5 EXPERIMENTAL

5.1. Considerações Gerais

Os reagentes líquidos e solventes utilizados nas reações, recristalizações e outras atividades foram previamente destilados e, quando necessário, tratados e desidratados de acordo com o método descrito na literatura^{5.0}.

Na cromatografia em camada fina (CCF) foi utilizada com fase estacionária, sílica gel 60 HR, Merck.

5.1.1. Reagentes

- Acetona P.A
- Álcool etílico 95%, Vetec. (*)
- Álcool metílico - PA, Vetec (*)
- Álcool butílico - PA, Vetec. (*)
- Cloreto de cálcio - puro (para dessecador), Quimibrás Industrias Químicas.
- Hidróxido de potássio - em pastilles, Merck, 99%
- Cisplatina 99% - Quiral Química
- 6-metilmercaptopyruvato 96% Microbiológica
- ácido tricloroisocianúrico

(*) – Reagentes segundo especificações ACS (4.0)

5.1.2. Equipamentos

- Analisador CHNS/O Sinc EA 1110
- Balança termogravimétrica Perkin-Elmer TGA 7
- Espectropolarímetro de Absorção Atômica - Varian – série 1106
- Espectrôfotômetro de Infravermelho Perkin Elmer FT-IR 2000
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) – Varian, Unity 300 (IME, RJ).
- Espectrômetro de massa Bruker Biflex III do Laboratório Van de Graaff do Departamento de Física da PUC-Rio.

5.1.3. Síntese

5.1.3.1. Procedimentos Geral da Síntese Orgânica

5.1.3.2. Síntese do 6-metilsulfonilpurina

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, contendo 20 mL de solução 3:7 de metanol: água, foi adicionado 1g (0,02 mmols) de 6-metilmercaptapurina. Em seguida, o agente oxidante foi adicionado à suspensão resultante, sob agitação constante, havendo o cuidado de manter a temperatura abaixo de 10°C, através de banho de gelo e cloreto de sódio. Ao final da reação, o produto formado foi filtrado, lavado com água quente e etanol, recristalizado em metanol e seco sob a lâmpada de infravermelho.

5.1.3.3. Síntese das 6-aminopurina

Em um balão de fundo de 25 mL, com duas bocas e condensador para refluxo, foram adicionados 5 mL de solvente e 0,20 g (1,01 mmol) de 6-metilsulfonilpurina. Em seguida, a amina correspondente foi adicionada ao meio reacional, sob agitação constante, e fez-se passar nitrogênio gasoso por 15 minutos. Foi, então, adaptada uma torneira ao topo do condensador, à qual estava conectada uma bola de borracha preenchida com nitrogênio gasoso. Com atmosfera inerte garantida, a mistura foi aquecida à temperatura de

refluxo do solvente. Ao término da reação, o sistema foi resfriado à temperatura ambiente. Após esta etapa, o solvente e o excesso de amina foram reduzidos quase que completamente por rotaevaporação, e o material obtido foi filtrado e lavado com água quente e acetato de etila. O produto obtido foi recristalizado no solvente apropriado e seco sob lâmpada de infravermelho.

5.1.4. Procedimento Geral da Síntese Inorgânica

5.1.4.1. Síntese do complexo

Em um bécher com aproximadamente 40 mL uma solução de 1:3 de acetona/água, adicionou-se 1 mmol de 6-aminopurinas, mantendo-se sob agitação a uma determinada temperatura até total dissolução, monitorando para que o volume de solução se mantivesse como o inicial. Retira-se o aquecimento deixando a solução esfriar até atingir a temperatura ambiente. Em seguida adiciona-se lentamente 1 mmol de cisplatina (0,3 g) sob a forma de pó. Deve tomar cuidado de só acrescentar uma nova porção de cisplatina quando a anterior já estava totalmente dissolvida. Após a dissolução total da cisplatina o volume da solução deve ser reduzido a 1/3 e o precipitado obtido foi lavado com etanol absoluto e éter etílico e após estar totalmente seco em estufa reservado em dessecador para posterior caracterização.

5.2. Técnicas Analíticas

As 6-aminopurinas e os possíveis complexos sintetizados foram caracterizados com as seguintes técnicas:

- Análise elementar (CHN)
- Espectrometria de absorção atômica (AA)
- Análise termogravimétrica (TGA)
- Ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹H)
- Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ¹³C)
- Infravermelho (IV)

Os procedimentos de cada uma das caracterizações estão descritos a seguir e com os resultados obtidos destas análises, pode-se propor as fórmulas moleculares e possíveis estruturas para as 6-aminopurinas sintetizadas e os complexos formados entre os complexos formados das 6-aminopurinas e a cisplatina.

5.2.1. Análise elementar (CHN)

Os elementos C, H e N, foram analisados simultaneamente mediante curva de calibração obtida com padrões secos e de alta pureza em condições iguais às das análises, com temperatura de queima de 600 segundos, sob temperatura de 1000⁰C e fluxo de gás de hélio.

As análises foram feitas em um Analisador Elementar (CHN), modelo EA 1110, da CE Instrumentos, pesando-se em balança analítica com precisão de 10⁻⁴ g entre 2 a 3 mg de cada amostra, acondicionadas em cápsula de estanho.

Todas as análises foram feitas em duplicatas e forneceram o percentual de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Cloro e fluor foram calculados por diferença.

5.2.2. Espectrofotometria de Absorção Atômica (AA)

O equipamento utilizado foi um Espectrômetro de Absorção Atômica, modelo A5, da Varian com comprimento de onda de 327 nm e banda espectral de passagem de 0,1 nm.

Foram preparadas soluções dos complexos na concentração de 10^{-3} mol/L em HNO_3 10 %. Os resultados obtidos foram comparados com uma curva analítica do ion Pt (II), construída a partir da análise de soluções deste ion, preparadas em concentrações de 0, 10, 20, 40 e 60 ppm, respectivamente.

Com os resultados obtidos foi possível determinar a concentração de Pt em cada um dos complexos.

5.2.3. Análise termogravimétrica (TGA)

Para as análises termogravimétricas, os ligantes e os complexos foram pesados em torno de 5 mg cada e foram acondicionados em cadinho de platina, em balança Termogravimétrica Perkin – Elmer TGA 7, e analisadas em equipamento da TA Instruments, um SDT – 2960.

As análises foram feitas com fluxo de 100mL/min de nitrogênio, rampa de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ e faixa de temperatura de aquecimento de 20 a 900°C .

A análise termogravimétrica gera como resultado uma curva de decomposição térmica que fornece os percentuais dos fragmentos de massa perdidos em função da temperatura. As informações obtidas foram importantes para se analisar como ocorreu a coordenação em cada complexo.

5.2.4. Análise por Espectrometria de Massas

A técnica de espectrometria de massa Laser Desorption Ionization (LDI) consiste em irradiar a amostra (sólida) diretamente com lasers. O laser tem as funções de dessorver, ou seja, de transferir moléculas para a fase gasosa, e de ionizá-las. Esta modalidade de espectrometria de massa é indicada para análise de substâncias de massas moleculares relativamente baixas (<1000 Da) e difíceis de serem volatilizadas (por ex, moléculas muito polares ou

termicamente instáveis) e requer que as moléculas absorvam no comprimento de onda do laser utilizado. Portanto, é uma técnica que se aplica à algumas substâncias difíceis de serem analisadas pela espectrometria de massa clássica que utiliza feixe de elétrons como agente ionizante (Electron Ionization – EI). A intensidade do laser que atinge a amostra é controlada por um atenuador posicionado na frente da amostra. O atenuador é um disco girante de quartzo revestido com um filme metálico de transparência gradual: o setor do disco sem filme deixa passar a intensidade máxima do laser até o setor onde o filme é espesso o suficiente para bloquear o feixe do laser totalmente. Atenuar a intensidade do laser é importante para evitar fragmentação excessiva das moléculas. Procura-se obter os espectros de massa com intensidade do laser pouco acima do limiar necessário para dessorver as moléculas, ou seja, com atenuação um pouco menor do que a utilizada no limiar.

Os espectros de massa apresentados neste trabalho foram obtidos no espectrômetro de massa Bruker Biflex III do Laboratório Van de Graaff do Departamento de Física da PUC-Rio. Resumidamente, esse equipamento utiliza laser UV, mais precisamente de N₂ com comprimento de onda de 337 nm, largura de pulso de cerca de 3 nanossegundos e potência de 10⁶ a 10⁷ W/cm². O analisador de massa é do tipo tempo de voo (TOF – Time of Flight) munido de espelho eletrostático de íons (Reflectron), ele pode ser operado nos modos linear ou refletido caso o reflectron seja desligado ou ligado, respectivamente. A polaridade da tensão de extração dos íons pode ser positiva ou negativa para obter espectros de íons positivos ou negativos, respectivamente.

Os complexo foram dissolvidos em solução 1:3 de água/acetona, as soluções resultantes são pingadas no porta amostra do espectrômetro; deixa secar à temperatura ambiente antes de proceder as análises.

5.2.5. RMN ¹H e RMN ¹³C

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance – 300 MHz operando a 75 MHz para RMN ¹³C e 300 MHz para RMN ¹H a temperatura ambiente. Foram utilizados tubos de vidro 5 mm de diâmetro e DMSO deuterado como solvente, a temperatura ambiente, numa concentração de 10 % em massa tanto para o RMN de próton quanto para o de carbono treze.

Todos os ligantes, foram analisados pela técnica de RMN, porém os complexos resultantes da interação da 6-aminopurinas e a cisplatina não foram analisados pela técnica de RMN.

5.2.6. Espectroscopia de Infravermelho (IV)

Utilizou-se um Espectrômetro de Absorção na Região do Infravermelho, modelo 2000 Ft-IR, da Perkin – Elmer, coletando-se os dados com intervalos de $0,5\text{ cm}^{-1}$, com resolução de $4,0\text{ cm}^{-1}$ e varredura de $0,2\text{ cm.s}^{-1}$ e número de scans de 120.

Para todos os compostos sintetizados foram feitos espectros na região de $4000 - 370\text{ cm}^{-1}$ e $710 - 30\text{ cm}^{-1}$. Preparou-se para a região de alta frequência ($4000 - 370\text{ cm}^{-1}$) pastilhas dos complexos com KBr e para a região de baixa frequência ($710 - 30\text{ cm}^{-1}$) pastilhas dos complexos com polietileno.

Através dos deslocamentos observados nas bandas dos compostos formados, em comparação com as dos materiais de partidas, pode-se verificar que havia realmente ocorrido à formação dos complexos.

Os resultados obtidos com as demais técnicas, associados às informações fornecidas pelas bandas de infravermelho, permitiram a proposta de algumas estruturas para os compostos sintetizados.