BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

19934

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS
TIOSEMICARBAZONAS DAS n -FORMILPIRIDINAS E DERIVADOS

Mônica de Mello Barreto Pessoa

TESE DE DOUTORADO

Prof^a Dr^a Marcia Laudelina Arruda Temperini

Orientadora

SÃO PAULO
2002

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004409

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P475c Pessôa, Mônica de Mello Barreto
Caracterização espectroscópica das tiossemicarbazonas das
n-formilpiridinas e derivados / Mônica de Mello Barreto
Pessôa. -- São Paulo, 2002.
126p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Temperini, Marcia Laudelina Arruda

1. Espectroscopia Raman 2. SERS 3. Ressonância magnética
nuclear I. T. II. Temperini, Marcia Laudelina Arruda.

543.08584 CDD

***“Caracterização Espectroscópica das
Tiossemicarbazonas dos n-Formilpiridinas e
Derivados”***

MÔNICA DE MELLO BARRETO PESSÔA

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Físico-Química.*

Aprovada por:

Profa. Dra. MÁRCIA LAUDELINA ARRUDA TEMPERINI
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. ANA MARIA DA COSTA FERREIRA
IQ – USP

Profa. Dra. SUSANA INÊS CÓRDOBA DE TORRESI
IQ – USP

Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS NART
IQ SC – USP

Prof. Dr. ALZIR AZEVEDO BATISTA
UFSCar

SÃO PAULO
26 DE FEVEREIRO 2002.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

***Ao Saulo,
Com carinho.***

Agradecimentos

A Professora Marcia Temperini pela orientação, paciência, confiança e principalmente amizade.

Ao Professor Oswaldo Sala pela incansável disposição e lições de vida.

A Dra. Vera Paoli Monteiro pela dedicação dispensada aos PATS, frutíferas discussões, e ajuda na interpretação dos espectros ^1H RMN.

A Dalva Lúcia pela amizade, incentivo e valiosas discussões.

Aos professores Yoshio, Mauro, Joel, Paulo Sérgio, Beth, Susana pelo agradável convívio.

A Amira e Gustavo Andrade por tudo que me ensinaram.

Aos amigos do Lem: Paolinha, Silvia Helena, Soneca, Edu, Marcello, Guilherme, Ary, Gustavo M., Nil, Norberto, Lúcia, Luiz Carlos (*in memorian*), Cely, Ricardo, Lucy, Hector, Serginho e Laércio.

A todos os amigos do IQUSP.

A D. Elzita, Paulinho e Nivaldo pelo apoio.

A todos do Laboratório de Materiais Eletroativos pela ajuda na obtenção dos voltamogramas e espectros eletrônicos.

A Miriam, Fernando e Marcio da Central Analítica (IQUSP) pela obtenção dos espectros ^1H RMN.

Aos amigos Cristina e Marcelo, Fabiana e Alexandre, João Brasil, Tania e Leon pelo incentivo e discussões científicas.

A todos do Colégio São Luís em especial a Rosana Rocca pela confiança.

A Dani e Felype, Debora e Carlinhos, grandes amigos.

A Beth e Paulo pela confiança e incentivo.

A meus irmãos Lufe e Joca, cunhadas Luciana e Claudia e a Carol, pelo carinho, paciência,...

A meus pais por tudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, pelo suporte financeiro.

Caracterização espectroscópica das tiossemicarbazonas das n-formilpiridinas e derivados

Índice:

Abstract	i
Resumo	iii

Capítulo I- Introdução

I.1- Considerações Gerais	1
I.2- Objetivos	2
I.3- Considerações sobre os trabalhos mais relevantes no contexto do estudo e sobre as técnicas utilizadas	3
PATS como fármaco	3
PATS como modificador de superfícies metálicas	4
Produtos faradáicos do PATSn	8
Espectroscopia SERS	9
Efeito Raman Ressonante	10
I.4- Parte Experimental	11
Síntese dos compostos	11
Espectros Raman	12
Espectros SERS	12
Procedimento para aquisição do eletrodo SERS ativo	12
Espectros ¹ H RMN	13
Espectros UV-Vis	13
I.5- Referências Bibliográficas	13

Capítulo II- Estudo Espectroscópico dos Compostos em Solução

II.1- Introdução	16
II.2- Parte Experimental	16
II.3- Resultados e Discussões	17
Efeito do solvente na configuração do PATS2, 2'MePATS2, 4'MePATS2 e DMePATS2	20
Influência da radiação excitante na isomerização do PATS2	31
Efeito dos íons no processo de isomerização do PATS2 em ACN	35
Determinação da cinética de isomerização do PATS2	42
Efeito dos cátions na configuração do 2'MePATS2 e DMePATS2 em ACN	45
Determinação da constante de estabilidade dos complexos de Mg ²⁺ , Ba ²⁺ e Ca ²⁺ com DMePATS2	58
II.4- Conclusões	62
II.5- Referências Bibliográficas	63

Capítulo III- Estudo dos Compostos Adsorvidos em Eletrodos

III.1- Introdução	66
III.2- Parte Experimental	67
Espectros SERS em ACN	67
SERS da redução do PATS2	67
Espectros UV-Vis	68
III.3- Resultados e Discussões	68
Espectros SERS do DMePATS2 adsorvido em prata em ACN	68
Efeito do Mg^{2+} no DMePATS2 adsorvido	72
Comparação entre os espectros SERS do PATS4 e do DMePATS2	79
Espectros SERS do PATS2 adsorvido em prata em ACN	81
Efeito do Mg^{2+} no PATS2 adsorvido	82
Monitoramento da redução faradáica do PATS2	84
III.4- Conclusões	93
III.5- Referências Bibliográficas	93

Capítulo IV- PATSn como Modificador de Superfícies Metálicas

IV.1- Introdução	95
IV.2- Parte Experimental	96
Espectros SERS	96
Estudo eletroquímico	96
IV.3- Resultados e Discussões	97
SERS do PATS4 em eletrodo de ouro em solução aquosa	97
Estudo eletroquímico do citocromo c nos eletrodos modificados	100
SERS do PATS4 e SERRS do citocromo c em eletrodo de ouro modificado por PATS4	104
Estabilidade do eletrodo modificado em função do tempo	110
Eletrodo modificado com PATS4 na presença de lisina e NH_4^+	111
IV.4- Conclusões	118
IV.5- Referências Bibliográficas	118

Capítulo V- Considerações Finais

V.1- Conclusões	120
-----------------	-----

Abreviaturas:

PATS2= tiossemicarbazona do 2-formilpiridina

2'MePATS2= 2'metil-tiossemicarbazona do 2-formilpiridina

4'MePATS2= 4'metil-tiossemicarbazona do 2-formilpiridina

DMePATS2= 4', 4'dimetil-tiossemicarbazona do 2-formilpiridina

PATS4= tiossemicarbazona do 4-formilpiridina

ACN = acetonitrila

DMSO = dimetilsulfóxido

DMF = dimetilformamida

4-PICAM = 4-picolil amina

Py= piridina

TMS = trimetil-silil propano

Bu₄NClO₄ = perclorato de tetrabutilamônio

DNA = Deoxy Nucleic Acid

STM = Scanning Tunneling Microscopy

SERS= Surface Enhanced Raman Scattering

SERRS= Surface Enhanced Resonance Raman Scattering

¹H RMN= Ressonância Magnética Nuclear (de hidrogênio)

CCD= Charge Coupled Device

P.A.= padrão analítico

SAM= *self-assembled monolayers* (mono-camadas auto-organizadas)

ABSTRACT

In this PhD thesis 2-formylpyridine thiosemicarbazone (PATS2) and derivatives configurations were characterized in the solid state and in solution using Raman and ^1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopies. Using spectroscopic data obtained from defined model solutions, information on the stereochemistry could be derived. It has been verified that the presence of the methyl groups in the N(4') atom of DMePATS2 caused a stabilization of the **Z** isomer in the solid state instead of the stable **E** isomer in PATS2.

Investigation in solution has shown a strong influence of the donor number of the solvents on the configuration of these compounds. Solvents with high donor numbers favor the formation of an intermolecular hydrogen bond between the solvent and the compound under investigation, thus stabilizing the **E** isomer. On the other hand, in solvents with low donor numbers, the **Z** isomer is stabilized due to intramolecular hydrogen bond.

The methyl groups in DMePATS2 are also responsible for the different behavior of PATS2 and DMePATS2 in the presence of alkali and alkaline earth cations. Whereas in case of PATS2 these cations only catalyze the E-Z isomerization in ACN solution, complex formation between DMePATS2 and the cations was found to take place. The observed difference in behavior can be explained by an increase in the basicity of the coordination binding sites in DMePATS2 with respect to PATS2, which stabilizes the cation-DMePATS2 complexes.

After characterization of the configuration of the compounds in the solid state and in solution, these molecules were adsorbed on a silver electrode and studied by SERS spectroscopy. The results have shown that the configuration of DMePATS2 adsorbed on the silver electrode depended on the applied potential. For negative potentials, the predominant configuration was **E**, while for positive potentials, almost only the **Z** isomer was found. In the presence of Mg^{2+} only the **Z** isomer of DMePATS2 was observed at any potential, which can be explained by the formation of Mg^{2+} -E-DMePATS2 complex in solution. Additionally a comparison between the SERS result obtained for DMePATS2 and PATS4 (4-formylpyridine thiosemicarbazone) was made. In the case of PATS4, the SERS results have shown that there is no change in the spectra when the applied potential is varied; that could be related to an isomerization process, which was expected since there is no possibility of forming an intramolecular hydrogen bond in this compound. The SERS spectra of PATS4 in the presence of Mg^{2+} indicate the formation of the Mg^{2+} -PATS4 complex on the surface.

The interest on the reduction products of these compounds concerns to the fact that they have a large spectrum of biological activities. Therefore they have been studied in more detail

using SERS and UV-Vis spectroscopy. In the case of PATS2, 2-picolyamine and thiourea could be identified as reduction products of the electrochemical reaction.

A further subject of interest was the investigation of the ability of 4-formylpyridine thiosemicarbazone (PATS4) to act as a surface modifier to mediate the interaction between a silver electrode and cytochrome c (Cc). In this case, SERS ($\lambda_{\text{ex}} = 632.8 \text{ nm}$) as well as surface enhanced resonance Raman scattering, SERRS ($\lambda_{\text{ex}} = 413.1 \text{ nm}$) spectroscopy were used. Addition of Cc to the electrolytic solution did not induce spectral changes in the vibrational modes of SERS spectra of PATS4 that could be related to the formation of a hydrogen bond between the biomolecule and PATS4. Nevertheless, the SERRS spectra of Cc on modified silver electrode depended on the applied potential indicating an interaction with the electrode. At -0.4 V (vs. Ag/AgCl) the Fe^{2+}Cc state marker bands at *ca.* 1368 and 1550 cm^{-1} were observed and, when oxidized to Fe^{3+}Cc ($+0.1 \text{ V}$), these bands shifted to *ca.* 1376 and 1562 cm^{-1} , respectively.

SERS spectra of $[\text{Ru}(\text{CN})_5\text{PATS4}]^{3-}$ on the silver electrode were also obtained in presence and absence of Cc. In this complex, the pyridinic nitrogen is coordinated with Ruthenium complex. Therefore, the only possibility of forming hydrogen bond with Cc is through the $\text{C}\equiv\text{N}$ group. The obtained results did not show any evidence that there is a hydrogen bond between Cc and this modifier. It is proposed that, in this case, the interaction governing the redox reaction is of electrostatic nature.

RESUMO

Nessa tese de doutorado foram caracterizadas as configurações das tiossemicarbazonas do 2-formilpiridina (PATS2) e derivados no estado sólido e em solução utilizando as técnicas espectroscópicas Raman e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN). Utilizando os dados espectroscópicos obtidos foi possível obter informações da estereoquímica desses compostos. Verificamos que a substituição de alguns átomos de hidrogênio por grupos metilas causaram no caso particular do 4,4'-dimetil-tiossemicarbazona do 2-formilpiridina (DMePATS2), a estabilização do isômero **Z** ao invés do **E**.

O estudo da caracterização desses compostos em solução mostrou que existe uma forte dependência da configuração presente em solução com o solvente. Essa dependência foi correlacionada com o valor de *donor number* dos solventes. Solventes com alto valor de *donor number* favorecem a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares (composto-solvente) e, portanto, estabiliza o isômero **E**. Por outro lado, em solventes com menor valor de *donor number*, o isômero **Z** é estabilizado pela ligação de hidrogênio intramolecular.

Comparando o efeito que os cátions alcalinos e alcalinos terrosos exercem sobre as configurações dos compostos PATS2 e DMePATS2, observamos novamente que os grupos metilas substituídos no N(4') do DMePATS2 têm um papel importante nas propriedades desses compostos. No caso do PATS2 não ocorre a formação de complexos com esses metais em solução de ACN, esses cátions somente aumentam a velocidade da isomerização E-Z PATS2. Para o DMePATS2, ocorre a formação de complexos com os cátions estudados o que pode ser explicado pela presença dos grupos metílicos que aumentam a basicidade dos centros de coordenação da molécula favorecendo o ataque pelos cátions e estabilizando os complexos.

Uma vez caracterizada as estruturas configuracionais predominantes no estado sólido e em solução, apresentamos a caracterização desses compostos adsorvidos em eletrodos utilizando nesse estudo a técnica SERS. Os resultados mostraram que a configuração do DMePATS2 adsorvido em eletrodo de prata depende do potencial aplicado ao eletrodo. Para potenciais negativos, a configuração predominante é **E** enquanto que para potenciais positivos existe quase que somente o isômero **Z** no eletrodo. A mudança no potencial aplicado ao eletrodo causa, portanto, isomerização E-Z reversível do DMePATS2 na superfície de prata.

Verificamos que na presença de Mg^{2+} o isômero **E** DMePATS2 não é observado no eletrodo de prata devido a formação do complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 em solução, ou seja, o complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 não adsorve na superfície. Esse resultado indica que se a coordenação e a adsorção à superfície envolvem o mesmo sítio molecular, ocorre uma

competição entre esses dois processos. No caso do 4-formilpiridina tiossemicarbazona (PATS4), os resultados SERS mostraram que variando o potencial aplicado ao eletrodo, não se observa nenhuma mudança significativa nos espectros em função do potencial indicando que não ocorre isomerização com o potencial, o que era esperado já que não existe possibilidade de formar ligação de hidrogênio intramolecular com o N do anel piridínico. Na presença de Mg^{2+} foi verificado que o complexo Mg^{2+} -PATS4 adsorve na superfície do eletrodo.

Devido às atividades biológicas desses compostos e aos diferentes mecanismos propostos na literatura, existe o interesse de conhecer os produtos da redução faradáica dos PATSn. Para isso, utilizamos a técnica SERS onde o potencial aplicado ao eletrodo é monitorado junto a um potenciostato acoplado a um registrador que indica o potencial de redução desses compostos. A espectroscopia na região do UV-Vis foi a técnica complementar usada na caracterização dos produtos faradáicos. Os resultados indicam que o 2-picolilamina e a tiouréia são os produtos de redução do PATS2.

Um outro ponto de interesse desse trabalho foi a investigação do desempenho do 4-formilpiridina tiossemicarbazona (PATS4) como modificador de eletrodo para mediar a interação entre eletrodo de prata e o citocromo c (Cc). Nesse caso a técnica SERS, Raman intensificado pela superfície ($\lambda_0=632,8$ nm) e a técnica SERRS, Raman Ressonante intensificado pela superfície ($\lambda_0=413,1$ nm) foram utilizadas. A adição de Cc na solução eletrolítica não causou nenhuma mudança espectral nos modos vibracionais no espectro SERS do PATS4 que pudessem estar relacionadas à formação de ligação de hidrogênio entre a biomolécula e o modificador. Os espectros SERRS do Cc em eletrodos de prata modificados com PATS4 foram dependentes no entanto, com o potencial aplicado ao eletrodo indicando uma interação com o eletrodo. Em $-0,4$ V (vs. Ag/AgCl) são observadas as bandas características do Fe^{2+} Cc em *ca.* 1368 e 1550 cm^{-1} e, quando oxidado a Fe^{3+} Cc ($+0,1$ V) essas bandas deslocam respectivamente para *ca.* 1376 e 1562 cm^{-1} .

Sintetizamos o complexo $[Ru(CN)_5PATS4]^{3-}$ e obtivemos os espectros SERS na presença e ausência de citocromo c. Como nesse complexo o N piridínico está ligado ao complexo de rutênio, não existe a possibilidade de formação de ligação de hidrogênio entre o anel piridínico do PATS4 e o citocromo c. Dessa maneira, se a interação entre o modificador e a biomolécula ocorresse por ligações de hidrogênio, deveríamos observar mudanças nos espectros SERS na região das bandas do estiramento do grupo $C\equiv N$. Os resultados desses experimentos não apresentaram nenhuma evidência quanto à formação de ligações de hidrogênio nesse sistema, o que indica que a interação entre o citocromo c e o $[Ru(CN)_5PATS4]^{3-}$ seja eletrostática.

Capítulo I- Introdução

I.1- Considerações Gerais

As tiossemicarbazonas das n-formilpiridinas (PATSn) (Fig.I.1) são compostos formados pela reação entre a tiossemicarbazida ($\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-\text{NH}_2$) e o n-piridinacetaldeído formando os três isômeros PATS2, PATS3 e PATS4 mostrados na Fig. I.1.

Figura I.1- Isômeros das tiossemicarbazonas das n-formilpiridinas.

No caso do PATS2, existem ainda, dois isômeros configuracionais E e Z (Fig. I.2), onde o grupo piridínico e o grupo tiouréia estão respectivamente, em *trans* e em *cis* em relação à dupla $\text{CN}(1')$.

Figura I.2- Estrutura dos isômeros E-PATS2 e Z-PATS2.

O interesse químico em estudar a família das tiossemicarbazonas do n-formilpiridina (PATSn) se deve tanto às suas propriedades farmacológicas [1-4] como também à habilidade de

adsorver quimicamente em eletrodo de ouro promovendo a resposta eletroquímica reversível do citocromo c [5-8]. Sabe-se que a mudança na configuração dessas moléculas pode causar, no primeiro caso, a perda de sua atividade biológica ou, no caso dos eletrodos modificados, a perda da resposta eletroquímica reversível do citocromo c. Torna-se clara, portanto, a importância de conhecer as interações existentes entre os PATSn e o ambiente químico (solvente, solução eletrolítica, superfície metálica) que podem influenciar na configuração desses compostos.

I.2- Objetivos

Este trabalho se propõe a fornecer dados espectroscópicos para o conhecimento estrutural desses compostos em diferentes meios.

Na fase sólida e em solução serão identificadas as estruturas e configurações mais estáveis dos compostos apresentados na Figura I.3. Nesse estudo, constataremos interessantes propriedades desses compostos como a formação de complexos com metais alcalinos e alcalinos terrosos e uma forte dependência da estrutura química com o solvente utilizado. Esses resultados serão apresentados no capítulo 2.

Figura I.3- Estrutura dos modificadores de superfícies em estudo.

Após conhecer o "comportamento químico" em solução, estudaremos o comportamento dessa família de compostos químicos adsorvidos em superfícies metálicas. Utilizar-se-á a técnica SERS para determinar a configuração de adsorção destes modificadores em eletrodos metálicos (Ag e Au), resultados apresentados no capítulo 3.

Conhecendo-se a estrutura do modificador no eletrodo, pode-se determinar a interação existente entre o citocromo c e o modificador. Utilizando a espectroscopia Raman intensificada pela superfície (SERS) e Raman ressonante intensificada pela superfície (SERRS), será

caracterizada a interação de modificadores de superfície com a molécula biológica citocromo c. Esses resultados serão apresentados no capítulo 4.

II.3- Considerações sobre os trabalhos mais relevantes no contexto do estudo e sobre as técnicas utilizadas.

PATS como fármaco

Com relação às propriedades farmacológicas, as tiosemicarbazonas que possuem um terceiro sítio de ligação como o N piridínico dos PATSn apresentaram atividades antitumorais, antivirais, bactericidas, antimaláricas e antifungos [9-11]. O mecanismo proposto para a atividade biológica desses compostos é que eles bloqueiam a atividade da enzima difosfato ribonucleosídeo redutase (RR), uma enzima obrigatória na síntese de DNA [8-14]. Um maior número de dados que levem à compreensão da relação estrutura-atividade é, portanto, de fundamental importância para se entender o mecanismo de ação desses compostos nos organismos.

Existem trabalhos na literatura [14-17] que mostram que a família do PATS2 são ligantes tridentados NNS, onde a formação de complexos de PATS2 com metais de transição é amplamente conhecida. Estudos de complexos de ferro e cobre mostraram que eles podem ser mais ativos do que as tiosemicarbazonas não complexadas na destruição de células cancerígenas assim como na inibição da síntese de DNA [4, 16].

Apesar dos cátions metálicos alcalinos e alcalinos terrosos estarem presentes em sistemas biológicos e serem, portanto, de grande interesse nessa área, poucos trabalhos relatam a formação de complexos com esses metais. O íon cálcio, por exemplo, está envolvido em várias funções celulares como a contração muscular, o crescimento celular e a coagulação do sangue. O controle desses processos ocorre na maioria das vezes através da modulação de proteínas específicas que se ligam ao cálcio e que na presença desse cátion são capazes de mudar de conformação para se ligarem a outras moléculas de efeitos específicos [18].

Casas e colaboradores [19] estudaram os complexos de semicarbazonas e tiosemicarbazonas de aldeídos e cetonas com diversos metais de transição. Eles relataram que os complexos desses ligantes com metais alcalinos e alcalinos terrosos ainda não foram discutidos na literatura. A pouca discussão na literatura desses complexos se deve em parte, à dificuldade de sua obtenção em meio aquoso e também, à alta sensibilidade necessária para

detecção dos mesmos, uma vez que a força de interação entre o ligante e esses metais deve ser fraca.

Existem na literatura trabalhos que reportam a formação de complexos de metais alcalinos com ligantes orgânicos que possuem átomos de nitrogênio com par de elétrons livres para coordenarem com o cátion metálico em meio de acetonitrila [20-22]. Madrakian e colaboradores [20] determinaram por NMR ^{23}Na a constante de formação de complexos de Na^+ e Li^+ com 1,10-fenantrolina, 2,2'-bipiridina e 8-hidroxiquinolina em diversos solventes orgânicos. Ghasemi e Shamsipur [21] calcularam as constantes desse mesmo sistema através de resultados de fluorimetria.

Foi verificado por esses autores, que independente do solvente utilizado a estabilidade do complexo formado decrescia na seguinte ordem: $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Na}^+$; ou seja, a estabilidade do complexo está diretamente relacionada com densidade de carga do cátion. O magnésio que tem maior densidade de carga deve formar o complexo mais estável na série enquanto que o íon Na^+ , com a menor densidade de carga, resulta na interação mais fraca entre metal-ligante. No entanto, a estabilidade termodinâmica não é uma medida da força absoluta dos complexos, mas sim uma medida relativa da força comparada com a solvatação do íon e do ligante. A maior estabilidade dos complexos com Mg^{2+} se deve ao resultado do balanço entre a energia de ligação e solvatação. Dessa maneira, a escolha de um solvente apropriado também é necessária para a realização desse estudo.

PATS como modificador de superfícies metálicas

Existem vários estudos na literatura que investigam a estrutura de proteínas adsorvidas em eletrodos [23-28]. Nesses trabalhos, utilizam-se compostos químicos que modificam os eletrodos metálicos favorecendo o transporte de elétrons entre a biomolécula e o eletrodo. Esses compostos são chamados de promotores (simplesmente por promoverem as reações eletroquímicas) e são distinguidos dos mediadores desde que, enquanto os mediadores participam do mecanismo de transferência de elétrons, os promotores só facilitam o transporte de elétrons sem participar, na faixa de potencial em estudo, da reação redox. Eletrodos modificados são portanto importantes por promoverem a resposta eletroquímica reversível de proteínas, como por exemplo o citocromo c, e assim, proporcionar um meio no qual a molécula biológica tenha uma resposta eletroquímica reversível.

O composto 4,4'-bipiridina foi o primeiro a ser utilizado como modificador de superfície [25], no entanto, o disulfeto da 4,4'-bipiridina passou a ser mais utilizado para esses estudos, uma vez que se liga melhor no eletrodo de ouro [29].

T. Sawaguchi e colaboradores [30] relataram recentemente que, apesar da grande importância eletroquímica e biológica dos eletrodos modificados, ainda não existe compreensão ao nível molecular das estruturas das mono-camadas auto-organizadas dos eletrodos modificados. O arranjo molecular e a orientação dessas moléculas adsorvidas em eletrodos metálicos permanecem ainda desconhecidos.

Uma das moléculas biológicas mais importantes é o citocromo *c*, que é uma proteína responsável pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória das células que ocorre na membrana da mitocôndria. No caso do citocromo *c* de coração de cavalo, o centro redox consiste de um grupo heme complexado com quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico enquanto que dois aminoácidos, histidina (His-18) e metionina (Met-80) servem como ligantes axiais.

Figura I.4- Estrutura química do grupo heme do citocromo.

Sobre o ponto de vista estrutural, o citocromo *c* de coração de cavalo é uma metaloproteína relativamente simples, constituída somente de cento e quatro aminoácidos (enovelado azul na Fig. I.5) e, por isso, considerada com frequência como metaloproteína modelo para outros sistemas mais complexos.

Figura I-5. Esquema da estrutura tridimensional do citocromo c (em vermelho o grupo porfirínico ligado ao ferro e a uma histidina, em azul estão representados os aminoácidos).

O principal objetivo da bioeletroquímica moderna é identificar como e exatamente onde ocorre o contato da proteína com o promotor de elétrons e, mais ainda, como os elétrons atravessam da monocamada adsorvida para o grupo heme “escondido” no interior da proteína.

As técnicas espectroscópicas *in situ* como SERS, SERRS, FTIR, eletroreflectância ou elipsometria quando combinadas com a eletroquímica fornecem informações precisas quanto a natureza da interação entre o citocromo c e os modificadores de superfícies.

Normalmente pelo menos dois grupos funcionais são necessários para que se tenha um bom modificador de superfície para esse estudo, um que se ligue à superfície metálica e outro para interagir com a biomolécula.

Existem várias vantagens em utilizar eletrodos modificados no estudo da reação redox do citocromo c entre elas: o eletrodo modificado serve como um doador ou receptor de elétrons, o promotor facilita o transporte de elétrons entre o eletrodo modificado e a biomolécula uma vez que os problemas associados com as interações eletrostáticas de longo alcance são inexistentes, os experimentos são relativamente fáceis de serem realizados, etc. Um dos problemas que podem eventualmente complicar as medidas eletroquímicas é, no entanto, a possibilidade da proteína adsorver na superfície modificada com o promotor. Existem trabalhos utilizando as técnicas SERRS, FTIR e eletroreflectância combinadas com experimentos eletroquímicos que mostraram que o citocromo c adsorve na maioria das superfícies de eletrodos cobertas com promotores [31].

Existem controvérsias na literatura quanto ao efeito da adsorção do citocromo c em eletrodos de platina, mercúrio, ouro ou prata. Essa adsorção resultaria sérias mudanças conformacionais e eventualmente a desnaturação da proteína. Betso e colaboradores demonstraram através de estudos eletroquímicos e espectroeletroquímicos a importância da camada de citocromo c adsorvido em eletrodos de Hg, Pt e Au na cinética e termodinâmica da

reação interfacial de transferência de elétrons [32]. Segundo os autores, a etapa lenta do transporte de massa difusional do citocromo *c* pode ser a difusão rotacional das moléculas adsorvidas de citocromo *c* necessárias no transporte de elétrons da superfície para as moléculas livremente difundidas do ferricitocromo.

Resultados utilizando a técnica SERS mostraram que mesmo no caso de amostras altamente purificadas de citocromo *c*, não é possível evitar mudanças conformacionais da proteína adsorvida na superfície metálica. Mudanças na ligação heme-ferro acompanhadas pela transição de spin baixo para spin alto foram observadas em potenciais próximos ao potencial de carga zero da prata em contato com soluções aquosas neutras [33, 34].

É interessante notar que os problemas associados com a adsorção do citocromo *c* em superfícies de eletrodo sólido levam ao conceito da modificação química dos eletrodos. Esse processo envolve a formação de uma camada auto-organizada de um filme molecular na superfície metálica. A molécula adsorvida (química ou fisicamente) possibilita a troca rápida de elétrons entre o citocromo *c* e o eletrodo é chamada de promotor da transferência de elétrons.

A modificação de eletrodos com derivados de piridina [23] transforma a superfície metálica hidrofóbica em hidrofílica tornando-a capaz de reconhecer e ligar convenientemente proteínas carregadas positivamente como o citocromo *c*.

Foi também verificado através da caracterização de superfície por voltametria e *STM* (microscopia de tunelamento) *in situ* de 4- e 2-mercaptopiridinas [30] que a orientação do nitrogênio piridínico é um fator chave para promover a reação eletroquímica reversível do citocromo *c*, pois, somente para a 4-mercaptopiridina, que tem o nitrogênio voltado para a solução, é que a resposta reversível pode ser observada.

Hill e colaboradores reportaram que a 4', 4'-bipiridina (PyPy) quando adsorvida em eletrodo de ouro permite uma eletroquímica reversível do citocromo *c* enquanto que não se observa resposta reversível em eletrodos não modificados [23, 25]. Através de resultados eletroquímicos os autores propõem que o nitrogênio piridínico seria o ponto de interação entre a biomolécula e o modificador através da formação de ligações de hidrogênio com os grupos lisinas protonados do citocromo *c*. Por outro lado, sabe-se que a molécula do citocromo *c* tem carga +9 em pH neutro, sendo portanto, um forte candidato a fazer interações eletrostáticas [35].

Dick e colaboradores reportaram recentemente um estudo da interação entre o citocromo *c* e alcanotióis terminados com grupos carboxílicos adsorvidos em eletrodo de prata [36]. Nesse estudo, os autores mostraram que existem duas possibilidades de interação entre a biomolécula e o modificador: eletrostática ou ligação covalente.

De maneira geral, um bom promotor para a transferência de elétrons do citocromo c deve promover uma interface ideal entre a biomolécula e a superfície do eletrodo, além de deixar esta superfície hidrofílica, o que elimina, ou pelo menos diminui, a adsorção irreversível do citocromo c na superfície do eletrodo. Outro papel importante dos modificadores de superfície é permitir que o citocromo c adote uma orientação apropriada em relação ao eletrodo na qual o transporte de elétrons na interface eletrodo/solução seja facilitado.

O comportamento das tiossemicarbazonas das n-formilpiridinas (PATSn) em solução ou adsorvidas em eletrodo metálico tem sido estudado em nosso laboratório através de técnicas espectroscópicas, para ajudar na interpretação do mecanismo de transferência de elétrons entre estes modificadores e o citocromo c [37-41].

Segundo Hill e colaboradores [5,6] essa família de modificadores seria a mais adequada para caracterizar eletroquimicamente a reação redox do citocromo c. Entre os compostos dessa família, o PATS4 seria o mais adequado pois apresenta o nitrogênio piridínico completamente voltado para a solução e "livre" para interagir com a biomolécula.

Em um de seus trabalhos de eletrodos modificados, Hill e colaboradores sugerem que a resposta não reversível das metaloproteínas no eletrodo modificado por PATS2 era devido à formação de ligação de hidrogênio intramolecular nesse modificador, formada entre o par de elétrons do nitrogênio piridínico e o hidrogênio do grupo amida na posição 2'. Desta maneira, o par de elétrons do grupo piridínico não estaria "livre" para interagir com o grupo lisina protonado do citocromo c.

Os resultados anteriores obtidos no nosso laboratório [37-40] mostraram que a configuração do PATS2 adsorvido em eletrodo em meio aquoso é E e não Z (Fig. I-2), de forma que a configuração e o mecanismo de adsorção proposto por Hill, fundamentados em apenas dados eletroquímicos, precisavam ser reavaliados.

Produtos faradâicos do PATSn

Vários trabalhos na literatura discutem a redução faradáica das tiossemicarbazonas das n-formilpiridinas, devido, principalmente, a essas moléculas apresentarem propriedades antivirais e antibacterianas [42].

Segundo Pozdeeva e Novikov [43] essa redução ocorre ou no anel piridínico ou no grupo tiocarbonila. Para Kitaev e col. [44] os compostos PATS4 e PATS3 sofrem redução envolvendo dois elétrons por molécula, não sendo discutido qual o grupo da molécula que é reduzido.

Lund [45] propôs um esquema de redução de tiossemicarbazonas de aldeídos alifáticos onde a redução ocorre em duas etapas, cada etapa envolvendo dois elétrons. Na primeira ocorre redução e quebra da ligação N(1') - N(2') formando a imina correspondente e tiouréia. A segunda etapa consiste na redução da imina a amina. Este esquema de redução faradáica também foi proposto para tiossemicarbazonas de aldeídos e cetonas aromáticas [46].

Espectroscopia SERS

O efeito SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*) foi descoberto em 1974, durante tentativas de se observar o espectro Raman da piridina adsorvida em eletrodo de prata [47]. Observou-se que ativando a superfície metálica através da realização de alguns ciclos de oxidação e redução do eletrodo de trabalho, ocorria intensificação do espectro da piridina adsorvida. Na época, esse aumento da intensidade Raman foi creditado ao aumento na área superficial no eletrodo de prata pois a intensificação só era observada após a realização dos ciclos de óxido-redução do eletrodo. Somente em 1977 os trabalhos de Jeanmaire e Van Duyne [48] e Creighton e Albrecht [49] concluíram que a intensificação do efeito SERS não poderia estar relacionada somente ao aumento da superfície do eletrodo. Nesses estudos, a intensificação dos espectros era da ordem de 10^6 vezes, enquanto que o aumento na área superficial do eletrodo era de apenas 10 vezes.

O efeito SERS ocorre para várias moléculas adsorvidas sobre a superfície de determinados metais como, por exemplo, ouro, prata e cobre [50]. A superfície metálica deve possuir determinadas características para que o efeito SERS possa ser observado. Os sistemas normalmente utilizados são eletrodos ativados eletroquimicamente, superfície de colóides, filmes finos de metais depositados em condições de ultra alto vácuo. A rugosidade da superfície é uma das condições necessárias para que a superfície seja SERS ativa podendo ser submicroscópica (com dimensões entre 10-100 nm) ou em escala atômica (*adatoms* ou vacâncias) [51].

Existem dois mecanismos diferentes que explicam a intensificação observada nos espectros SERS: o eletromagnético e o químico. No efeito eletromagnético ocorre uma intensificação do campo elétrico da radiação (incidente e espalhada) nas proximidades de uma superfície metálica rugosa. Este efeito não altera a polarizabilidade da molécula e portanto não depende da natureza química da molécula e do tipo de interação molécula-metal. O efeito químico, admite que ocorre uma transferência de carga entre o metal e a molécula adsorvida podendo aumentar a polarizabilidade do adsorbato resultando numa intensificação do sinal Raman da ordem de 10^2 . Na maioria das vezes os experimentos SERS são realizados em

superfícies metálicas rugosas, nas quais ambos os mecanismos podem ser ativos. Ainda não existem regras de seleção bem definidas que sejam capazes de detectar a presença do mecanismo de transferência de carga em um determinado sistema. Não é possível saber através de regras simples qual ou quais mecanismos de intensificação dão origem a um determinado espectro [52].

O efeito SERS é um fenômeno, portanto, da intensificação do sinal Raman de moléculas adsorvidas em metais nobres numa ordem de magnitude de 5 ou 6 vezes. Em certos casos, no entanto, a intensificação pode ser enorme, na ordem de 10^{14} a 10^{15} quando combinado com o efeito Raman ressonante. Recentemente, foi possível até detectar o espectro Raman de uma única molécula devido à vantagem da grande intensificação do campo observado no SERS que permite a observação de uma seção de choque efetiva para o espalhamento Raman maior que 10^{-16} cm²/molécula [53-55]. Esse efeito é uma ferramenta excelente para aplicações na área da química analítica.

Efeito Raman Ressonante

O espectro Raman ressonante é obtido quando a energia do fóton da radiação excitante está próxima, ou coincide com a energia de transição eletrônica da espécie espalhadora. Este espectro obtido se diferencia em relação ao espectro Raman ordinário pela intensificação muito grande de algumas bandas Raman. Esta técnica pode então fornecer detalhes dos estados eletrônicos excitados, uma vez que somente modos vibracionais associados ao cromóforo são intensificados no Raman ressonante. Além disso, essa técnica tem alta sensibilidade, permitindo detectar em alguns casos concentrações da ordem de 10^{-6} mol.L⁻¹. Isso faz da espectroscopia Raman ressonante uma importante ferramenta auxiliar para atribuímos o grupo cromóforo associado a transições eletrônicas. Também é útil na atribuição da própria transição eletrônica, pois o tipo de modo vibracional envolvido na intensificação dá uma indicação do tipo de transição envolvida [56].

Quando um adsorbato apresenta uma banda intensa de transferência de carga na região da radiação laser excitante a intensificação SERS se combina com o efeito Raman ressonante, os dois efeitos são multiplicativos e temos o SERRS (*Surface Enhanced Resonance Raman Scattering*).

A espectroscopia Raman Ressonante intensificada pela superfície, SERRS é uma das técnicas mais utilizadas para o estudo de biomoléculas na superfície de eletrodos [57, 58], pois permite caracterizarmos a molécula biológica que interage com o modificador de superfície. Os espectros mostram que a forma reduzida e oxidada do citocromo c mantém-se em sua

conformação nativa quando adsorvido em eletrodo de prata modificado com uma monocamada de dissulfeto de 4-bipiridina ou 4-mercaptopiridina. A pequena distância da biomolécula ao eletrodo modificado, quando esses modificadores são utilizados, permite a observação do espectro SERRS do citocromo c [59]. Por outro lado, em eletrodo de prata sem modificador, as frequências vibracionais das bandas características do estado de spin da biomolécula adsorvida são deslocadas, indicando mudanças conformacionais que podem ser relevantes para a função biológica do citocromo c [60].

I.4- Parte Experimental

Síntese dos compostos

Os compostos derivados do PATS2 foram sintetizados a partir do 2-piridinacetaldeído recém destilado e das tiossemicarbazidas substituídas recristalizadas. Para o 2'MePATS2, 4' MePATS2 e DMePATS2 utilizou-se respectivamente a 2-metil-3- tiossemicarbazida, 4-metil-3- tiossemicarbazida e 4, 4-dimetil-3- tiossemicarbazida. O composto PATS4 foi sintetizado a partir do 4-piridinacetaldeído recém destilado.

Dissolve-se 3 mmols de tiossemicarbazida numa solução 2:1 metanol: água (V:V) a 70°C e em seguida adiciona-se gotas de ácido clorídrico concentrado até que o pH dessa solução seja 4. À essa solução adiciona-se 3 mmols de *n*-piridinaldeído. Essa mistura é deixada em repouso por três horas até que todo o composto formado seja precipitado. O sólido obtido foi filtrado em funil de placa porosa e estocado em dessecador à vácuo.

O complexo de $[\text{Ru}(\text{CN})_5(\text{PATS4})]^{3-}$ foi gentilmente cedido pela Dra. Izaura Diógenes (Universidade Federal do Ceará). O procedimento seguido para a síntese foi dissolver 0,1mmol de $\text{K}_4[\text{Ru}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 2 mL de água previamente desaerada. A reação de aquação do íon complexo hexacianorutenato (II) ocorre *in situ* através da adição de 5 mL de uma solução aquosa contendo 0,1mmol de Br_2 e 1mmol de KBr, sob forte agitação e fluxo de argônio. Embora a reação de aquação seja rápida, o fluxo de argônio deve ser mantido durante um período de 20 minutos para eliminação do possível excesso de Br_2 , evitando dessa forma que o ligante se oxide e forme outros produtos não desejáveis. Em seguida, adicionou-se 0,3 mmol do ligante PATS4 dissolvido em água e deixou-se reagir por uma hora sob fluxo de argônio e agitação. A precipitação foi feita por adição de acetona, a frio. A solução foi deixada em repouso, no refrigerador, por 12 horas. Após esse período procedeu-se a filtração em funil de placa porosa e o precipitado foi estocado em dessecador à vácuo.

A pureza de todos os compostos sintetizados foi verificada através da análise elementar do IQUSP (Perkin-Elmer Model 2400 analyser).

Espectros Raman

Os espectros Raman foram obtidos em celas rotatórias para evitar a decomposição das amostras pela incidência contínua do laser, com resolução espectral de 5 cm^{-1} , no espectrômetro Jobin Yvon U1000.

Espectros SERS

Os espectros SERS foram obtidos na radiação de 632,8 nm (laser He-Ne - Spectra-Physics) em um instrumento Renishaw Raman Imaging Microscope System 3000 equipado com um microscópio com capacidade de aumento de até 80 vezes sendo a detecção efetuada através de um CCD. Os espectros na radiação 413,1 nm foram obtidos no espectrômetro Jobin Yvon U1000 sendo a detecção efetuada através de uma fotomultiplicadora.

Utilizou-se nessas medidas um potenciostato PAR 263 A. Para as medidas em meio de ACN utilizou-se como eletrodo de referência um fio de prata enquanto para soluções em meio aquoso foi utilizado como referência Ag/AgCl saturado.

Procedimento para aquisição do eletrodo SERS ativo

Antes de iniciar qualquer medida SERS, polia-se o eletrodo com lixa d'água *mesh* 1000, em seguida, lavava-se o eletrodo com água bidestilada, sonicava-o em etanol P.A. e finalmente sonicava-o novamente com água bidestilada.

As soluções eletrolíticas utilizadas foram preparadas com reagentes de grau analítico, água bidestilada e ACN de grau espectroscópico. Os modificadores utilizados foram recristalizados antes de todos os espectros, este procedimento melhorou muito a relação sinal-ruído dos espectros. O citocromo c proveniente da Sigma Aldrich foi utilizado sem nenhum tratamento prévio.

O procedimento seguido para a obtenção dos espectros SERS consistiu em:

Ativar o eletrodo de trabalho com ciclos de óxido-redução entre potenciais que dependiam do eletrólito suporte e do eletrodo de trabalho. Para o eletrodo de prata foram aplicados ciclos de 50 mV/s entre potenciais $-0,2\text{V}$ a $+0,2\text{V}$ em solução aquosa 0,1M KCl. Para o eletrodo de ouro aplicou-se 25 ciclos de 100 mV/s entre potenciais $-0,3\text{V}$ a $+1,3\text{V}$ numa solução aquosa 0,1M KCl [61]. A ativação dos eletrodos foi monitorada com o voltamograma

cíclico e com a intensificação do fundo do espectro Raman obtido com o branco (solução aquosa 0,1M KCl). Percebeu-se que a incidência do laser na superfície do eletrodo durante os ciclos de óxido-redução melhorava a relação sinal/ruído dos espectros.

Após ativar o eletrodo obtêm-se espectros da superfície do eletrodo na presença somente das soluções eletrolíticas. Em seguida, troca-se a solução eletrolítica por outra contendo o modificador e obtêm-se o espectro SERS.

Para melhorar a relação sinal ruído do espectro SERS, submetia-se o eletrodo, quando necessário, a mais ciclos de óxido-redução. Observou-se que os espectros eram os mesmos quando se fazia ciclos com ou sem o composto na solução.

Espectros ^1H RMN

Os espectros ^1H RMN foram obtidos no equipamento Brüker 500 MHz (Central Analítica IQUSP). Utilizou-se como padrão o TMS. Todos os espectros foram obtidos na temperatura ambiente.

Espectros UV-Vis

Os espectros eletrônicos UV-Vis foram obtidos no espectrofotômetro Beckmann DU-70. Utilizamos nesses experimentos cela de quartzo de 1mm de caminho óptico.

I.5- Referências Bibliográficas:

1. F.A. French, E.J. Blanz, Jr., S.C. Shaddix, R.N. Brockman, *J. Med. Chem.*, **17**, (1974) 172.
2. W.E. Antholine, J. Knight, H. Whelan, D. Petering, *Mol. Pharm.*, **13** (1977) 89.
3. A.E. Liberta, D.X. West, *Biomet.*, **5** (1992) 121.
4. E.W. Ainscough, A.M. Brodie, W.A. Denny, G.J. Finlay, J.D. Ranford, *J. Inorg. Biochem.*, **70** (1998) 175.
5. H.A.O. Hill, D.J. Page, N.J. Walton, *J. Electroanal. Chem.*, **208** (1986) 395.
6. H.A.O. Hill, D.J. Page, N.J.S. Walton, *J. Electroanal. Chem.*, **217** (1987) 141.
7. F.A. Armstrong, H.A.O. Hill, N.J. Walton, *Acc. Chem. Res.*, **21** (1988) 407.
8. J.E. Frew, H.A.O. Hill, *Eur. J. Biochem.*, **172** (1988) 261.
9. E.J. Blanz, F.A. French, *Cancer Res.*, **28** (1968) 2419.
10. Ah. Altun, M. Kumru, A. Dimoglo, *J. Mol. Structure (Theochem)*, **535** (2001) 235.
11. D.X. West, S.B. Padhye, P.B. Sonawane, *Struct. Bonding* **76** (1991) 1.
12. F.A. French, E.J. Blanz, Jr., J.R. Do Amaral, D.A. French, *J. Med. Chem.*, **13**, (1970) 1117.

13. I.H. Hall, C.B. Lackey, T.D. Kistler, J.S. Ives, H. Beraldo, L.J. Ackerman, D.X. West, *Arch. Pharm. Med. Chem.*, **333** (2000) 217.
14. W.E. Antholine, J.M. Knight, D.H. Petering, *J. Med. Chem.*, **19** (1976) 339.
15. A.E. Liberta, D.X. West, *Biomet.*, **5** (1992) 121.
16. E.W. Ainscough, A.M. Brodie, J.D. Ranford, J.M. Waters, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1997) 1251.
17. J. García-Tojal, A. García-Orad, A.A. Díaz, J.L. Serra, M.K. Urtiaga, M.I. Arriortua, T. Rójo, *J. Inorg. Biochem.*, **84** (2001) 271.
18. D. E. Brodersen, *Tese de doutorado -Institute of Molecular and Structural Biology, University of Aarhus, Dinamarca, 1999.*
19. J.S. Casas, M.S. Garcia-Tasende, J. Sordo, *Coord. Chem. Rev.*, **209** (2000) 197.
20. T. Madrakian, A. Afkhami, J. Ghasemi, M. Shamsipur, *Polyhedron*, **15** (1996) 3647.
21. J. Ghasemi, M. Shamsipur, *J. Coord. Chem.*, **26** (1992) 337.
22. A. Feofanov, A. Ianoul, S. Gromov, O. Fedorova, M. Alfimov, I. Nabiev, *J.Phys. Chem.*, **101** (1997) 4077.
23. M.J. Eddowes, H.A.O. Hill, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1977) 771.
24. F.A. Armstrong, G.S. Wilson, *Electrochim. Acta*, **45** (2000) 2623.
25. P.M. Allen, H.A.O. Hill, N.J. Walton, *J. Electroanal. Chem.*, **178** (1984) 69.
26. I. Taniguchi, K. Toyosawa, H. Yamaguchi, K. Yasukouchi, *J. Chem. Soc., Chem Commun.* (1982) 1032.
27. I. Taniguchi, K. Toyosawa, H. Yamaguchi, K. Yasukouchi, *J. Electroanal. Chem.*, **140** (1982) 187.
28. J.J. Davis, H.A.O. Hill, A.M. Bond, *Coord. Chem. Rev.*, **200-202**(2000) 411.
29. I. Taniguchi, M. Iseki, H. Yamaguchi, K. Yasukouchi, *J. Electroanal. Chem.*, **175** (1984) 341.
30. T. Sawaguchi, F. Mizutani, S. Yoshimoto, I. Taniguchi, *Electrochim. Acta*, **45** (2000) 2861.
31. M. Fedurco, *Coord. Chem. Reviews*, **209** (2000) 263.
32. S.R. Betso, M.H. Klapper, L.B. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 8197.
33. P. Hildebrandt, M. Stockburger, *Biochemistry* **28** (1989) 6710.
34. G. Niaura, A.K. Gaigalas, V.L. Vilker, *J. Electroanal. Chem.* **416** (1996) 167.
35. D. Hobara, K. Niki, T.M. Cotton, *Biospectroscopy* **4** (1998) 161.
36. L.A. Dick, A.J. Haes, R.P. Van Duyne, *J.Phys. Chem. B* **104** (2000) 11752.
37. L.S. Pinheiro, Dissertação de mestrado, IQUSP, 1990.

38. L.S. Pinheiro, M.L.A. Temperini, *J. Electroanal. Chem.*, **295** (1990) 169.
39. M.R. dos Santos, Dissertação de mestrado, IQUSP, 1995.
40. M.L.A. Temperini, M.R. dos Santos, V.R. Paoli Monteiro, *Spectrochim. Acta.*, **51A** (1995) 1517.
41. M.M.B. Pessoa, G.F.S. Andrade, V.R. Paoli Monteiro, M.L.A. Temperini, *Polyhedron*, **20** (2001) 3133.
42. I.S. Shehatta, A.M. Hassanein, E.M. Mabrouk, *Monatshefte fur Chemie*, **126** (1995) 851.
43. A.G. Pozdeeva, E.G. Novikov, *J. of Applied Chem. of the USSR*, **39** (1966) 2508.
44. Y.P. Kitaev, G.K. Budnikov, T.V. Trepol'skaya, I.M. Skrebkova, *J. of General Chem. of the USSR*, **37** (1967) 1362.
45. H. Lund, *Acta Chem. Scandinavica*, **13** (1959) 249.
46. Y. Asahi, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **11** (1963) 930.
47. M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, *J. Chem. Phys. Lett.*, **26** (1974) 163.
48. D.L. Jeanmaire, R.P. VanDuyne, *J. Electroanal. Chem.*, **84** (1977) 1.
49. M.G. Albrecht, J.A. Creighton, *J. Am. Chem. Soc.*, **99** (1977) 5215.
50. C.A. Jennings, G.J. Kovacs, R. Aroca, *Langmuir*, **9** (1993) 2151.
51. A. Campion, *Vibrational Spectroscopy of Molecules on Surfaces*, J.T. Yeates, T.E. Madey, Plenum Press, 1987.
52. J.F. Arenas, M.S. Wolley, J.C. Otero, J.M. Marcos, *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 3119.
53. K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2957.
54. A.M. Michaels, J. Jiang, L. Brus, *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 11965.
55. C.J.L. Constantino, T. Lemma, P.A. Antunes, R. Aroca, *Anal. Chem.* **73** (2001) 3674.
56. W.J. Barreto, Tese de Doutorado, IQUSP 1993.
57. T. M. Cotton, D. Kaddi, D. Iorga, *J. Am. Chem. Soc.*, **105** (1983) 7462.
58. M. S. Sibbald, G. Chumanov, T. M. Cotton, *J. Phys. Chem.*, **100** (1996) 4672.
59. D. Hobara, K. Niki, C. Zhou, G. Chumanov, T.M. Cotton, *Colloids. Surf., B* **93**(1994) 241.
60. S. Lecomte, H. Wackerbarth, T. Soulimane, G. Buse, P. Hildebrandt, *J. Am. Chem. Soc.*, **120** (1998) 7381.
61. C. Zhou, S. Te, J.H. Kim, T.M. Cotton, X. Yu, T. Lu, S. Dong, *J. Electroanal. Chem.*, **319** (1991) 71.

Capítulo II- Estudo Espectroscópico dos Compostos em Solução

II.1- Introdução

Durante os últimos trinta anos, têm-se caracterizado e testado a atividade biológica dos complexos de metais de transição das tiossemicarbazonas do 2-formilpiridina e de seus derivados [1-5]. Desde então, esses trabalhos de pesquisa têm comparado e quantificado a atividade anti-bacterial, antimalárica, antineoplástica e antiviral dos complexos de transição com os ligantes livres. Sugere-se que, quando complexados a metais como Cu e Fe, a atividade biológica desses compostos é intensificada em comparação aos ligantes livres [1, 6-8].

Embora existam diversos trabalhos na literatura que reportem a caracterização de complexos de metais de transição, a interação entre cátions alcalinos e alcalinos terrosos e as tiossemicarbazonas do 2-formilpiridina e seus derivados nunca foi mencionada, mesmo sabendo que cátions como Mg^{2+} e Ca^{2+} são de grande interesse em sistemas biológicos.

A principal dificuldade no estudo da química de coordenação de cátions alcalinos e alcalinos terrosos com ligantes convencionais é que normalmente esses complexos são fracos e, portanto, difíceis de serem detectados [9, 10].

O objetivo desse estudo consiste na determinação da configuração mais estável do PATS2 e de seus derivados metilados no estado sólido e em diferentes solventes utilizando as técnicas Raman e RMN. A influência dos cátions alcalinos e alcalinos terrosos no processo de isomerização E-Z do PATS2 bem como a formação de complexos desses cátions com o DMePATS2 também foram investigados.

II.2- Parte Experimental

Os espectros Raman das soluções foram obtidos utilizando como radiação excitante a linha 457.9 nm de um laser Ar^+ (*Innova 90- Coherent Radiation*); a potência do laser na amostra foi de no máximo 50 mW. Devido à fluorescência do 2'MePATS2 na região do azul, os espectros Raman dos compostos no estado sólido foram obtidos utilizando como radiação excitante a linha 647.1 nm do laser Kr^+ (*Innova 90- Coherent Radiation*).

As soluções foram preparadas com os compostos recém recristalizados e com os solventes dimetilsulfóxido (DMSO) e acetonitrila (ACN) recém destilados e com água bidestilada. Os demais solventes foram utilizados sem nenhum tratamento prévio.

As concentrações das soluções variaram entre 0,05 mol.L⁻¹ e soluções saturadas, dependendo da solubilidade dos compostos. Para o PATS2 foi utilizada solução saturada para

todos solventes. Não foi possível obter o espectro Raman do PATS2 em 1,2 dicloro etano ($C_2H_4Cl_2$) e em piridina devido à insolubilidade deste composto nesses solventes. Para o DMePATS2 em ACN e em DMSO utilizamos uma concentração de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ do composto e, para os demais solventes, utilizamos solução saturada.

No processo de isomerização E-Z, as concentrações do ânion perclorato foram de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. A concentração dos cátions utilizadas na formação dos complexos com DMePATS2 foi de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.

Os solventes d_3 -ACN, D_2O , CD_2Cl_2 , d_6 -DMSO e d_6 -py foram utilizados nos espectros RMN utilizando como referência interna o TMS. Todos os espectros foram obtidos em temperatura ambiente.

II.3- Resultados e Discussões

Utilizou-se para a determinação da configuração dos compostos no estado sólido resultados anteriores obtidos através da espectroscopia Raman [11-13] onde a atribuição das frequências características de cada isômero foi baseada em análises de coordenadas normais e cálculos *ab initio* da tiosemicarbazida [14-16] assim como a atribuição proposta por Beraldo e Tosi para o PATS2 [17] e por Green e Harrison para formilpiridina [18]. As bandas em 1231, 1437, 1587 e 1606 cm^{-1} são utilizadas para caracterizar o isômero E enquanto que as bandas em 1218, 1470, 1557 e 1596 cm^{-1} são características do isômero Z.

A Tabela II.1 apresenta as frequências das bandas Raman e a atribuição tentativa dos modos vibracionais dos compostos no estado sólido.

Tabela II.1- Atribuição tentativa das bandas Raman do PATS2, 2'MePATS2, 4'MePATS2 e DMePATS2. Em *itálico* estão as bandas observadas após a deuteração do PATS2.

E-PATS2	d ₃ -PATS2 [15]	Z-PATS2 [14]	Bandas características	2'MePATS2	4'MePATS2	DMePATS2	Atribuição do PATS2
998 (2.7)	995 (2.2)			990 (5.4)	997 (3.1)	999 (sh)	Respiração do anel py (1)
-		997 (4.0)		1007 (1.4)	1004 (sh)	1006 (3.4)	
-	<i>1040 (1.4)</i>	-		1048 (0.2)	1050 (0.2)	1049 (0.8)	β CH py (18a, 18b)
1089 (1.2)	1080 (0.4)	1080 (1.5)		-	1084 (1.1)	-	ν CS + ν NH ₂ + δ N(2')H
1113 (1.4)	-	1108 (1.3)		-	1108 (1.0)	1098 (2.0)	
1152 (0.2)	1150 (0.3)	-		1172 (br)	1150 (1.0)	1161 (0.9)	ν CS + ν N-N + ν CN + δ (NCS)
-	-	1218 (4.0)	Z	-	-	1215 (5.1)	β CH py X sens.
1231 (2.1)	1230 (2.4)	1230 (sh)	E	1232 (2.2)	1233 (2.3)	-	
1256 (0.2)	1256 (0.4)	-		-	1263 (0.2)	1252 (0.7)	β CH py (9a ou 3)
1295 (1.7)	1290 (2.4)	-		1296 (3.8)	1293 (0.4)	1300 (0.1)	
					1314 (0.4)	1312 (0.5)	ν N-N + ν CN
-	<i>1342 (0.6)</i>			1350 (0.5)			
-	<i>1400 (3.0)</i>	1386 (1.5)	Z			1396 (1.0)	
1431 (1.4)	-	-	E	1432 (sh)	-	-	δ N(4')H ₂ + ν CN
1437 (1.7)	1437 (0.9)	1437 (0.8)		1439 (2.2)	1436 (2.5)	-	py
1469 (0.5)	-	1470 (2.1)	Z	1465 (0.5)	1470 (0.4)	1475 (2.7)	δ N(4')H ₂ + ν CN
1530 (0.5)	-	-		-	1529 (0.4)	1543 (sh)	δ N(2')H + ν CN
		1557 (10)	Z			1553 (6.5)	ν C=N(1') +
1587 (10)	1585 (10)	1586 (sh)	E	1586 (10)	1587 (10)	-	py ν C-C (8a ou 8b) +
1594 (sh)		1596 (9.0)	Z	-	-	1591 (10)	py ν C-C (8b ou 8a)
1606 (3.8)	1605 (7.8)	-	E	1605 (6.0)	1604 (5.4)		
-		-		1612 (sh)			

Intensidade relativa em parêntesis, sh = *shoulder*; br = *broad*

A Figura II.1 apresenta os espectros Raman dos compostos da família do PATS2 no estado sólido.

Figura II.1- Espectros Raman dos compostos da família do PATS2 no estado sólido; $\lambda_0=647,1$ nm.

O espectro do PATS2 mostra que esse composto é sintetizado na configuração E [13]. O espectro Raman do 2'MePATS2 é muito similar ao do E-PATS2, como esperado uma vez que a presença do grupo metila no átomo N(2') impede a formação do isômero Z. A presença das bandas em 1233, 1436, 1587 e 1604 cm^{-1} no espectro do 4'MePATS2 indica que a configuração desse composto também é E no estado sólido. O espectro Raman do DMePATS2 no estado sólido apresenta somente as bandas em 1215, 1475, 1553 e 1591 cm^{-1} indicando que a configuração Z é a mais estável para esse composto. M.L.A. Temperini e colaboradores sintetizaram tanto o isômero Z quanto o E-PATS2. A comparação entre os espectros RMN com os espectros Raman possibilitou determinar quais são as bandas Raman características de cada isômero [13].

A presença da ponte de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio ligado ao átomo N(2') e o átomo de N do anel piridínico deveria estabilizar a configuração Z nesses compostos, mas os dados espectroscópicos indicaram que o único composto dessa família que tem a configuração Z é o DMePATS2. Infelizmente, não encontramos na literatura um trabalho que utilize dados de raio-X para reportar a estrutura do DMePATS2, porém, as atribuições das configurações do PATS2 e do 4'MePATS2 através das espectroscopias Raman e RMN corroboram com resultados de raio-X desses compostos [19, 20].

A estabilização do isômero E pode ser interpretada devido à presença de pontes de hidrogênio intermoleculares entre os átomos de hidrogênio ligados ao átomo N(4') e o átomo de

nitrogênio ligado ao anel piridínico. No caso do DMePATS2, não existe ponte de hidrogênio intermoleculares, pois os átomos de hidrogênio ligados ao N(4') foram substituídos por metilas estabilizando, portanto, a ligação de hidrogênio intramolecular entre o átomo de hidrogênio ligado ao N(2') e o átomo de nitrogênio do anel piridínico.

Efeito do solvente na configuração do PATS2, 2'MePATS2, 4'MePATS2 e DMePATS2

Conhecendo a configuração mais estável desses compostos no estado sólido é possível estudar a influência do meio nas suas configurações em solução. Enquanto que o PATS2 é sintetizado preferencialmente na configuração E, o DMePATS2 é sintetizado na forma Z permitindo uma comparação entre os compostos. Desta maneira, partindo de dois isômeros diferentes podemos determinar qual o efeito e a importância do solvente na configuração destes compostos. Não foi possível, infelizmente, obter resultados com o 4'MePATS2 em diferentes solventes devido a insolubilidade nos solventes utilizados nesse estudo.

A Figura II.2 apresenta os espectros Raman do PATS2 nos solventes estudados. Os espectros mostram como o isômero E muda para Z dependendo do solvente.

Figura II.2- Espectros Raman do PATS2 nos diversos solventes, $\lambda_0=457,9$ nm (* bandas dos solventes).

A presença do isômero E-PATS2 em DMSO e em água, já havia sido discutida por Temperini e colaboradores [12, 13], a diferença observada entre esses dois espectros, principalmente quanto ao valor das frequências vibracionais dos modos relacionados com o anel piridínico são relacionados às interações por ligações de hidrogênio entre o anel piridínico e moléculas de água (esse tipo de interação não existe com o DMSO).

No espectro Raman de uma solução recém preparada de PATS2 em ACN observam-se bandas em 990, 1226, 1584 e 1606 cm^{-1} que são características do isômero E indicando a presença desse isômero em solução. A presença das bandas com pequena intensidade em 996, 1214 e 1558 cm^{-1} indicam também, a presença isômero Z nessa solução.

A análise dos espectros Raman da solução de PATS2 em ACN em função do tempo de preparo da solução mostrou que ocorre uma intensificação das bandas características do isômero Z concomitante ao decréscimo das bandas relacionadas ao isômero E indicando que a concentração relativa desses dois isômeros em solução muda com o tempo. Quando o equilíbrio é atingido, i.e. quando não se observam mais variações com relação à variação na intensidade relativa das bandas nos espectros Raman, as bandas características do isômero Z são predominantes no espectro.

A isomerização E-Z do E-PATS2 em ACN em função do tempo de preparo das soluções também foi analisada através da técnica ^1H RMN, utilizando os deslocamentos químicos dos prótons ligados ao grupo formil C(7)H (7,26) e tiourea N(2')H (14,3) para monitorar esse processo [21]. As intensidades dos picos relativos aos prótons do isômero Z aumentam em relação à intensidade dos picos relacionados aos prótons do isômero E. Quando o equilíbrio é atingido, ou seja, quando não se observa mais variação nos espectros RMN, a relação E/Z é igual a 60/40 (Tabela II.2).

Tabela II.2- Deslocamentos químicos obtidos nos espectros RMN (δ , ppm) do E-PATS2 em diferentes solventes, após atingir o equilíbrio.

Solvente	7 E	7 Z	2' E	2' Z	3 E	3 Z	4 E	4 Z	5 E	5 Z	% Z
CH_2Cl_2	7.88	7.18	9.10	14.4	7.90	7.47	7.76	7.89	7.32	7.40	90
$\text{d}_3\text{-ACN}$	7.97	7.26	9.81	14.3	8.04	7.60	7.80	7.97	7.35	7.57	40
$\text{d}_6\text{-DMSO}$	8.08	7.43	11.6	14.0	8.27	7.79	7.82	8.09	7.37	7.57	0
D_2O	8.10	7.46	-	-	7.92	7.67	7.95	8.02	7.50	7.54	0

É importante ressaltar que no espectro Raman, as bandas predominantes na solução em equilíbrio são características do isômero Z, apesar da concentração desse isômero em solução ser praticamente igual à do isômero E (dados RMN). Utilizamos os espectros RMN para determinar a relação de isômero E/Z na solução de PATS2 em acetonitrila, pois a integração dos picos obtida nos espectros é diretamente relacionada com a concentração da espécie em solução. No espectro Raman, as intensidades das bandas dependem não só da concentração da espécie em solução, mas também do tensor de polarizabilidade das espécies [22]. A intensidade Raman

depende da probabilidade de transição, ou seja, do quadrado do momento de transição e da quarta potência da frequência da radiação espalhada, conforme a fórmula:

$$I_{mn} = \left(\frac{16\pi^2}{9c^4} \right) I_0 \nu^4 \sum_i \sum_j |(\alpha_{ij})_{mn}|^2$$

onde, I_0 é a intensidade da radiação incidente e ν é a frequência da radiação espalhada.

A variação encontrada entre a integração dos picos no espectro ^1H RMN e as intensidades relativas das bandas nos espectros Raman indicam que a polarizabilidade da espécie E deve ser diferente do isômero Z, a polarizabilidade do isômero Z é maior que a do E-PATS2.

A isomerização E-Z do PATS2 também foi verificada na solução de PATS2 em CH_2Cl_2 . No espectro Raman dessa solução em equilíbrio, observam-se somente as bandas características do isômero Z.

Nos espectros Raman das soluções alcoólicas como n-propanol e isopropanol, solventes que permitem a formação de pontes de hidrogênio tanto com o N(2') como com o N piridínico do PATS2, verificamos que as principais bandas são também características do isômero E. A presença do ombro em *ca.* 1214 cm^{-1} e da banda em 1560 cm^{-1} pode sugerir a existência do isômero Z nessas soluções, mas assim como em solução aquosa, essas bandas devem estar relacionadas com a presença da ponte de hidrogênio intermolecular entre o N piridínico e a água.

A Tabela II.3 apresenta os valores das frequências vibracionais para o E e Z-PATS2 no estado sólido (somente para comparação) e os valores obtidos nos diversos solventes que permitem determinar a configuração mais estável do PATS2 em cada solvente.

Tabela II.3- Frequências Raman do PATS2 sólido e em vários solventes.

E-PATS2	998		1231	1437	1469		1587	1594	1606	E
Z-PATS2	997	1218	1230		1470	1557		1596		Z
DMSO	993		1232	1436			1587		1601	E
H ₂ O	1008		1234	1441			1570	1595	1618	E
n-propanol	999	1214(sh)	1230			1564	1588		1608	E
isopropanol	997	1212(sh)	1227			1562	1588		1608	E
ACN#	996	1212(sh)	1228			1557	1584	1599		E-Z
CH ₂ Cl ₂	993	1213			1473	1560		1602		Z

no equilíbrio, sh= *shoulder* (ombro)

Os solventes utilizados podem ser classificados quanto à capacidade de formação de pontes de hidrogênio como [23]:

- Doadores de Hidrogênio: CH_2Cl_2
- Receptores de Hidrogênio: DMSO, ACN
- Doadores e receptores de Hidrogênio: H_2O , n-propanol e isopropanol

A isomerização do E para o Z-PATS2 deve ocorrer somente em solventes que não interajam com o hidrogênio ligado ao N(2') do PATS2, de modo que a ponte de hidrogênio intramolecular do isômero Z seja favorecida.

Apesar de ACN ser um solvente receptor de hidrogênio o isômero Z é estabilizado, ou seja, a ligação de hidrogênio entre o HN(2') do PATS2 com o solvente é fraca. Além disso, a ACN deve favorecer o rompimento das pontes de hidrogênio intermoleculares que existem no PATS2 sólido (entre HN(4') e S e HN(4') e H_2O) que estabilizavam o isômero E (no estado sólido) [24].

Em DMSO o isômero E é estabilizado, pois seu caráter receptor de próton é maior que a ACN. O oxigênio do DMSO, além de ser mais eletronegativo que o nitrogênio da ACN, sente o efeito indutivo +i das duas metilas fazendo com que no DMSO, a ponte de hidrogênio seja favorecida.

Em água e nas soluções alcoólicas pode ocorrer tanto formação de pontes de hidrogênio com o N piridínico como também com o H ligado ao N(2') existindo, portanto uma maior concentração do isômero E nessas soluções.

Phillies e colaboradores [25] mostraram a dependência da configuração dos antibióticos macrocíclicos nonactin, monactin, dinactin e tetranactin em diferentes solventes. Eles verificaram que em solventes que têm a tendência a formar ligação de hidrogênio como H_2O , DMSO e álcoois, a configuração do composto nessas soluções deve ser “aberta”, permitindo a formação de ligações de hidrogênio entre o solvente e as moléculas em estudo. Os nossos resultados são coerentes com esse trabalho onde o E-PATS2 (configuração “aberta”) possui o nitrogênio piridínico e o hidrogênio ligado ao N(2') “livres” para interagir com a molécula do solvente. A ligação de hidrogênio intramolecular no isômero Z (configuração “fechada”) impede que existam interações tipo pontes de hidrogênio entre o Z-PATS2 e as moléculas do solvente, sendo esse isômero o mais estável em solventes como ACN e CH_2Cl_2 .

A Figura II.3 representa as interações intermoleculares discutidas acima.

Figura II.3- Representação das interações intermoleculares (PATS2-solvente).

A Figura II.4 apresenta os espectros Raman do 2'MePATS2 em diversos solventes. Nenhuma variação significativa quanto à frequência e intensidade relativa das bandas foi observada nos espectros Raman do 2'MePATS2 entre os solventes estudados (H₂O, DMF, DMSO e CH₂Cl₂), o que já era esperado uma vez que o grupo metila ligado ao N(2') “evita” a formação do isômero Z devido ao impedimento estérico.

Figura II.4- Espectros Raman do 2'MePATS2 nos diversos solventes, $\lambda_0=457,9$ nm (* bandas dos solventes).

O estudo do 4'MePATS2 em diferentes solventes foi comprometido devido à baixa solubilidade desse composto nos solventes estudados, somente em DMSO conseguiu-se obter uma solução cuja concentração possibilitou a aquisição do espectro Raman. Para os outros solventes, a solubilidade era tão baixa que não foi possível obter sinal Raman das soluções. O espectro Raman em DMSO indicou a predominância do isômero E nessa solução. Esse resultado é consistente com dados de RMN em DMSO relatados na literatura para esse composto [8].

A Figura II.5 apresenta os espectros Raman do DMePATS2 em diferentes solventes e a Tabela II.4 os resultados RMN dessas soluções. Para CD_2Cl_2 , D_2O , d_3 -ACN, d_6 -DMSO e d_6 -piridina (py) as porcentagens dos isômeros foram obtidas com os espectros RMN onde através da integração dos picos observados pudemos calcular a porcentagem de cada isômero existente na solução. Para as demais soluções, obtivemos somente os espectros Raman, pois não tínhamos os solventes deuterados para os espectros RMN.

Figura II.5- Espectros Raman do DMePATS2 nos diversos solventes, $\lambda_0=457,9$ nm (* bandas dos solventes).

Os espectros Raman em ACN e CH_2Cl_2 são semelhantes ao espectro do composto obtido no estado sólido, indicando que o isômero Z predomina nesses solventes. O espectro RMN da solução de DMePATS2 em $\text{d}_3\text{-ACN}$ indica a presença de 78% do isômero Z em solução (Tabela II.4). A presença dos 22% do isômero E nessa solução pode ser inferida a partir dos alargamentos das bandas em 1001 e 1593 cm^{-1} no espectro Raman dessa solução.

O espectro Raman do DMePATS2 em DMSO apresenta as bandas características do isômero E em 996, 1234, 1438 e 1586 cm^{-1} junto com bandas do isômero Z de menor intensidade relativa, indicando que nesse solvente o isômero predominante é o E e que portanto, ocorreu isomerização em solução. O espectro RMN dessa solução mostrou que existem 22% do isômero Z nesse solvente.

O espectro RMN do DMePATS2 em solução aquosa apresenta 60% do isômero E em solução após atingido o equilíbrio (Tabela II.4) enquanto que o espectro Raman apresenta bandas características do isômero E com um pequeno deslocamento nos valores de frequência no sentido de maior comprimento de onda. O deslocamento nos valores de frequência observado nos espectros Raman em solução em comparação com os valores das frequências observados no espectro da solução em DMSO pode ser atribuído à ligação de hidrogênio entre as moléculas de água e o DMePATS2 conforme já mencionado para o PATS2 [12, 13].

A presença das bandas em 1000, 1210, 1555 e 1593 cm^{-1} nos espectros do DMePATS2 em 1,2- $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$, CH_2Cl_2 e ACN indica que o isômero Z é o predominante nessas soluções, pois não existe a possibilidade de interação tipo ponte de hidrogênio com o solvente que favoreça a isomerização.

Tabela II.4- Deslocamentos químicos obtidos nos espectros RMN (δ , ppm) do Z-DMePATS2 em diferentes solventes, após atingir o equilíbrio.

Solvente	7 E	Z	2' E	Z	3 E	Z	4 E	Z	5 E	Z	% Z
CH_2Cl_2	-	7.43	-	15.1	-	7.47	-	7.88	-	7.34	95
$\text{d}_3\text{-ACN}$	8.13	7.52	9.64	15.2	7.97	7.65	7.84	8.04	7.38	7.50	78
$\text{d}_6\text{-DMSO}$	8.23	7.59	11.2	15.1	7.89	7.77	7.84	8.09	7.37	7.54	22
D_2O	8.31	7.53	--	--	7.96	7.68	7.94	8.02	7.49	7.50	40
$\text{d}_6\text{-py}$	8,46	7,58	11,97	15,1	8,08	7,40	7,64	7,74	7,17	7,2	45

O modelo de configuração aberta ou fechada descrito para o PATS2, também serve para explicar a isomerização do DMePATS2. Em solventes com maior capacidade para formar ligações de hidrogênio, maior a tendência do Z -DMePATS2 (configuração fechada) isomerizar para E (aberta).

Tanto o *n*-propanol como o isopropanol, possuem grupos hidroxilas que podem formar ligação de hidrogênio com o N piridínico, enfraquecendo a ponte de hidrogênio intramolecular causando a isomerização de Z para E. Os ombros existentes em 1234 e 1587 cm^{-1} nos espectros Raman das soluções alcoólicas de DMePATS2 em *n*-propanol e isopropanol indicam a presença do isômero E nestas soluções. A isomerização deve ser favorecida no isopropanol em relação ao

n-propanol devido ao efeito +i referente à posição das metilas, que deixa o hidrogênio da hidroxila mais ácido do que no n-propanol formando ligações de hidrogênio mais fortes resultando então, no aumento da concentração do isômero E. Esses ombros são intensificados nas soluções em H₂O, piridina, DMF e DMSO mostrando nesta ordem, o aumento da concentração do isômero E nessas soluções.

Em H₂O, DMSO e DMF o isômero E é favorecido já que esses solventes possuem átomos de oxigênio formadores de ligações de hidrogênio com o H N(2') do composto. Além dessa interação, pode ocorrer também a formação de ligações de hidrogênio entre o N piridínico e as moléculas de água e DMF.

A análise do espectro Raman do DMePATS2 em piridina é mais complexa, pois os modos vibracionais mais intensos do composto observados nos espectros estão relacionados aos modos do anel piridínico e praticamente coincidem com o espectro do solvente. Esse espectro mostra que existe uma mistura dos dois isômeros: E e Z. A piridina (solvente) deve “competir” com o anel piridínico do composto para interagir com o hidrogênio ligado ao N(2') do DMePATS2.

A Tabela II.5 apresenta os valores das frequências vibracionais para o Z-DMePATS2 no estado sólido (somente para comparação) e os valores obtidos nos diversos solventes que permitem determinar a configuração mais estável do DMePATS2 em cada solvente.

Tabela II.5- Frequências Raman do DMePATS2 sólido e em vários solventes.

Z-DMePATS2	999	1006	1098	1215	1475	1553	1591	isômero
(CH ₂) ₂ Cl ₂		1002	1097		1471	1555	1593	Z
CH ₂ Cl ₂		1003	1098	1210	1472	1556	1595	Z
ACN		1004	1098	1210	1473	1553	1593	Z
n-propanol		1002		1209 1234(sh)	1471	1556	1587(sh)	E
isopropanol		1002		1209 1232(sh)	1471(sh)	1557	1587	E
DMF	993	1003		1210 1230	1473	1556	1584	E
Py				1216 1226	1471	1553	1581	E
H ₂ O				1212	1439	1472	1559	E
DMSO	996			1214 1233	1475	1558	1597	E

sh=shoulder (ombro)

Gutmann [26, 27] definiu *donor number* como o valor de entalpia molar da reação entre o solvente, doador de um par de elétrons, com o haleto de antimônio (SbCl₅) – receptor em um meio inerte como 1-2- dicloro etano.

Existem diversos modelos que têm sido empregados para explicar as interações entre solventes e solutos baseados nas propriedades físicas dos solventes como permissividade relativa, constante dielétrica, etc. Segundo Gritzner [28], essas propriedades não são adequadas

para explicar efeitos cinéticos e termodinâmicos relacionados às interações solvente-soluto. Tentou-se com os nossos dados relacionar a porcentagem do isômero E existente em solução com os valores da permissividade relativa e com os valores de momento de dipolo dos solventes, mas não foi possível obter nenhuma correlação. Por outro lado, o valor de *donor number*, que descreve as interações individuais das moléculas do solvente com as espécies dissolvidas em solução em termos de ligações químicas, apresentou uma boa correlação com os nossos dados.

A Figura II.6 relaciona todos os resultados espectroscópicos e permite a comparação entre o efeito do solvente no PATS2 e no DMePATS2.

Figura II.6- Relação entre a porcentagem do isômero E-PATS2 e E-DMePATS2 com o *donor number* do solvente.

Quanto maior for a capacidade do solvente em doar um par de elétrons para o composto formando ligação com o hidrogênio ligado ao N(2'), maior será a tendência do isômero Z (estável no estado sólido) isomerizar na solução. Esta relação pode ser observada na Fig. II.6 onde se verifica a linearidade entre o *donor number* do solvente e a porcentagem do isômero E, tanto para o PATS2 como para o DMePATS2. Como pode ser observado existe um aumento da porcentagem do isômero E em solução com o aumento da capacidade doadora de par de elétrons do solvente.

O isômero Z é estabilizado em solventes como CH_2Cl_2 que tem baixo valor de *donor number*. Esse resultado é explicado devido ao fato de que nesses solventes, com baixa capacidade de doar par de elétrons e, portanto, de interagir com o hidrogênio ácido ($\text{H}(\text{N}2')$), a interação intramolecular através da ponte de hidrogênio $\text{N}(2')\text{H}\dots\text{N}$ piridínico é favorecida estabilizando a configuração Z. Conforme aumenta a habilidade doadora de par de elétrons, mais forte será a ligação de hidrogênio intermolecular entre o $\text{HN}(2')$ e o solvente, aumentando assim, a estabilidade da configuração E.

Comparando as porcentagens do isômero E do PATS2 e do DMePATS2 nos solventes H_2O e DMSO verifica-se o efeito que as metilas substituintes no $\text{N}(4')$ do DMePATS2 causaram na estabilização da configuração desses compostos. A possibilidade de interação entre o PATS2 e moléculas do solvente através dos átomos de hidrogênio ligados ao $\text{N}(4')$ faz com que tanto em água quanto em DMSO exista somente o isômero E-PATS2. A presença dos grupos metilas substituídas no $\text{N}(4')$ do DMePATS2 impedem interações intermoleculares por ligações de hidrogênio que estabilizaria o isômero E e existindo, portanto o isômero Z nessas soluções.

É interessante ressaltar a importância das metilas substituídas na estabilização do isômero Z. Em solução aquosa, o N piridínico pode interagir com as moléculas de água através de ligações de hidrogênio [13]. Comparando a porcentagem do isômero E-DMePATS2 em água e em DMSO, no entanto, é verificado que apesar da possibilidade dessa interação, a configuração E é mais estável, proporcionalmente, em DMSO que em água.

Conclui-se então que a interação intermolecular $\text{N}(2')\text{H}$ é o principal fator que governa a estabilidade da configuração E em solução. Além disso, a porcentagem existente de isômero E em solução depende do balanço existente entre as ligações de hidrogênio intermoleculares (solvente-composto) e intramolecular.

Influência da radiação excitante na isomerização do PATS2

Os espectros Raman do PATS2 em CH_2Cl_2 mostraram que a isomerização de E para Z-PATS2 era praticamente instantânea, porém os resultados RMN, efetuados sem incidência de luz laser, indicaram que a isomerização não era instantânea nesse solvente. Esse resultado sugeriu que a incidência de luz na amostra estaria catalisando o processo de isomerização. Essa hipótese foi verificada e para tanto, foram obtidos os espectros de uma solução de PATS2 nesse solvente em função do tempo de incidência de diferentes radiações excitantes.

Foram preparadas três soluções saturadas de PATS2 em CD_2Cl_2 no escuro, deixou-se durante uma hora, uma lâmpada de mercúrio que emite radiação no ultravioleta irradiando luz

sobre a primeira solução e a linha 457,9 nm do laser de argônio irradiando luz sobre a segunda solução; a terceira solução foi mantida no escuro. Os espectros Raman dessas soluções, com exceção da terceira (escuro) que não foi monitorado em função do tempo, foram obtidos utilizando a linha 457,9 nm do laser Ar^+ como radiação excitante. Foram obtidos também, os espectros RMN dessas soluções em função do tempo.

A Figura II.7A apresenta os espectros Raman de uma solução saturada de PATS2 em CD_2Cl_2 obtidos após incidência da radiação 457,9 nm por uma hora (potência 50 mW na amostra) em função do tempo. A presença das bandas em 1226, 1431, 1584, 1604 cm^{-1} no espectro inicial indica a existência do isômero E. Após a obtenção desse espectro, a solução foi mantida no escuro. Comparando os espectros dessa figura, observa-se que com o tempo ocorre a intensificação da banda em 1560 cm^{-1} concomitante com a diminuição de intensidade da banda em 1584 cm^{-1} . Esse resultado confirma os anteriores que indicam que com o tempo de preparação da solução ocorre isomerização E para Z-PATS2 em CD_2Cl_2 . O último espectro apresentado na Fig. II.7A, após um mês de preparo da solução, indica que o equilíbrio E-Z PATS2 já foi atingido, mas a presença de novas bandas em 1495 e 1650 cm^{-1} sugere também que a amostra se decompôs ou que uma nova espécie se formou em solução.

Figura II.7- Espectros Raman de uma solução saturada de PATS2 em CD_2Cl_2 submetida a diferentes tratamentos, $\lambda_0=457,9 \text{ nm}$ (* bandas do solvente).

A Figura II.7B apresenta os espectros Raman de uma solução saturada de PATS2 em CD_2Cl_2 que sofreu incidência da luz proveniente de uma lâmpada de mercúrio por uma hora. O primeiro espectro dessa figura apresenta as bandas 1214, 1561, 1602 cm^{-1} que são características do isômero Z. Observa-se também nesse espectro a presença de um ombro em 1587 cm^{-1} característico do isômero E. Após a obtenção desse espectro, a solução foi mantida no escuro.

Comparando esses espectros com os da Figura II.7A observa-se que o primeiro espectro apresenta as bandas características do isômero Z. A relação sinal-ruído desses espectros é menor do que os espectros da Figura II.7A devido à decomposição da amostra com a radiação. O primeiro espectro dessa série, no entanto, já apresenta as bandas intensas do isômero Z indicando que esse é o isômero predominante em solução. Com o tempo, não se observa uma variação significativa da intensidade relativa das bandas, somente uma diminuição na relação sinal-ruído. O espectro dessa solução obtido após um mês sugere que a amostra se decompôs ou que uma nova espécie se formou em solução, devido à perda do sinal Raman.

A Figura II.7C apresenta o espectro de uma solução saturada de PATS2 em CD_2Cl_2 que foi mantida no escuro durante um mês. Comparando esse espectro com os apresentados na Figura II.7A e II.7B, observa-se que após um mês, o E-PATS2 isomeriza para Z-PATS2 independente da radiação da luz. Esse resultado confirma o efeito do solvente na isomerização dos compostos PATS2 e DMePATS2.

A Tabela II.6 apresenta os valores obtidos, através dos espectros ^1H RMN, para as porcentagens do isômero E-PATS2 existentes nas soluções saturadas em CD_2Cl_2 . Os primeiros espectros RMN foram obtidos imediatamente após a obtenção dos espectros Raman.

Tabela II.6- Porcentagem do isômero E-PATS2 em CD_2Cl_2 obtidas a partir dos espectros ^1H RMN das mesmas soluções utilizadas para a obtenção dos espectros Raman.

amostra	30 min	1 hora	1 dia	10 dias	20 dias
escuro	100	100	70	65	60
457,9 nm	97	94	70	60	60
UV	60	60	60	60	*

*A presença de novos picos no espectro RMN dificultou o cálculo da %E-PATS2 indicando a formação de nova espécie em solução.

Através dos resultados obtidos com os espectros Raman e com os dados RMN apresentados na Tabela II-6 pode-se concluir:

- a) O efeito do solvente na isomerização E-Z PATS2 existe e é independente da incidência de luz na amostra, pois mesmo no escuro ocorre isomerização do composto;
- b) A porcentagem do isômero E após 10 dias é praticamente igual para as três soluções, isto é, a posição de equilíbrio é a mesma, o que permite concluir que a luz somente catalisa o processo.
- c) A radiação 457,9 nm apresenta um efeito catalítico pouco significativo nessa isomerização, pois a porcentagem obtida para o isômero E dessa solução é muito próxima aos valores obtidos para a amostra que ficou no escuro;
- d) A incidência de luz na região do ultravioleta catalisa o processo de isomerização;

Efeito dos íons no processo de isomerização do PATS2 em ACN

A Figura II.8 apresenta um conjunto de espectros Raman de soluções de PATS2 em ACN recém preparada (A) e após duas semanas (B). Em cada conjunto de espectros o primeiro é o espectro da solução de PATS2 em ACN na ausência de cátions e os outros espectros são na presença dos percloratos de Na^+ , Li^+ e Mg^{2+} . Todas as soluções são saturadas em PATS2 (ca. $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$) e com $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de ClO_4^- .

Figura II.8- Espectros Raman das soluções de PATS2 em ACN (saturadas) e na presença de 0,1 mol.L⁻¹ de ClO₄⁻ (*bandas do solvente).

Enquanto a intensidade relativa da banda em 1584 cm⁻¹ (E) e em 1604 cm⁻¹ (Z) são diferentes de acordo com os cátions utilizados no conjunto A, indicando diferentes relações E/Z PATS2, todas as soluções têm, após atingir o equilíbrio, a mesma relação E/Z-PATS2 (conjunto B). Esse resultado mostra que na presença dos cátions alcalinos e alcalinos terrosos aumenta a velocidade da reação de isomerização E-Z PATS2.

Não foi observada nenhuma variação significativa nos espectros Raman e nem RMN do PATS2 em solução d₃-ACN contendo Bu₄NClO₄ (0,1 mol.L⁻¹) em relação ao espectro da solução do PATS2 em d₃-ACN indicando que nem o ânion ClO₄⁻ e nem o cátion Bu₄N⁺ interferem no processo de isomerização do PATS2.

Apresentamos a seguir as porcentagens do isômero Z-PATS2 em solução, resultados obtidos com os espectros RMN desse composto em d_3 -ACN e na presença dos sais de perclorato.

Tabela II.7- Porcentagem do isômero Z-PATS2 em d_3 -ACN em função do tempo obtidos com os espectros RMN.

Solução	[cátion] (mol.L^{-1})	uma hora	um dia	uma semana
ACN	-	~0	~7%	22%
Bu_4NClO_4	0.1	~0	~5%	26%
NaClO_4	0.1	~0	18%	36%
$\text{LiClO}_4/\text{Bu}_4\text{NClO}_4$	0.06/ 0.05	~0	25%	30%
$\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$	0.05	6%	30%	39%

Os dados apresentados na Tabela II.7 mostram que o ânion ClO_4^- não exerce influência na reação de isomerização E para Z PATS2. Tanto a solução sem sal de perclorato quanto a solução contendo $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de Bu_4NClO_4 contém a mesma porcentagem do isômero Z nos diferentes tempos. A solução contendo $0,06 \text{ mol.L}^{-1}$ LiClO_4 e $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ Bu_4NClO_4 , ou seja, praticamente a mesma concentração de ClO_4^- que a solução com Mg^{2+} , apresentou uma cinética mais lenta que a solução com Mg^{2+} confirmando a dependência do cátion na reação de isomerização.

A concentração dos sais de ClO_4^- utilizada para obter esses espectros foi bem maior (ca. 20 vezes) que a concentração de PATS2 ($\sim 5 \text{ mmol.L}^{-1}$) mas obtivemos também, os espectros Raman do PATS2 com concentrações menores de ClO_4^- . A Figura II.9 apresenta os espectros Raman do PATS2 em ACN saturado ($\sim 5 \text{ mmol.L}^{-1}$) (a), com 5 mmol.L^{-1} de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (b) e 10 mmol.L^{-1} de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (c), sendo A a série das soluções recém preparadas B, C e D de 1 dia, 1 semana e 2 semanas respectivamente.

Figura II.9- Espectros Raman das soluções de PATS2 (5 mmol.L⁻¹) em ACN (a) e na presença de 5 mmol.L⁻¹ de Mg²⁺ (b) e 10 mmol.L⁻¹ de Mg²⁺ (c) (*bandas da ACN).

Analisando os espectros b, em comparação com os espectros a nas quatro séries, podemos observar que para concentrações iguais de PATS2 e Mg²⁺ (5 mmol.L⁻¹), a presença dos íons nessa concentração já influencia na isomerização. As bandas em 1558 e 1600 cm⁻¹, isômero Z, são intensificadas no espectro da solução recém preparada. O efeito catalítico nesse caso é menor que o verificado para concentrações maiores dos íons.

O espectro c da Figura II.9 (recém-preparada) mostra que com 10 mmol.L^{-1} de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ o efeito dos íons na isomerização é o mesmo que o obtido com maior concentração de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (50 mmol.L^{-1}). Após 15 dias, Figura II.9 (1 mês) o equilíbrio é atingido.

A Figura II.10 apresenta os espectros UV-Vis de soluções 1 mmol.L^{-1} de PATS2 em ACN (A) e na presença de 2 mmol.L^{-1} de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (B) recém preparados, após 1 hora, 1 dia e 15 dias de preparo obtidos em temperatura ambiente. Utilizamos nesses espectros soluções mais diluídas de PATS2 que para os espectros Raman e RMN pois a absorvidade molar (ϵ) deste composto é alta (*ca.* $30000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) [21].

Figura II.10- Espectros eletrônicos de absorção do PATS2 em ACN (1 mmol.L^{-1}) (A) e com 2 mmol.L^{-1} de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (B), caminho óptico de 1 mm.

Os espectros eletrônicos de absorção apresentados na Fig. II.10 apresentam uma banda intensa e larga em 320 nm atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$ da tiossemicarbazona [29]. Com o tempo ocorre diminuição da intensidade relativa dessa banda e intensificação dos ombros em 240 e 266 nm. Nota-se também um pequeno deslocamento para comprimento de onda maior da banda em 320 nm.

Comparando os espectros da Figura II.10A com II.10B nota-se que os espectros das soluções recém preparadas com e sem Mg^{2+} são semelhantes. É importante ressaltar que o tempo da obtenção dos espectros eletrônicos (*ca.* 30 segundos) é bem menor que os espectros Raman e RMN e por isso os espectros iniciais tanto na ausência quanto na presença de $Mg(ClO_4)_2$ são praticamente iguais. Nota-se ainda que na série A demora 15 dias para que a intensidade da banda diminua enquanto que na presença de $Mg(ClO_4)_2$ após uma hora já podemos notar variação espectral. Essas mudanças, deslocamento da frequência da banda em 320 nm e variação das intensidades relativas das bandas em 240 e 266 nm, estão relacionadas com a isomerização de E para Z-PATS2. Após 15 dias, observa-se que o espectro da Figura II.10A é semelhante ao da Figura II.10B. Esses espectros confirmam os resultados Raman e RMN, mostrando o efeito catalítico do Mg^{2+} na isomerização do E-PATS2 em ACN.

A figura II.11 apresenta as deconvoluções da banda em 320 nm dos espectros inicial (solução recém preparada) e final (solução com 15 dias) que foram apresentados na Figura II.10. Utilizamos para deconvoluir esses espectros o programa Grams/386, versão 3.02 da *Galactic Industries Corporation*.

Figura II.11- Deconvolução dos espectros apresentados na Fig. II.10: recém preparados (A) PATS2 em ACN e (B) com Mg^{2+} ; após 15 dias (C) PATS2 em ACN e após 15 dias na presença de Mg^{2+} (D).

Antes da deconvolução corrigiu-se a linha base e alterou-se a unidade de comprimento de onda (nm) para número de onda (cm^{-1}), esse procedimento foi realizado, pois o programa utiliza frequência e não comprimento de onda nos cálculos da deconvolução. Depois de concluir a deconvolução, os espectros estão apresentados em comprimento de onda (nm) para facilitar a sua análise.

Consideramos somente a banda em 320 nm limitando a região do espectro entre 250 e 400 nm. Utilizamos a função Mix (Lorenziana + Gaussiana) para calcular as bandas dos espectros e a função linear para ajustar a linha base na deconvolução. Nenhum parâmetro (meia largura, intensidade ou valor de frequência) foi fixado durante a interação na deconvolução.

Nos espectros da Figura II.11 foi observado que a banda larga em 320 nm é resultante da sobreposição de duas bandas em *ca.* 313 e 329 nm. Nos dois espectros das soluções recém preparadas a intensidade relativa dessas duas bandas é semelhante. Após atingir o equilíbrio da isomerização, as intensidades relativas dessas bandas são praticamente iguais nos dois espectros (C e D). Verifica-se que com o tempo, a intensidade da banda em 313 nm decresce concomitantemente com a intensificação da banda em 329 nm.

Antonini e colaboradores [21] atribuíram as bandas do isômero Z em 332 nm e E-PATS2 em 323 nm no espectro eletrônico do PATS2 em DMSO. Eles verificaram que a presença da ligação de hidrogênio intramolecular no Z-PATS2 podia ser confirmada comparando o espectro UV dos dois isômeros, o isômero Z tem um máximo de absorção (332 nm) em comprimento de onda maior que o isômero E (323nm). Os valores das bandas atribuídos nesse trabalho não podem ser comparados com os dados obtidos em ACN, pois os espectros eletrônicos são dependentes do solvente, mas juntamente com os resultados Raman e RMN anteriores, podemos atribuir a banda em 313 nm ao isômero E e a banda em 329 nm ao isômero Z.

A deconvolução dos espectros UV-Vis do PATS2 com $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ em ACN mostrou que não existe nenhuma indicação de formação de complexos, uma vez que não foram observadas novas bandas que poderiam estar relacionadas ao complexo. Assim esses resultados são coerentes com os outros dados espectroscópicos que apresentaram somente dados relacionados aos isômeros E e Z livres.

Determinação da cinética de isomerização do PATS2

Para compararmos o efeito catalítico dos cátions alcalinos e alcalinos terrosos na isomerização do PATS2 em ACN, obtivemos o espectro eletrônico da solução de PATS2 ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) e com 1 mmol.L^{-1} dos sais de perclorato de Na^+ , Li^+ e $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ do $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ em função do tempo num comprimento de onda fixo em 350 nm (Figura II.12). Escolhemos esse comprimento de onda, pois a variação da intensidade estaria diretamente relacionada com o aparecimento da espécie Z, já que esse comprimento de onda está fora da região de absorção da espécie E.

Figura II.12- Variação da absorvância do PATS2 em ACN com o tempo no comprimento de onda fixado em 350 nm. As soluções com os cátions de perclorato estão descritas na legenda.

Os dados apresentados na Figura II.12 indicam que a reação de isomerização do E-PATS2 para o isômero Z é de ordem zero, pois observamos que a absorvância medida é diretamente proporcional ao tempo da reação. A análise desses resultados está resumida na Tabela II-8. O coeficiente de correlação está próximo a um para todos os casos confirmando a linearidade da relação. Sendo uma reação de ordem zero determina-se a constante cinética da reação através do coeficiente angular da reta (dA/dt). A reação de ordem zero tem uma velocidade que é independente da concentração do reagente [30, 31].

$$v = k$$

$$\frac{d[\text{PATS2}]}{dt} = k$$

Como o valor da absorvância medido está diretamente relacionado com a concentração de PATS2, ou seja, $A = \epsilon \cdot b \cdot [\text{PATS2}]$, temos que:

$$\frac{d[\text{PATS2}]}{dt} = \frac{dA}{dt} \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot b}$$

$$k = \frac{dA}{dt} \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot b}$$

Tabela II.8- Resumo dos resultados obtidos com os dados da Figura II.12: coeficiente de correlação das retas, constante cinética e meia-vida das reações de isomerização do PATS2.

	Puro	Sódio	Lítio	Magnésio
Coeficiente de correlação	0,9962	0,9963	0,9952	0,9964
k ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	$1,6 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$2,9 \cdot 10^{-7}$	$3,9 \cdot 10^{-7}$
Meia vida (min)	1562 (~26h)	1000 (~17h)	862 (~14h)	641 (~11h)

Pode-se verificar com os dados apresentados na Tabela II.8 que a constante cinética do Mg^{2+} é a maior entre os cátions estudados. O Mg^{2+} é, portanto, o cátion que tem o maior efeito catalítico na isomerização do PATS2 em ACN.

O tempo de meia vida dessas reações foi calculado com a fórmula:

$$t_{1/2} = c^0/2k,$$

sendo c^0 a concentração analítica inicial do PATS2 nas soluções e k a constante cinética na reação.

Considerando que após dez meias vidas a reação está praticamente concluída, pois mais de 99,9% do reagente já transformou, a solução de PATS2 em ACN deve demorar ca. 260 horas para atingir o equilíbrio, o que é equivalente a aproximadamente 11 dias. Já na presença de Na^+ , Li^+ e Mg^{2+} o equilíbrio deve ser atingido após aproximadamente 7, 6 e 4,5 dias respectivamente.

A Figura II.13 apresenta um modelo do mecanismo proposto para o efeito do Mg^{2+} na isomerização do PATS2.

Figura II.13- Mecanismo proposto para o efeito do Mg^{2+} na isomerização do PATS2; # = complexo ativado.

Nesse modelo, o cátion Mg^{2+} interage com o E-PATS2 através dos átomos $\text{N}(1')$ e S formando um complexo de ativação, enfraquecendo a dupla ligação $\text{C}=\text{N}(1')$ e favorecendo a isomerização para Z-PATS2. Os espectros Raman e ^1H NMR não permitiram detectar a formação desse complexo de transição, no entanto, dados de cálculos teóricos *ab initio* (HF e MP2) realizados por A.P. Lamounier e colaboradores [32] mostraram que a interconversão E-Z envolve a rotação através do $\text{C}(7)=\text{N}(1')$ indicando uma interação do Mg^{2+} com o S e $\text{N}(1')$ no estado de transição.

Efeito dos cátions na configuração do 2'MePATS2 e DMePATS2 em ACN

Foram obtidos os espectros Raman e ^1H RMN do 2'MePATS2 e DMePATS2 em solução de ACN contendo metais alcalinos e alcalinos terrosos.

Nenhuma variação significativa foi observada nos espectros das soluções de 2'MePATS2 em função da presença do cátion Mg^{2+} , Figura II.14. A presença de ombros em 1000, 1460 e 1564 cm^{-1} e o alargamento da banda em 1234 cm^{-1} sugerem uma fraca interação do N piridínico com o Mg^{2+} .

Figura II.14- Espectros Raman do 2'MePATS2 em ACN e na presença de Mg²⁺ (*bandas do solvente).

A Tabela II.9 apresenta os deslocamentos químicos referentes aos prótons do 2'MePATS2 obtidos nos espectros de ¹H NMR.

Tabela II.9- Deslocamentos químicos (ppm) dos prótons de 2'MePATS2 em d₃-ACN e na presença de Mg(ClO₄)₂.

¹ H(ppm)	7	6	5	4	3
-	7,75	8,56	7,29	7,74	8,00
Mg ²⁺	7,75	8,54	7,34	7,79	8,05

Os valores obtidos para os deslocamentos químicos dos prótons do 2'MePATS2 indicam que na presença de Mg^{2+} ocorre uma pequena variação para campo magnético mais baixo dos prótons 3, 4 e 5 indicando uma pequena interação com o cátion. Esses prótons tornam-se mais desblindados devido à interação entre o N piridínico e o Mg^{2+} .

O espectro Raman da solução $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de DMePATS2 em ACN é muito semelhante ao espectro contendo $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de Bu_4NClO_4 indicando que nem o ânion ClO_4^- e nem o cátion Bu_4N^+ induzem a isomerização Z-E.

A Figura II.15 apresenta os espectros Raman do DMePATS2 em d_3 -ACN e na presença dos percloratos de Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} e Ca^{2+} .

Figura II.15- Espectros Raman do DMePATS2 em d_3 -ACN e na presença dos percloratos de Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} e Ca^{2+} .

Analisando a figura II.15 de cima para baixo, podemos observar as variações no espectro do DMePATS2 quando na presença dos metais Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} e Ca^{2+} . As principais mudanças espectrais ocorrem com os modos vibracionais do anel piridínico do composto (1000 (ν_1), 1205 (ν_{9a}) e 1592 (ν_{8a} , 8b) cm^{-1}) que são deslocados para frequências maiores na presença dos cátions, indicando que o N piridínico é um dos centros de coordenação desses complexos [33, 34].

A vibração envolvendo o estiramento $C=N(1')$ em 1554 cm^{-1} no Z-DMePATS2 é deslocada para 1560 cm^{-1} na presença dos metais. Nos complexos, a banda em 1553 cm^{-1} desloca para frequência maior (1560 cm^{-1}) indicando que o N (1') é um outro centro de ligação com os

metais. Além dessa banda, mais duas bandas novas são observadas em 1362 e 1545 cm^{-1} na presença de Mg^{2+} que estão relacionadas à presença da espécie aniônica do DMePATS2. A ausência do H ligado ao N(2'), aumenta a deslocalização eletrônica da molécula e enfraquece a dupla ligação C=N(1') deslocando esse modo vibracional para menor frequência.

García-Tojal e colaboradores [35-37] verificaram nos espectros infravermelho dos complexos de cobre e ferro com PATS2 deslocamentos das bandas vibracionais relacionadas a piridina e ao C=N(1') para frequências maiores, quando comparados com o espectro do ligante livre. Os autores atribuem esses deslocamentos de frequências a dois fatores: ao caráter π receptor do ligante que possibilita a retrodoação π dos orbitais cheios do metal para o ligante e/ou, à mudança conformacional no processo de complexação. Como os metais alcalinos e alcalinos terrosos não possuem elétrons π para doar, o deslocamento observado deve ser causado pela mudança de configuração e a formação do complexo.

As intensidades relativas das bandas em 1096 e 1153 cm^{-1} que tem contribuições de várias coordenadas internas [$\Delta(\text{C}=\text{S}) + \Delta(\text{C}=\text{N}) + \Delta(\text{N}-\text{N})$] diminuem na presença dos metais e aparece uma nova banda em ca. 1130 cm^{-1} . A variação observada nessas bandas está relacionada à interação do metal com o átomo de enxofre e o N imínico e a concomitante redistribuição eletrônica.

Existem trabalhos na literatura [1-4] que mostram que a família do PATS2 são ligantes tridentados N-N-S, onde a formação de complexos com metais de transição é amplamente conhecida. Já a formação de complexos com os metais alcalinos e alcalinos terrosos não tinha sido relatada para esse ligante. Os espectros Raman indicam que Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} e Ca^{2+} interagem com o DMePATS2 em ACN formando complexos através dos N piridínico, N imínico e S (Fig. II.16) [38].

Figura II.16- Estrutura química dos complexos M^{+n} -E-DMePATS2.

Tentamos obter os complexos no estado sólido evaporando o solvente, mas infelizmente o espectro obtido não foi o do complexo e sim do ligante livre. Deve existir, portanto, um meio favorável como o solvente ACN [26, 27], para que este tipo de interação entre os metais, alcalinos e alcalinos terrosos, e DMePATS2 possa existir. A ligação com esses metais é fraca, mas pode ser detectada através das técnicas Raman e RMN. Nota-se a importância das técnicas espectroscópicas Raman e RMN utilizadas nesse estudo para identificar o complexo e determinar a espécie do ligante no complexo.

Analisando a série dos espectros ^1H RMN do DMePATS2 em d_3 -ACN da Figura II.17, de cima para baixo, percebe-se a diminuição da intensidade dos picos referentes ao isômero Z concomitantemente ao aumento das intensidades dos picos do isômero E. O espectro RMN do DMePATS2 com Bu_4NClO_4 (Fig. II.17b) é semelhante ao espectro do composto em d_3 -ACN (Fig. II.17a) confirmando que não existe interação do ânion ClO_4^- com o DMePATS2, enquanto que na presença dos metais, o Z-DMePATS2 isomeriza para E formando o complexo ilustrado na Figura II.16.

Figura II.17- Espectros ^1H RMN do DMePATS2 e dos complexos em $\text{d}_3\text{-ACN}$.

A Tabela II.10 apresenta os resultados resumidos obtidos com os espectros RMN do DMePATS2 em solução de ACN e na presença dos cátions Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} e Ca^{2+} . Observa-se que a diferença entre os deslocamentos químicos dos prótons H(3)E e H(3)Z é de aproximadamente 0.3 ppm, o que pode ser explicado pelo efeito anisotrópico $\text{C}(7)=\text{N}(1')$ no deslocamento químico do próton H(3)E no conformero predominante presente em solução [21]. A adição dos cátions à solução de DMePATS2 em d_3 -ACN causam a isomerização da espécie Z para E e a concomitante complexação dessa espécie. Nesses conformeros E, o próton H(3)E_c não tem mais a contribuição anisotrópica $\text{C}(7)=\text{N}(1')$ tendo, portanto um valor próximo ao valor do deslocamento químico do $\delta\text{H}(3)\text{Z}$.

Tabela II.10- Deslocamentos químicos dos prótons do DMePATS2 em d_3 -ACN e na presença dos cátions (ppm), após atingir o equilíbrio.

¹ H(ppm) Cátion	7 E _c ou E	7 Z	2' E _c ou E	2' Z	3 E _c ou E	3 Z	4 E _c ou E	4 Z	5 E _c ou E	5 Z	q/r	% Z
-	8.06	7.46	9.54	15.16	7.91	7.57	7.77	7.98	7.31	7.43	...	78
Bu_4N^+	8.08	7.46	9.58	15.16	7.92	7.56	7.76	7.96	7.30	7.41	...	78
Na^+	8.28	7.48	9.85	15.24	7.62	7.58	7.87	7.96	7.38	7.43	1.05	62
Li^+	8.28	7.48	10.18	15.24	7.65	7.61	7.91	8.00	7.43	7.46	1.67	48
Ba^{2+}	8.41	sobreposição	9.96	15.46	7.62	7.61	7.99	8.04	7.50	7.51	1.48	10
Ca^{2+}	8.48	...	10.17	...	7.70	...	8.05	...	7.55	...	2.02	0
Mg^{2+}	8.61+8.42	7.47	...	15.52	7.87	7.66	8.13	8.02	7.61	7.50	3.08	12

E_c = isômero E dos complexos

q/r = carga/raio

O efeito de blindagem observado para os prótons H(4)E e H(5)E na presença dos cátions pode ser correlacionado com a relação carga/raio dos cátions e confirma a coordenação do E-DMePATS2 através do nitrogênio piridínico. O próton H(7), que está próximo ao centro de coordenação, assim como o próton H(2') Z, também apresentam o efeito da blindagem na presença dos cátions com aumento proporcional à relação carga/raio. No caso do H(2'), o efeito de blindagem observado pode ser interpretado como uma evidência da formação de “complexos de encontro” entre os cátions e o isômero Z na etapa de pré-associação do processo de isomerização Z para E-DMePATS2.

É importante ressaltar que o complexo com Mg^{2+} é um caso especial nesse conjunto de complexos estudados devido à desprotonação do N(2') e à formação de um complexo diferente como evidenciado pelo alargamento dos picos do E-DMePATS2 e dos sinais de água no espectro

^1H RMN. Essa desprotonação já foi várias vezes observada e relatada na literatura para essa família de ligantes [7, 8, 29, 36, 39].

A figura II.18 apresenta a região de 9 a 15 ppm dos espectros ^1H RMN dos complexos. Nessa região do espectro, observa-se somente os picos referentes aos prótons 2'E (9,5 ppm) e 2'Z-DMePATS2 (15,16 ppm). Nos espectros dos complexos de Na^+ e Li^+ (Fig. II.18 a e b) verifica-se a presença dos dois isômeros (E e Z) em solução. A intensidade relativa do pico referente ao próton 2'E é maior no complexo de Li^+ que no Na^+ .

O espectro do complexo de Mg^{2+} (Fig. II.18 c) foi ampliado para mostrar que não existe o pico característico do próton 2'E do complexo indicando que nesse complexo, o ligante está na forma aniônica.

Os espectros do complexo de Ba^{2+} e Ca^{2+} , Figura II.18 d e e respectivamente, mostram que nessas soluções praticamente não existe o próton 2'Z livre. A presença do pico em *ca.* 10 ppm referente ao próton 2'E do complexo indica que nesses complexos o ligante DMePATS2 está na forma neutra.

Figura II.18- ^1H NMR das soluções dos complexos de DMePATS2 em $\text{d}_3\text{-ACN}$ na região do $\text{N}(2')\text{H}$.

Ainscough e colaboradores [8] descreveram a síntese dos complexos PATS2 com prata na forma neutra e aniônica, isto é, sem o hidrogênio ligado ao $\text{N}(2')$ desse composto. Para obter a espécie aniônica o procedimento adotado pelos autores foi misturar quantidades equimolares do PATS2 e sódio metálico em metanol. Com o objetivo de obter os espectros Raman de uma solução aniônica do DMePATS2, realizou-se o mesmo procedimento descrito por Ainscough, trocando o PATS2 por DMePATS2.

A Figura II.19 apresenta os espectros Raman de uma solução 50 mmol.L^{-1} de DMePATS2 em metanol e na presença de sódio metálico, obtidos com a radiação excitante

457,9 nm (laser de Ar^+). A presença das bandas em 1555 e 1595 cm^{-1} , características do isômero Z, e da banda em 1585 cm^{-1} , característica do isômero E, no espectro Raman do composto em metanol puro indica que existem os dois isômeros em solução. Esse resultado está de acordo com o obtido anteriormente para o solvente n-propanol, onde se obteve aproximadamente 30% do isômero E. O metanol, assim como a água, pode estabilizar o isômero E através de pontes de hidrogênio intermoleculares entre a água e o N piridínico e também com o hidrogênio ligado ao N(2'), existindo dessa maneira os dois isômeros em solução.

Figura II.19- Espectros Raman do DMePATs2 em metanol (neutro e aniônico).

Após a adição de uma quantidade equimolar de sódio metálico (50 mmol.L^{-1}) à solução de DMePATS2 em metanol, observa-se, no espectro Raman, um aumento na intensidade relativa dos modos vibracionais do DMePATS2 em relação às bandas do solvente. Esse resultado se deve ao efeito Raman Pré-Ressonante da nova espécie formada em solução (*vide* espectro eletrônico da espécie discutido a seguir, Fig. II.20).

As bandas em 1368 e 1550 cm^{-1} , que também aparecem no espectro Raman do complexo de Mg^{2+} em 1362 e 1545 cm^{-1} indicam a presença da espécie aniônica. O deslocamento da banda em 1001 cm^{-1} (respiração do anel piridínico) para 996 cm^{-1} a presença das bandas em 1230 , 1435 e 1570 cm^{-1} indicam a presença do isômero E-DMePATS2, a banda em 1593 cm^{-1} indica a presença do isômero Z-DMePATS2. Ao adicionar mais sódio metálico a essa solução observa-se uma intensificação das bandas em 1368 e 1550 cm^{-1} , confirmando que são características da espécie aniônica.

O aumento da intensidade relativa das bandas do composto observado no espectro Raman após adição de sódio metálico à solução de DMePATS2 sugere a ocorrência do efeito Raman Ressonante. O espectro Raman Ressonante é obtido quando o comprimento de onda da radiação excitante é próximo ou coincidente com a transição eletrônica das espécies em estudo causando um aumento na intensidade relativa dos modos vibracionais associados a um determinado cromóforo [40].

Os espectros eletrônicos de absorção UV-Vis das duas soluções (Figura II.20) mostram que na presença do sódio metálico aparece uma nova banda em 375 nm . Utilizando a radiação excitante $457,9 \text{ nm}$, próxima a 375 nm , foi possível observar o efeito Pré-Ressonante da espécie aniônica.

Figura II.20- Espectro eletrônico de absorção UV-Vis do DMePATS2 em metanol e na presença de sódio metálico.

Observa-se também no espectro de absorção do DMePATS2 com sódio a presença da banda em 316 nm do DMePATS2 "neutro". Ainscough relatou no seu trabalho que os espectros NMR de ^{13}C do PATS2 aniônico ainda apresentavam os picos característicos à sua forma neutra existindo, portanto, as duas espécies em solução [8]. Tanto os espectros Raman como os de absorção do DMePATS2 em metanol indicaram a presença da forma neutra e também da aniônica quando se adicionou sódio metálico a essa solução.

Os resultados apresentados indicam que no caso do Mg^{2+} existe além do complexo com o ligante neutro, o complexo com o ligante na forma aniônica. Para confirmar que as novas bandas Raman que aparecem no espectro do complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 são relacionadas à desprotonação do ligante obtiveram-se os espectros Raman de uma solução DMePATS2 ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$) com MgClO_4 ($0,015 \text{ mol.L}^{-1}$) em $\text{d}_3\text{-ACN}$ 99,9% Figura II.21a. Nessa condição, as bandas em 1362 e 1545 cm^{-1} são bem evidentes no espectro e podem ser associadas ao complexo com o ligante desprotonado. Nota-se também que existem várias bandas, de baixa intensidade, na região de modos vibracionais relacionados ao estiramento C-C do anel piridínico (acima de 1553 cm^{-1}). A presença dessas bandas indica a existência de várias espécies em solução, por exemplo: os ombros em 1583 e 1601 cm^{-1} são referentes ao isômero E-DMePATS2 livre, as bandas em 1564 e 1618 cm^{-1} ao complexo Mg-DMePATS2 e o ombro em 1593 cm^{-1} ao isômero Z-DMePATS2 livre. Pode-se observar um aumento da intensidade relativa da banda em 1155 cm^{-1} concomitantemente ao decréscimo da banda em 1100 cm^{-1} , indicando interação do ligante com o Mg^{2+} através do átomo de enxofre.

O espectro obtido após a adição de pequena quantidade de água a essa solução está apresentado na Figura II.21 b onde se observa que a intensidade relativa das bandas em 1012, 1215, 1480, 1564 e 1618 cm^{-1} aumenta. Como essas últimas bandas são sempre observadas nos espectros dos complexos com metais alcalinos e alcalinos terrosos (Figura II.15) elas podem ser atribuídas ao ligante neutro (conforme os resultados obtidos com ^1H RMN). Após adição de mais água a essa solução (espectro c e d) as bandas em 1362 e 1546 cm^{-1} desaparecem indicando que elas são do ligante desprotonado.

Figura II.21- Espectros Raman das soluções 15 mmol.L^{-1} DMePATS2 com 15 mmol.L^{-1} de Mg^{2+} em ACN (a) e na presença de 0,1% (V:V) (b), 0,2% (V:V) (c), e 0,3% (V:V) de H_2O .

Conclui-se, portanto, que os íons Mg^{2+} foram solvatados pelas moléculas de água e conseqüentemente, a concentração do ligante E-DMePATS2 “livre” em solução de ACN aumenta com o aumento da concentração de água resultando na isomerização de Z para E-DMePATS2 em solução.

Determinação da constante de estabilidade dos complexos de Mg^{2+} , Ba^{2+} e Ca^{2+} com DMePATS2.

Para estimar a constante de estabilidade destes complexos obtivemos os espectros Raman e RMN do DMePATS2 com diferentes concentrações dos metais estudados. Para o Mg^{2+} este estudo foi mais detalhado que para os outros cátions (Ba^{2+} e Ca^{2+}), foram utilizadas 6 soluções com concentrações diferentes desse cátion.

Conforme mencionado anteriormente, o tensor polarizabilidade Raman do isômero E é diferente do isômero Z. Dessa maneira, não podemos relacionar as intensidades Raman com as

concentrações de cada espécie existentes em solução. Foram obtidos então, com essas soluções, os espectros RMN para determinarmos as constantes de estabilidade dos complexos.

Metodologia utilizada no cálculo das constantes de estabilidade [41]:

A formação de um complexo mononuclear, ML_n , é determinada pela interação entre um íon metálico, M, e um ligante, L, que pode ser uma molécula ou um ânion e que se comporta como uma base de Lewis, ou um doador de elétrons. A extensão de cada etapa sucessiva de formação de complexos mononucleares é avaliada através de uma constante de equilíbrio estequiométrica:

Os produtos sucessivos das constantes de estabilidade individuais (K_n) fornecem as constantes globais de formação que nesse caso são mais adequadas ao método experimental utilizado na determinação de complexos. Os equilíbrios e as respectivas constantes de estabilidade (β_n) são, então:

A determinação de constantes de estabilidade depende de dados experimentais que forneçam as concentrações livres de metal e/ou de complexante em equilíbrio, além das concentrações totais conhecidas. A formação de complexos pode ser avaliada através do número médio de ligantes (n) determinado através de uma série de métodos experimentais.

Como o DMePATS2 é um ligante tridentado (N-N-S) e os cátions estudados possuem raios iônicos pequenos para coordenarem com mais de 2 ligantes foram consideradas somente a formação de ML e ML_2 . Determinamos então β_1 e β_2 para cada complexo.

A concentração total ou analítica do íon metal, C_M , é dada por:

$$C_M = [M] + [ML] + [ML_2] \quad (3)$$

De forma análoga, a concentração analítica do ligante, C_L , é dada por:

$$C_L = [L] + [ML] + 2[ML_2] \quad (4)$$

Substituindo (1) e (2) em (3) temos:

$$C_M = [M] + [M][L]\beta_1 + \beta_2[M][L]^2$$

Substituindo (1) e (2) em (4) temos:

$$C_L = [L] + [M][L]\beta_1 + 2\beta_2[M][L]^2$$

O número médio de ligantes (n) será igual a:

$$n = \frac{C_L - [L]}{C_M} = \frac{[\text{ligante coordenado}]}{C_M}, \text{ ou então:}$$

$$n = \frac{\beta_1[L] + 2\beta_2[L]^2}{1 + \beta_1[L] + \beta_2[L]^2}$$

Pode ser observado que a determinação experimental da concentração de equilíbrio do ligante livre permite, sem o uso das concentrações analíticas de metal ou de ligante, o cálculo de n e este se torna, então, uma função única da concentração de ligante livre. O conhecimento de pelo menos n diferentes concentrações de ligantes livres permite calcular as constantes de estabilidade dos complexos em equilíbrio. O número médio de ligantes pode variar de zero, quando não há complexação a um número máximo que, em alguns casos, pode ser o próprio número máximo de coordenação do ligante ao íon metálico ou um número menor já que representa a existência de diversas espécies, ML_n , em equilíbrio e em concentrações diferentes.

A porcentagem do ligante livre em solução foi calculada através da razão $Z(\text{livre})/E(\text{complexado})$ dos valores de integração dos prótons do espectro RMN. Com a concentração do ligante livre calculamos as constantes de estabilidade dos complexos. Estes dados estão apresentados na Tabela II.11.

Tabela II.11- Concentração do isômero Z DMePATS2 livre (mmol/L) nas soluções dos complexos $E-M^{n+}$ -DMePATS2 em d_3 -ACN e constantes de estabilidade dos complexos.

$[M^{n+}]$ (mmol/L)	Z-DMePATS2 (Mg^{2+})	Z-DMePATS2 (Ba^{2+})	Z-DMePATS2 (Ca^{2+})
10	22,0		
20	14,0	13,5	8,5
50	6,0	5,0	0,50
100	3,5		
150	3,5		
200	3,0		
$\beta_1 (M^{-1})$	-	$3 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^4$
$\beta_2 (M^{-2})$	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^6$

Existe uma outra função, grau de formação da espécie, α , que representa a fração de metal convertido em determinada espécie. Esta função permite determinar a proporção relativa das diversas espécies em equilíbrio num sistema:

$$\alpha_j = \frac{[ML_j]}{C_M} = \frac{\beta_j [L]^j}{1 + \beta_1 [L] + \beta_2 [L]^2}$$

Ou então:

$$\alpha_j = \alpha_0 \cdot \beta_j [L]^j,$$

onde α_0 é a fração do metal não complexado.

Através dessa última equação, pode-se chegar à composição percentual do sistema em análise, resumido na Tabela II.12. Pode-se observar que não existe a espécie ML no complexo de magnésio, pois o valor negativo obtido para β_1 indica que a formação dessa espécie não é favorável. Conforme já discutido, o Mg^{2+} é o único cátion entre os metais estudados que forma o complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 com o ligante na forma aniônica. Os valores calculados para as constante de estabilidade desse complexo indica que a espécie ML_2 é mais favorável que a ML

Existem reportados na literatura trabalhos de complexos da família das tiossemicarbazonas do 2-formilpiridina onde a estrutura ML_2 do complexo também foi observada [33, 35, 42]. Uma das possibilidades para a estrutura do complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 é ser hexacoordenado formando um octaedro, conforme indicado na Figura II.22.

Figura II.22- Estrutura do complexo $[Mg^{2+}-(E-DMePATS2)_2]$ e uma esquema simplificado de um octaedro.

Tabela II.12- Concentração (mol.L⁻¹) existente de cada espécie nas soluções dos complexos em d₃-ACN.

	α 0	α 1	α 2	[M] (mol.L ⁻¹)	[L] (mol.L ⁻¹)	[ML] (mol.L ⁻¹)	[ML2] (mol.L ⁻¹)
[Mg ²⁺] (mol.L ⁻¹)							
0,01	0,1		0,9	0,0009	0,0225	-	0,0091
0,02	0,2		0,8	0,0041	0,0140	-	0,0159
0,05	0,6		0,4	0,0291	0,0060	-	0,0209
0,1	0,8		0,2	0,0803	0,0035	-	0,0197
0,15	0,8		0,2	0,1205	0,0035	-	0,0295
0,2	0,8		0,2	0,1695	0,0030	-	0,0305
[Ba ²⁺] (mol.L ⁻¹)							
0,02	0,1	0,6	0,3	0,0029	0,0135	0,0118	0,0053
0,05	0,4	0,5	0,1	0,0182	0,0050	0,0273	0,0045
[Ca ²⁺] (mol.L ⁻¹)							
0,02	0,0	0,5	0,5	0,0001	0,0085	0,0108	0,0092
0,05	0,1	0,9	0,0	0,0043	0,0005	0,0435	0,0022

II.4- Conclusões

A utilização das técnicas espectroscópicas Raman e RMN possibilitou determinar a configuração dos compostos tiossemicarbazona da 2-formilpiridina e de seus derivados metilados. Com esses resultados, verificou-se que com exceção do composto DMePATS2, que apresenta a configuração Z como mais estável no estado sólido, todos os outros compostos estudados apresentaram o isômero E como o mais estável na fase sólida. Foi mostrado que a estabilização da configuração E nesses compostos está diretamente relacionada à presença de ligações de hidrogênio intermoleculares. O isômero Z é estabilizado por uma ligação intramolecular que só existe devido à presença dos grupos metilas substituídas no N(4').

Em solução, a configuração mais estável depende do composto considerado e da natureza do solvente. Existe uma correlação entre a configuração predominante em solução e o *donor number* do solvente utilizado. Solventes com alto valor de *donor number* favorecem a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares (composto-solvente) e, portanto, estabilizam o isômero E. Por outro lado, em solventes com menor valor de *donor number*, o isômero Z é estabilizado pela ligação de hidrogênio intramolecular. No caso do PATS2 foi constatado que a incidência de luz na solução desse composto catalisa o processo de isomerização. Foi verificado, no entanto, que o processo de isomerização é independente da presença de luz uma vez que amostras preparadas e armazenadas no escuro também isomerizaram dependendo do solvente utilizado.

Analisando o efeito que os cátions alcalinos e alcalinos terrosos exercem sobre as soluções de PATS2 e DMePATS2, pode-se concluir que novamente os grupos metilas

substituídos no N(4') têm um papel importante nas propriedades desses compostos. Enquanto que no caso do PATS2 os metais alcalinos e alcalinos terrosos são catalisadores da reação de isomerização E-Z, no composto DMePATS2 ocorre a formação de complexo com os cátions estudados.

Comparando os valores das constantes cinéticas obtidas para as reações de isomerização do PATS2 conclui-se que o Mg^{2+} é o cátion que apresenta maior efeito catalítico, o que pode ser justificado com a relação carga-raio dos cátions. Sendo o Mg^{2+} o menor cátion e o de maior carga entre os metais estudados, ele tem maior tendência a interagir com o PATS2 favorecendo o processo de isomerização.

Com relação à formação de complexos com o DMePATS2 verificamos que a estabilidade dos complexos está relacionada ao tamanho dos cátions. O complexo Ca^{2+} -E-DMePATS2 que é o que tem o maior raio iônico, é o que apresenta maior constante de estabilidade entre os complexos estudados.

II.5- Referências Bibliográficas

1. W. Antholine, J. Knight, H. Whelan, D.H. Petering, *Mol. Pharmacol.* **13** (1977) 89.
2. D.X. West, C.S. Carlson, A.C. Whyte, A.E. Liberta, *Transition Met. Chem.* **15** (1990) 43.
3. A. Abras, H. Beraldo, E.O. Fantini, R.H.U. Borges, M.A. Da Rocha, L. Tosi, *Inorg. Chim. Acta* **172** (1990) 113.
4. A.E. Liberta, D.X. West, *BioMetals* **5** (1992) 121.
5. L.A. Saryan, K. Mailer, C. Kishnamurti, W. Antholine, D.H. Petering, *Biochem. Pharm.* **30** (1981) 1595.
6. E.W. Ainscough, A.M. Brodie, J.D. Ranford, J.M. Waters, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1997) 1251.
7. E.W. Ainscough, A.M. Brodie, J.D. Ranford, J.M. Waters, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1991) 2125.
8. E.W. Ainscough, A.M. Brodie, W.A. Denny, G.J. Finlay, J.D. Ranford, *J. Inorg. Biochem.* **70** (1998) 175.
9. J. Ghasemi, M. Shamsipur, *J. Coord. Chem.* **26** (1992) 337.
10. T. Madrakian, A. Afkhami, J. Ghasemi, M. Shamsipur, *Polyhedron* **15** (1996) 3647.
11. L.S.Pinheiro, M.L.A.Temperini, *J.Electroanal.Chem.* **295** (1990) 169.
12. M.R. Santos, dissertação de mestrado, IQUSP, 1995.
13. M.L.A. Temperini, M.R. Santos, V.R. Paoli Monteiro, *Spectrochim. Acta* **51A** (1995) 1517.

14. G. Keresztury, P.M. Marzocchi, *Spectrochim. Acta*, **31A** (1975) 275.
15. D.N. Sathyanarayana, K. Volka, K. Geetharani, *Spectrochim. Acta*, **33A** (1977) 517.
16. A. Vijay, D.N. Sathyanarayana, *Spectrochim. Acta*, **48A** (1992) 1601.
17. H. Beraldo, L. Tosi, *Inorg. Chim. Acta*, **125** (1986) 173.
18. J.H.S. Green, D.J. Harrison, *Spectrochim. Acta*, **33A** (1977) 75.
19. V.N. Biyushkin, Y.M. Chumanov, N.M. Samus, I.D. Baka, *J. Struct. Chem.* **28** (1987) 119.
20. D.X. West, G.A. Bain, R.J. Butcher, J.P. Jasinski, Y. Li, R.Y. Pozdniakiv, J. Valdés-Martínez, R.A. Toscano, S. Hernández-Ortega, *Polyhedron* **15** (1996) 665.
21. I. Antonini, F. Claudi, P. Franchetti, M. Grifantini, S. Martelli, *J. Med. Chem.* **20** (1977) 447.
22. O. Sala, Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho, Ed. Unesp, 1996.
23. K.A. Connors Chemical Kinetics – The Study of Reaction Rates in Solution, 1932.
24. V.N. Biyushkin, Y.M. Chumanov, N. Samus, I.D. Baka, *J. Struct. Chem.*, **28** (1987) 119.
25. G.D.J. Phillies, I.M. Asher, H.E. Stanley, *Biopolymers* **14**, 2311 (1975).
26. V. Gutmann, E. Wyckera, *Inorg. Nucl. Chem. Letters*, **2** (1966) 257.
27. V. Gutmann, *Electrochim. Acta* **21** (1976) 661.
28. G. Grittner, F. Hörzenberger, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **88** (1992) 3013.
29. I.C. Mendes, L.R. Teixeira, R. Lima, H. Beraldo, N.L. Speziali, D.X. West, *J. Mol. Struct.* **559** (2001) 355.
30. K.A. Connors, *Chemical Kinetics: the study of reaction rates in solution*, (1990) New York.
31. P.W. Atkins, *Physical Chemistry* (1994), 5th edition Oxford.
32. A.P.Lamounier, H.A. Duarte, M.M.B. Pessôa, M.L.A. Temperini, H.F.D. Santos – *XI Simpósio Brasileiro de Química Teórica* – Caxambú, MG (2001).
33. H. Beraldo, L. Tosi, *Inorg. Chim. Acta*, **75** (1983) 249.
34. D.M. Kovala, A. Domopoulou, M.A. Demertzis, G. Valle, A. Papageorgiou, *J. Inor. Biochem.* (1997) 147.
35. J. García-Tojal, J.L. Pizarro, L. Lezama, M.I. Arriortua, T. Rojo, *Inorg. Chim. Acta*, **278** (1998) 150.
36. J. García-Tojal, J. García-Jaca, R. Cortés, T. Rojo, M.K. Urtiaga, M.I. Arriortua, *Inorg. Chim. Acta*, **249** (1996) 25.
37. J. García-Tojal, T. Rojo, *Polyhedron*, **18** (1999) 1123.
38. M.M.B. Pessôa, G.F.S. Andrade, V.R. Paoli Monteiro, M.L.A. Temperini, *Polyhedron*, **20** (2001) 3133.
39. D.X. West, J.K. Swearingen, J. Valdés-Martínez, S. Hernández-Ortega, A. K. El-Sawaf, F.

- van Meurs, A. Castiñeiras, I. Garcia, E. Bermejo, *Polyhedron* **18** (1999) 2919.
40. R.J. H. Clark, T. J. Dines, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **25** (1986) 131.
41. M.E.V.S. Ilha , *Tese de Doutorado*, IQ-USP (1983).
42. D. Kovala-Demertzi, A.Domopoulou, M.A. Demertzis, J. Valdés-Martínez, S. Hernández-Ortega, G. Espinosa-Pérez, D.X. West, M.M. Salberg, G.A. Bain, P.D. Bloom, *Polyhedron* **15** (1996) 2587.

Capítulo III- Estudo dos compostos adsorvidos em eletrodos.

III.1- Introdução

A espectroscopia SERS (*Surface-enhanced Raman scattering*) tem sido uma técnica excelente para determinar os sítios de ligação de moléculas em superfícies metálicas [1-5]. Os espectros SERS do PATS2 e PATS4 adsorvido em eletrodo de prata em solução aquosa mostraram que o átomo de nitrogênio imínico e de enxofre dessas moléculas são os centros de ligação desses compostos na superfície [6]. Esses espectros são sensíveis aos ânions eletrolíticos, pHs da solução e ao potencial aplicado ao eletrodo. Foi mostrado que a configuração do PATS2 adsorvido é E (Fig. III.1) tanto em solução aquosa como em solução de DMSO [7].

Figura III.1- Estrutura dos isômeros E e Z-PATS2.

Sabe-se através do estudo espectroscópico apresentado no capítulo II que o DMePATS2 é o único composto dessa família que tem a configuração Z no estado sólido, enquanto que em solução de ACN ocorre pouca isomerização, existindo cerca de 80 % do isômero Z em solução. A presença do cátion Mg^{2+} em solução de ACN causa a isomerização de Z para E-DMePATS2 seguida da complexação do isômero E com Mg^{2+} [8]. É importante enfatizar que o isômero Z não interage com o Mg^{2+} .

A influência do íon Mg^{2+} na adsorção de espécies em eletrodo de prata tem sido investigada na literatura. Corio e colaboradores mostraram que a presença de Mg^{2+} na solução eletrolítica muda o sítio de ligação do complexo bis(1,10-fenantrolina) diciano de ferro (II) no eletrodo de prata [9]. Por outro lado, Feofanov e colaboradores estudaram a complexação de corantes de *crown éter* com Mg^{2+} ; eles reportaram que a adsorção desses corantes em prata não impede sua complexação com Mg^{2+} [10, 11]. Baldwin e colaboradores demonstraram a formação

do complexo de 4-mercaptopiridina com Cu^{2+} quando o ligante já estava adsorvido em colóide de prata [12].

O objetivo desse trabalho é determinar a configuração dos compostos adsorvidos em eletrodo de prata e verificar a influência do Mg^{2+} na adsorção dos compostos nos eletrodos metálicos. Os espectros SERS do PATS2 em metanol foram obtidos para ajudar na elucidação do mecanismo de redução do PATS2.

III.2- Parte Experimental

Espectros SERS em ACN

O eletrodo de trabalho utilizado foi um tarugo de prata (99,99%) com área de 0.13 cm^2 , inserido em teflon; o eletrodo auxiliar e de referência utilizados foram um fio de platina e de prata, respectivamente. As soluções foram preparadas com ACN (Merck grau Uvasol) recém destiladas. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos utilizando um Potenciostato - Galvanostato PAR 263 A.

Antes de cada experimento, o eletrodo de trabalho era mecanicamente polido com lixa 600-*mesh*, sonicado por 10 minutos em etanol e em seguida lavado com etanol e com água destilada. A ativação do eletrodo foi obtida através de ciclos de óxido-redução numa solução aquosa eletrolítica $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ de KCl. Em seguida, lavava-se o eletrodo ativado com ACN e deixava-o imerso por 15 minutos numa solução $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de DMePATS2 em ACN para formar as monocamadas auto-organizadas (SAM). Para a investigação do efeito de Mg^{2+} , a SAM foi formada deixando-se o eletrodo ativado numa solução de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de DMePATS2 em ACN na presença de diferentes concentrações de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. Os eletrodos de prata modificados foram então lavados novamente com o solvente e colocados numa cela eletroquímica para obter os espectros SERS.

Para o PATS2 e PATS4, o eletrodo de prata ativado foi imerso numa solução saturada dos compostos em ACN para formar a SAM. A SAM dos compostos PATS2 e PATS4 na presença de Mg^{2+} foram formadas pela imersão dos eletrodos numa solução saturada dos compostos com $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ em ACN.

SERS da redução do PATS2

Após ativação do eletrodo em solução eletrolítica $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KCl}$, deixávamos o mesmo por *ca.* 30 minutos numa solução aquosa saturada de PATS2, lavávamos o eletrodo com água bidestilada e obtínhamos o espectro SERS deste eletrodo.

Utilizamos como eletrodo de trabalho, auxiliar e referência, um tarugo de ouro ou prata policristalino de pureza 99,9% inserido em teflon, um fio de platina e Ag/AgCl, respectivamente. A solução eletrolítica utilizada foi 0,1 mol.L⁻¹ Et₄NCl em metanol, pois somente nesse meio foi possível observar a redução do PATS2; em meio aquoso, o pico da redução do PATS2 coincide com a redução da água.

Espectros UV-Vis

Os espectros eletrônicos na região do UV-vis foram obtidos no espectrofotômetro HP8453. O potencial aplicado no eletrodo de prata foi monitorado com o potenciostato PAR 362 da EG&G Princeton Applied Research. Utilizou-se uma cela de quartzo com 1 cm de caminho óptico. A solução eletrolítica foi de 3,5.10⁻⁵ mol.L⁻¹ de PATS2 em 0,1 mol.L⁻¹ Et₄NCl metanol. O eletrodo de trabalho utilizado foi uma chapa de prata com área de 0,07cm². Utilizou-se como eletrodo de referência e auxiliar um fio de Ag/Ag⁺ e uma chapa de Pt com 1,8 cm² de área.

III.3- Resultados e Discussões

Espectros SERS do DMePATS2 adsorvido em prata em ACN

A Figura III.2 apresenta o espectro SERS do DMePATS2 adsorvido em eletrodo de prata em solução de ACN 0,1 mol.L⁻¹ Bu₄NBF₄ nos potenciais indicados na figura. Ao variar o potencial do eletrodo observa-se uma grande mudança nas intensidades relativas das bandas. As bandas em 987, 1200, 1432 e 1570 cm⁻¹ diminuem de intensidade quando o potencial vai para valores positivos, enquanto que a intensidade das bandas em 1000, 1215, 1470 e 1597 cm⁻¹ aumenta. Essa dependência com o potencial é um processo reversível, como pode ser observado na figura.

Figura III.2- Espectros SERS do DMePATS2 adsorvido em eletrodo de prata em solução 0,1 mol.L⁻¹ Bu₄NBF₄ ACN, nos potenciais indicados na figura.

Comparando esses espectros SERS com o espectro Raman do Z-DMePATS2 em solução de ACN pode-se verificar que o espectro SERS em potenciais positivos é muito similar ao espectro Raman em solução Z-DMePATS2, indicando que essa é a configuração predominante no eletrodo. As bandas observadas em potenciais negativos em 987, 1200, 1432 e 1570 cm⁻¹

podem ser atribuídas ao isômero E-DMePATS2, apesar de terem as frequências um pouco deslocadas em relação às bandas obtidas no espectro Raman do E-DMePATS2 em solução de DMSO (994, 1230, 1438 e 1584 cm^{-1}) [8]. Esse deslocamento pode ser atribuído tanto à variação do solvente (ACN ao invés de DMSO) ou à adsorção da molécula na superfície do eletrodo. Como nessa região de potenciais o DMePATS2 é eletroinativo, ou seja, não sofre redução nem oxidação, Pode-se concluir que a mudança no potencial aplicado ao eletrodo causa a isomerização E-Z reversível do DMePATS2 na superfície de prata.

Para entender o efeito que a variação do potencial aplicado ao eletrodo causa na configuração do DMePATS2 adsorvido assume-se que o DMePATS2 esteja adsorvido na prata através dos átomos nitrogênio (imínico) e enxofre, como no caso das tiossemicarbazonas das n-formilpiridinas (PATSn) [6]. Levando-se também em consideração o importante papel que o átomo de hidrogênio N(2')H tem no processo de isomerização do DMePATS2, devido à formação de pontes de hidrogênio [15], pode-se explicar o efeito da variação do potencial aplicado ao eletrodo. Para potenciais positivos o DMePATS2 adsorve preferencialmente na configuração Z com o anel piridínico e o átomo de hidrogênio N(2')H praticamente perpendiculares à superfície. Com a adsorção, a dupla ligação C=N(1') é enfraquecida e, para potenciais mais negativos, o hidrogênio ácido ligado ao N(2')H é atraído pela superfície. Esses dois fatores favorecem a quebra da ligação de hidrogênio intramolecular levando à isomerização para a configuração E na superfície. Para o isômero E, potenciais negativos, o deslocamento para frequências menores das bandas da piridina no espectro SERS indica que o anel piridínico deve estar aproximadamente paralelo em relação à superfície. Sabe-se que quando moléculas como o benzeno, piridina e pirazina adsorvem paralelas em relação à superfície, suas bandas são deslocadas para frequências menores [13]. A Figura III.3 apresenta um esquema das configurações das espécies adsorvidas nos eletrodos com potenciais positivos e negativos.

Figura III.3- Esquema do E e Z-DMePATS2 adsorvido no eletrodo.

A análise dos espectros SERS na região de frequências baixas poderia confirmar os sítios de interação dos compostos no eletrodo. A Figura III.4 apresenta o espectro SERS do DMePATS2 a partir de 200 cm^{-1} . A presença da banda intensa da ACN em 380 cm^{-1} e a banda larga em *ca.* 200 cm^{-1} , atribuída ao modo vibracional do Ag-Cl proveniente da ativação do eletrodo, dificultam a análise de bandas de baixas intensidades nessa região onde estão os modos Ag-N e Ag-S.

Figura III.4- Espectro SERS do DMePATS2 adsorvido em prata numa solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ Bu_4NBF_4 ACN em $+0,6\text{V}$ (*bandas do solvente).

Efeito do Mg^{2+} no DMePATS2 adsorvido

A Figura III.5 apresenta o espectro SERS do DMePATS2 adsorvido em eletrodo de prata em solução de ACN $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ Bu_4NBF_4 e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ nos potenciais indicados na figura.

Figura III.5- Espectros SERS do DMePATS2 adsorvido em eletrodo de prata em solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Bu}_4\text{NBF}_4$ com $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ACN, nos potenciais indicados na figura (* banda da ACN e # banda do ClO_4^-).

A variação do potencial aplicado ao eletrodo não causa nenhuma mudança significativa nos espectros. Mesmo para potenciais negativos somente são observadas bandas características

do isômero Z-DMePATS2. O espectro do complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 em solução de ACN apresentado na Figura III.5 não é observado nos experimentos SERS. Esse resultado mostra que se a monocamada do DMePATS2 é formada em soluções contendo o complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 e o espectro SERS for obtido com uma solução eletrolítica contendo Mg^{2+} , o isômero E-DMePATS2 não é observado na superfície devido à formação do complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 em solução.

Observa-se nos espectros com potenciais positivos um aumento do sinal SERS que pode ser atribuído ao mecanismo de transferência de carga, considerando que nessa radiação excitante a condição de ressonância foi atingida. O aumento na relação sinal ruído em +0,6V permitiu a observação das bandas de baixa intensidade em 1300, 1500 cm^{-1} atribuídas aos modos vibracionais da tiossemicarbazona e da banda em 1580 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C-C do anel piridínico do isômero E, que pode estar adsorvido em pequena quantidade no eletrodo.

Na presença de Mg^{2+} as bandas mais intensas dos espectros SERS em qualquer potencial são características do isômero Z. Esse resultado mostra que se a monocamada de DMePATS2 é formada a partir de soluções contendo Mg^{2+} , e esse cátion for mantido na solução eletrolítica, o isômero E sai da superfície do eletrodo devido à formação do complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 em solução. Mesmo para potenciais mais negativos que -0,2V (Fig. III.6), as bandas mais intensas observadas são atribuídas ao Z-DMePATS2 adsorvido na superfície e as bandas características do complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 não são observadas nos espectros.

Figura III.6- Espectros SERS do DMePATS2 adsorvido em eletrodo de prata em solução 0,1 mol.L⁻¹ Bu₄NBF₄ com 0,1 mol.L⁻¹ Mg(ClO₄)₂ ACN, nos potenciais indicados na figura.

Diferente dos resultados reportados na literatura [9-12], o complexo Mg²⁺-E-DMePATS2 não adsorve na superfície. Esse resultado sugere que se a coordenação e a adsorção à superfície envolvem o mesmo sítio molecular, ocorre uma competição entre esses dois processos. Nesse caso em particular, a complexação em solução com o Mg²⁺ ocorre predominantemente devido à alta relação da concentração Mg²⁺/DMePATS2.

A Figura III.7 apresenta o espectro SERS do DMePATS2 adsorvido em eletrodo de prata numa solução de ACN 0,10 mol.L⁻¹ Bu₄NBF₄ e 0,05 mol.L⁻¹ DMePATS2 e diferentes concentrações de Mg(ClO₄)₂ em -0,4V.

Figura III.7- Espectros SERS do DMePATS2 adsorvido em eletrodo de prata em $-0,4V$ na presença de: a) $0,02 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, b) $0,05 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, c) $0,10 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ e d) mesma condição que (c) após adição de mais DMePATS2 na cela (* bandas do solvente).

Comparando os espectros apresentados nessa figura nota-se a influência do cátion Mg^{2+} no espectro SERS do DMePATS2. O espectro SERS obtido de uma solução eletrolítica contendo $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$ de Mg^{2+} apresenta as bandas características do E-DMePATS2 em 1226 , 1430 e 1570 cm^{-1} , junto com as bandas Z. Conforme aumenta a concentração dos íons Mg^{2+} em solução (Fig. III.7b e Fig. III.7c), as bandas E desaparecem e a relação sinal/ruído do espectro diminui. Quando mais DMePATS2 é adicionado na solução eletrolítica (Fig. III.7d), o sinal do espectro melhora novamente, mas não é observada nenhuma banda característica do isômero E.

A presença da espécie E no eletrodo de prata em solução contendo $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$ de Mg^{2+} é devida à alta concentração de E-DMePATS2 livre nessa solução eletrolítica. Os resultados de

RMN mostraram que para essa concentração de Mg^{2+} , cerca de 30% do DMePATS2 está livre em solução. Nas outras soluções, com 0,05 e 0,100 mol.L⁻¹ de Mg^{2+} , existem somente cerca de 13 e 7% do ligante livre respectivamente. Esses resultados indicam que quando a concentração do íon Mg^{2+} na solução eletrolítica é baixa, o isômero E pode adsorver na superfície. Para soluções contendo a mesma concentração de DMePATS2 e Mg^{2+} (0,05 mol.L⁻¹) a espécie E coordena com o cátion Mg^{2+} e não adsorve no eletrodo.

A dependência do tempo nos espectros SERS do DMePATS2 na presença de Mg^{2+} está apresentada na Figura III.8. O DMePATS2 foi adsorvido no eletrodo de prata a partir de uma solução de ACN contendo somente o composto em solução. O primeiro espectro foi obtido após conectar o eletrodo de trabalho por alguns segundos na cela eletroquímica contendo uma solução eletrolítica 0,1 mol.L⁻¹ de Mg^{2+} em -0,2 V. Esse espectro apresenta bandas características do isômero E e Z-DMePATS2. Após 5 minutos, o espectro apresenta quase que somente as bandas Z e pode-se notar que esse espectro está com a relação sinal/ruído pior do que o primeiro. Após 10 minutos, o espectro SERS do DMePATS2 quase desapareceu, mas as bandas fracas observadas são relacionadas ao isômero Z (as duas bandas fortes em 917 e 1372 cm⁻¹ são bandas do solvente). Um espectro semelhante a esse foi obtido após 15 minutos indicando que o equilíbrio foi atingido.

Figura III.8- Espectros SERS do DMePATS2 em função do tempo após a adição de Mg²⁺ na cela eletrolítica nos potenciais indicados.

Em +0,4V, o espectro SERS apresenta somente as bandas característica do isômero Z e a razão sinal/ruído do espectro não muda tanto com o tempo como para o potencial -0,2V. Após 15 minutos, o espectro apresenta as mesmas bandas observadas no primeiro espectro obtido nesse potencial.

Esses resultados levam à conclusão que em potenciais negativos ocorre um aumento da concentração do íon Mg^{2+} na interfase eletrodo-solução, favorecendo complexação com o isômero E em solução. Como o complexo se liga aos mesmos sítios moleculares com que o DMePATS2 adsorve no eletrodo, não aparece o isômero E no espectro SERS. Em potenciais positivos não observamos esse resultado, pois o isômero adsorvido é o Z e também devido à grande repulsão eletrostática do Mg^{2+} pelo eletrodo.

Na interfase os principais equilíbrios são:

Em potenciais negativos o equilíbrio III é deslocado para a direita devido à alta concentração de Mg^{2+} na interfase. Para potenciais positivos a concentração de Mg^{2+} é baixa na interfase (repulsão eletrostática) e, portanto, não ocorre depleção do isômero Z na superfície.

Comparação entre os espectros SERS do PATS4 e do DMePATS2

Resultados anteriores do PATS4 adsorvido no eletrodo de prata em solução aquosa indicaram que o PATS4 adsorve no eletrodo de prata através dos átomos N imínico e enxofre, ou seja, o anel piridínico não adsorve ao eletrodo [6].

A Figura III.9 A apresenta o espectro SERS do PATS4 adsorvido em eletrodo de prata em solução eletrolítica de ACN 0,1 mol.L⁻¹ Bu₄NBF₄ nos potenciais indicados. Os mesmos valores de frequência das bandas da piridina no espectro SERS e no espectro Raman do composto indicam que o anel piridínico não interage com a superfície. Quando o potencial é varrido no sentido de potenciais positivos não se observa nenhuma variação significativa indicando que, nesse caso, não ocorre isomerização com o potencial, o que era esperado já que não existe possibilidade de formar ligação de hidrogênio intramolecular com o N do anel piridínico.

Figura III.9- Espectro SERS do PATS4 adsorvido em eletrodo de prata em ACN 0,1 mol.L⁻¹ Bu₄NBF₄ (A) e na presença de 0,1 mol.L⁻¹ de Mg²⁺ nos potenciais indicados.

A Figura III.9 B apresenta o espectro SERS do PATS4 adsorvido em eletrodo de prata em solução eletrolítica de ACN 0,1 mol.L⁻¹ Bu₄NBF₄ com 0,1 mol.L⁻¹ Mg(ClO₄)₂ nos potenciais indicados na figura. A variação do potencial aplicado ao eletrodo não causa nenhuma variação

significativa nos espectros SERS, no entanto, quando comparado com o conjunto de espectros obtidos na ausência de Mg^{2+} (Fig. III.9 A) observa-se que os valores das frequências características dos modos vibracionais da piridina se deslocam para valores de maior energia (1007, 1200, 1593 e 1638 cm^{-1}) indicando que o anel piridínico está coordenado ao cátion Mg^{2+} [14-15].

Esses resultados confirmam a explicação proposta no caso do DMePATS2. A ausência do complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 na superfície se deve ao fato de que tanto no complexo com Mg^{2+} quanto na adsorção do DMePATS2 no eletrodo de prata envolvem os mesmos sítios de ligação. No caso do PATS4, como a adsorção ocorre através dos átomos de N imínico e enxofre e como o Mg^{2+} se coordena ao composto somente pelo N piridínico, é possível detectar o complexo adsorvido na superfície [16].

Espectros SERS do PATS2 adsorvido em prata em ACN

A influência do solvente na isomerização do PATS2 foi apresentada no capítulo II dessa tese. Verificou-se que em ACN, o E-PATS2 sofre isomerização atingindo 40% do isômero Z e que na presença de Mg^{2+} esse processo é catalisado.

Resultados anteriores mostraram que o PATS2 adsorvia na configuração E no eletrodo de prata tanto em solução aquosa quanto em DMSO [7]. Para verificar a adsorção do PATS2 em ACN, obtivemos os espectros SERS do PATS2 adsorvido em prata em solução 0,1 mol.L⁻¹ Bu₄NClO₄ ACN apresentados na Figura III.10.

Figura III.10- Espectros SERS do PATS2 adsorvido em eletrodo de prata em solução 0,1 mol.L⁻¹ Bu₄NBF₄ ACN, nos potenciais indicados na figura.

Para potenciais negativos, observamos as bandas em 1000, 1225, 1295, 1432, 1465, 1586 e 1606 cm⁻¹, características do isômero E. A intensificação das bandas em 1294 e 1468 cm⁻¹ que são atribuídas aos modos vibracionais do grupo tiossemicarbazona confirmam que o PATS2 em ACN também adsorve ao eletrodo através dos átomos N(1') e S [6].

Em potenciais positivos, observamos a intensificação das bandas em 1565 e 1606 cm⁻¹ características ao isômero Z. Essas bandas estão deslocadas para frequências maiores quando comparadas com o isômero Z em solução ACN (1558 e 1598 cm⁻¹) [8], mas são também diferentes das frequências obtidas para o complexo AgPATS2 (1550, 1586 e 1620 cm⁻¹) [7]. Esse deslocamento pode, portanto, ser atribuído à adsorção do isômero Z-PATS2 na superfície do eletrodo.

Efeito do Mg²⁺ no PATS2 adsorvido

A Figura III.11 apresenta o espectro SERS do PATS2 adsorvido em eletrodo de prata em solução de ACN 0,1 mol.L⁻¹ Bu₄NBF₄ e 0,1 mol.L⁻¹ Mg(ClO₄)₂ nos potenciais indicados na figura.

Figura III.11- Espectros SERS do PATS2 adsorvido em eletrodo de prata em solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Bu}_4\text{NBF}_4$ com $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ACN, nos potenciais indicados na figura.

Apesar da relação sinal-ruído desses espectros ser menor que os espectros apresentados na Figura III.10, em $-0,4\text{V}$ são observadas as mesmas bandas presentes no espectro SERS na ausência de Mg^{2+} (1000 , 1226 , 1560 , 1586 e 1606 cm^{-1}) características do isômero E-PATS2. Variando o potencial para valores mais positivos verifica-se uma intensificação do sinal Raman, isto é, uma maior relação sinal-ruído dos espectros. Observa-se também, em potenciais mais positivos, uma pequena diminuição da intensidade relativa da banda em 1586 cm^{-1} mostrando a tendência do composto E-PATS2 isomerizar para Z em potenciais positivos.

Comparando esses espectros com os espectros na ausência do Mg^{2+} (Fig. III.10) observa-se que na presença do cátion, a variação do potencial não causa um efeito tão pronunciado na isomerização do composto. A intensidade da banda em 1586 cm^{-1} diminuiu muito menos do que na ausência de Mg^{2+} . Esse resultado auxilia na interpretação do mecanismo de ação do Mg^{2+} no processo catalítico da isomerização E para Z-PATS2 em ACN.

Os resultados apresentados no capítulo II mostraram que no caso do PATS2, os metais alcalinos e alcalinos terrosos somente catalisam o processo de isomerização desse composto em ACN.

Sabe-se que existe o seguinte equilíbrio em solução de ACN [8]:

Na presença de Mg^{2+} o equilíbrio acima não é deslocado uma vez que esse cátion somente catalisa o processo de isomerização. Nos espectros SERS, no entanto, o isômero Z não é predominante nem para potenciais positivos, indicando que, nesse caso, esse isômero não tem a tendência de adsorver na superfície. Como nos espectros SERS do PATS2 na presença de Mg^{2+} não é possível detectar o isômero Z-PATS2 na superfície de prata, espera-se que esse isômero esteja em solução. O equilíbrio:

deve ser deslocado para direita.

Esses resultados indicam que no caso do PATS2, o Mg^{2+} também “compete” com o eletrodo de prata pela adsorção do composto uma vez que os centros de ligação do PATS2 à prata são os mesmos da formação do complexo de transição com Mg^{2+} de modo que o Z-PATS2 não adsorve no eletrodo, mesmo para potenciais positivos.

Monitoramento da redução faradáica do PATS2

O estudo do comportamento eletroquímico das tiossemicarbazonas das n-formilpiridinas é de grande interesse uma vez que esses compostos apresentam atividade biológica que está diretamente relacionada a seu comportamento redox [17-22]. Além disso, existem propostos na literatura mecanismos conflitantes para a redução desses compostos [23-25]; a utilização da técnica SERS deve ajudar na elucidação do mecanismo de redução dos compostos.

A combinação de técnicas eletroquímicas e espectroscópicas pode auxiliar na interpretação da reação redox de compostos químicos [26]. Nesse estudo, os estados de oxidação são mudados eletroquimicamente através da adição ou remoção de elétrons no eletrodo enquanto são realizadas simultaneamente, medidas na solução adjacente ao eletrodo. Técnicas espectroeletroquímicas são convenientes portanto, para a obtenção do espectro e do potencial redox e para detectar as espécies geradas eletroquimicamente.

M. R. dos Santos obteve, em seu trabalho de mestrado, os espectros SERS dos possíveis produtos da redução do PATS2 [27]. Repetimos alguns de seus experimentos em condições experimentais mais favoráveis à obtenção de espectros com maior relação sinal-ruído e assim, ajudar na elucidação do mecanismo de redução do PATS2. Apresentamos a seguir, o estudo da redução faradáica do 2-formilpiridina tiossemicarbazona realizados através da voltametria cíclica acoplada à espectroscopia na região do UV-Vis e SERS.

O comportamento eletroquímico do PATS2 em $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Et}_2\text{NCl}$ metanol é apresentado na Figura III.12. O voltamograma cíclico em linhas pontilhadas representa o comportamento eletroquímico do eletrodo de prata na solução eletrolítica ($0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Et}_2\text{NCl}$, metanol) na ausência de PATS2. A linha cheia é o voltamograma cíclico do PATS2 onde é possível observar uma onda de corrente faradáica em $-1,4 \text{ V}$ atribuída à redução do composto [23-27]. Observa-se também que trata-se de um processo irreversível pois não existe o pico correspondente na região anódica de potenciais.

Figura III.12- Voltamogramas cíclicos do eletrodo de prata: sem (- - -) e com (—) PATS2 na presença de $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Et}_4\text{NCl}$ [27].

A figura III.13 apresenta os espectros SERS do PATS2 adsorvido em eletrodo de prata numa solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ Et}_4\text{NCl}$ em metanol nos potenciais indicados. À medida que o potencial torna-se mais negativo pode-se observar algumas variações nos espectros SERS do PATS2. Em potenciais mais catódicos ocorre variação de frequência e intensidade relativa das bandas na região de 1000 à 1600 cm^{-1} .

Figura III.13- Espectros SERS do PATS2 adsorvido em eletrodo de prata em solução 0,1 mol.L⁻¹ Et₄NCl metanol.

No intervalo de potencial entre -0,2 V e -0,8 V observam-se pequenas variações nas bandas em 1561 (ν C=N) e 1585 e 1606 cm⁻¹ (ν C-C, 8a, 8b) [6, 7] que diminuem de intensidade conforme o potencial é deslocado para região catódica. Em -1,2 V aparecem somente duas novas bandas nessa região, em 1567 e 1593 cm⁻¹.

Com a variação do potencial observamos também uma intensificação da banda em 1432 cm⁻¹ e um pequeno deslocamento para menor frequência, 1428 cm⁻¹. Essa banda corresponde ao modo amida II envolvendo portanto o grupo N(4')H₂.

O espectro em potencial -1,4 V é bastante diferente do espectro obtido em -0,2 V, uma vez que observamos uma banda intensa em 787 cm⁻¹ e duas bandas na região de 1500-1600 cm⁻¹ o que pode indicar a presença da espécie reduzida adsorvida ao eletrodo.

Para a identificação dos produtos de redução, comparamos os espectros SERS obtidos nos diferentes potenciais, principalmente em -1,4 V, com os espectros SERS dos possíveis produtos de redução.

Através de técnicas polarográficas foram propostos mecanismos da redução de tiossemicarbazonas, no entanto, não existe um consenso quanto a esse mecanismo. Pozdeeva e Novikov [24] propuseram dois possíveis mecanismos para a redução do PATS2. Em um deles a redução ocorreria no anel piridínico formando uma dihidropiridina e no outro, a redução ocorreria na ligação C=S formando um tiol (Fig. III.14).

Figura III.14- Esquema dos mecanismos proposto por Pozdeeva e Novikov para a redução do PATS2.

Por outro lado, Kitaev e colaboradores [23], em concordância com Lund [25, 28], descreveram que a redução de tiossemicarbazonas aromáticas ocorre através da transferência de 4 elétrons: a quebra da ligação simples N-N seguida pela redução de dois elétrons da imina formada, Figura III.15.

Figura III.15- Esquema dos mecanismo proposto por Kitaev e Lund para a redução do PATS2.

Espera-se que a redução do anel piridínico formando a dihidropiridinaldeído leve ao desaparecimento do modo vibracional característico de respiração do anel piridínico em 997 cm^{-1} . Observamos, no entanto, que essa banda está presente em todos os espectros SERS do PATS2 independente do potencial, descartando a possibilidade de formação dessa espécie.

Comparando o espectro SERS do PATS2 em $-1,2\text{V}$ com o espectro SERS da 2-picam podemos observar algumas semelhanças como, por exemplo, a presença das bandas em 1567 e 1593 cm^{-1} . Essas bandas aparecem em 1561 e 1587 cm^{-1} no espectro da 2-picam adsorvida em eletrodo de prata $0,1\text{ mol.L}^{-1}$ KCl solução aquosa [27]. A pequena variação quanto à frequência pode ser explicada devido a diferentes condições experimentais (eletrodo de trabalho e solução eletrolítica). O espectro SERS da 2-picam apresenta também uma banda intensa em 1000 cm^{-1} como no espectro do PATS2 [27].

O mecanismo proposto por Kitaev e colaboradores [23] e Lund [25] mostra que a formação da 2-picam implica na presença também da tiouréia. Os espectros SERS da TU obtidos em eletrodos de prata em metanol [27] apresentam bandas em 614, 717, 1080, 1383 e 1582 cm^{-1} . Analisando os espectros do PATS2 em função do potencial observa-se uma intensificação das bandas na região de 600-800 cm^{-1} que podem estar relacionadas ao modo vibracional de estiramento do C=S presentes em 614 e 717 cm^{-1} nos espectros da TU.

A análise dos espectros SERS permite constatar a redução do PATS2, indica que o segundo mecanismo (Fig. III.15) deve estar correto, mas não é conclusiva quanto à identidade das espécies formadas.

Utilizamos também a espectroscopia UV-vis *in situ* para monitorar a redução eletroquímica do PATS2 e assim obter mais informações quanto ao produto de redução formado.

Figura III.16- Espectros eletrônicos UV-VIS do PATS2 em 0,1 mol.L⁻¹ Et₄NCl em metanol, nos seguintes potenciais indicados na Figura.

A Figura III.16 apresenta os espectros UV-vis da solução 3,5.10⁻⁵ mol.L⁻¹ de PATS2 em 0,1 mol.L⁻¹ Et₄NCl metanol nos potenciais indicados na Figura. Esses espectros foram obtidos

após cinco minutos de aplicação do potencial no eletrodo de trabalho, mesma condição experimental adotada para os espectros SERS.

O espectro eletrônico obtido no potencial de zero volts corresponde ao espectro do PATS2 em solução de metanol. A banda em 322 nm corresponde à transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ da tiossemicarbazona do PATS2 [29]. À medida que variamos o potencial para valores mais negativos observamos algumas variações nesse espectro. A banda em 322 nm diminui de intensidade e desloca para valores de menor energia, a banda em 206 nm sofre grande intensificação e uma nova banda aparece em 240 nm que é intensificada no potencial $-1,4V$.

Foram obtidos também espectros em função do tempo. Na Figura III.17 é apresentada a evolução dos espectros eletrônicos de uma solução $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de PATS2 em $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de Et_4NCl em metanol em função do tempo nos potenciais $-0,4$ e $-0,8 \text{ V}$. O primeiro espectro foi obtido logo após aplicar o potencial na cela, os demais foram obtidos num intervalo de 30 segundos, durante quinze minutos.

Figura III.17- Evolução dos espectros eletrônicos do PATS2 em solução de metanol $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ Et_4NCl em $-0,4$ e $-0,8 \text{ V}$ vs. Ag/Ag^+ em função do tempo.

Para os espectros em $-0,4V$ não observamos nenhuma variação significativa em função do tempo, somente uma pequena intensificação da banda em 206 nm.

Em $-0,8V$ foram observadas grandes mudanças nos espectros eletrônicos em função do tempo de aplicação do potencial na cela. Observamos nesses espectros, o aparecimento de um ombro em 380 que é intensificado em função do tempo. Após 15 minutos esse ombro perde intensidade novamente. Esse resultado sugere a formação de um intermediário de reação com

meia-vida longa que pôde ser detectado através dos espectros eletrônicos. Observamos também nesses espectros, que a banda em 322 nm no espectro inicial perde intensidade em função do tempo. Percebe-se também a intensificação das bandas em 206 nm e 240 nm e do ombro em 260 nm.

Figura III.18- Evolução dos espectros eletrônicos do PATS2 em solução de metanol $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ Et_4NCl em $-1,4 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ em função do tempo.

A Figura III.18 apresenta a evolução dos espectros eletrônicos de uma solução $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de PATS2 em $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de Et_4NCl em metanol em função do tempo em $-1,4 \text{ V}$. Nesse potencial, nós esperamos que todo o PATS2 deva ser reduzido, vide voltamograma cíclico, Fig. III.12. Observamos nesses espectros, a diminuição da intensidade da banda em 322 nm concomitantemente à intensificação das bandas em 206 e 240 nm, conforme descrito para os outros potenciais. Vale ressaltarmos que após 5 minutos o espectro obtido apresenta a banda em 240 nm como a mais intensa do espectro.

Para atribuímos os resultados obtidos nos espectros eletrônicos do PATS2, obtivemos também os espectros eletrônicos dos possíveis produtos de redução. A Figura III.19 apresenta os espectros UV-Vis do PATS2, da 2-PICAM, da tiouréia, do metanol e de uma solução do eletrólito suporte Et_4NCl em metanol. Como pode ser observado, o espectro UV-vis da 2-PICAM apresenta duas bandas intensas em 209 e 260 nm e o espectro UV-vis da tiouréia

apresenta uma banda intensa em 240 nm. Observamos também que todos esses compostos apresentam bandas intensas na região de 200 nm, o que dificulta a análise dessa banda nos espectros eletrônicos.

Figura III.19- Espectros eletrônicos UV-VIS do PATS2 ($3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), da 2-picam ($5,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), da tiouréia ($7,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), do eletrólito suporte Et_4NCl em metanol e do próprio metanol, cela de quartzo de caminho óptico de 1 mm.

A Tabela III.1 apresenta os valores da absorvidade molar do PATS2 e dos possíveis produtos de redução. Como podemos observar o valor do ϵ para a tiouréia é cerca de dez vezes maior do que da 2-picam, de modo que a banda em 260 nm atribuída à 2-picam será difícil de ser observada nesse experimento de redução do PATS2. O desaparecimento da banda em 322 nm, atribuída ao PATS2 confirma que o composto está reduzindo e que uma nova espécie está se formando. A presença da banda em 240 nm indica que a redução do PATS2 segue o mecanismo proposto por Kitaev e Lund [25, 27, 28].

Tabela III.1 Absorvidade molar, ϵ ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) dos compostos em metanol [24].

composto	ϵ
PATS2	27.187
2-picam	1773
tiouréia	12700

III.4- Conclusões

Os resultados obtidos com os espectros SERS mostraram que a variação do potencial aplicado ao eletrodo induz a isomerização Z-E tanto do PATS2 quanto do DMePATS2 na superfície. Para potenciais positivos o isômero Z é predominante em solução enquanto que para potenciais negativos o isômero E adsorve preferencialmente.

A influência do Mg^{2+} na espécie DMePATS2 adsorvida na superfície foi explicada considerando os equilíbrios na interfase: adsorção e complexação. Em potenciais negativos a alta concentração de Mg^{2+} na interfase causa a depleção do E-DMePATS2 na superfície devido à formação do complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 em solução. Para potenciais positivos o isômero Z-DMePATS2 adsorve irreversivelmente na superfície.

A ausência do E-DMePATS2 nos espectro SERS na presença de Mg^{2+} e a detecção do complexo Mg^{2+} -PATS4 na superfície de prata levam à conclusão de que se o sítio de adsorção da molécula ao eletrodo for o mesmo que o envolvido na formação do complexo, deve existir uma competição entre adsorção e complexação e o complexo não deve ser detectado na superfície.

Com relação à redução do PATS2 foi concluído que a utilização de técnicas espectroscópicas acopladas possibilitou determinar qual dos mecanismos propostos na literatura representam corretamente o processo de redução do composto. Nesse estudo, verificamos que os produtos de redução do PATS2 é a tiouréia e a 2-pícam.

III.5- Referências Bibliográficas

1. J.C. Rubim, M.L.A. Temperini, P. Corio, O. Sala, A.H. Jubert, M.E. Chaconvillalba, P.J. Aymonino, *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 345.
2. A.G. Brolo, M.L.A. Temperini, S.M.L. Agostinho, *Electrochim. Acta* **44** (1998) 559.
3. A.G. Brolo, D.E. Irish, *J. Electroanal. Chem.*, **414** (1996) 183.
4. M.L.A. Temperini, J.C. Rubim, O. Sala, A.H. Jubert, M.E. Chacon Villalba, P.J. Aymonimo, *J. Raman Spectrosc.*, **22** (1991) 301.
5. J.R. Bertolino, M.L.A Temperini, O. Sala, *J. Raman Spectrosc.*, **20** (1989) 725.
6. L.S. Pinheiro, M.L.A. Temperini, *J. Electroanal. Chem.*, **295** (1990) 169.
7. M.L.A. Temperini, M.R. Santos, V.R. Paoli Monteiro, *Spectrochim. Acta*, **51A**(1995) 1517.
8. M.M.B. Pessôa, G.F.S. Andrade, V.R. Paoli Monteiro, M.L.A. Temperini, *Polyhedron*, **20** (2001) 3133.
9. P. Corio, M.L.A. Temperini, J.C. Rubim, P.S. Santos, *Spectrochim. Acta* **55A**, 12 (1999) 2411.

10. A. Feofanov, A. Ianoul, V. Oleinikov, S. Gromov, O. Fedorova, M. Alfimov, I. Nabiev, *J. Phys. Chem.*, **100** (1996) 2154.
11. A. Feofanov, A. Ianoul, V. Oleinikov, S. Gromov, O. Fedorova, M. Alfimov, I. Nabiev, *J. Phys. Chem. B*, **101** (1997) 4077.
12. J. Baldwin, N. Schühler, I.S. Butler, M.P. Andrews, *Langmuir*, **12** (1996) 6389.
13. A.G. Brolo, D.E. Irish, J. Lipkowski, *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 3906.
14. J.C. Rubim, I.G.R. Gutz, O. Sala, *Chem. Phys. Lett.* **111** (1984) 117.
15. K.M. Mukherjee, T.N. Misra, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1996) 2227.
16. M.M.B. Pessôa, M.L.A. Temperini, *J. Raman Spectrosc.* **33** (2002) 50.
17. F.A. French, E.J. Blanz Jr., *Cancer Res.* **26** (1996) 1638.
18. D.X. West, S.B. Padhye, P.B. Sonawane, *Struct. Bond.* **76** (1991) 76.
19. W. Antholine, J. Knight, H. Whelan, D.H. Petering, *Mol. Pharm.* **13** (1977) 89.
20. E.W. Ainscough, A.M. Brodie, J.D. Ranford, J.M. Waters, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1** (1991) 2125.
21. G. J. Patriarche, J.C. Vire, *Anal. Chim. Acta*, **196** (1987) 193.
22. I.S. Shehatta, A.M. Hassanein, E.M. Mabrouk, *Monatsh. Chem.* **126** (1995) 851.
23. Y.P. Kitaev, G.K. Budnikov, T.V. Troepol'skaya, I.M. Skrebkova, *J. Gen. Chem. URSS* **37** (1967), 1362.
24. A.G. Pozdeeva, E.G. Novikov, *J. Appl. Chem. USSR* **13** (1966) 2508.
25. H. Lund, *Acta Chem. Scandinavica* **13** (1959) 249.
26. W.R. Heineman, *J. Chem. Educ.*, **60** (1983) 305.
27. M.R. dos Santos, Dissertação de mestrado, IQUSP (1995).
28. B. Soucaze-Guillous, H. Lund, *J. Electroanal. Chem.* **423** (1997) 109.
29. I.C. Mendes, L.R. Teixeira, R. Lima, H. Beraldo, N.L. Speziali, D.X. West, *J. Mol. Struct.* **559** (2001) 355.

Capítulo IV- PATSn como modificador de superfícies metálicas

IV.1- Introdução

Hill e colaboradores afirmaram existir uma ponte de hidrogênio entre grupos lisina protonados do citocromo c e o modificador, sendo essa a interação responsável pela resposta eletroquímica reversível do citocromo c nesses eletrodos modificados. Através de resultados de voltametria cíclica concluíram que o PATS4 é o melhor modificador de eletrodos dessa família [1, 2].

A resposta voltamétrica reversível para a reação de transferência de um elétron do citocromo c usando eletrodo modificado indica que a molécula mantém suas funções biológicas e não está desnaturada na superfície do eletrodo [3].

L.S. Pinheiro e M.L.A. Temperini caracterizaram a adsorção do PATS4 em eletrodo de prata em solução aquosa e concluíram que o N imínico e o átomo de enxofre são os sítios de interação desse composto no eletrodo, estando o N piridínico “livre” para interagir com a solução [4].

Sabe-se, no entanto, que o citocromo c possui uma carga +9 em solução com pH 7 sendo, dessa maneira, um forte candidato a fazer interações eletrostáticas [5]. Dick e colaboradores relataram o estudo da interação entre alcanotióis terminados com ácidos carboxílicos adsorvido em eletrodo de prata e o citocromo c, onde existem as duas possibilidades de interações entre o citocromo c e o eletrodo modificado: eletrostática ou ligação covalente [6]. Foi mostrado nesse trabalho que, no caso da interação eletrostática, a oxidação do citocromo c apresenta diferente grau de reversibilidade dependendo do tamanho do alcanotiol utilizado. Para ligações covalentes entre citocromo c (Fe^{2+}) e o eletrodo modificado, a resposta eletroquímica tem um grau intermediário de reversibilidade e, nesse caso, não resulta num sistema biomimético ideal.

I. S. Moreira e colaboradores verificaram que o eletrodo modificado de ouro com $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{pyS}]^{-4}$, onde 4pyS é 4-mercaptopiridina é mais estável que o eletrodo de ouro modificado pelo ligante 4-mercaptopiridina livre. Através da resposta faradáica do citocromo c constatou-se que o eletrodo modificado pelo íon complexo é mais eficiente que o 4pyS, o que poderia sugerir que a interação entre a biomolécula e o modificador fosse eletrostática [7].

A espectroscopia Raman ressonante é uma técnica muito utilizada na elucidação da relação estrutura-função de biomoléculas [8]. O princípio dessa técnica é que a radiação excitante utilizada coincide com uma transição eletrônica do cromóforo. O ganho da intensidade das bandas Raman Ressonante é tão alto que as bandas Raman não intensificadas não são

detectadas. Os espectros Raman Ressonante apresentam portanto, exclusivamente as bandas referentes ao cromóforo [9]. Essa seletividade faz com que a técnica seja muito interessante para estudos estruturais de biomoléculas grandes.

Se o sistema estudado estiver próximo a uma superfície metálica ativa e a radiação excitante for adequada para o efeito SERS então, a soma dos dois efeitos origina o SERRS.

Cotton e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que a espectroscopia SERRS também podia ser aplicada ao estudo do citocromo c. O espectro não apresenta nenhuma banda da proteína que não seja do grupo heme. O fator de intensificação observado em colóide de prata foi interpretado devido à orientação perpendicular do grupo heme em relação à superfície do metal [10].

Apresentamos nesse capítulo, o estudo da interação entre o eletrodo modificado com PATS4 e o citocromo c usando a espectroscopia SERS ($\lambda_{\text{ex}} = 514,5$ e $632,8$ nm) e SERRS ($\lambda_{\text{ex}} = 413,1$ nm).

IV.2- Parte Experimental

Espectros SERS

Após ativação do eletrodo em solução eletrolítica $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KCl, deixa-se o mesmo por *ca.* 30 minutos numa solução aquosa saturada de PATS4, lava-se o eletrodo com água bidestilada e obtêm-se o espectro SERS deste eletrodo. Utilizou-se como eletrodo auxiliar um fio de platina e como eletrodo de referência Ag/AgCl. Os espectros SERRS do citocromo c foram obtidos em uma solução $5 \cdot 10^{-6}$ de citocromo c em $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KH_2PO_4 (tampão pH = 7,0).

Os espectros SERRS do citocromo c ($413,1$ nm) e SERS do PATS4 ($514,5$ nm) foram obtidos no espectrômetro Jobin Yvon U1000, sendo a detecção efetuada através de uma fotomultiplicadora. Os espectros SERS do PATS4 adsorvido em ouro em solução eletrolítica $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KCl foram obtidos com a radiação excitante $632,8$ nm no equipamento Renishaw Raman System 3000.

Estudo eletroquímico

Os voltamogramas cíclicos do citocromo c foram obtidos usando um potenciostato-galvanostato 30 da ECOCHEMIE, utilizando solução $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de citocromo c em tampão $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KH_2PO_4 pH=7,0. O procedimento utilizado na modificação dos eletrodos foi o mesmo adotado para os espectros SERS, isto é, ativou-se os eletrodos numa solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$

KCl e, em seguida deixou-se o eletrodo imerso numa solução saturada do modificador por 30 minutos. Utilizou-se como eletrodo de referência e auxiliar, Ag/AgCl e um fio de platina, respectivamente.

IV.3- RESULTADOS E DISCUSSÕES

SERS do PATS4 em eletrodo de ouro em solução aquosa

A Figura IV.1 apresenta os espectros SERS do PATS4 em eletrodo de ouro em solução eletrolítica 0,1 mol.L⁻¹ KCl em diferentes pHs nos potenciais indicados. Para pH=6,0, o deslocamento da frequência e da intensidade relativa da banda em 1475 cm⁻¹ com a variação do potencial aplicado ao eletrodo, indica que esse modo vibracional está relacionado com o centro de adsorção do PATS4 e, como essa banda é atribuída ao modo ($\delta N(2')H + \nu CN$), pode-se confirmar que o nitrogênio imínico é um dos sítios de ligação do PATS4 ao eletrodo [4]. Ao comparar o espectro SERS do PATS4 em pH=6,0 com o espectro do PATS4 no estado sólido, Fig. IV.2, observamos que as bandas em *ca.* 1100, 1300, 1475, 1550 cm⁻¹ ($\nu CS + \tau N(4')H_2$, $\nu NN + \nu CN$, $\delta N(2')H + \nu CN$, νCN) mudaram de intensidade relativa no espectro SERS em comparação com o espectro no estado sólido. Como essas bandas são atribuídas aos modos vibracionais tiossemicarbazida, indicam que o nitrogênio imínico é mesmo o centro de adsorção do PATS4 no eletrodo e sugere que o átomo de enxofre também esteja adsorvido na superfície.

Sabe-se que quando a piridina está adsorvida ao eletrodo através do nitrogênio piridínico, ao abaixar o pH da solução a relação sinal-ruído do espectro diminui devido à adsorção mais fraca do piridínio no eletrodo em comparação com a piridina [11]. A Figura IV.1 mostra que quando a solução eletrolítica é acidificada, não se observa diminuição na relação sinal-ruído dos espectros; esse resultado corrobora com a interpretação de que o anel piridínico não interage com o eletrodo e que deve estar voltado para a solução. Analisando o espectro em pH=1,0, observa-se a presença da banda em 1636 cm⁻¹ e o deslocamento para frequência maior da banda atribuída a respiração do anel piridínico, de 1000 para 1005 cm⁻¹, características do íon piridínio, confirmando a formação da espécie protonada e como se observa o espectro SERS sem diminuição de intensidade em função do tempo pode-se concluir que não existe interação entre o anel piridínico do modificador e a superfície.

Figura IV.1- Espectros SERS do PATS4 em eletrodo de ouro em solução eletrolítica 0,1 mol.L⁻¹ KCl em diferentes pHs nos potenciais indicados na figura, $\lambda_0=632,8\text{nm}$.

Figura IV.2- Espectro Raman do PATS4 no estado sólido, $\lambda_0=632,8\text{nm}$.

Pode-se observar, também nessa figura, os espectros SERS do PATS4 em $\text{pH}=1,0$ em função do tempo no potencial de $-0,2\text{V}$. Novamente, se o anel piridínico estivesse adsorvido no eletrodo, a relação sinal-ruído desses espectros deveria diminuir com o tempo, devido à dessorção da molécula. Não observa-se nenhuma variação significativa na relação sinal-ruído desses espectros com o tempo confirmando, portanto, que os centros de adsorção do PATS4 ao eletrodo são somente o N imínico e o átomo de enxofre.

É importante ressaltar nesses espectros SERS do PATS4 ($\text{pH}=1,0$) que o deslocamento nas frequências das bandas relacionadas ao anel piridínico indicam a presença do íon piridínio, e que o nitrogênio piridínico está “voltado” para a solução eletrolítica. Além do deslocamento das frequências, observa-se também a intensificação das bandas em *ca.* 1100 cm^{-1} , a diminuição da intensidade relativa da banda em *ca.* 1300 cm^{-1} e aumento no valor da meia largura da banda em *ca.* 1600 cm^{-1} , devido também à presença do íon piridínio.

Os resultados obtidos através destes espectros SERS indicam que o PATS4 pode ser um bom modificador de eletrodos para o estudo da reação redox do citocromo c, uma vez que possui o N piridínico livre para interagir com a biomolécula, Figura IV.3.

Figura IV.3- Esquema do PATS4 adsorvido no eletrodo.

Estudo eletroquímico do citocromo c nos eletrodos modificados

Sabe-se que um bom modificador de superfície para o estudo da reação redox do citocromo c é aquele que proporciona a resposta reversível da biomolécula [1-3, 12, 13]. Para testarmos a reversibilidade do eletrodo de ouro modificado por PATS4 existem alguns testes de diagnósticos que são realizados com os voltamogramas cíclicos. Os resultados desses voltamogramas devem cumprir as seguintes condições, para processos reversíveis [14]:

- o gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura do voltamograma cíclico deve ser linear e passar pela origem;
- a variação entre o potencial do pico catódico e o anódico deve ser $59/n$ mV;
- a relação entre a corrente do pico anódico e catódico deve ser 1;
- o potencial de pico deve ser independente da velocidade de varredura.

O voltamograma cíclico de um sistema irreversível não possui picos reversíveis e quando a velocidade de varredura é aumentada, ocorre um afastamento entre os potenciais de pico observados.

Existem sistemas que são reversíveis em baixas velocidades de varredura mas tornam-se irreversíveis em velocidades maiores após ter passado por uma região conhecida como quase-reversível. Nesse caso, a corrente de pico aumenta linearmente com variação da velocidade de varredura.

A Figura IV.4 apresenta os voltamogramas de uma solução 1mmol.L^{-1} de citocromo c em tampão fosfato ($0,1\text{ mol.L}^{-1}\text{ KH}_2\text{PO}_4$) $\text{pH}=7,0$ em eletrodo de ouro modificado por PATS4.

Voltamograma do eletrodo Au/PATS4 sem citocromo c, em tampão fosfato pH = 7,0, $v = 50 \text{ mV/s}$.

Figura IV.4- Voltamogramas cíclicos de uma solução 1 mmol.L^{-1} de citocromo c em tampão fosfato pH = 7,0 em diferentes velocidades de varredura ilustradas na figura; eletrodo de trabalho Au modificado por PATS4.

Os voltamogramas acima apresentam uma variação de 65 mV entre o pico de oxidação e o de redução (ΔE), o que é consistente com uma reação quase-reversível [1]. A variação da velocidade de varredura desses ciclos mostrou que a corrente do pico aumenta linearmente com a velocidade de varredura e não com a raiz quadrada da velocidade como para ondas “nernstianas” [15], Figura IV.5. Esse resultado também indica que ocorre um processo quasi-reversível de oxido-redução.

Figura IV.5- Gráfico da corrente de pico em função da velocidade de varredura dos voltamogramas cíclicos do citocromo c.

A análise dos voltamogramas cíclicos obtidos não permite contudo, entender o tipo de interação que existe entre o modificador PATS4 e o citocromo c. A obtenção dos espectros SERS é fundamental para auxiliar nesse estudo.

Antes de discutir os resultados obtidos através dos espectros SERS apresentamos o espectro eletrônico do citocromo c, Figura IV.6.

Figura IV. 6- Espectro de absorção 0,20 mM do citocromo c numa solução aquosa tamponada pH =7,0 (0,1 mol.L⁻¹ NaClO₄, 20 mmol.L⁻¹ KH₂PO₄).

Observa-se no espectro eletrônico uma banda intensa em 408 nm e uma banda de menor intensidade em 550 nm correspondentes respectivamente as bandas Soret e Q do anel porfirínico do citocromo c [9].

Na Figura IV.7 é mostrado o espectro Raman normal (514,5 nm) e ressonante (413,1 nm) de uma solução aquosa 1.10⁻⁶ mol.L⁻¹ de citocromo c tamponada em pH=7,0. As bandas observadas na região de frequência entre 1300-1700 cm⁻¹ no espectro Raman ressonante (413,1 nm) são características de modos vibracionais que incluem predominantemente estiramentos C-C e C-N do anel porfirínico [16, 17]. A banda mais intensa em 1372 cm⁻¹ é associada ao modo vibarcional ν_4 , A_{1g} que é um modo praticamente puro da vibração de estiramento C-N. No ferrocitocromo c (Fe²⁺) essa banda desloca *ca.* de 10 cm⁻¹, para 1360 cm⁻¹, o que pode ser interpretado em termos do aumento da retrodoação da densidade eletrônica nos orbitais antiligantes π^* da porfirina devido à redução do ferro, enfraquecendo a ligação C-N [18]. Esse modo ν_4 pode, portanto, ser usado como uma indicação do estado de oxidação da biomolécula, permitindo determinar o estado redox do grupo heme do citocromo c.

Figura IV.7- Espectro Raman Normal e Raman Ressonante de uma solução 1.10^{-6} mol.L⁻¹ de citocromo c em tampão fosfato pH = 7,0, # bandas do PO₄³⁻.

SERS do PATS4 e SERRS do citocromo c em eletrodo de ouro modificado por PATS4

Os espectros SERRS do citocromo c foram obtidos utilizando a radiação 413,1 nm (Kr⁺) onde é possível observar o espectro da biomolécula devido à intensificação das bandas Raman pelo efeito SERS e Raman Ressonante. A análise do modificador é feita através da comparação dos espectros SERS do PATS4 na presença e ausência do citocromo c utilizando como radiação excitante 632,8 nm (He-Ne), onde as bandas da biomolécula não podem ser observadas.

A figura IV.8 apresenta os espectros SERS do PATS4 adsorvido em eletrodo de ouro em solução aquosa na radiação excitante de 413,1 nm.

Figura IV.8- Espectros SERS do PATS4 adsorvido em eletrodo de ouro em solução aquosa tamponada ($0,1\text{mol.L}^{-1}$ NaClO_4 , 20 mmol.L^{-1} KH_2PO_4 , $\text{pH}=7,0$) nos seguintes potenciais: a) $-0,2\text{V}$; b) $-0,1\text{V}$; c) $+0,1\text{V}$; d) $+0,2\text{V}$, $\lambda_0=413,1\text{ nm}$; # banda do PO_4^{-3} .

Os espectros apresentados na figura IV.8 mostram que na região de potenciais de interesse para o estudo da reação redox do citocromo c ($-0,2\text{V}$ a $+0,2\text{V}$) os espectros do modificador não sofrem influência do potencial. Além disso, podemos perceber que o PATS4 não apresenta nenhuma banda na região próxima a 1360 cm^{-1} , referente ao grupo heme do citocromo c, que poderia interferir na análise do espectro do citocromo c.

A figura IV.9 apresenta os espectros SERRS do citocromo c adsorvido no eletrodo modificado na radiação excitante de $413,1\text{ nm}$ ou seja, próximo à banda de absorção do citocromo c. Nesses espectros observamos somente as bandas do citocromo c.

Figura IV.9- Espectros SERRS do citocromo c adsorvido no eletrodo de ouro modificado por PATS4 em solução aquosa tamponada ($0,1\text{ mol.L}^{-1}$ NaClO_4 , 20 mmol.L^{-1} fosfato, $\text{pH}=7,0$) nos seguintes potenciais: : a) $-0,2\text{V}$; b) $-0,1\text{V}$; c) $+0,1\text{V}$; d) $+0,2\text{V}$, $\lambda_0=413,1\text{ nm}$.

As bandas em 1376 e 1363 cm^{-1} presentes no espectro da figura IV-9 são atribuídas ao modo C-N de respiração do macrociclo pirrol (ν_4). Essas bandas são usadas normalmente como marca para o estado redox do citocromo c e correspondem à forma oxidada (1375 cm^{-1}) e reduzida (1363 cm^{-1}) [16-20]. A presença da banda em 1376 cm^{-1} no espectro c ($+0,1\text{V}$) está indicando portanto, que o citocromo c está com o grupo heme oxidado (Fe^{3+}), enquanto para o espectro a ($-0,1\text{V}$) o ferro está reduzido (Fe^{2+}). Em $+0,2\text{V}$ não é possível observar a banda em 1376 cm^{-1} . Como o tempo de aquisição desses espectros é muito grande, cerca de 30 minutos, a exposição do laser na amostra pode causar a foto-redução do citocromo c e por isso não observamos a banda em 1376 cm^{-1} no espectro em $+0,2\text{V}$.

No eletrodo de ouro, a região espectral onde ocorre o SERS não coincide com a região onde ocorre o Raman ressonante do citocromo c, dificultando a obtenção do espectro da biomolécula [20, 21]. Além disso, o longo tempo da aquisição desses espectros também comprometeu a relação sinal-ruído dos mesmos, uma vez que foram utilizados nesses experimentos o espectrômetro Jobin Yvon e uma fotomultiplicadora como detetor. Como a radiação do laser na amostra pode decompor a biomolécula [20] repetimos esse experimento com eletrodos de prata, numa menor janela espectral para melhorar a relação sinal-ruído dos espectros.

Figura IV.10- Espectros SERS do PATS4 em eletrodo de prata obtido na radiação 514,5 nm (a) e SERRS do citocromo c (1.10^{-6} mol.L $^{-1}$) em eletrodo de prata modificado por PATS4 ($\lambda_0 = 413,1$ nm).

A Figura IV.10a apresenta os espectros SERS do PATS4 adsorvido em eletrodo de prata em solução 0,1 mol.L⁻¹ KCl. Utilizou-se a radiação excitante 514,5 nm nos espectros SERS do PATS4 por proporcionar uma maior intensificação do sinal SERS no eletrodo de prata [21]. As bandas em 1204 e 1600 cm⁻¹ observadas nesses espectros são atribuídas a modos vibracionais do anel piridínico, β CH X sensível ν C-C (py-8a,8b), respectivamente.

A Figura IV.10b apresenta os espectros SERRS do citocromo c em eletrodo de prata modificado por PATS4 utilizando a radiação excitante 413,1 nm. Observam-se nesses espectros, além das bandas do PATS4, bandas características do citocromo c em 1370 e 1503 cm⁻¹. Ao variar o potencial aplicado ao eletrodo, pode-se observar o deslocamento de frequência da banda em 1370 cm⁻¹ para 1376 cm⁻¹. Esse comportamento é característico à mudança do Fe²⁺ para Fe³⁺ [16-20] e indica que a biomolécula está interagindo com a superfície modificada. Infelizmente, bandas características ao estado de spin na região de 1590-1600 cm⁻¹ [17] são coincidentes com os espectros PATS4 dificultando uma análise mais detalhada do espectro nessa região.

Como foi verificado que o N piridínico do PATS4 não adsorve na superfície podendo interagir com a solução e admitindo que, quando ocorrem interações com esse átomo deve-se observar mudanças nos espectros SERS, obtivemos os espectros SERS do PATS4 na presença e na ausência de citocromo c utilizando como radiação excitante a linha 632,8 nm (He-Ne). Nessa radiação, fora da banda de absorção do citocromo c (efeito Raman Ressonante) não é possível observar bandas Raman relacionadas aos modos vibracionais do citocromo c e portanto, observa-se somente o espectro do PATS4 mesmo na presença da biomolécula. Dessa maneira, caso a interação entre o citocromo c e o PATS4 seja através de ligações de hidrogênio, deve-se observar variações no espectro SERS do PATS4 quando comparados os espectros com e sem citocromo c.

A Figura IV.11a apresenta os espectros SERS do PATS4 adsorvido em eletrodo de ouro em solução 0,1mol.L⁻¹ KCl obtidos com a radiação excitante 632,8 nm. Como podemos observar, não existe nenhuma variação significativa entre esses espectros SERS e os obtidos em eletrodo de prata (Fig. IV.10a). As bandas em 1000, 1205 e 1600 cm⁻¹ observadas nesses espectros são também atribuídas aos modos vibracionais do anel piridínico (respiração, β CH X sensível e ν C-C (py-8a,8b), respectivamente).

Os espectros SERS apresentados na Figura IV.11 b são claramente iguais ao do PATS4 e nenhuma banda característica ao citocromo c pode ser observada nesses espectros. Não existe também nenhuma variação quanto à frequência e intensidades das bandas observadas que indicasse uma interação por ligações de hidrogênio entre o PATS4 e o citocromo c.

Figura IV.11. Espectros SERS do PATS4 adsorvido em eletrodo de ouro na ausência (a) e na presença (b) do citocromo c, $\lambda_0=632,8$ nm.

Estabilidade do eletrodo modificado em função do tempo.

Para realizarmos uma análise mais correta quanto à possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre o PATS4 e o citocromo c obtivemos os espectros SERS de uma pequena janela espectral utilizando o CCD no modo parado. Dessa maneira, pequenos deslocamentos de frequências podem ser observados.

A Figura IV.12 apresenta os espectros SERS do PATS4 em eletrodo de prata em 0V em função do tempo, espectros cinzas: solução eletrolítica tampão pH=7,0 (0,1 mol.L⁻¹ de PO₄³⁻) e, espectros pretos na presença de 5.10⁻⁶ mol.L⁻¹ de citocromo c em tampão fosfato pH=7,0; essas foram as condições experimentais utilizadas na obtenção dos espectros SERRS (Raman Ressonante intensificado pela superfície, $\lambda_0=413,1$ nm).

Os espectros cinzas mostram que não existe variação nem na frequência, nem na intensidade relativas das bandas Raman em função do tempo no potencial de 0V, ou seja, o eletrodo mantém-se estável após uma hora. Os espectros SERS do PATS4 na presença de citocromo c (pretos) obtidos com o mesmo eletrodo que os anteriores, também não variaram em função do tempo. Nesse caso, obteve-se espectros para um tempo maior (2 horas) e durante esse período nenhuma mudança significativa foi observada nesses espectros.

Figura IV.12- Espectros SERS do PATS4 em eletrodo de prata em 0V em função do tempo, espectros cinzas: solução eletrolítica de tampão pH=7,0 e, espectros pretos na presença de $5 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de citocromo c em tampão fosfato pH=7,0.

Eletrodo modificado com PATS4 na presença de lisina e NH_4^+ .

Na tentativa de simular uma condição experimental semelhante à interação por ponte de hidrogênio entre o PATS4 e o citocromo c, obtivemos os espectros SERS do PATS4 em solução eletrolítica 0,1 mol.L⁻¹ NH_4Cl . Nessa solução, os íons NH_4^+ poderiam interagir com o PATS4 formando ligações de hidrogênio com o nitrogênio piridínico. A Figura IV.13 apresenta os espectros SERS obtidos nessas condições em diferentes potenciais.

Comparando os espectros SERS da Figura IV.13 com os espectros SERS do PATS4 em eletrodo de ouro obtido em 0,1mol.L⁻¹ KCl, pH=6,0 (Fig. IV.11a), não é possível verificar

nenhuma variação significativa quanto a frequência nem quanto a intensidade relativa das bandas.

Figura IV.13- Espectros SERS do PATS4 em eletrodo de ouro, solução eletrolítica 0,1 mol.L⁻¹ NH₄Cl nos potenciais indicados na figura, $\lambda_0=632,8\text{nm}$.

É proposto na literatura que a interação entre o citocromo c e o PATS4 ocorre através ligações de hidrogênio entre grupos lisinas carregadas positivamente e o N do PATS4. Na tentativa de observar a formação de ligação de hidrogênio entre o PATS4 e a lisina protonada, obtivemos os espectros SERS do PATS4 em uma solução eletrolítica contendo $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de lisina.

Sabe-se que o aminoácido lisina ($\text{NH}_3^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_3^+) - \text{CO}_2^-$) possui em $\text{pH}=7,0$ carga líquida positiva ($\text{pK}_1=2,20(\text{COOH})$; $\text{pK}_2=8,90 (\text{NH}_3^+)$; $\text{pK}_3=10,28$ (grupo R ($\text{NH}_3^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}$)) [22]. Obtivemos os espectros SERS do PATS4 em eletrodo de ouro e solução tampão de fosfato $\text{pH}=7,0$ na presença de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de lisina (protonada, nessas condições) com a finalidade de comparar esses resultados com os obtidos na presença de citocromo c. A Figura IV.14 apresenta os espectros SERS obtidos nos potenciais de interesse para o estudo com citocromo c.

Comparando os espectros SERS da Figura IV.14 com os espectros SERS do PATS4 em eletrodo de ouro obtido em $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KCl}$, $\text{pH}=6,0$ (Fig. IV.11a) não é possível verificar nenhuma variação significativa quanto a frequência nem quanto a intensidade relativa das bandas que pudessem confirmar uma interação de ligações de hidrogênio com o PATS4.

Figura IV.14- Espectros SERS do PATS4 em eletrodo de ouro (tampão pH=7,0) na presença de 0,1mol.L⁻¹ de lisina nos potenciais indicados na figura, $\lambda_0=632,8\text{nm}$.

Os espectros SERS do PATS4 na presença de lisina e do íon NH_4^+ não apresentaram variação das frequências das bandas. Este fato pode ser atribuído à não interação entre o PATS4 e os compostos protonados através de ligação de hidrogênio. Talvez, em solução aquosa exista uma interação por pontes de hidrogênio entre o átomo N piridínico do PATS4 e moléculas de água (da solução eletrolítica) que impede que ocorra a interação desse modificador com os íons eletrolíticos em solução.

Figura IV.15- Esquema do eletrodo modificado por PATS4 interagindo com as moléculas de água da solução.

Existem trabalhos reportados na literatura onde o complexo pentaciano rutenato de 4 mercaptopiridina é utilizado como modificador de eletrodos metálicos para o estudo da reação redox do citocromo c [7, 23]. Utilizamos o complexo $[\text{Ru}(\text{CN})_5\text{PATS4}]^{3-}$ como modificador de superfície para ajudar na elucidação do tipo de interação existente entre o PATS4 e o citocromo c.

O íon pentaciano rutenato se liga ao PATS4 através do N piridínico e, portanto, impossibilita a interação por ligação de hidrogênio entre esse N e o citocromo c. Dessa forma, a interação desse complexo com o citocromo c deve ser monitorada pela variação de intensidade e frequência da banda do estiramento CN quando comparamos os espectros SERS desse complexo na presença e na ausência do citocromo c, uma vez que os grupos CN são disponíveis para interagir com a biomolécula.

A Figura IV.16 apresenta os espectros SERS do complexo $[\text{Ru}(\text{CN})_5\text{PATS4}]^{3-}$ adsorvido em eletrodo de prata e o SERRS do citocromo c nesse eletrodo modificado.

Figura IV.16- Espectros SERS do modificador $[\text{Ru}(\text{CN})_5\text{PATs4}]^{3-}$ adsorvido em eletrodo de prata numa solução tampão pH 7,0 e na presença de citocromo c nos potenciais indicados na figura, $\lambda_0 = 413,1 \text{ nm}$.

A presença das bandas em 1023, 1208 e 1610 cm^{-1} no espectro SERS do $[\text{Ru}(\text{CN})_5\text{PATs4}]^{3-}$, atribuídas a modos vibracionais do anel piridínico, indicam que o N piridínico está coordenado ao complexo pentaciano rutenato, quando comparamos essas bandas com as bandas obtidas no espectro SERS do PATs4 (1000, 1205 e 1600 cm^{-1}) [4].

Apesar da baixa relação sinal-ruído obtida nos espectros SERRS do citocromo c podemos observar a presença da banda característica do estado redox do citocromo c (Fe^{2+} , Fe^{3+}) em 1371 e 1374 cm^{-1} , respectivamente.

A Figura IV.17 apresenta os espectros SERS do complexo na presença e ausência do citocromo c. Esses espectros foram obtidos no equipamento Renishaw com a radiação excitante 632,8 nm.

Figura IV.17. Espectros SERS do modificador $[\text{Ru}(\text{CN})_5\text{PATS4}]^{3-}$ adsorvido em eletrodo de prata numa solução tampão pH 7,0 (a) e na presença de citocromo c (b) nos potenciais indicados na figura, $\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$.

Observamos nos espectros apresentados na Figura IV-17 uma banda de baixa intensidade na região de 2100 cm^{-1} que é atribuída ao modo vibracional do estiramento CN. Quando comparados os espectros obtidos na presença do citocromo c não é possível observar nenhuma variação significativa quanto à frequência nem quanto à intensidade relativa dessas bandas que significasse uma possível interação por ligação de hidrogênio entre o cianeto e o citocromo c. Esse resultado pode indicar que a interação entre os modificadores e o citocromo c não ocorre através de ligação de hidrogênio mas sim, uma interação eletrostática.

IV.4- CONCLUSÕES

Os espectros SERS do PATS4 em eletrodo de ouro e solução aquosa em diferentes pHs permitiram confirmar que o N imínico e o enxofre são os centros de adsorção do PATS4 ao eletrodo e que o N piridínico está voltado para a solução.

O uso de diferentes radiações excitantes é seletivo para detectar o PATS4 adsorvido ou para monitorar as bandas características do estado de oxidação do citocromo c em função do potencial. O valor do potencial redox e as frequências dos modos vibracionais do citocromo c sugerem que o grupo heme da biomolécula está na sua forma nativa.

Como não foi possível verificar uma variação significativa entre os espectros SERS do PATS4 em solução eletrolítica, pH=7,0 (tampão fosfato) e os espectros SERS do PATS4 na presença de citocromo c que pudesse indicar que a interação entre a biomolécula e o modificador seja através de ligações de hidrogênio, poderíamos supor que no caso do PATS4 a interação fosse eletrostática. O PATS4 é, no entanto, um composto neutro e não há indicação nos espectros SERS da presença de uma espécie aniônica adsorvida no eletrodo o que descarta a possibilidade de uma interação eletrostática. A interação que deve existir entre o modificador e a biomolécula deve ser por pontes de hidrogênio entre moléculas de água que interagem com o PATS4 e o citocromo c, Figura IV.15.

IV.5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. H.A.O. Hill, D.J. Page, N.J. Walton, *J. Electroanal. Chem.*, **217** (1987) 129.
2. H.A.O. Hill, D.J. Page, N.J.S. Walton, *J. Electroanal. Chem.*, **217** (1987) 141.
3. H.A.O. Hill, L.H. Guo, G. McLendon, *Cytochrome c a Multidisciplinary Approach*; R.A. Scott, A.G. Mauk, 1996, cap.7.
4. L.S. Pinheiro, M.L.A. Temperini, *J.Electroanal.Chem.* **295** (1990) 169.
5. D.Hobara, K. Niki, T.M. Cotton, *Biospectroscopy*, **4** (1998) 161.

6. L.A. Dick, A.J. Haes, R.P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 11752.
7. I. C. N. Diógenes, F.C. Nart, I.S. Moreira, *Inorg. Chem.*, **38** (1999), 1646.
8. T.G. Spiro, X. Li, *In Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T.G., Ed.; Wiley: NY, 1988, vol. III, 1-37.
9. P. Hildebrandt, *Cytochrome c a Multidisciplinary Approach*; R.A. Scott, A.G. Mauk, 1996, cap.6.
10. T.M. Cotton, S.G. Schultz, R.P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1980) 7960.
11. D.L. Jeanmaire, R.P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem.*, **84** (1977) 1.
12. H.A.O. Hill, *Coord. Chem. Reviews*, **151** (1996) 115.
13. F.A. Armstrong, G.S. Wilson, *Electrochimica Acta*, **45** (2000) 2623.
14. R. Greef, R. Peat, L. M. Peter, D. Pletcher, J. Robinson, *Instrumental Methods in Electrochemistry*, 1985, cap.6, Ed, John Wiley & Sons.
15. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, cap.12.
16. M. Abe, T. Kitagawa, Y. Kyogoku, *J. Chem. Phys.* **69** (1978) 4526.
17. P. Hildebrandt, M. Stockburger, *Biochemistry*, **28** (1989) 6710.
18. T. Kitagawa, Y. Ozaki, J. Teraoka, Y. Kyogoko, T. Yamanka, *Biochim. Biophys. Acta* **494** (1977) 100.
19. M.S. Sibbald, G. Chumanov, T.M. Cotton, *J. Phys. Chem.*, **100** (1996) 4672.
20. D. Hobar, K. Niki, C. Zhou, G. Chumanov, T. M. Cotton, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **93** (1994) 241.
21. J.C. Rubim- *Tese de Livre-Docência*, (1993) Instituto de Química -USP.
22. A. L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, *Principles of Biochemistry*, cap. 5, 2nd Ed. Worth Publishers (1993).
23. I.C.N. Diógenes, F.C. Nart, M.L.A. Temperini, I.S. Moreira, *Inorg. Chem.*, **40** (2001) 4884.

Capítulo V- Considerações Finais

V.1- Conclusões

Através das técnicas espectroscópicas Raman e ^1H RMN foi possível determinar a configuração dos compostos das tiossemicarbazonas das 2-formilpiridina e de seus derivados metilados tanto na fase sólida como em solução. Antes da obtenção dos dados espectroscópicos, um químico poderia pensar que todos os compostos em questão seriam estabilizados por uma ligação de hidrogênio intramolecular que resultaria na formação de um anel de seis átomos, estável, com configuração Z. Os resultados espectroscópicos mostraram, no entanto, que com exceção do composto DMePATS2, que apresenta como configuração mais estável a Z no estado sólido, todos os outros compostos estudados apresentaram o isômero E como o mais estável na fase sólida. Foi mostrado que a estabilização da configuração E nesses compostos está diretamente relacionada à presença de ligações de hidrogênio intermoleculares. O isômero Z é estabilizado por uma ligação intramolecular que só existe devido à presença dos grupos metilas substituídas no N(4'). Com a presença dessas metilas, as ligações de hidrogênio intermoleculares são rompidas e um novo balanço energético em relação às interações moleculares é atingido; a ligação de hidrogênio intramolecular é favorecida nesse caso.

O estudo em solução dos compostos mostrou que a configuração mais estável depende do composto considerado e da natureza do solvente. A alta deslocalização eletrônica e a presença de grupos possíveis de formar ligações de hidrogênio, faz com que as configurações desses compostos sejam fortemente dependentes do ambiente químico. Existe uma correlação entre a configuração predominante em solução e o *donor number* do solvente utilizado. Solventes com alto valor de *donor number* favorecem a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares (composto-solvente) e, portanto, estabilizam o isômero E. Por outro lado, em solventes com menor valor de *donor number*, mesmo para o caso do PATS2, o isômero Z é estabilizado pela ligação de hidrogênio intramolecular N-H-Npy. Nesse caso, as ligações de hidrogênio intermoleculares (PATS2-PATS2) são rompidas por moléculas do solvente resultando na estabilização de novas interações.

Comparando o efeito que os cátions alcalinos e alcalinos terrosos exercem sobre as soluções de PATS2 e DMePATS2, pode-se concluir que novamente os grupos metilas substituídos no N(4') têm um papel importante nas propriedades desses compostos. No caso do PATS2 não ocorre a formação de complexos com os metais alcalinos e alcalinos terrosos em solução de ACN, esses cátions somente catalisam a reação de isomerização E-Z. Já o composto

DMePATS2 forma complexo com os cátions estudados, o que pode também ser explicado através da presença dos grupos metilas que, nesse caso, aumentam a basicidade dos centros de coordenação da molécula favorecendo o ataque pelos cátions e estabilizando os complexos.

A presença do átomo de enxofre e a grande deslocalização eletrônica nos PATSn faz com que esses compostos adsorvam facilmente em eletrodos de ouro e prata. A adsorção nas superfícies metálicas deve influenciar na configuração desses compostos e, como eles são utilizados como modificadores de eletrodos, existe um grande interesse em determinar a configuração e o ‘comportamento químico’ dos compostos quando adsorvidos. Os resultados obtidos com os espectros SERS mostraram que a variação do potencial aplicado ao eletrodo induz a isomerização Z-E tanto do PATS2 quanto para o DMePATS2 na superfície. Para potenciais positivos o isômero Z é predominante enquanto que para potenciais negativos o isômero E adsorve preferencialmente.

Verificamos que a presença do Mg^{2+} na solução eletrolítica utilizada nos experimentos SERS causa uma competição entre a superfície e o cátion Mg^{2+} pelos sítios de coordenação do DMePATS2. Como a concentração de Mg^{2+} na interfase é alta para potenciais negativos, ele deve interagir com o DMePATS2 adsorvido e causar a depleção do E-DMePATS2 na superfície devido à formação do complexo Mg^{2+} -E-DMePATS2 em solução. Para potenciais positivos o isômero Z-DMePATS2 adsorve irreversivelmente na superfície.

Comparando os resultados entre o DMePATS2 e o PATS4 verificamos que o isômero E-DMePATS2 desaparece da superfície metálica na presença de Mg^{2+} e que o complexo Mg^{2+} -PATS4 está presente no eletrodo de prata o que podemos concluir que, se o sítio de adsorção da molécula ao eletrodo for o mesmo que o envolvido na formação do complexo, deve existir uma competição entre adsorção e complexação e o complexo não deve ser detectado na superfície.

Sabe-se que o PATS4 é o melhor modificador de eletrodos para o estudo da reação redox do citocromo c. O estudo espectroscópico do eletrodo modificado por PATS4 é interessante para elucidar o mecanismo de ação desse composto como modificador. A utilização de diferentes radiações excitantes permite selecionar a detecção do PATS4 adsorvido ou monitorar as bandas características do estado de oxidação do citocromo c em função do potencial. O valor do potencial redox e as frequências dos modos vibracionais do citocromo c indicaram que o grupo heme da biomolécula está na sua forma nativa quando utilizamos o eletrodo modificado por PATS4. Como não foi possível verificar uma variação significativa entre os espectros SERS do PATS4 em solução eletrolítica pH=7,0 (tampão fosfato) e os espectros SERS do PATS4 na presença de citocromo c que indicasse uma interação por ligações de hidrogênio direta entre a

biomolécula e o modificador poderíamos pensar que no caso do PATS4 essa interação é eletrostática.

O estudo em solução desses compostos mostrou, no entanto, a grande tendência em formar ligações de hidrogênio entre os PATSn e os solventes. Como a solução eletrolítica utilizada na caracterização da interação modificador-citocromo c é aquosa, acreditamos que existem fortes ligações de hidrogênio entre, principalmente, o N piridínico e moléculas de água e que o citocromo c deve interagir, através de ligações de hidrogênio com a monocamada de água formada nesses eletrodos.