<p style="text-align: center;">6</p>
----------	---

η (%)	51
Pf (°C)	200.1 - 201.5
IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$):	1474, 1505 (C=C _{arom}); 2918 (CH _{alq})
RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) J (Hz)	8.43 (2H, t, J = 7.4 Hz, 2xCH); 8.39 (1H, d, J = 9.2 Hz, CH); 8.30 (1H, d, J = 8.0 Hz, CH); 7.91 - 7.87 (1H, m, CH); 7.87 - 7.82 (1H, m, CH); 4.88 (2H, q, J = 7.3 Hz, NCH ₂); 3.31 (3H, s, 2-CH ₃); 1.52 (3H, t, J = 7.3 Hz, NCH ₂ CH ₃)
RMN de ¹³ C (150.91 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	13.60 (NCH ₂ CH ₃); 16.83 (CH ₃); 45.39 (NCH ₂); 114.44 (CH); 124.14 (CH); 126.17 (CH); 127.36 (2xC); 128.77 (CH); 129.44 (2xCH); 139.32 (2xC); 173.73 (C)

Síntese do iodeto de 6-acetamida-3-etil-2-metil-benzo[*d*]tiazol-3-io (7)

A síntese do sal 7 consistiu na reacção da base heterocíclica *N*-(2-metilbenzo[*d*]tiazol-6-il)acetamida (26) com o reagente alquilante iodoetano (22) (Esquema 13).

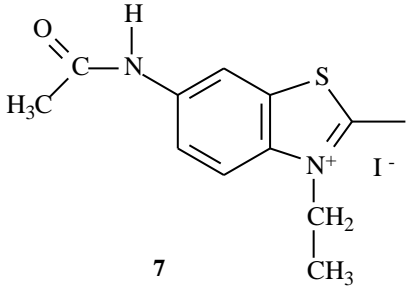


Esquema 13. Síntese do iodeto de 6-acetamida-3-etil-2-metil-benzo[*d*]tiazol-3-io (7).

O rendimento da reacção foi relativamente baixo (38%). O p.f. determinado experimentalmente apresenta um intervalo de fusão de cerca de 4 °C, valor aceitável para um composto com um bom grau de pureza. Os dados espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 7.

O composto apresenta bandas características de IV do composto pretendido: vibração das ligações C=C aromáticos a 1482,1537 e 1586 cm^{-1} , da ligação C=O a 1691 cm^{-1} , vibração dos CH da cadeia alquímica a 2922 e 3033 cm^{-1} e da ligação N-H a 3451 cm^{-1} . O espectro de RMN de ^1H apresenta o número de prótons, obtido por integração, esperado teoricamente. Destacando-se a presença do próton do N-H a 10.42 ppm, dos prótons aromáticos a 7.5 - 9 ppm, o quarteto da ligação N-CH₂ a 4.70 ppm, os prótons do grupo metilo a 3.06 ppm, o grupo metilo da acetamida a 2.04 ppm e o tripleto do metilo da cadeia alquímica a 1.45 ppm. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta todos os sinais esperados, presença do grupo metilo a 13.25 ppm, do grupo metilo da cadeia alquímica a 16.44 ppm, do grupo metilo da acetamida a 24.10 ppm, da ligação N-CH₂ a 44.67 ppm, os quatro carbonos quaternários aromáticos a 130 - 170 ppm e o sinal do C=O a 174.92 ppm.

Tabela 7 - Caracterização física e espectroscópica do iodeto 6-acetamido-3-etil-2-metil-benzo[d]tiazol-3-io (7).

Composto	
η (%)	38
Pf (°C)	203.6 - 207.9
IV ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$):	1482,1537,1586 (C=C _{arom}); 1691 (C=O); 2922,3033 (CH _{alq}); 3451 (NH)

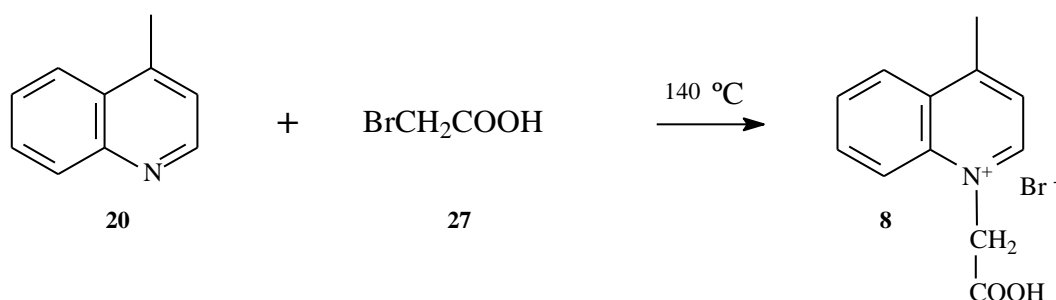
<p>RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) J (Hz)</p>	<p>10.42 (1H, s, NH); 8.75 (1H, s, CH); 8.17 (1H, d, $J = 13.8$ Hz, CH); 7.73 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, CH); 4.70 (2H, q, $J = 10.9$ Hz, NCH_2CH_3); 3.06 (3H, s, CH_3); 2.04 (3H, s, COCH_3); 1.45 (3H, t, $J = 11$ Hz, NCH_2CH_3)</p>
<p>RMN de ^{13}C (150.91 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm)</p>	<p>13.25 (CH_3); 16.44 (NCH_2CH_3); 24.10 (COCH_3); 44.67 (NCH_2); 112.96 (CH); 116.92 (CH); 121.04 (CH); 130.20 (C); 136.03 (C); 139.07 (C); 169.07 (C); 174.92 (COCH_3)</p>

3.2.2 Síntese de sais quaternários de amônio por fusão

O método escolhido para a síntese destes sais quaternários de amônio foi o método de fusão da mistura reaccional a $140\text{ }^\circ\text{C}$, uma vez que permite a obtenção de rendimentos razoáveis sem o uso de solventes orgânicos. O processo geral encontra-se já descrito no ponto (2.3.2).

Síntese do brometo de 1-(carboximetil)-4-metilquinolin-1-íon (8)

A síntese do brometo de 1-(carboximetil)-4-metilquinolin-1-íon (8) foi obtido após se fazer reagir a base heterocíclica lepidina (20) com um excesso do reagente alquilante ácido bromoacético (27) (Esquema 14).

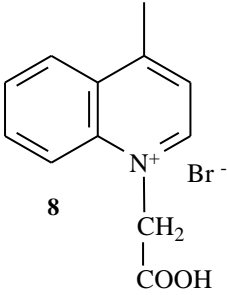


Esquema 14- Síntese do brometo de 1-(carboximetil)-4-metilquinolin-1-íon (8).

Os dados obtidos referentes à caracterização deste produto encontram-se resumidos na tabela 8.

O rendimento obtido foi de 63%, um rendimento razoável, isto deve-se ao facto de que apesar do cuidadoso controlo da temperatura realizado algum do material de partida se pode ter decomposto pela acção do calor. O espectro de RMN de ^1H apresenta os protões aromáticos pretendidos a 8 - 9.5 ppm, o pico de ressonância da ligação N-CH₂ a 6.01 ppm e os protões do grupo metilo a 3.06 ppm. Os resultados obtidos no RMN de ^{13}C demonstram a presença do carbono da ligação do N-CH₂ a 61.37 ppm, os carbonos aromáticos 120 - 165 ppm bem como o sinal característico da ligação C=O do ácido carboxílico a 170.85 ppm. O p.f. do composto apresenta um intervalo de fusão de cerca de 4° C, apresentando assim um bom grau de pureza. O espectro de IV do composto apresenta bandas características de ligações C=C aromáticos a 1585, 1532 e 1603 cm⁻¹ e presença de um grupo C=O a 1738 cm⁻¹.

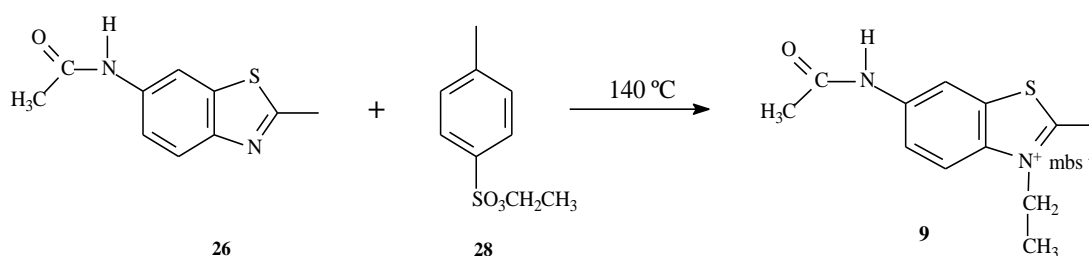
Tabela 8 - Caracterização física e espectroscópica do brometo de 1-(carboximetil)-4-metilquinolin-1-íon (8).

Composto	
η (%)	63
Pf (°C)	201.6 - 205.5
IV ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$):	1585, 1532, 1603 (C=C _{arom}); 1731 (C=O); 2981 (CH _{alq});
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	9.42 (1H, d, <i>J</i> = 6.7 Hz, CH); 8.58 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, CH); 8.41 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz, CH); 8.30 (1H, t, <i>J</i> = 8.6 Hz, CH); 8.16 (1H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz, CH); 8.10 (1H, t, <i>J</i> = 8.3 Hz, CH); 6.01 (2H, s, NCH ₂); 3.06 (3H, s, 4-CH ₃);

RMN de ^{13}C (150.91 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm)	23.74 (CH ₃); 61.37 (NCH ₂); 122.47 (CH); 126.67 (CH); 130.92 (CH); 133.33 (CH); 134.02 (CH); 139.85 (CH); 142.05 (C); 153.11 (C); 164.79 (C); 170.85 (C=O)
--	---

Síntese do 4-metilbenzenossulfonato de 6-acetamida-3-etil-2-metilbenzo[*d*]tiazol-3-*io* (9)

A síntese do sal (9) foi obtido através da reação entre a base heterocíclica N-(2-metilbenzo[*d*]tiazol-5-il)acetamida (26) com o reagente alquilante *p*-toluenossulfonato de etilo (28) (Esquema 15).



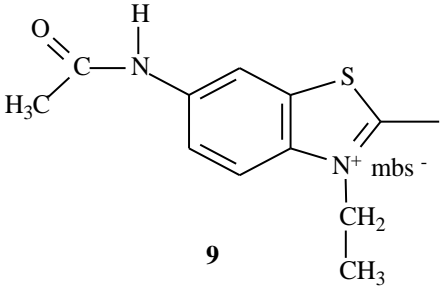
Esquema 15- Síntese do 4-metilbenzenossulfonato de 6-acetamida-3-etil-2-metilbenzo[*d*]tiazol-3-*io* (9).

Os dados espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 9.

O composto apresenta bandas características do composto pretendido: bandas características da ligação S=O do contra-íão a 1206 cm^{-1} , de ligações C=C aromáticos a 1484, 1547 e 1588 cm^{-1} , a ligação C=O a 1691 cm^{-1} , as bandas dos CH da cadeia alquímica a 3026 e 3111 cm^{-1} e da ligação N-H a 3492 cm^{-1} . O espectro de RMN de ^1H apresenta o número de prótons, obtido por integração, esperado teoricamente. Destacando-se a presença do próton do N-H a 10.53 ppm, o quarteto correspondente aos dois prótons do N-CH₂ a 4.69 ppm, os prótons do grupo metilo a 3.16 ppm, o grupo metilo da acetamida a 2.11 ppm, o tripleto do grupo metilo da cadeia alquímica a 1.45 ppm bem com os sinais dos prótons do contra-íão, a 7.11 e 7.48 dos aromáticos e o seu grupo metilo a 2.19 ppm. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta também todos os sinais. Destacando-se a presença do grupo metilo a 13.18 ppm, o grupo metilo da cadeia alquímica a 16.32 ppm, do grupo metilo da acetamida a 24.04 ppm, a ligação N-CH₂ a

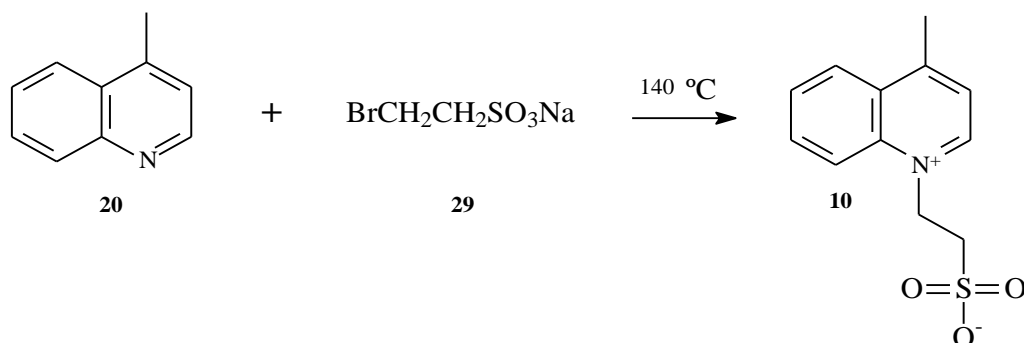
45.09 ppm e do C=O a 176.7 2 ppm. O p.f determinado para o sal (9) apresenta um intervalo de cerca de 1 °C, confirmando assim uma alta pureza.

Tabela 9 - Caracterização física e espectroscópica do 4-metilbenzenossulfonato de 6-acetamida-3-etil-2-metilbenzo[d]tiazol-3-io (9).

Composto	 <p style="text-align: center;">9</p>
η (%)	68
Pf (°C)	174.8 - 175.9
IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$):	1206 (S=O); 1484, 1547, 1588 (C=C _{arom}); 1691 (C=O); 3026, 3111 (CH _{alq}); 3492 (NH)
RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	10.53 (1H, s, NH); 8.84 (1H, s, CH); 8.24 (1H, d, <i>J</i> = 12.9 Hz, CH); 7.83 (1H, d, <i>J</i> = 10.4 Hz, CH); 7.48 (2H, d, <i>J</i> = 11.4 Hz, 2xCH); 7.11 (2H, d, <i>J</i> = 11.3 Hz, 2xCH); 4.69 (2H, q, <i>J</i> = 9.4 Hz, NCH ₂); 3.16 (3H, s, CH ₃); 2.29 (3H, s, CH ₃); 2.11 (3H, s, COCH ₃); 1.45 (3H, t, <i>J</i> = 8.6 Hz, NCH ₂ CH ₃)
RMN de ¹³ C (150.91 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	13.18 (2-CH ₃); 16.32 (NCH ₂ CH ₃); 21.21 (CH ₃); 24.04 (COCH ₃); 45.09 (NCH ₂); 109.56 (2xCH); 113.37 (CH); 117.36 (CH); 121.51 (CH); 130.16 (C); 135.99 (C); 137.58 (2xC); 139.06 (C); 170.43 (C); 176.72 (COCH ₃)

Síntese do 4-metil-1-(2-sulfoetil)quinolin-1-íio (10)

A reacção de fusão da base heterocíclica lepidina (20) com o reagente alquilante ácido 2-bromoetanosulfónico (sal de sódio) (29) em excesso formou o sal de amónio quaternário (10) (Esquema 16).



Esquema 16- Síntese do 4-metil-1-(2-sulfoetil)quinolin-1-íio (10).

Não foi possível determinar o p.f., devido a possível decomposição do grupo SO_3^- . Todos os dados obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 10. O espectro de RMN de ^1H apresenta o número de prótons, obtido por integração, esperado teoricamente. Destacando-se a presença dos prótons aromáticos entre 8 e 9 ppm, da ligação N- CH_2 a 5.24 ppm, os prótons da ligação N- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ a 3.41 ppm e os prótons do grupo metilo a 2.99 ppm. O RMN de ^{13}C confirma também a presença dos sinais esperados teoricamente, com especial importância a presença dos três carbonos quaternários a 135 - 155 ppm, o carbono da ligação do N- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ a 55.19 ppm e o carbono da ligação N- CH_2 a 55.67 ppm. O espectro IV do composto apresenta bandas da ligação S=O a 1320 cm^{-1} , as vibrações das ligações C=C aromáticos a 1575 cm^{-1} , a ligação C=O a 1738 cm^{-1} e as bandas dos CH da cadeia alquílica a 2963 cm^{-1} . O rendimento da reacção foi um pouco inferior a 50%, muito provavelmente devido ao facto de que, apesar do cuidadoso controlo da temperatura realizado, algum material de partida se pode ter decomposto pela acção do calor.

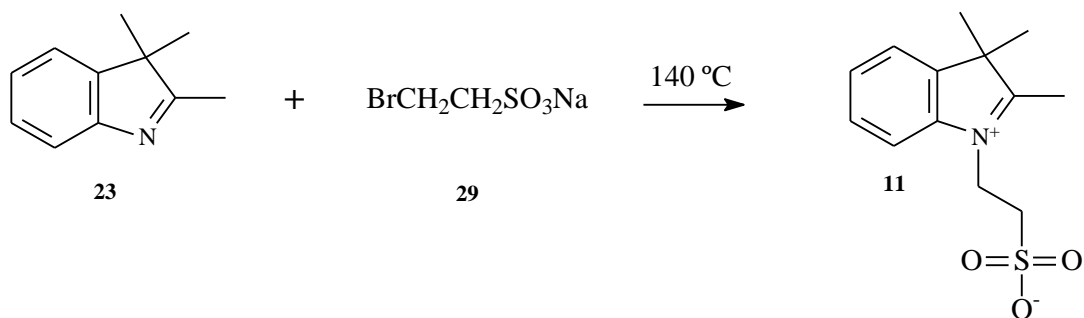
Tabela 10 - Caracterização física e espectroscópica do 4-metil-1-(2-sulfoetil)quinolin-1-íio (10).

Composto	<p>10</p>
----------	-----------

η (%)	42
Pf (°C)	dec.
IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$):	1320 (S=O); 1575 (C=C _{arom}); 2963 (CH _{alq})
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) J (Hz)	9.32 (2H, d, $J = 6.1$ Hz, 2xCH); 8.56 - 8.48 (1H, m, CH); 8.30 - 8.22 (1H, m, CH); 8.03 (2H, d, $J = 14.0$ Hz, 2xCH); 5.24 (2H, t, $J = 8.1$ Hz, NCH ₂); 3.41 (2H, t, $J = 7.9$ Hz, NCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻); 2.99 (3H, s, CH ₃)
RMN de ^{13}C (150.91 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm)	21.38 (CH ₃); 55.19 (NCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻); 55.67 (NCH ₂); 124.03 (CH); 126.23 (CH); 128.78 (CH); 129.95 (CH); 132.48 (CH); 135.77 (C); 143.61 (C); 147.93 (CH); 152.85 (C)

Síntese do 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)indol-1-íon (11)

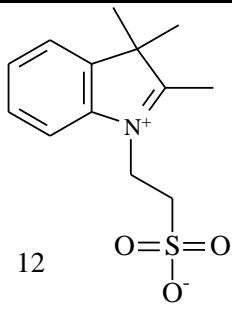
A síntese do sal 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)indol-1-íon (11) consistiu na reacção da base heterocíclica 2,3,3-trimetilindolenina (23) com o reagente alquilante ácido 2-bromoetanosulfónico (sal de sódio) (29) em excesso (Esquema 17).



Esquema 17. Síntese do 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)indol-1-íon (11).

O composto apresenta bandas características do composto pretendido: bandas características da ligação S=O a 1346 cm^{-1} , das ligações C=C aromáticos a 1581 cm^{-1} e as bandas dos CH da cadeia alquímica a 2970 cm^{-1} . O p.f. para este sal, tal como para o sal (10), não foi possível determinar pela possível decomposição do grupo SO_3^- . O rendimento da reacção, tal como para o sal (10) foi um pouco inferior a 50%, muito provavelmente devido ao facto de que, apesar do cuidadoso controlo da temperatura realizado, o material de partida pode-se decompor pela acção do calor. O espectro de RMN de ^1H apresenta a ressonância dos prótons aromáticos a 7.5 - 8 ppm, os da ligação N-CH₂ a 4.61 ppm, os do grupo metilo da posição 2 a 2.81 ppm, os da ligação N-CH₂-CH₂-SO₃⁻ a 2.54 ppm e os dois grupos metilo da posição 3 a 1.48 - 1.36 ppm. O RMN de ^{13}C apresenta o sinal dos oito carbonos aromáticos a campo alto, o sinal do carbono do N-CH₂-CH₂-SO₃⁻ a 48.73 ppm e o sinal do carbono do N-CH₂ a 50.06 ppm. Tanto o espectro de RMN de ^1H e o ^{13}C apresentaram todos os sinais teoricamente esperados para o sal 11. Os dados espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 11.

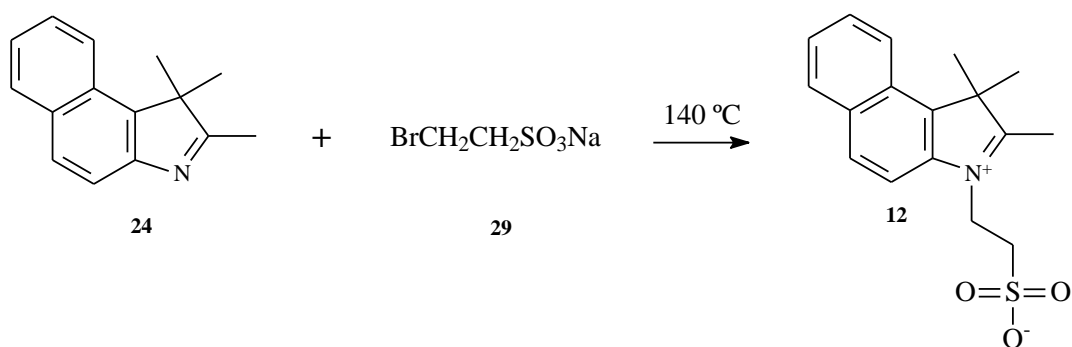
Tabela 11 - Caracterização física e espectroscópica do 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)indol-1-íon (11)

Composto	 12
η (%)	42
Pf (°C)	dec.
IV ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$):	1346 (S=O); 1581 (C=C _{arom}); 2970 (CH _{alq})
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) J (Hz)	7.84 - 7.77 (1H, m, CH); 7.75 - 7.69 (1H, m, CH); 7.57 - 7.48 (2H, m, 2xCH); 4.61 (2H, t, J = 6.9 Hz, NCH ₂); 2.81 (3H, s, CH ₃); 2.54 (2h, t, J = 6.9 Hz, NCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻); 1.48 - 1.36 (6H, m, 2xCH ₃)

RMN de ^{13}C (150.91 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm)	13.68 (CH_3); 23.77 ($2\times\text{CH}_3$); 48.73 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$); 50.06 (NCH_2); 113.75 (CH); 117.68 (C); 124.85 (CH); 125.51 (CH); 128.79 (CH); 138.91 (C); 140.34 (C); 203.47 (C);
---	---

Síntese do 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)-1H-benzo[e]indol-1-íon (12)

O sal 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)-1H-benzo[e]indol-1-íon (12) foi obtido através da reacção de alquilação da base heterocíclica 1,1,2-trimetil-benz(o)indole (24) com o reagente alquilante ácido 2-bromoetanosulfónico (sal de sódio) (29) (Esquema 18).

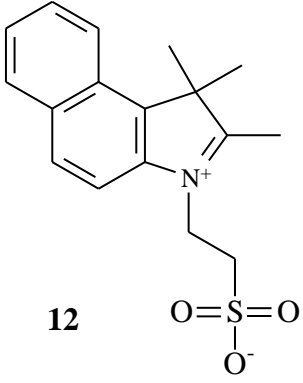


Esquema 18- Síntese do 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)-3H-indol-1-íon (12).

Os dados espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 12.

O composto apresenta bandas características do composto pretendido: bandas características da ligação S=O a 1226 cm^{-1} , das ligações C=C aromáticos a 1521 e 1552 cm^{-1} e as bandas dos CH da cadeia alquímica a 2918 cm^{-1} . O espectro de RMN de ^1H apresenta o número de prótons, obtido por integração, esperado teoricamente. Destacando-se a presença dos prótons da zona aromática a 6.5 - 8 ppm, dos prótons da ligação N-CH₂ a 4.40 ppm, dos prótons da ligação N-CH₂.CH₂.SO₃⁻ a 2.09 ppm, os prótons do grupo metilo da posição 2 a 1.96 ppm e os prótons dos dois grupos metilo da posição 3 a 1.43 ppm. O espectro de RMN ^{13}C apresentou também os sinais esperados teoricamente. Destacando-se o sinal do carbono do metilo da posição 2 a 13.78, os carbonos dos metilos da posição 3 a 26.37 e a ligação do N-CH₂ a 35.67 ppm, do N-CH₂.CH₂.SO₃⁻ a 51.19 ppm. O p.f. como para os últimos dois sais descritos (10 e 11), não foi possível de determinar devido a possível decomposição do grupo SO₃⁻. O rendimento da reacção, devido ao possível problema que o sais (10 e 11) também apresentaram, foi um pouco inferior a 50%.

Tabela 12 - Caracterização física e espectroscópica do 2,3,3-trimetil-1-(2-sulfoetil)-3H-indol-1-íio (12).

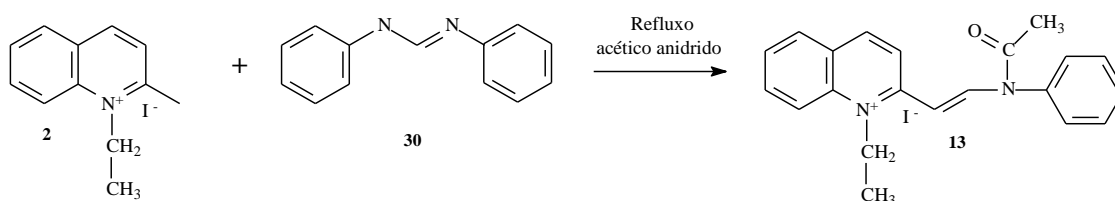
Composto	 <p style="text-align: center;">12</p>
η (%)	56
Pf (°C)	dec.
IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$):	1226 (S=O); 1521,1552 (C=C _{arom}); 2918 (CH _{alq})
RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) J (Hz)	1.43 - 1.40 (6H, m, 2xCH ₃); 1.96 (3H, s, CH ₃); 2.09 (2H, t, <i>J</i> = 7.1 Hz, NCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻); 4.4 (2H, t, <i>J</i> = 6.9 Hz, NCH ₂); 6.82 (1H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz, CH); 7.05 (1H, d, <i>J</i> = 7.4 Hz, CH); 7.14 (1H, t, <i>J</i> = 7.9 Hz, CH); 7.18 (1H, d, <i>J</i> = 7.8 Hz, CH); 7.25 (1H, d, <i>J</i> = 7.7 Hz, CH); 7.68 (1H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz, CH)
RMN de ¹³ C (150.91 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	13.78 (CH ₃); 26.37 (2xCH ₃); 35.67 (NCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻); 51.19 (NCH ₂); 61.21 (C); 106.14 (CH); 124.68 (CH); 125.21 (CH); 125.93 (CH); 128.41 (CH); 131.33 (C); 132.48 (C); 137.12 (CH); 138.81 (C); 143.26 (C); 195.00 (C)

3.2.3 Síntese de sais intermediários com cadeias alquílicas

O método escolhido para a síntese destes sais intermediários foi o método em que se utiliza a mistura de um sal quaternário de amônio com a *N,N'*-difenílformamidina. O processo geral encontra-se já descrito no ponto (2.3.3).

Síntese do iodeto de (*E*)-1-etil-2-(2-(*N*-fenilacetamida)vinil)quinolin-1-io (13)

A síntese do iodeto de (*E*)-1-etil-2-(2-(*N*-fenilacetamida)vinil)quinolin-1-io (13) consistiu na reacção do sal quaternário de amônio [1-etil-2-metilquinolin-1-io (2)] com o reagente *N,N'*-D-fenílformamidina (30) (Esquema 19).



Esquema 19. Síntese do iodeto (*E*)-1-etil-2-(2-(*N*-fenilacetamida)vinil)quinolin-1-io (13).

Tanto no espectro de RMN de ^1H como no de ^{13}C apresentam o número de prótons e carbonosesperado teoricamente, respectivamente. No espectro de RMN de próton destaca-se a presença dos prótons aromáticos de ligação do grupo fenilacetamida ao anel aromático, os da ligação N-CH_2 a 4.52 ppm, o grupo metilo da acetamida a 2.15 ppm e os prótons do grupo metilo da cadeia alquílica a 1.19 ppm. O RMN de ^{13}C apresenta o sinal característico da presença do grupo metilo da cadeia alquílica a 13.25 ppm, do grupo metilo da acetamida a 23.71 ppm, da ligação N-CH_2 a 48.02 ppm e a do C=O a 169.94 ppm. O p.f. para este composto foi de 200.5 - 204.7 °C, apresentando assim uma boa pureza. Os restantes dados obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 13.

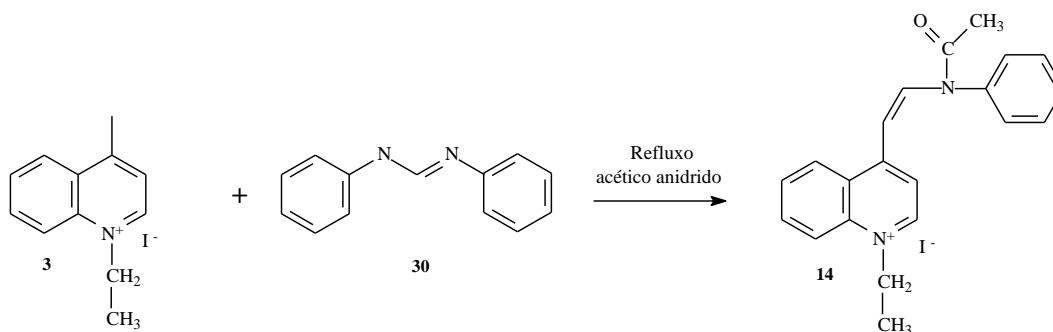
Tabela 13 - Caracterização física e espectroscópica do iodeto (*E*)-1-etil-2-(2-(*N*-fenilacetamida)vinil)quinolin-1-io (13).

Composto	<p>13</p>
----------	-----------

η (%)	63
Pf (°C)	200.5 - 204.7 °C
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) J (Hz)	8.97 (1H, d, $J = 13.7$ Hz, CH); 8.90 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, CH); 8.51 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, CH); 8.38 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, CH); 8.31 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, CH); 8.09 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, CH); 7.90 - 7.83 (1H, m, CH); 7.74 - 7.68 (2H, m, 2xCH); 7.65 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, CH); 7.58 - 7.52 (2H, m, 2xCH); 5.55 (1H, t, $J = 9.9$ Hz, CH); 4.52 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, NCH ₂ CH ₃); 2.15 (3H, s, CH ₃); 1.19 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, NCH ₂ CH ₃)
RMN de ^{13}C (150.91 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm)	13.43 (NCH ₂ CH ₃); 23.71 (COCH ₃); 48.02 (NCH ₂); 101.62 (CH); 118.81 (CH); 127.03 (CH); 127.41 (C); 127.62 (CH); 128.19 (CH); 128.89 (CH); 130.23 (C); 130.60 (CH); 131.27 (CH); 135.57 (CH); 137.20 (CH); 138.33 (CH); 144.36 (C); 155.26 (C); 169.94 (COCH ₃)

Síntese do iodeto de (Z)-1-etil-4-(2-(*N*-fenilacetamida)vinil)quinolin-1-íio (14)

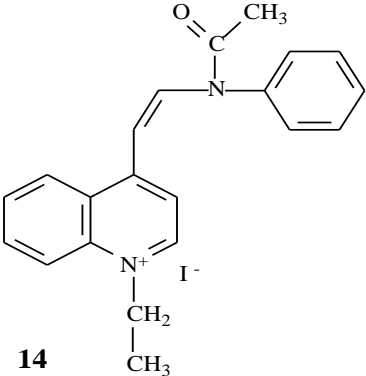
A síntese do sal (14) intermediário consistiu na reacção do sal quaternário de amónio [1-etil-4-metilquinolin-1-íio (3)] com o reagente *N,N'*-*D*-fenilformamidina (30) (Esquema 20).



Esquema 20. Síntese do iodeto de (Z)-1-etil-4-(2-(*N*-fenilacetamida)vinil)quinolin-1-íio (14).

O p.f. obtido para este composto foi de 214.7 - 217.3 °C, indicando assim um bom grau de pureza do composto obtido. Os dados espectroscópicos, rendimento e p.f. obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 14. O espectro de RMN de ^1H apresenta a presença dos catorze prótons aromáticos esperados teoricamente, bem como o tripleto da ligação N-CH₂ a 4.95 ppm, o grupo metilo da acetamida a 2.09 ppm e o quarteto do grupo metilo da cadeia alquílica a 1.54 ppm. O RMN de ^{13}C apresenta o sinal característico da presença do grupo metilo da cadeia alquílica a 15.72 ppm, do grupo metilo da acetamida a 23.63 ppm, da ligação N-CH₂ a 52.84 ppm e a do C=O a 169.85 ppm. O rendimento foi relativamente baixo, possível consequência das sucessivas recristalizações necessárias para a obtenção de um produto bastante puro.

Tabela 14 - Caracterização física e espectroscópica da síntese do iodeto de (Z)-1-etil-4-(2-(N-fenilacetamida)vinil)quinolin-1-íio (**14**)

Composto	 <p style="text-align: center;">14</p>
η (%)	24
Pf (°C)	214.7 - 217.3
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) J (Hz)	9.22 (1H, d, J = 6.6 Hz, CH); 8.90 (1H, d, J = 13.9 Hz, CH); 8.47 (1H, d, J = 8.9 Hz, CH); 8.39 (1H, d, J = 6.6 Hz, CH); 8.20 - 8.14 (1H, m, CH); 7.94 (1H, d, J = 8.0 Hz, CH); 7.90 - 7.86 (1H, m, CH); 7.71 (2H, t, J = 7.5 Hz, 2xCH); 7.65 (1H, t, J = 7.4 Hz, CH); 7.54 (2H, d, J = 7.5 Hz, 2xCH); 6.05 (1H, d, J = 14.0 Hz, CH); 4.95 (2H, q, J = 7.2 Hz, NCH ₂ CH ₃); 2.09 (3H, s, CH ₃); 1.54 (3H, t, J = 7.2 Hz, NCH ₂ CH ₃)

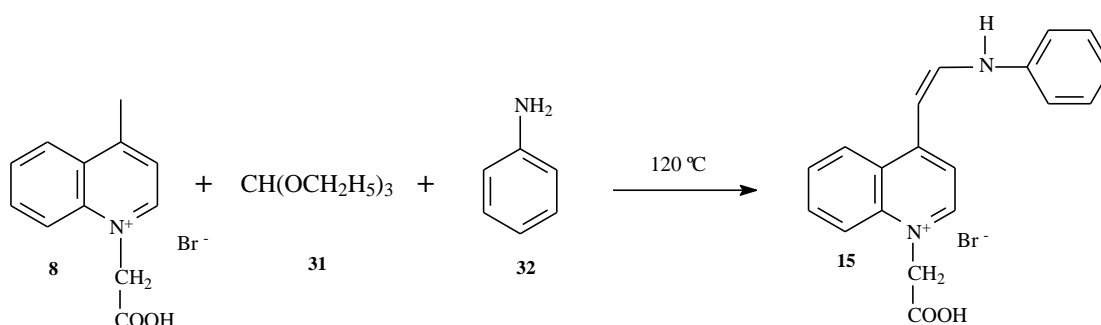
<p>RMN de ^{13}C (150.91 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm)</p>	<p>15.72 (NCH₂CH₃); 23.61 (CH₃); 52.84 (NCH₂); 103.57 (CH); 115.39 (CH); 118.82 (CH); 125.75 (CH); 126.51 (C); 128.33 (CH); 129.18 (CH); 130.31 (CH); 131.09 (CH); 135.54 (CH); 137.62 (CH); 137.81 (CH); 140.60 (C); 146.92 (C); 153.90 (C); 169.85 (COCH₃)</p>
--	---

3.2.4 Síntese de sais intermediários com cadeias carboxi-alquílicas

O método escolhido para a síntese destes sais intermediários foi o método em que se utiliza a mistura de um sal quaternário de amónio com o trietilortoformato e a anilina. O processo geral encontra-se já descrito no ponto (2.3.4).

Síntese do brometo (*E*)-1-(10-carboximetil)-4-(2-(fenilamino)vinil)quinolin-1-íio (15)

A reacção do sal quaternário de amónio [brometo de 1-(carboximetil)-4-metilquinolin-1-íio (8)] com o reagentes trietilortoformato (31) e anilina (32) levou a formação do sal intermediário (15) (Esquema 21).

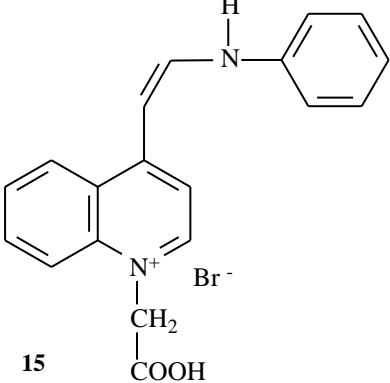


Esquema 21. Síntese do brometo (*Z*)-1-(10-carboximetil)-4-(2-(fenilamina)vinil)quinolin-1-íio (15).

O rendimento da reacção foi razoavelmente bom, tendo possivelmente havido algum material de partida que não reagiu e alguma perda nas recristalizações efectuadas. O espectro de RMN de ^1H apresenta o número de prótons, obtido por integração, esperado teoricamente. Destacando-se a presença da ressonância da ligação N-H a 9.53 ppm, dos prótons aromáticos

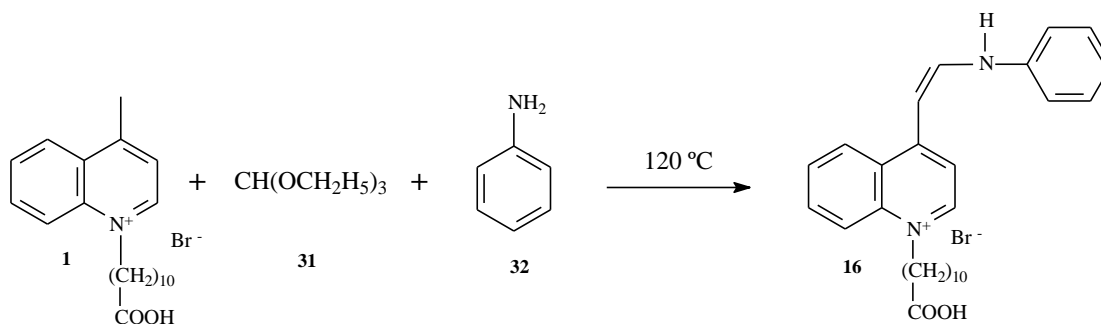
entre os 6.5 e os 8.8 ppm e os prótons da ligação N-CH₂ a 4.58 ppm. O RMN de ¹³C apresenta o sinal característico da presença da ligação N-CH₂ a 67.71 ppm, a do C=O a 166.40 ppm bem como todos os carbonos aromáticos a 115- 150 ppm. Os dados espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 15.

Tabela 15 - Caracterização física e espectroscópica do brometo (Z)-1-(10-carboximetil)-4-(2-(fenilamina)vinil)quinolin-1-íio (**15**).

Composto	 <p style="text-align: center;">15</p>
η (%)	76
RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) J (Hz)	9.53 (1H, s, NH); 8.78 (1H, d, <i>J</i> = 11.8 Hz, CH); 8.48 (1H, d, <i>J</i> = 7.4 Hz, CH); 8.22 (1H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz, CH); 8.15 (1H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz, CH); 8.11 (1H, d, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH); 8.07 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, CH); 7.75 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz, CH); 7.20 - 7.34 (4H, m, 4xCH); 7.18 (1H, t, <i>J</i> = 7.1 Hz, CH); 6.87 (1H, d, <i>J</i> = 12.4 Hz, CH); 4.58 (2H, s, <i>J</i> = 7.1 Hz, NCH ₂ COOH)
RMN de ¹³ C (150.91 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	67.71 (NCH ₂); 118.38 (CH); 122.61 (2xCH); 129.63 (C); 130.89 (2xCH); 130.27 (CH); 130.67 (2xCH); 131.67 (CH); 132.41 (2xCH); 138.39 (CH); 141.88 (C); 142.09 (C); 142.73 (CH); 143.97 (C); 166.40 (COOH)

Síntese do brometo (*E*)-1-(10-carboxidecil)-4-(2-(fenilamino)vinil)quinolin-1-íon (16)

A síntese do sal intermediário (16) consistiu na reacção do sal quaternário de amónio [1-(10-carboxidecil)-4-metilquinolin-1-íon (1)] com os reagentes trietilortoformiato (31) e anilina (32) (Esquema 22).



Esquema 22 - Síntese do brometo (*Z*)-1-(10-carboxidecil)-4-(2-(fenilamina)vinil)quinolin-1-íon (16).

O rendimento obtido para esta reacção foi bom, tendo-se isolado o produto sob a forma de um óleo (avermelhado). Os dados espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 16. O espectro de RMN de ^1H bem como o de ^{13}C apresentam o número de prótons e carbonos, respectivamente, esperado teoricamente. No espectro de RMN de próton destaca-se a presença do próton da ligação N-H a 9.69 ppm, os treze prótons aromáticos a 6.50 - 9.00 ppm, o tripleto da ligação N-CH₂ a 4.63 ppm e os prótons da cadeia alquílica a 1.23 - 1.48 ppm. No espectro de RMN de ^{13}C destaca-se a presença dos sinais dos CH₂ da cadeia alquílica a 14.00 - 24.00 ppm, o próton característico da ligação N-CH₂ a 65.87 ppm, os sinais dos carbonos aromáticos a 115.00 - 145.00 ppm e o sinal do C=O a 167.78 ppm.

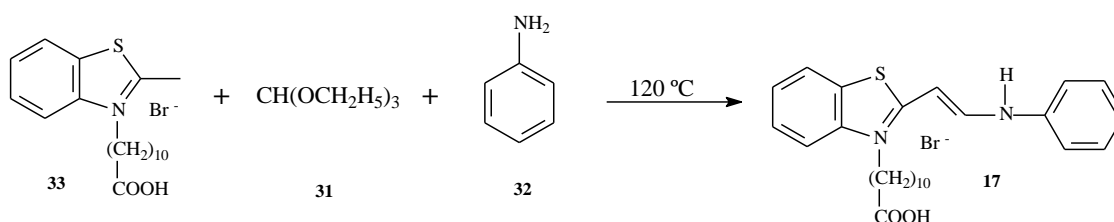
Tabela 16 - Caracterização física e espectroscópica brometo (*Z*)-1-(10-carboxidecil)-4-(2-(fenilamina)vinil)quinolin-1-íon (16).

Composto	<p>16</p>
----------	-----------

η (%)	81
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) J (Hz)	9.69 (1H, s, NH); 8.91 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, CH); 8.65 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, CH); 8.32 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, CH); 8.20 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, CH); 8.12 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, CH); 8.04 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, CH); 7.82 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, CH); 7.44 - 7.31 (4H, m, 4xCH); 7.14 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, CH); 6.77 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, CH); 4.63 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, NCH_2COOH); 1.48 - 1.32 (6H, m, $(\text{CH}_2)_3$); 1.23 (12H, s, $(\text{CH}_2)_6$)
RMN de ^{13}C (150.91 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm)	14.06 (CH_2); 14.24 (CH_2); 14.76 (CH_2); 15.06 ($2\times\text{CH}_2$); 15.28 ($2\times\text{CH}_2$); 22.99 (CH_2); 23.75 (CH_2); 65.87 (NCH_2); 117.38 ($2\times\text{CH}$); 123.48 ($2\times\text{CH}$); 128.81 (C); 129.63 ($2\times\text{CH}$); 131.21 ($4\times\text{CH}$); 133.68 (CH); 139.21 (CH); 141.28 (C); 141.96 (C); 142.68 (CH); 144.27 (C); 167.78 (COOH)

Síntese do brometo (*E*)-3-(10-carboxidecil)-2-(2-(fenilamino)vinil) benzo[*d*]tiazol-3-io (17)

A reacção do sal quaternário de amónio brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzo[*d*]tiazol-3-io (33) com os reagentes trietilortoformiato (31) e anilina (32) formou o sal intermediário (17) (Esquema 23).

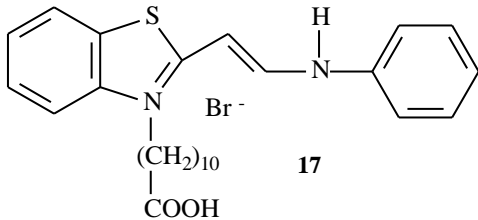


Esquema 23 - Síntese do brometo (*Z*)-1-(10-carboxidecil)-4-(2-(fenilamina)vinil)quinolin-1-io (17).

O rendimento e os dados espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 17.

O espectro de RMN de ^1H apresenta o número de prótons, obtido por integração, esperado teoricamente. Destacando-se a presença do próton da ligação N-H a 11.96 ppm, os onze prótons aromáticos a 6.00 - 9.00 ppm, o tripleto da ligação N-CH₂ a 4.41 ppm e os prótons da cadeia alquílica a 1.17 - 1.49 ppm. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta todos os sinais de carbono esperados teoricamente. Apresenta os sinais dos CH₂ da cadeia alquílica a 20.00 - 35.00 ppm, o próton característico da ligação N-CH₂ a 43.62 ppm, os sinais dos carbonos aromáticos a 115.00 - 165.00 ppm e o sinal do C=O a 178.15 ppm. O p.f. obtido para este composto foi de 142.2 - 144.1 ° C, o pequeno intervalo de fusão demonstra que o composto tem um bom grau de pureza.

Tabela 17 - Caracterização física e espectroscópica da síntese do brometo (E)-3-(10-carboxidecil)-2-(2-(fenilamina)vinil)benzo[d]tiazol-3-io (17).

Composto	 <p style="text-align: center;">17</p>
η (%)	38
Pf (°C)	142.2 - 144.1
RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) J (Hz)	11.96 (1H, s, NH); 8.67 (1H, d, J = 11.7 Hz, CH); 8.15 (1H, d, J = 7.9 Hz, CH); 7.94 (1H, t, J = 10.2 Hz, CH); 7.66 (1H, t, J = 7.8 Hz, CH); 7.53 (1H, t, J = 7.6 Hz, CH); 7.51 - 7.42 (4H, m, 4xCH); 7.22 (1H, t, J = 6.8 Hz, CH); 6.43 (1H, d, J = 11.9 Hz, CH); 4.41 (2H, t, J = 7.5 Hz, NCH ₂); 1.49 - 1.42 (6H, m, (CH ₂) ₃); 1.17 (12H, s, (CH ₂) ₆)

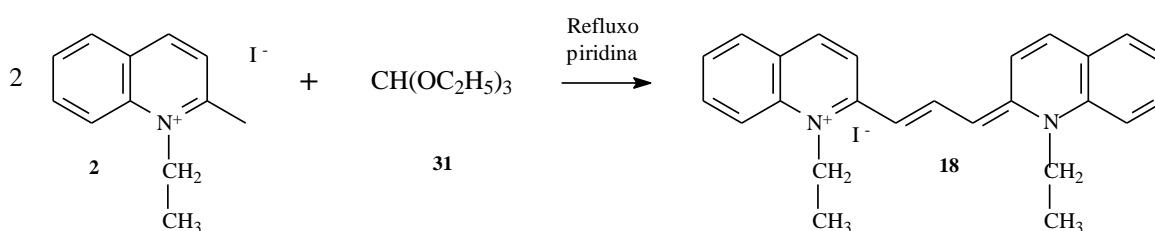
RMN de ^{13}C (150.91 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm)	23.76 (CH_2); 26.48 (CH_2); 28.87 ($4\times\text{CH}_2$); 30.95 ($2\times\text{CH}_2$); 34.64 (CH_2); 43.66 (NCH_2); 89.14 (CH); 118.38 ($2\times\text{CH}$); 121.81 (CH); 123.29 (CH); 126.31 (CH); 126.91 (CH); 127.58 (CH); 130.27 ($2\times\text{CH}$); 133.88 (C); 138.96 (C); 141.61 (C); 148.67 (C); 164.58 (CH); 178.11 (COOH)
--	--

3.2.5 Síntese de carbocianinas simétricas

O método escolhido para a síntese das carbocianinas foi o método em que se utiliza a mistura de um sal quaternário de amónio com o trietilortoformiato em refluxo de piridina. O processo geral encontra-se já descrito no ponto (2.3.5).

Síntese do iodeto de 1-etil-2-((1*E*,3*Z*)-3-(1-etilquinolin-2(1*H*)-ilideno)prop-1-en-1-il)quinolin-1-íio (18)

A síntese da carbocianina (18) consistiu na reacção do sal quaternário de amónio 1-etil-2-metilquinolin-1-íio (2) com o reagente trietilortoformiato (31) (Esquema 24).



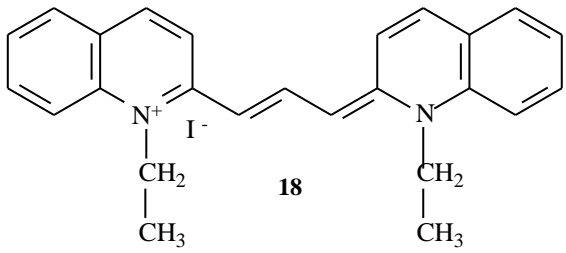
Esquema 24 - Síntese do iodeto de 1-etil-2-((1*E*,3*E*)-3-(1-etilquinolin-2(1*H*)-ilideno)prop-1-en-1-il)quinolin-1-íio (18).

Os dados espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 18.

Obteve-se um intervalo de 284.8 - 287.4 °C para o p.f. deste composto, apresentando assim um bom grau de pureza. O espectro de RMN de ^1H apresenta todos os sinais esperados

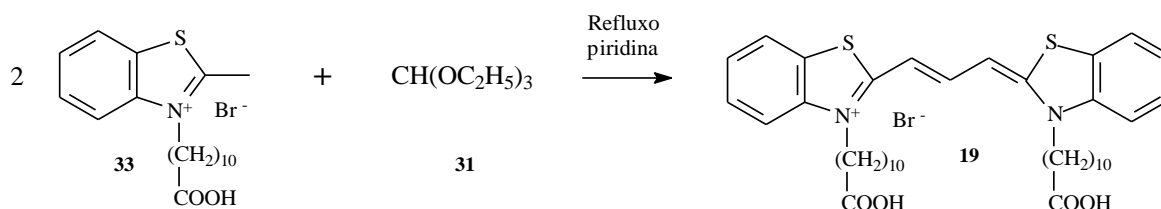
teoricamente. Destacando-se a presença dos prótons dos grupos aromáticos a 6.50 - 9.00 ppm, o quarteto das ligações N-CH₂ a 4.10 ppm e tripleto dos metilos das cadeias alquílicas a 1.43 ppm. O RMN de ¹³C apresenta a presença de uma zona alifática (12.00 - 17.00 ppm), o sinal característico da presença das ligações dos N-CH₂ a 29.72 e 43.84 ppm e de uma zona de carbonos aromáticos e heteroaromáticos (100-155 ppm).

Tabela 18 - Caracterização física e espectroscópica da síntese do iodeto de 1-etil-2-((1E,3E)-3-(1-etilquinolin-2(1H)-ilidene)prop-1-en-1-il)quinolin-1-íio (**18**).

Composto	
η (%)	63
Pf (°C)	284.8 - 287.4
RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm) J (Hz)	8.69 (1H, t, J = 12.7 Hz, CH); 8.30 (2H, d, J = 9.6 Hz, 2xCH); 7.99 (2H, d, J = 9.5 Hz, 2xCH); 7.90 - 7.80 (4H, m, 4xCH); 7.79 - 7.69 (2H, m, 2xCH); 7.44 (2H, t, J = 7.4 Hz, 2xCH); 6.58 (2H, d, J = 12.7 Hz, 2xCH); 4.10 (4H, q, J = 5.2 Hz, 2xNCH ₂); 1.43 (6H, t, J = 7.0 Hz, 2xNCH ₂ CH ₃)
RMN de ¹³ C (150.91 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	12.95 (NCH ₂ CH ₃); 17.10 (NCH ₂ CH ₃); 29.72 (NCH ₂); 43.84 (NCH ₂); 105.72 (2xCH); 115.24 (2xCH); 121.01 (4xCH); 124.83 (2xCH); 128.51 (4xCH); 129.23 (CH); 132.17 (2xC); 139.05 (C); 144.88 (2xC); 152.26 (C)

Síntese do brometo 3-(10-carboxidecil)-2-(3-(3-(10-carboxidecil)-3H-benzo[d]tiazol-2-ilideno)prop-1-en-1-il)benzo[d]tiazol-3-io (19)

A reacção do sal quaternário de amónio brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzo[d]tiazol-3-io (1) com o reagente trietilortoformiato (2) durante uma hora (Esquema 25).



Esquema 25- Síntese do brometo 3-(10-carboxidecil)-2-(3-(3-(10-carboxidecil)-3H-benzo[d]tiazol-2-ilideno)prop-1-en-1-il)benzo[d]tiazol-3-io (19)

Os dados espectroscópicos obtidos na caracterização deste composto encontram-se resumidos na tabela 19. O espectro de RMN de ^1H apresenta o número de prótons, obtido por integração, esperado teoricamente. Destacando-se a presença dos prótons da ligação N-CH₂ a 4.34 ppm e os prótons das cadeias alquílicas a 1.44 - 1.36 ppm. O RMN de ^{13}C apresenta o sinal característico da presença das ligações dos N-CH₂ a 33.50 e 47.12 ppm e a presença do sinal do C=O a 174.5 ppm. A reacção teve um rendimento razoável, tendo em conta as sucessivas recristalizações a que foi sujeito. O p.f. obtido coincide com o experimental de referência, teve um intervalo de 133.9 - 135 .1 °C.

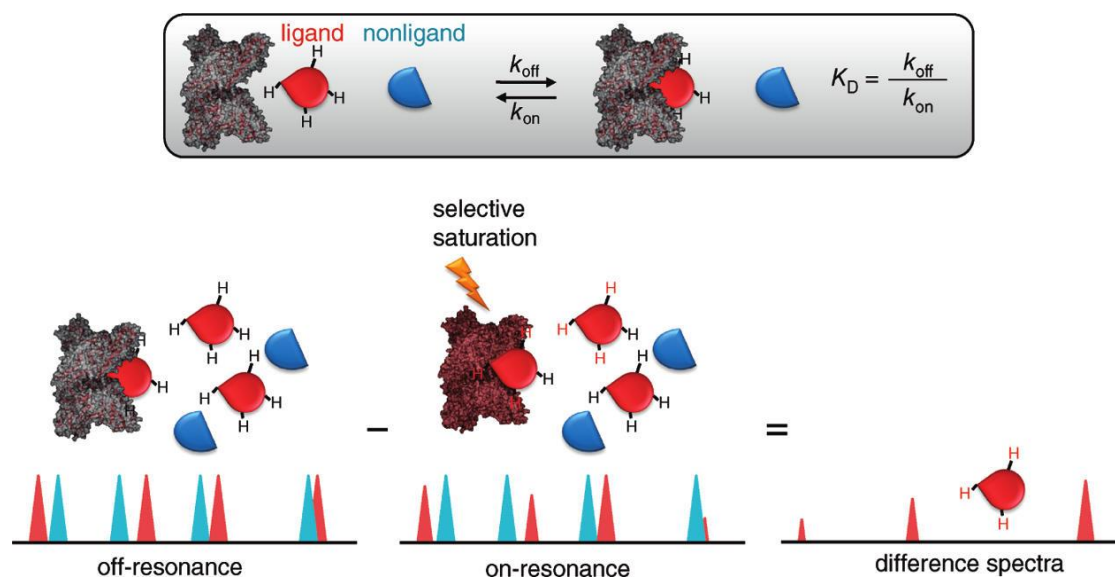
Tabela 18 - Caracterização física e espectroscópica do brometo 3-(10-carboxidecil)-2-(3-(3-(10-carboxidecil)-3H-benzo[d]tiazol-2-ilideno)prop-1-en-1-il)benzo[d]tiazol-3-io (19).

Composto	
η (%)	58

Pf (°C)	133.9 - 135 .1 °C
RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm) J (Hz)	8.01 (2H, d, J = 7.8 Hz, 2xCH); 7.78 (4H, d, J = 8.4 Hz, 4xCH); 7.58 (1H, t, J = 7.7 Hz, CH); 7.43 (2H, t, J = 7.6 Hz, 2xCH); 6.63 (2H, d, J = 12.6 Hz, 2xCH); 4.34 (4H,s, 2xNCH ₂); 1.44 - 1.39 (12H, m, (CH ₂) ₆); 1.36 (24H, s, (CH ₂) ₁₂)
RMN de ¹³ C (150.91 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	24.2 (2xCH ₂); 25.7 (2xCH ₂); 26.7 (2xCH ₂); 27.1 (2xCH ₂); 28.2 (2xCH ₂); 28.4 (4xCH ₂); 28.5 (4xCH ₂); 33.5 (NCH ₂); 47.12 (NCH ₂); 102.3 (CH); 111.3 (2xCH); 115.24 (2xCH); 122.2 (2xCH); 124.9 (2xCH); 128.4 (CH); 140.5 (2xC); 141.8 (C); 144.88 (2xC); 149.5 (CH); 173.7 (C); 174.5 (2xCOOH)

3.3 RMN-STD

A interação entre os cinco sais quaternários de amônio e as proteínas lisozima e RNase foi estudada por RMN-STD. A técnica de RMN-STD resulta da diferença entre o espectro de transferência de saturação e o espectro de RMN usual. A solução de proteína é seletivamente irradiada a uma frequência afastada do sinal mais próximo do sal - espectro *on-resonance*. Caso o sal esteja ligado à proteína, ocorre transferência de saturação, dependente do tempo de contacto entre a proteína e o sal. De seguida, efetuou-se uma nova irradiação, para valores de frequência afastados de qualquer sinal (proteína ou ligando) - espectro *off-resonance*. Através da subtração do espectro *on-resonance* e o espectro *off-resonance* resulta um espectro contendo unicamente os sinais dos prótons do sal que efetivamente se ligou à proteína (Esquema 26).



Esquema 27- Esquema da técnica RMN-STD.

Os espectros de RMN-STD obtidos para os complexos sal-proteína e os respectivos espectros de referência são apresentados nas figuras 5, 6, 7, 8 e 9. Os sais quaternários de amônio têm diferentes propriedades heterocíclicas, grupos funcionais e cadeias carboxi-alquílicas e demonstraram diferentes tipos de interação com as proteínas. Todos os sais quaternários demonstraram interação nos espectros de RMN-STD, os resultados são interpretados a medida que irão ser apresentados.

3.3.1 Espectro RMN-STD do brometo de 1-(10-carboxidecil)-4-metilquinolin-1-íio (1)

Os espectros de RMN de ^1H do sal quaternário de amônio 1 e dos complexos do sal 1 - proteínas são apresentados na Figura 4, assim como os respectivos desvios químicos dos prótons.

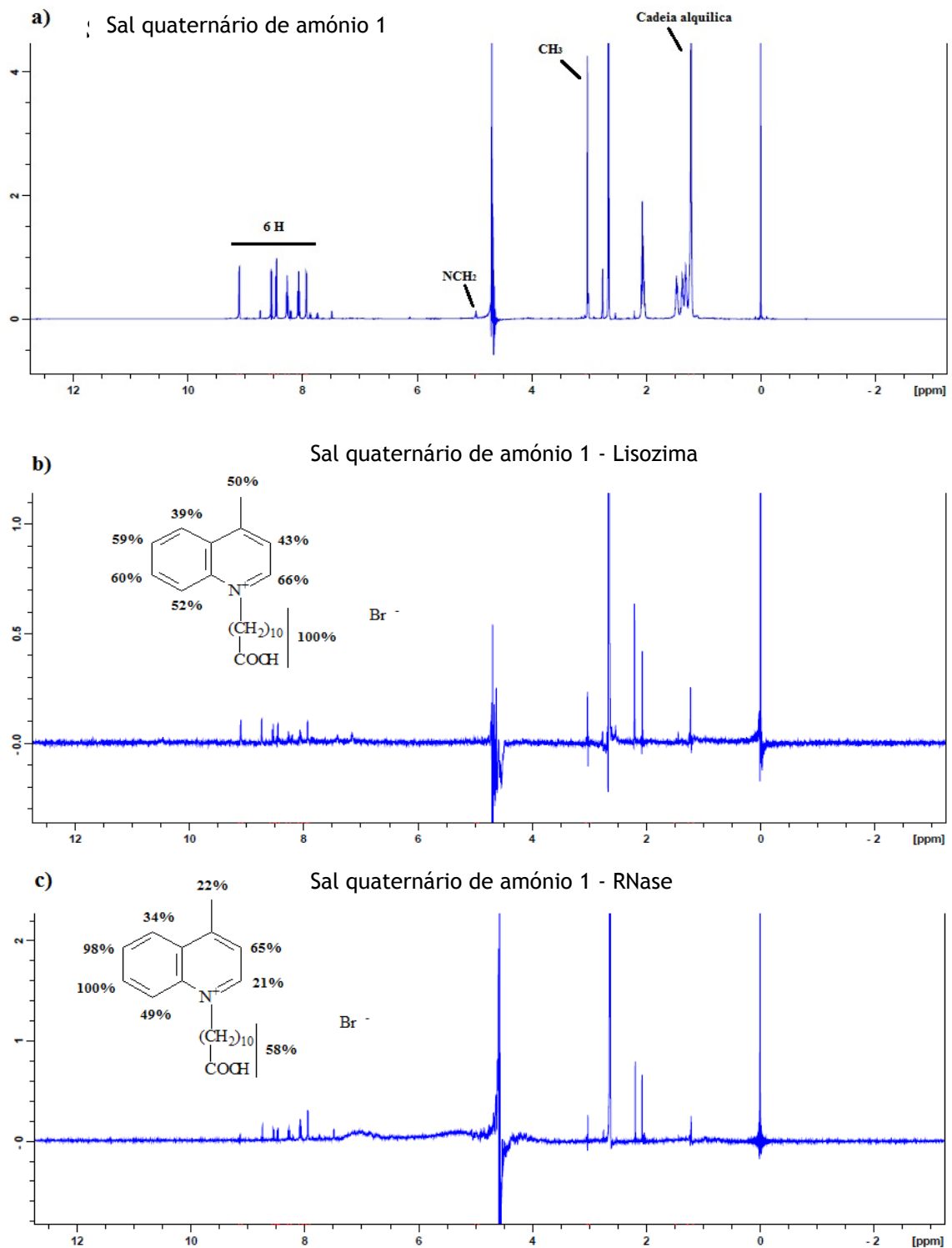


Figura 4 - Espectros RMN-STD do sal quaternário de amônio (1) com as proteínas.

Foram observados sinais de STD em ambas as experiências, tanto para o complexo sal quaternário de amônio (1) com a lisozima como para o complexo com a RNase.

De acordo com os resultados obtidos, os prótons da cadeia carboxi-alquílica estão envolvidos na interação com a lisozima. Tanto os prótons dos grupos aromáticos como do grupo metilo apresentam % de STD de cerca de 50%. Nenhum sinal de STD foi detectado na zona do NCH_2 , consequência da cadeia alquílica longa ou devido a interferência do sinal da água (sinal a 4-5 ppm).

Os resultados para o STD do sal 1 - RNase, diferem do anterior visto que o maior sinal de STD foi detectado para os dois prótons do grupo aromático, enquanto a cadeia carboxi-alquílica apresenta % de STD de 68%. Ainda, os prótons do grupo metilo e os restantes prótons encontram-se mais afastados da proteína visto apresentarem sinais de saturação menos intensos.

3.3.2 Espectro RMN-STD do iodeto de 1-etil-2-metilquinolin-1-íon (2)

O espectro ^1H RMN do sal quaternário de amônio 2 e os espectros dos complexos do sal 2 - proteínas são apresentados na Figura 5, assim como os respectivos desvios químicos dos prótons.

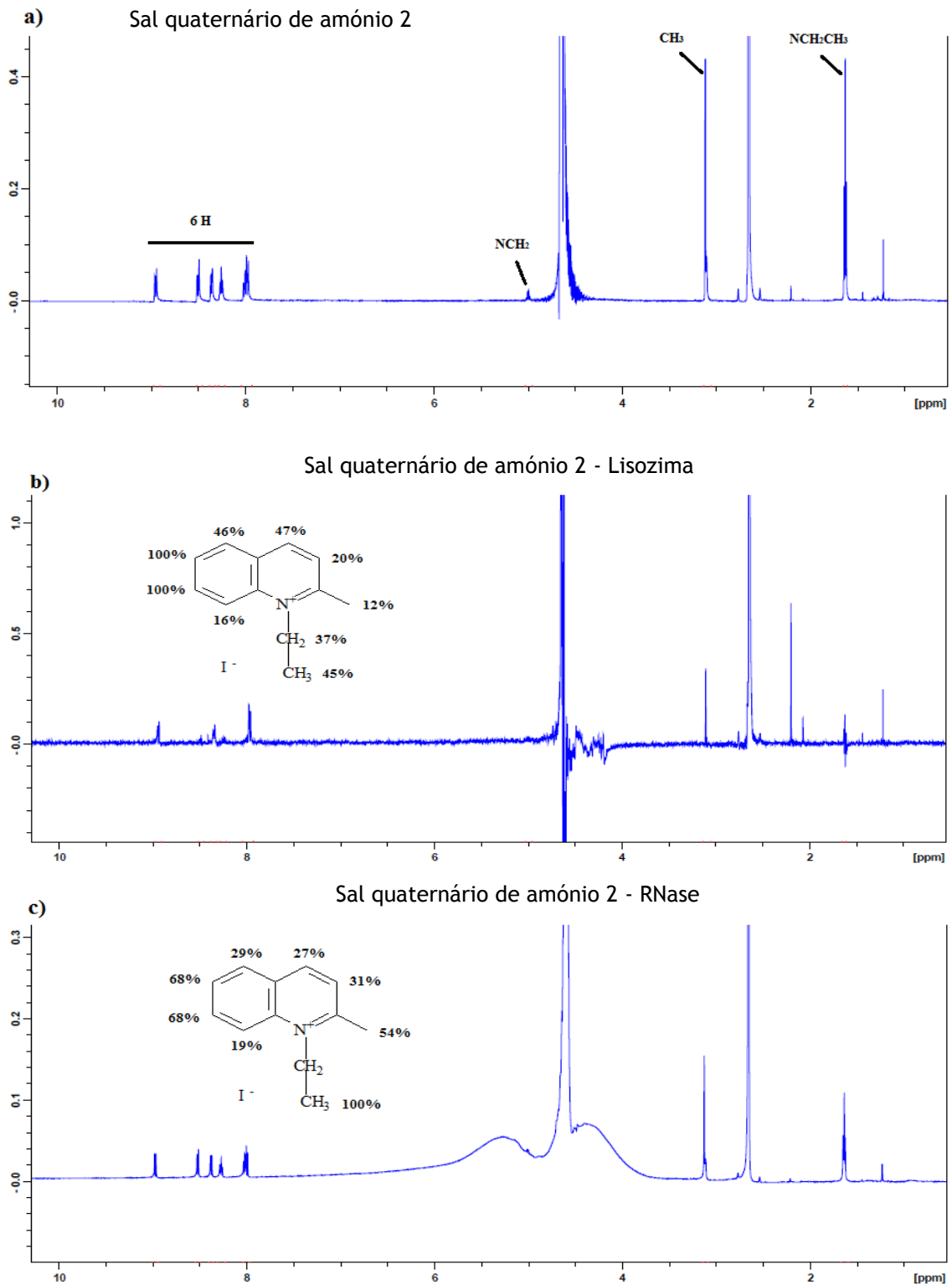


Figura 5 - Espectros RMN-STD do sal quaternário de amônio (2) com as proteínas.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 6 com a lisozima a interação é preferencial pelo grupo aromático seguida do grupo metilo terminal da cadeia alquílica com % de STD cerca de 50%. Os prótons do grupo metilo aromático e o próton adjacente são os que apresentaram menor % de saturação sugerindo que estão mais distantes da proteína.

As maiores % de STD com a RNase foram detetadas, para os prótons do grupo metilo terminal da cadeia alquílica, seguido de dois prótons da cadeia aromática e do grupo metilo com cerca de 60% de saturação. Os restantes prótons aromáticos são os que apresentam menores % de saturação estando mais distantes da proteína. Nenhum sinal de STD foi detetado para os prótons NCH_2 , consequência da interferência do sinal da água (sinal a 4-6 ppm).

3.3.3 Espectro RMN-STD do iodeto de 1-etil-4-metilquinolin-1-íon (3)

Na figura 6 apresentam-se os desvios químicos dos espectros ^1H RMN do sal quaternário de amônio (3) como os espectros dos complexos do sal 3 - proteínas.

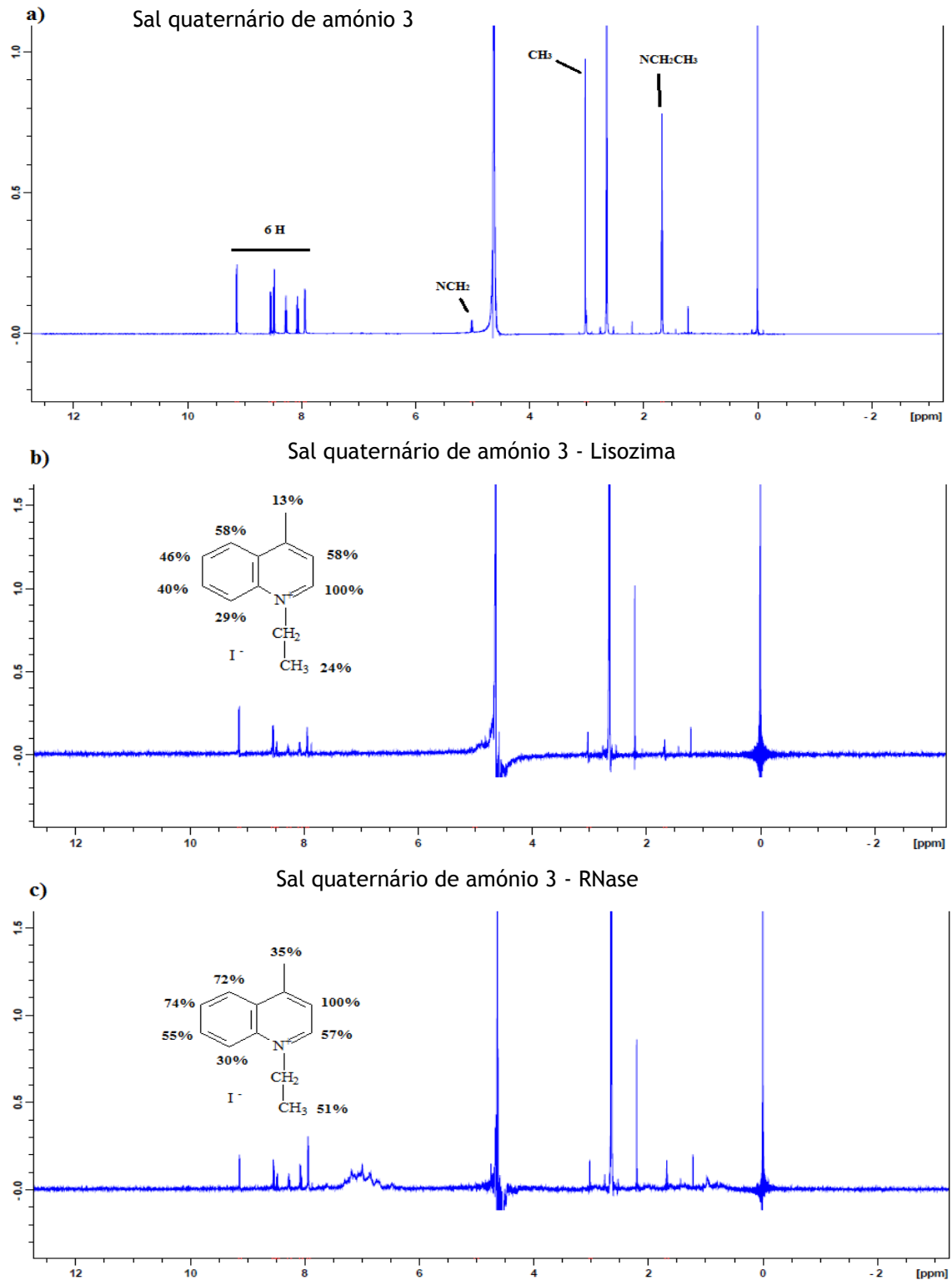


Figura 6 - Espectros RMN-STD do sal quaternário de amônio (3) com as proteínas

De acordo com os resultados apresentados na Figura 7 a interação com ambas as proteínas ocorre pelos protões aromáticos do sal quaternário de amónio (3). A diferença reside no facto que no complexo sal 3 - RNase os protões do grupo metilo tem uma % de saturação de cerca de 50% enquanto que no complexo com a lisozima é cerca de 20%. Para ambas as proteínas, nenhum sinal de STD foi detetado para a zona do NCH_2

3.3.4 Espectro RMN-STD do iodeto de 3-etil-2-metilnafto[2,1-d][1,3]tiazol-3-io (6)

Na Figura 7 apresentam-se os espectros do sal quaternário de amônio (6) com a lisozima e com a RNase, assim como os respectivos desvios químicos dos prótons.

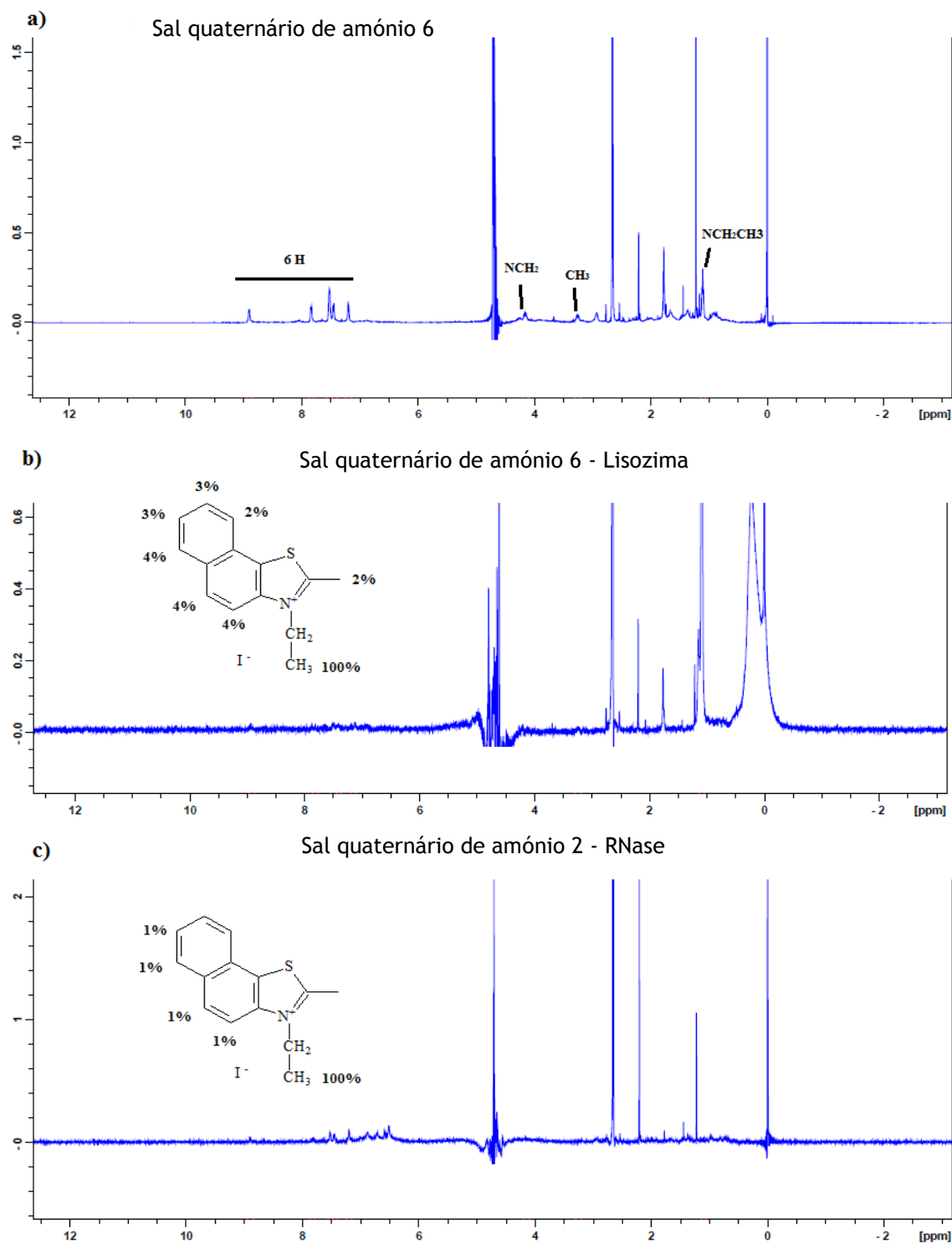
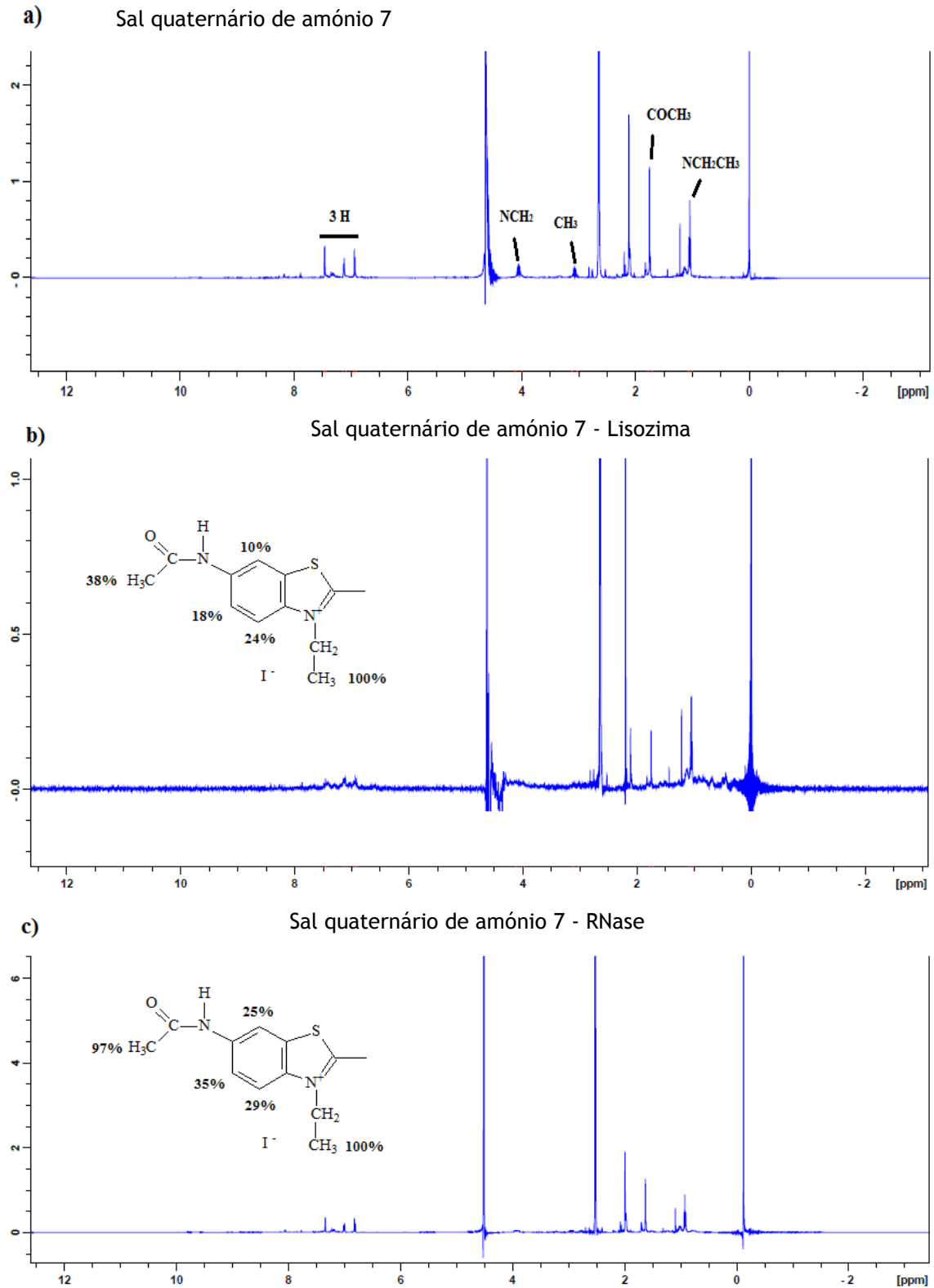


Figura 7 - Espectros RMN-STD do sal quaternário de amônio (6) com as proteínas.

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que a interação deste sal com as duas proteínas ocorre preferencialmente pelo grupo metilo da cadeia alquílica, porque tem 100% de saturação. Os restantes prótons têm % de STD pouco significativas. Nenhum sinal de STD foi detectado para a zona do NCH_2 , possível consequência da interferência do sinal da água (sinal a 4-5 ppm).

3.3.5 Espectro RMN-STD do 6-acetamida-3-etil-2-metil-benzo[d]tiazol-3-io (7)



De acordo com os resultados de RMN-STD apresentados na Figura 8, os grupos envolvidos na interação do sal quaternário de amônio (7) com as proteínas são semelhantes. Em ambos os casos é o grupo metilo da cadeia alquílica que apresenta a maior % de saturação com as duas proteínas. No caso da RNase também o grupo metilo aromático tem uma elevada saturação (cerca de 97%). No entanto, os prótons dos grupos aromáticos tem valores de STD menores indicando que estão mais distantes das proteínas. Nenhum sinal de STD foi detectado para a zona do NCH_2 e do grupo metilo (-3 ppm). Nenhum sinal de STD foi obtido para a zona do NCH_2 e do grupo metilo (-3 ppm) em ambos os casos, possível consequência da interferência do sinal da água (sinal a 4-5 ppm).

CONCLUSÕES

Com este trabalho sintetizou-se um conjunto de compostos, sais quaternários de amónio, sais intermediários e carbocianinas, e avaliou-se as interacções moleculares com proteínas padrão por *RMN - STD* de alguns deles.

Os métodos de síntese utilizados para os diferentes tipos de compostos mostraram-se satisfatórios, com rendimentos em média de 50/60 %. Em relação à síntese de sais quaternários de amónio, a utilização do método de síntese por refluxo de acetonitrilo constitui uma alternativa em muitos casos à utilização do método por fusão, ultrapassando-se o problema de decomposição dos materiais de partida e do baixo ponto de ebulição de alguns deles.

A técnica de *RMN - STD* permitiu a identificação dos principais locais de ligação dos sais quaternários às proteínas, proporcionando assim informações estruturais importantes sobre as interacções moleculares sal-proteína. Essas interacções são de seguida aqui descritas de uma forma mais pormenorizada.

Os sais quaternários de amónio 1 e 3 apenas diferem entre si na sua cadeia alquílica. Apesar de ambos apresentarem em geral uma boa contribuição de ligação à proteína por parte de toda a estrutura, existem algumas diferenças. Para o sal 1 que contém um grupo carboxilo no final da sua cadeia alquílica, os resultados demonstram que a sua ligação com a lisozima ocorre preferencialmente pela interacção da cadeia carboxi-alquílica, enquanto que a sua ligação com a RNase se dá preferencialmente pelos protões dos grupos aromáticos. Contrariamente a este, o sal 3 que apresenta uma cadeia alquílica composta por um grupo etilo, apresenta a mesma ligação preferencial tanto para a lisozima como para a RNase, a qual ocorre nos protões dos grupos aromáticos.

Os sais quaternários de amónio, derivados da quinaldina 2 e da lepidina 3 apenas diferem na posição do grupo metilo no anel aromático. Apesar de ambos apresentarem, em geral, uma boa contribuição de ligação à proteína por parte de toda a estrutura existem algumas diferenças. Para o sal derivado da quinaldina 2 que apresenta o grupo metilo na posição 2, os resultados demonstram que a sua ligação com a lisozima se dá preferencialmente pelos protões aromáticos e a ligação com a RNase ocorre preferencialmente pelo grupo metilo da cadeia alquílica. Para o sal derivado da lepidina 3, que apresenta o grupo metilo na posição 4, embora também apresente uma ligação preferencial, pelos protões aromáticos à lisozima acontece que a sua ligação à RNase já não ocorre preferencialmente pelo grupo metilo da cadeia alquílica, mas ocorrer preferencialmente pelos protões aromáticos.

Os sais quaternários 6 e 7 são derivados do 2-metilbenzotiazol. O sal 6 apresenta mais um anel entre os carbonos 6 e 7 do 2-metilbenzotiazol e o sal 7 apresenta um grupo acetamida na

posição 6. Por análise de RMN-STD verifica-se que a presença de mais um anel, não apresenta uma mais valia para uma ligação directa do sal à proteína. Contudo, verifica-se que indirectamente talvez tenha potenciado a ligação da grupo etilo à proteína, pois a ligação às duas proteínas é feita a 100% pelos protões da cadeia alquílica. A presença do grupo acetamida provoca uma interação mediana (37%) com a lisozima e uma interação excelente (97%) com a RNase.

Em suma, a minha dissertação permitiu o estudo da interação de cinco sais quaternário de amónio com a lisozima e com a RNase, proporcionando assim informações estruturais importantes sobre as interações moleculares sal-proteína. Estas informações podem permitir que no futuro estes sais quaternários de amónio possam ser utilizados em outras técnicas, como por exemplo, a sua utilização como ligandos para purificação de proteínas em cromatografia de afinidade.

PERSPETIVAS FUTURAS

Na actualidade, a descoberta de novos ligandos de afinidade para a purificação de biomoléculas tem sido um tema de grande importância e tem revelado um progresso contínuo, em várias e diferentes áreas do conhecimento, com especial ênfase para a biotecnologia e para as ciências da saúde.

O desenvolvimento de ligandos baseados em sais quaternários de amónio pode apresentar algumas vantagens relativamente a outro tipo de ligandos. Algumas dessas características são o seu pequeno tamanho, possibilitando um mais fácil acesso ao centro activo de uma proteína, a sua maior solubilidade em comparação com outro tipo de compostos e a sua fácil síntese, com possibilidade de introdução de vários grupos funcionais no anel heterocíclico, podendo potenciar algum tipo de interações. As cadeias alquílicas podem facilmente possuir grupos carboxílicos terminais, que podem ser imobilizados em matrizes cromatográficas, as cadeias podem possuir também maior ou menor comprimento, permitindo o ajuste entre as interações iónicas e hidrofóbicas aliado ao facto de ser possível a introdução de grupos funcionais nos anéis heterocíclicos podendo assim uma grande variedade e de tipos de interação.

No estudo de RMN-STD, verificou-se que os sais quaternários de amónio estudados interagiam com as proteínas estudadas, em diferente sítios da molécula, e de diferentes maneiras. Como tal, seria interessante realizar o mesmo estudo com outras proteínas.

Os sais mais promissores deveriam-se ligar covalentemente a uma matriz cromatográfica e serem usados como ligandos em cromatografia de afinidade.

No futuro, para aplicações reais destes sais quaternários de amónio como ligandos de afinidade para purificação de proteínas. Seria necessário realizar estudos de imobilização a matrizes cromatográficas e total caracterização desse suporte (estudos de capacidade dinâmica, etc...).

BIBLIOGRAFIA

AATCC. Colour Index International The Society of Dyers and Colourists, American Association of Textile Chemists and Colourists. 3^a ed., 1999.

Agbavwe C., Somoza M.M. 2011. Sequence-Dependent Fluorescence of Cyanine Dyes on Microarrays. PLoS ONE 6: e22177.

Alves I. Sal quaternário de 2-metilbenzotiazole como ligando cromatográfico para a purificação de proteínas. Dissertação de Mestrado, Universidade da Beira Interior, 2014.

Boto R.E.F., Almeida P., Queiroz J.A. 2008. Thiocarbocyanine as ligand in dye-affinity chromatography for protein purification. Biomed. Chromatogr. 22: 278-288.

Boto R.E.F., Anyanwu U., Sousa F., Almeida P., Queiroz J.A. 2009. Thiocarbocyanine as ligand in dye-affinity chromatography for protein purification. II. Dynamic binding capacity using lysozyme as a model. Biomed. Chromatogr. 23: 987-993.

Borisenko V., Loughed T., Hesse J., Füreder-Kitzmüller E., Fertig N., Behrends J.C., Woolley G.A, Schütz G.J. 2003. Simultaneous optical and electrical recording of single gramicidin channels. Biophys. J. 84: 612-622.

Broadbent D.A. Basic principles of textile coloration. The Society of Dyers and Colourists. 2001.

Christie, R.M.; Colour Chemistry. 2001. London:Royal Society of Chemistry. Capítulo 1: 1-11.

Cruz C., Boto R.E.F., Almeida P., Queiroz J.A. 2011. Study of specific interaction between nucleotides and dye support by nuclear magnetic resonance. J. Mol. Recognit. 24: 975-980.

De la Hoz A., Diaz-Ortiz A., Moreno A. 2005. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. Chem. Soc. Rev. 34: 164-178.

Denizli A., Pişkin E. 2001. Dye-ligand affinity systems. J. Biochem. Biophys. Methods. 49: 391-416.

Ebert B, Riefke B, Sukowski U, Licha K. 2011. Cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging in vivo: acute tolerance, pharmacokinetics, and fluorescence imaging. J. Biomed. Opt. 16:066003

Fabian J., Nakazume H., Matsuoka M. 1992. Near-infrared absorbing dyes. *Chem. Rev.* 92: 1197-1226.

Federici M.M., Chock P.B., Stadtman E.R. 1985. Interaction of Cibacron Blue F3GA with glutamine synthetase: use of the dye as a conformational probe: 1. Studies using unfractionated dye samples. *Biochemistry* 24: 647-660.

Franzini R.M., Kool E.T. 2011. Improved templated fluorogenic probes enhance the analysis of closely related pathogenic bacteria by microscopy and flow cytometry. *Bioconjug Chem.*; 22: 1869-1877.

Garg N., Galaev I.Y., Mattiasson B. 1996. Dye-affinity techniques for bioprocessing: recent developments. *J. Mol. Recognit.* 9: 259-274.

Guirgis B.S., Sá e Cunha C., Gomes I., Cavadas M., Silva I., Doria G., Blatch G.L., Baptista P.V., Pereira E., Azzazy H.M., Mota M.M., Prudêncio M.; Franco R. 2012. Gold nanoparticle-based fluorescence immunoassay for malaria antigen detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 402:1019-27

Hamer F.M. *The chemistry of the heterocyclic compounds.* 1964. New York :Interscience. York, 1964.

Henderson B.W., Gollnick S.O. *Mechanistic principles of photodynamic therapy.* Horspool, W., Lenci, F. *Handbook of organic photochemistry and photobiology.* CRC press, Boca Raton, 2003.

Johnson, M.A., Reedy, J.D., Yang, K. 1970. US Pat., 3965178 (to Continental Oil); *Chern. Abstr.*, 85, 93790.

Jones R.A. *Quaternary Ammonium Salts. Their use in phase-transfer catalysis.* Academic Press, Londres 2001; Capítulo 1.

Kappe C.O., Dallinger D., Murphree S.S. *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments and Protocols.* Wiley-VCH, Weinheim 2009; Capítulo 2.

Labrou N.E. 2003. Design and selection of ligands for affinity chromatography. *J. Chromatogr. B.* 790: 67-78.

Landini D., Maia A., Rampoldi A. 1986. Stability of quaternary onium salts under phase-transfer conditions in the presence of aqueous alkaline solutions. *J. Org. Chem.* 51: 3187-3191.

Lidström P., Tierney J., Wathey B., Westman J. 2001. Microwave assisted organic synthesis-a review. *Tetrahedron.* 57: 9225-9283.

Macomber, R. S. *A Complete Introduction to NMR Spectroscopy.* John Wiley & Sons, 1998, New York.

Matsuoka M., *Infrared Absorbing Dyes: Topics in Applied Chemistry.* 1990, New York: Plenum Press.

Mayer M., Meyer B. 1999. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38: 1784-1788.

Mayer M., Meyer B. 2001. Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR to Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 6108-6117.

Mishra A., Behera P.K., Mishra B.K., Behera G.B. 2000. Cyanine during the 1990s: A review. *Chem. Rev.* 100: 1973-2011.

Mustroph H., Reiner K., Mistol J., Ernst S., Keil D., Hennig L. 2009. Relationship between the molecular structure of cyanine dyes and the vibrational fine structure of their electronic absorption spectra. *Chem. Phys. Chem.* 10: 835-840.

Pardal A.C., Nunes M.J., Gama A.M., Queiroz J.A., Almeida P. 2002. Preliminary studies on the use of cyanines as ligands in dye-affinity chromatography of proteins. *Color Technol.*, 118: 95-99.

Park J.W., Kim Y., Lee K.J., Kim D.J. 2012. Novel cyanine dyes with vinylsulfone group for labeling biomolecules. *Bioconjug Chem.* 23: 350-362.

Sasson Y.; Neumann R., *Handbook of phase transfer catalysis.* 1997. Springer Netherlands; Capítulo 3.

Skotland T. 1981. Studies on the interaction of Cibacron Blue and Procion Red with dopamine betamonooxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* 659: 312-325.

Strekowsk L. Heterocyclic polymethine dyes: synthesis, properties and applications. Topics in Heterocyclic Chemistry, Ed. Springer. Berlin, 2008.

Venkataraman K., The Chemistry of Synthetic Dyes. 1952. London: Academic Press.

Vollhardt K. P. C.; Schore N. E.. 2003. Organic Chemistry, Fourth Edition: Structure and Function, W. H. Freeman: New York: 950-981.

Weissberger A. The cyanine dyes and related compounds. Interscience. New York. 1964.

Winstead A.J., Fleming N., Hart K., Toney D. 2008. Microwave synthesis of quaternary ammonium salts. Molecules 13: 2107-2113.