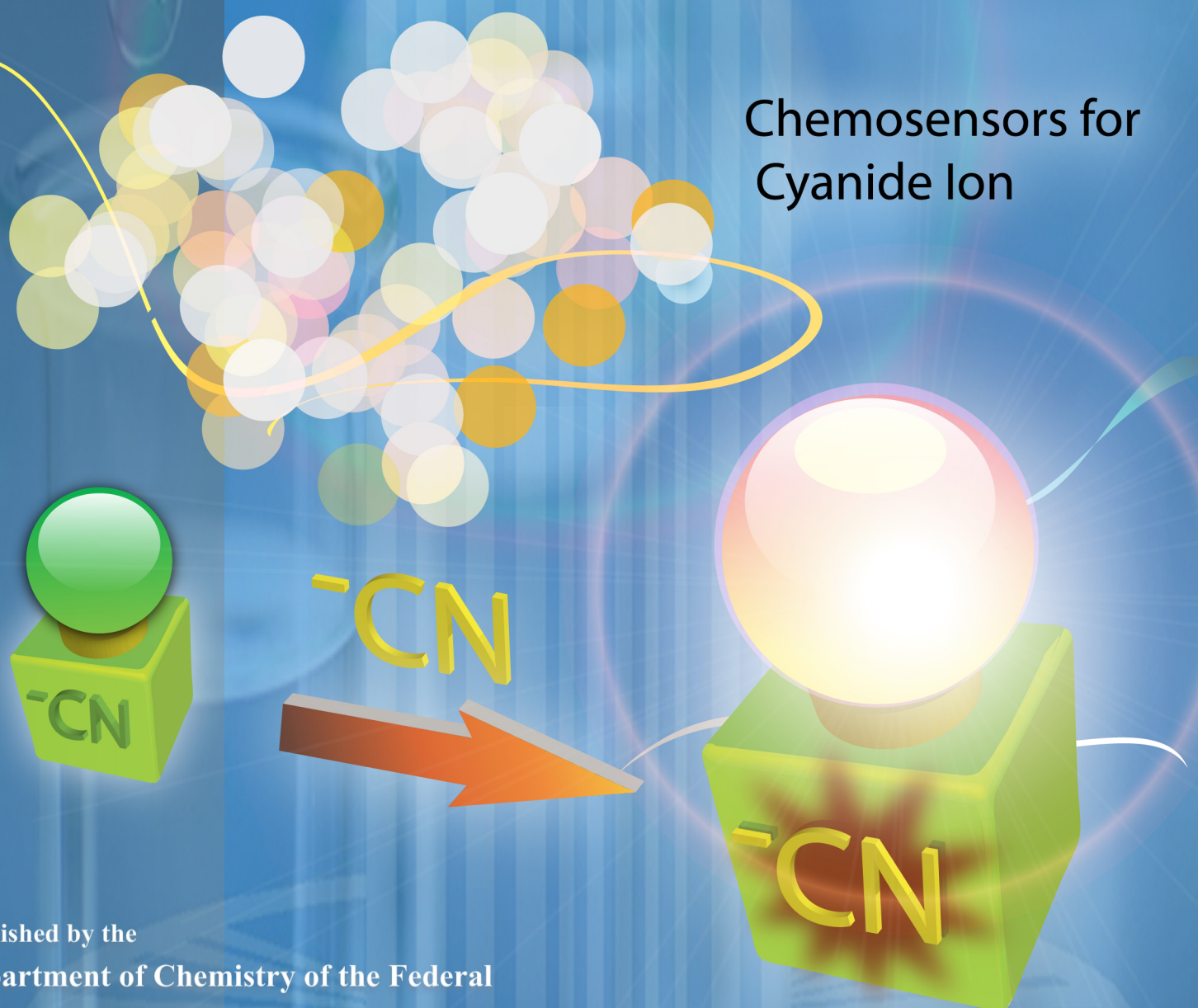


JANUARY-MARCH
2010
VOLUME 2
NUMBER 1

Orbital

The Electronic Journal of Chemistry

Chemosensors for
Cyanide Ion



Published by the
Department of Chemistry of the Federal
University of Mato Grosso do Sul.
Campo Grande, BRAZIL

Orbital - Volume 2 Number 1 - January-March 2010

EDITORIAL

Editorial

Adilson Beatriz, Marcos Serrou do Amaral

FULL PAPERS

Interactions between DNA purinic bases and amodiaquine: A theoretical approach	
<i>Valdemar Lacerda Júnior, José Maria Pires, Adilson Beatriz, Maria Lara Palmeira de Macedo Arguelho</i>	1-10
Metal complexes as antibacterial agents: Synthesis, characterization and antibacterial activity of some 3d metal complexes of sulphadimidine	
<i>Adedibu Clement Tella, Joshua Ayoola Obaleye</i>	11-26
Excitation and ionization energies of substituted anilines calculated with density functional theory	
<i>Yuji Takahata, Alberto dos S. Marques, Luiza G. Pereira</i>	27-40
Assessment of genetically modified soybean crops and different cultivars by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis	
<i>Glaucia Braz Alcantara, Andersson Barison, Maiara da Silva Santos, Luis P. S. Santos, José F. F. de Toledo, Antonio Gilberto Ferreira</i>	41-52

REVIEWS

<u>Analytical assays based on chromogenic and fluorogenic chemosensors for the detection of cyanide</u>	
<i>Vanderléia Gava Marini, Lizandra Maria Zimmermann, Vanderlei Gageiro Machado</i>	53-91

PAPERS ON EDUCATION

Developing the enzyme-machine analogy: a non-mathematical approach to teaching Michaelis-Menten kinetics	
<i>Simon Brown</i>	92-100

Editorial

It is with great satisfaction that we are launching the second volume of Orbital – The Electronic Journal of Chemistry. Making a project of this scope a reality represents a herculean—if not quixotic—effort, but a generous dose of both determination and dauntlessness helped us set in motion the editorial process that has brought the latest edition of this online journal to fruition. This endeavor has been made less arduous and more feasible by the tireless collaboration of our invaluable *ad hoc* peer reviewers and Editorial Board members. We also wish to express our thanks to the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul for the pivotal institutional support provided and to the many authors who have demonstrated their faith in us by submitting scientific papers for review.

Orbital was devised by faculty members of the UFMS as an alternative channel for the dissemination of chemistry studies. Its Editorial Board brings together scientists from regions throughout Brazil, who have taken up our invitation enthusiastically. With the exception of Oceania, every continent (the Americas, Europe, Asia, and Africa) is represented by at least one member on our permanent Editorial Board. Our mission is to make Orbital renowned worldwide for the relevance and high standard of its content, a goal currently being achieved through the submission of high-quality manuscripts from a host of countries, including India, Egypt, and Morocco, with increasing participation of Brazilian contributors.

Throughout 2009, we strove to publish our scheduled issues on a more regular basis—a key priority of the editors for future editions.

It is our wish that the current issue can furnish our readers with high-quality information, so as to ensure enjoyable reading and provoke fruitful reflection.

Temos a grata satisfação de lançar o segundo volume da revista Orbital – The Electronic Journal of Chemistry. Um projeto como este é sempre um trabalho hercúleo e quixotesco, mas com muita vontade e coragem iniciamos o processo de edição de uma revista virtual. A tarefa é menos árdua e mais exequível graças ao incansável trabalho de nossos prestimosos pareceristas *ad hoc* e de nossos conselheiros. Não poderíamos deixar de agradecer ao indispensável suporte institucional da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e a confiança que os autores têm depositado em nós, por meio da submissão de seus artigos científicos.

Orbital foi idealizada por professores da UFMS com vistas a oferecer um canal alternativo de disseminação dos trabalhos de química. O corpo editorial da revista constitui-se de cientistas de todas as regiões do Brasil, os quais aceitaram prontamente, com entusiasmo, o convite de

integrá-lo. Com exceção da Oceania, a revista conta com pelo menos um membro de cada continente (Américas, Europa, Ásia e África) em seu Corpo Editorial permanente. Tornar Orbital mundialmente conhecida por publicar artigos científicos de qualidade e relevância é nossa ambição. Esse objetivo está se cumprindo com a submissão de manuscritos de qualidade de vários países, como Índia, Egito e Marrocos, ao mesmo tempo em que, gradualmente, as contribuições de autores brasileiros vêm se tornando mais frequentes.

Durante o ano de 2009, trabalhamos arduamente para manter a periodicidade da revista. Sua pontualidade, daqui para frente, será uma prioridade premente para os editores.

Desejamos a você, caro leitor, uma excelente leitura e frutíferas reflexões!

Adilson Beatriz (UFMS)
Marcos Serrou do Amaral
The Editors

Interactions between DNA purinic bases and amodiaquine: A theoretical approach

Valdemar Lacerda Júnior^{a*}, José Maria Pires^b, Adilson Beatriz^c and
Maria Lara P. M. Arguelho^d

^aDepartamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo. CEP: 29075-910 - Vitória-ES, Brazil

^bDepartamento de Física, Universidade Federal do Espírito Santo. CEP: 29075-910 - Vitória-ES, Brazil

^cDepartamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. CEP: 79074-460 - Campo Grande-MS, Brazil

^dDepartamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 São Cristovão - SE, Brazil

Received: 14 January 2010; revised: 23 February 2010; accepted: 21 March 2010.
Available online: 19 April 2009.

ABSTRACT: We study theoretically the amodiaquine-adenine and amodiaquine-guanine adducts formation using Density Functional Theory (B3LYP) and the 6-31G(d) basis set for the geometry optimizations and 6-31+G(d,p) for the analysis of the global indexes: electrophilicity (ω), electronic chemical potential (μ), hardness (η) and softness (S), based in the Frontier Molecular Orbital Theory - FMO. Local softness for nucleophilic reaction (s_k^+) sites over guanine was evaluated using Fukui function (f_k^-). We also evaluated the guanine Electrostatic Potential (EP) values using the (MSK) charge scheme. The theoretical calculations had demonstrated that the amodiaquine has greater electronic affinity for the guanine, with irreversible formation of the amodiaquine-guanine adduct, as reported before on a previous experimental work.

Keywords: amodiaquine, adduct formation, Fukui index, softness, density functional theory, DFT

Introduction

Electrochemical studies of small molecule/DNA complexes have focused primarily on solution-phase phenomena, in which DNA-induced changes in redox potentials and/or diffusion constants of organic and inorganic species [1, 2]. However, DNA biosensors offer considerable promised for obtaining information necessary for development various

* Corresponding author. E-mail: vljuniorqui@gmail.com

fields such as biomedical and environmental research. Recent activity in this direction has also centered upon the design of biosensors that exploit the interaction between the surface-confined DNA and target drugs [3-7].

Some studies suggested that interactions of 4-aminoquinolines with DNA might underlie the antimalarial activity of these compounds. In general, 4-aminoquinolines derivatives appear to bind to nucleoproteins and inhibit DNA and RNA polymerase [8, 9].

Amodiaquine (AMD), an 4-aminoquinoline derivative is a potent chemotherapeutic used in the malaria treatment caused by both resistant and sensitive strains of *Plasmodium falciparum*, used either alone or in combination with sulphadoxine-pyrimethamine, might be a safe and efficacious drug option for malaria treatment in pregnancy and for intermittent preventive treatment [10, 11]. Having in mind the evaluation of the reactivity among the AMD and the purinic bases adenine (ADE) and guanine (GUA) (Figure 1), as well as the possible adducts formation (Scheme 1), we made a theoretical study as follows below.

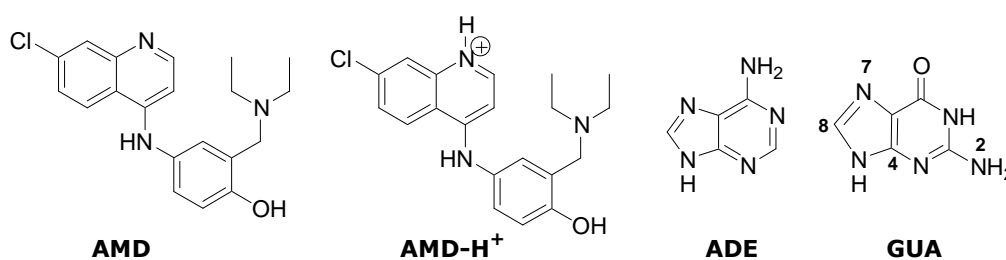


Figure 1. Structures used in the theoretical calculations.

Since the classical definition of Mulliken with regards to the electronegativity (χ) in 1934 [12], and the appearance of the hardness (η) and softness (S) [13, 14], in the 60's, to explain the acid-base reactions, see HSAB principle [13, 15], several works were set out [16] and new theories developed. Among them we point out the application of the density functional theory to best describe the molecular electronic structure and chemical reactions [17, 18]. To foresee the chemical reactivity of a molecule and more than that, the precise attack sites is, without doubt, a very hard and primordial task to the Chemistry [19-21]. In this sense, the indexes of Fukui, proposed in 1952 [22], give good results in many cases. Works were developed from the Molecular Orbital Theory, including applications in QSAR [23-26].

In this article we analyze local and global properties, aiming to distinguish the difference between the formation of the N7- and N2-adducts, which come from the reaction between the amodiaquine (AMD) and guanine (GUA) (Scheme 1).

We will also use the Electrostatic Potential (EP) values to help our decision with regards to the most probable adduct to be formed. Once and for all we will compare ours

results with the experimental data.

Model Equations

The stabilization in energy when the system acquires an additional electronic charge, ΔN , from the environment has been defined [27, 28], as the global electrophilicity index, ω :

$$\omega = \mu^2/2\eta \quad (1)$$

in terms of the electronic chemical potential μ , and the chemical hardness η , μ and η may be approached in terms of the one electron energies of the frontier molecular orbital HOMO (ε_H) and LUMO (ε_L), as $\mu \approx \varepsilon_H + \varepsilon_L / 2$ and $\eta \approx \varepsilon_L - \varepsilon_H$, respectively [18, 29]. The electrophilicity index encompasses both the propensity of the electrophile to acquire an additional electronic charge driven by μ^2 (the square of the electronegativity) and the resistance of the system to exchange electronic charge with the environment described by η , simultaneously. A good electrophile is in this sense characterized by a high value of μ and a low value of η . Associated with the definition of global electrophilicity, there is an additional and useful relationship that accounts for the maximum electronic charge, ΔN_{\max} , that the electrophile may accept from the environment. Note that in the present approach, the environment may be represented by either external effects coming for instance from the interaction with the solvent or more simply as field effects coming from the presence of substituent groups in the molecule. It has been defined as [27]:

$$\Delta N_{\max} = -\mu/\eta \quad (2)$$

Also, the following partition for ΔN_{\max} is possible in terms of the electrophilic Fukui functions:

$$\Delta N_{\max}(k) = \Delta N_{\max} f_k^+ \quad (3)$$

Note that within the present model, the maximum electrophilicity power within a molecule will be located at the softest site of the system. If we further use the exact relationship between local softness and electrophilic Fukui function, namely $s_k^+ = S^* f_k^+$ [18, 29], the local softness for nucleophilic reaction (s_k^+), can be generalize as:

$$s_k^\alpha = S^* f_k^\alpha \quad (4)$$

where $\alpha = +, -, 0$ refer to nucleophilic, electrophilic, and radical reactions respectively [18, 30]. A local version of the HSAB principle has been proposed in terms of these quantities [31, 32].

The Fukui function is by far the most important local reactivity index. It is defined as [33]:

$$f(\mathbf{r}) = \partial\rho(\mathbf{r})/\partial N_{v(\mathbf{r})} = (\delta\mu/\delta v(\mathbf{r}))_N \quad (5)$$

Because of the discontinuities in slope of the $\rho(\mathbf{r})$ versus N curve. Three types of Fukui functions can be written as follows:

for nucleophilic attack:

$$f^+(\mathbf{r}) = (\partial\rho(\mathbf{r})/\partial N)_{v(\mathbf{r})}^+ \approx \rho_{N+1}(\mathbf{r}) - \rho_N(\mathbf{r}) \approx \rho_{\text{LUMO}}(\mathbf{r}) \quad (6)$$

for electrophilic attack:

$$f^-(\mathbf{r}) = (\partial\rho(\mathbf{r})/\partial N)_{v(\mathbf{r})}^- \approx \rho_N(\mathbf{r}) - \rho_{N-1}(\mathbf{r}) \approx \rho_{\text{HOMO}}(\mathbf{r}) \quad (7)$$

for radical attack:

$$f^0(\mathbf{r}) = 1/2 [f^+(\mathbf{r}) + f^-(\mathbf{r})] \quad (8)$$

which lead us back to what exists in the essence of the Fukui frontier orbital theory.

Use these local $f(\mathbf{r})$ functions sometimes become difficult, so to deal with this problem, the related condensed-to-atom variants are written for the atomic site k of the molecule. The corresponding Fukui functions can be written [30] by replacing the associated electron densities by the respective electron populations q_k , as:

for nucleophilic attack:

$$f_k^+ = q_k(N+1) - q_k(N) \quad (9)$$

for electrophilic attack:

$$f_k^- = q_k(N) - q_k(N-1) \quad (10)$$

for radical attack:

$$f_k^0 = 1/2 [(f_k^+) + (f_k^-)] \quad (11)$$

Global softness is defined us [18]:

$$S = 1/\eta \quad (12)$$

We will use eqs. 4, 9 and 12 to calculate the nucleophilic attack sites at guanine atoms (S_k^+).

Material and Methods

Computational Methods

All calculations were performed with Gaussian 03 package of programs [34]. A pre-optimization was performed with semi-empirical PM3 method. Full geometry optimization for amodiaquine AMD, protonated-amodiaquine AMD-H⁺, adenine ADE and

guanine GUA were performed applying both Hartree-Fock method (3-21G basis set) and B3LYP hybrid functional [35, 36] with the standard 6-31G(d) basis set. All stationary points were characterized as minima or transition structures by calculating the harmonic vibrational frequencies and ZPE corrections were applied in energy calculations using the same theoretical level used in optimization. The global indexes (μ , η and ω) were calculated at B3LYP/6-31+G(d,p)// B3LYP/6-31G(d) level and the EP values at B3LYP/6-31+G(d,p) level with full geometry optimization. The charges were derived from the EP using the MKS (Merz-Singh-Kollman) scheme [37, 38].

Results and Discussion

To decide if the AMD reacts with GUA or ADE we analyze the global indexes (μ , η and ω), obtained from the energy of the FMO (HOMO-LUMO), as described before.

Through the analysis of the global indexes results pointed out in the Table 1, we show recently [39] that the protonated-amodiaquine, AMD-H⁺, is the best electrophile ($\omega = 8.75$). On the other hand, guanine, GUA, is the worse electrophile and best nucleophile ($\omega = 1.10$).

Table 1. Global indexes* (μ , η and ω) [39].

Compounds	HOMO	LUMO	μ	η	ω
AMD-H ⁺	-0.3208	-0.2109	-0.2659	0.1099	8.75
AMD	-0.2083	-0.0627	-0.1355	0.1456	1.72
ADE	-0.2310	-0.0337	-0.1324	0.1973	1.21
GUA	-0.2241	-0.0279	-0.1260	0.1962	1.10

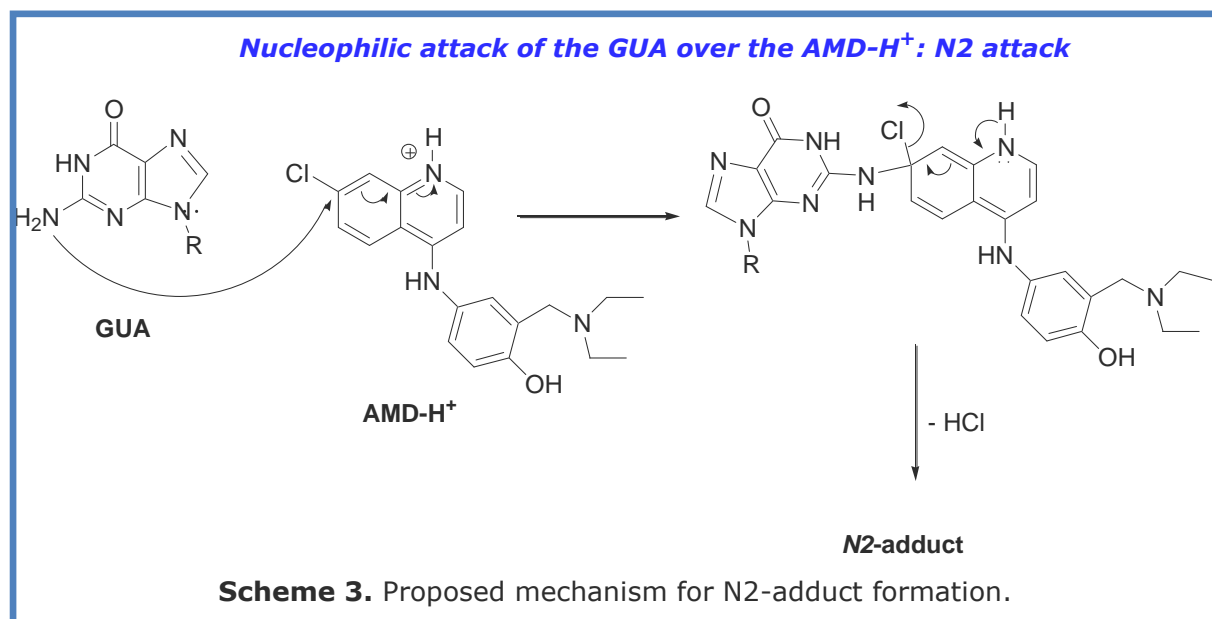
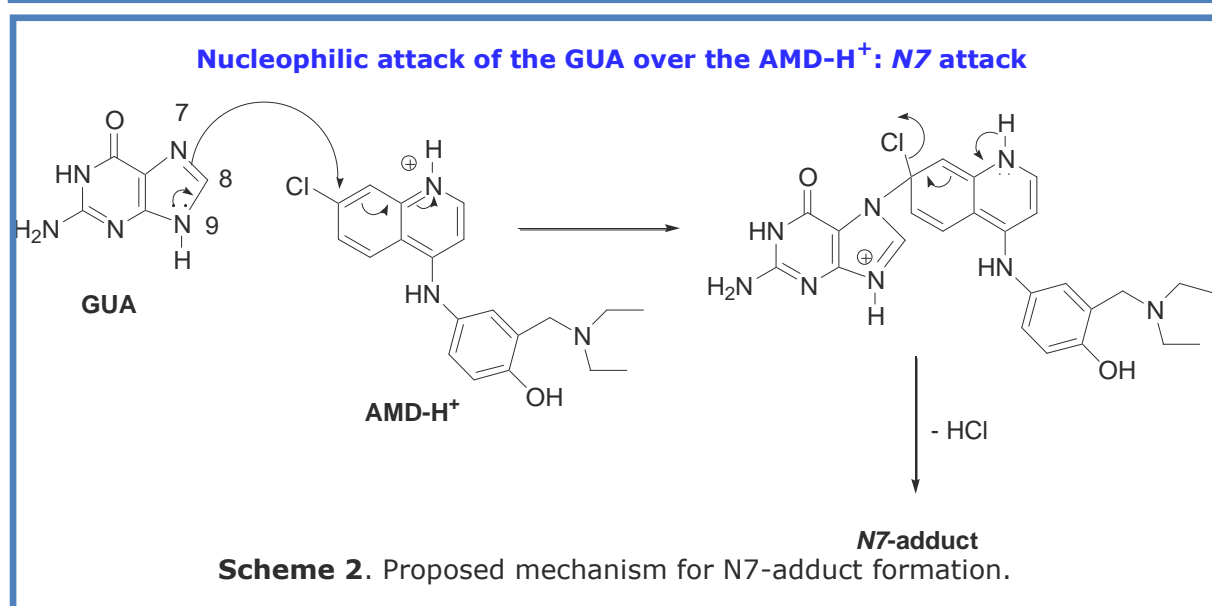
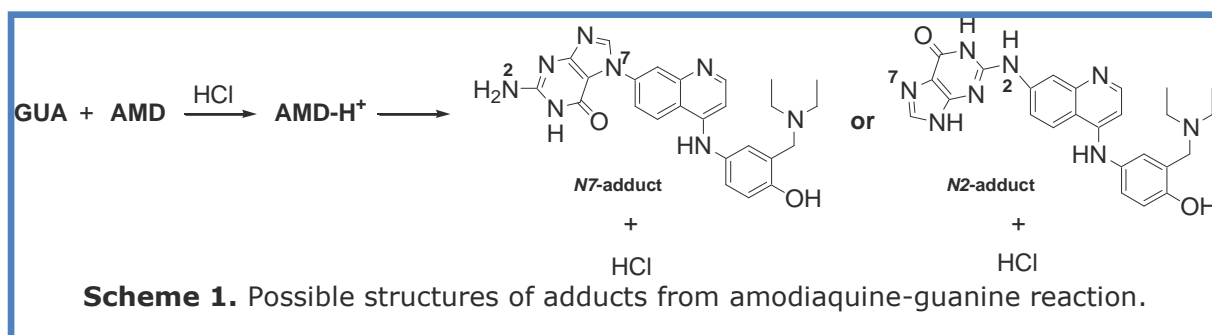
*HOMO, LUMO, electronic chemical potential, μ , and chemical hardness, η , values are in au, electrophilicity power values, ω , are in eV. We used eq. 1, and references [19, 28] as explained in the text, to calculate ω , μ and η , respectively.

With this information we were able to propose two different possible structures for the adduct formed between AMD and GUA, which differ only for the N7 or N2 GUA attack sites (Scheme 1). Schemes 2 and 3 shows the proposed mechanisms for N7- and N2-adducts formation, respectively. Obtained data in our laboratory suggests the formation of the guanine adduct.

To obtain some information about the favored position for the nucleophilic attack of the GUA over the AMD-H⁺, our first approach was to evaluate the local Fukui indexes which were calculated according to eq. 9. It is worthwhile reminding that the results of enthalpy (ΔH) reported by Munk, B. H et al., with calculations at B3LYP/6-31G(d) level [40] indicated that C8 oxidation is thermodynamically preferred to the C4.

They obtained the following values of ΔH : C8 -33.06 Kcal/mol, C4 -18.23 Kcal/mol – for hydroxyl radical and ΔH : C8 -18.98 Kcal/mol, C4 -2.86 Kcal/mol for methoxy.

radical (See reference 38). Our calculations shown in Table 2 are in accordance with these values, once a higher C8 oxidation value, implies in a greater softness.



The EP values analyzes (Table 2) indicates N7 us the best nucleophilic attack site when compared with N2.

We believe that adduct reaction formation of aromatic amines and phenols with guanine, occurs preferentially with the nitrogen N2 or N7 of the guanine structure. Our hypotheses are supported by biological studies revealing the formation of these types of aniline's adducts [41, 42] and quinoline derivatives [43, 44].

Others studies indicated that electrophilic quinines react with DNA by 1,4-Michael addition and nitrogen N7 of the guanine is the principal nucleophilic region involved in the adduct formation. In all the cases there are structural likenesses with amodiaquine region [45, 46].

Table 2. Calculated local indexes q , f_k^- , f_k^+ , s_k^- , s_k^+ , $|s_k^+|$ and EP for amodiaquine.

Atoms	$q(0)^a$	$f_k^- = q(-) - q(0)$	$f_k^+ = q(0) - q(+)$	$s_k^+ = S * f_k^+{}^{b,c}$	$s_k^- = S * f_k^-$	$ s_k^+ = S * f_k^+{}^d$	EP ^{b,c}
N2	-0.857598	-0.062799	-0.056385	-0.320076	-0.287385	0.320076	-18.289193
N7	-0.589348	-0.030391	-0.070529	-0.154898	-0.359475	0.154898	-18.356188
C8	0.297498	-0.099224	-0.172429	-0.505729	-0.878843	0.505729	-14.665376
C4	0.478210	-0.030722	-0.144345	-0.156585	-0.735703	0.156585	-14.652578

^aThe charges were calculated using the MSK scheme.

^bGlobal softness (S) was calculated using equation 12 and is equal to 5.096840.

^c s_k^+ and f_k^+ were calculated using equations 4 and 9, respectively.

^d $|s_k^+|$ module of the s_k^+ .

On the other hand the softness for nucleophilic attack (s_k^+), its module, is much higher over N2. In fact to decide which reactive site (N7 or N2) will be attached by AMD is not trivial, and both contribution: electron-transfer and electrostatically controlled reactions probable are competing [21].

We hope this study became a good indication for laboratory work synthesis, in order to propose new antimalarial drugs.

Conclusion

The redox behavior of amodiaquine within the DNA environment is important in the studies of the toxicity effects in malarial therapy. The intercalations of the amodiaquine in the DNA structure with the subsequent adduct formation between the amodiaquine and guanine can contribute to bigger vulnerability of the DNA to oxidative processes.

Theoretical calculations had demonstrated that the amodiaquine has greater electronic affinity for the guanine. The preferential way for the formation of the adduct between the antimalaric and the purinic base GUA (N2-adduct or N7-adduct) was determined according to the local softness. This analysis predicted the preference for the N2-adduct formation.

The local softness for C8 and C4 atoms of GUA, indicated correctly the most

favorable oxidation site, the C8 atom, in agreement with experimental data, indicating that the basis we used are precise enough for these calculations.

Acknowledgements

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES/FUNCITEC), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) for financial support.

References and Notes

- [1] Carter, T. M.; Rodriguez, M.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8901.
- [2] Molinier-Jumel, C.; Malfoy, B.; Raymond, J.; Reynaud, J. A.; Aubel-Sadron, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *84*, 441.
- [3] Oliveira-Brett, A. M.; Chiorcea Paquim, V. C.; Piedade, J. A. P. *Medical Eng. Physics* **2006**, *28*, 963.
- [4] Radi, A.; El Ries, M. A.; Kandil, S. *Anal. Chim. Acta.* **2003**, *495*, 61.
- [5] El-Hady, D. A.; Abdel-Hamid, M. I.; Seliem, M. M.; El-Maali, N. A. *Talanta.* **2005**, *66*, 1207.
- [6] Wang, L.; Lin, L.; B. J. Ye. *Pharmac. Biomed. Anal.* **2006**, *42*, 625.
- [7] Ibrahim, M. S.; Shehatta, I. S.; Al-Nayeli, A. A. *J. Pharmac. Biomed. Anal.* **2002**, *28*, 217.
- [8] Tagbor, H.; Bruce, J.; Browne, E.; Randal, A.; Greenwood, B.; Chandramohan, D. *The Lancet.* **2006**, *368*, 1349.
- [9] Obonyo, C. O.; Juma, E. A.; Ogutu, B. R.; Vulule, J. M.; Lau, J. J. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *101*, 117.
- [10] Koram, K. A.; Abuaku, B.; Duah, N.; Quashie, N. *Acta Tropica.* **2005**, *95*, 194.
- [11] Kofoed, P. E.; Ursing, J.; Poulsen, A.; Rodrigues, A.; Bergquist, Y.; Aaby, P.; Rombo, L. J. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *101*, 231.
- [12] Mulliken, R. S. *J. Chem. Phys.* **1934**, *2*, 782.
- [13] Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533.
- [14] Pearson, R. G. *Science* **1966**, *151*, 172.
- [15] Yang, W.; Parr, R. G. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 6723.
- [16] Chattaraj, P. K.; Roy, D. R. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, PR46-PR74. See also references therein.
- [17] Hohenberg, P.; Kohn, W. *Phys. Rev. B* **1964**, *136*, 864.
- [18] Duarte, H. A.; Rocha, W. R. Teoria do Funcional da Densidade. In N.H. Morgan, K. Coutinho, (eds) Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular, pp 73-111. Editora Livraria da Física, São Paulo (2007). See also references therein.
- [19] Hout Jr, R. F.; Levi, B. A.; Hehre, W. J. *J. Com. Chem.* **1982**, *3*, 234.
- [20] Bader, R. F. W.; MacDougall, P. J.; Lau, C.D.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1594.

- [21] Anderson, J. S. M.; Melin, J.; Ayers, P. W. *J. Chem. Theory Comp.* **2007**, *3*, 375.
- [22] Fukui, K.; Yonezawa, T.; Shingu, H. **1952**, *20*, 722.
- [23] Giambiagi, M.; de Giambiagi, M. S.; Pires, J. M.; Pitanga, P. *J. Mol. Structure (THEOCHEM)* **1988**, *180*, 223. See also references therein.
- [24] Pires, J. M.; de Giambiagi, M. S.; Giambiagi, M. *J. Mol. Structure (THEOCHEM)* **1991**, *228*, 305. See also references therein.
- [25] Mundim, K. C.; Pires, J. M. *J. Mol. Structure (THEOCHEM)* **1993**, *282*, 13. See also references therein.
- [26] Pires, J. M.; Floriano, W. B.; Gaudio, A. C. *J. Mol. Structure (THEOCHEM)* **1997**, *389*, 159. See also references therein.
- [27] Parr, R. G.; von Szentpaly, L.; Liu, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7512 .
- [28] Domingo, L. R.; Aurell, M. J.; Pérez, P.; Contrelas, R. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3884
- [29] Parr, R. G.; Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7512.
- [30] Yang, W.; Mortier, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5708.
- [31] Mendez, F.; Gázquez, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9298. See also: Meza, R.; Gordillo, B.; Galván, M. *Int. J. Quantum. Chem.* **2005**, *104*, 29.
- [32] Gázquez, J. L.; Mendez, F. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 4591.
- [33] Yang, W.; Parr, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4049.
- [34] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A., Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Wallingford CT, **2004**.
- [35] Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
- [36] Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B.* **1988**, *37*, 785.
- [37] Besler, B. H.; Merz, K. M. Jr.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 431.
- [38] Singh, U. C.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* **1984**, *5*, 129.
- [39] Arguelho, M. L. P. M.; Alves, J. P. H.; Stradiotto, N. R.; Lacerda Jr., V.; Pires, J. M.; Beatriz, A. *Quím. Nova* **2010**, *33*, in press.
- [40] Munk, B.H.; Schlegel, H.B. Private Communication from Department of Chemistry Wayne State University, <http://www.chem.wayne.edu/~hbs/chm6440/Guanine.pdf>. Cited 21 Sept 2005 (2005)

- [40] Munk, B.H.; Schlegel, H.B. Private Communication from Department of Chemistry Wayne State University, <http://www.chem.wayne.edu/~hbs/chm6440/Guanine.pdf>. Cited 2 May 2005 (2005).
- [41] Shapiro, R.; Ellis, S.; Hingerty, B.E.; Broyde, S. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 335.
- [42] Fan, J. Y.; Ohms, S. J.; Boyd, M.; Denny, W.A. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *12*, 1166.
- [43] Galiegue-Zouitina, S.; Baileul, B.; Loucheux-Lefebvre, M-H. *Cancer. Res.* **1985**, *45*, 520.
- [44] Soglia, J. R.; Turesky, R. J.; Paehler, A.; Vouros, P. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2819.
- [45] Li, K-M.; Todorovic, R.; Devanesan, P.; Higginbotham, S.; Kofeler, H.; Ramanathan, R.; Gross, M. L.; Rogan, E.G.; Cavalieri, E. L. *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 289.
- [46] Cavalieri, E.L.; Rogan, E.G.; Chakravarti, D. *Cell Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 665.

Metal complexes as antibacterial agents: Synthesis, characterization and antibacterial activity of some 3d metal complexes of sulphadimidine

Adedibu C. Tella* and Joshua A. Obaleye

Department of Chemistry, P. M. B. 1515, University of Ilorin, Kwara State, Nigeria.

Received: 23 November 2009; revised: 07 February 2010; accepted: 18 February 2010.
Available online: 02 May 2010.

ABSTRACT: Metal complexes of Sulphadimidine(SAD) were synthesized. The complexes were formulated as $[\text{Co}(\text{SAD})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Cu}(\text{SAD})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, $[\text{Ni}(\text{SAD})_2\text{Cl}_2\text{H}_2\text{O}]$, $[\text{Cd}(\text{SAD})_2\text{Br}_2]$, $[\text{Fe}(\text{SAD})_3](\text{H}_2\text{O})_3$ and $[\text{Mn}(\text{SAD})_2\text{Cl}_2]$ characterized by elemental Analysis, conductivity, IR, UV-Vis, Magnet moment and $^1\text{H-NMR}$ and Mass spectroscopies. Co(II), Mn(II), and Ni(II) sulphadimidine complexes consist of metal ion which coordinates through amino nitrogen of the terminal NH_2 group and oxygen of sulfonamidic group of the two molecules of sulphadimidine ligand and two halide ions to form octahedral structure while Cd(II) coordinates with sulphadimidine through amino nitrogen of the terminal NH_2 group with two bromine ions to complete tetrahedral structure. In Cu(II) sulphadimidine complex, copper ion coordinates through both pyrimidinic nitrogen (heterocyclic nitrogen) and sulfonamidic nitrogen of the two molecules of sulphadimidine. Fe(III) coordinates to three molecules of sulphadimidine through heterocyclic nitrogen (pyrimidinic nitrogen) and sulfonamidic nitrogen, with three molecules of water outside the coordination sphere. Both Fe(III) and Cu(II) complexes exhibit octahedral geometry. The antibacterial activity of the complexes and the ligands was investigated against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. The data obtained revealed that the complexes showed greater activity against the three micro-organisms when compared to parent compound. Stability constant of the complexes were evaluated for the metal salts, the order of stability constant β was found to be $\text{Cu(II)} > \text{Fe(III)} > \text{Ni(II)} > \text{Co(II)} > \text{Cd(II)}$. The values of stability constant (β) was found to be $\log 6.31$, 5.93 , 5.29 , 4.63 and 3.92 , respectively. The stability constant data revealed that this ligand may be used as antidote or chelating agent for medical treatment of metals overload or poisoning.

Keywords: sulphadimidine; spectroscopy; antimicrobial activity

* Corresponding author. E-mail: ac_tella@yahoo.co.uk

Introduction

Sulpha drugs show important biological activity e.g mechanism of action is based on the competitive antagonism of PABA (*p*-aminobenzoic acid) and the sulfanilamide [1]. They are a group of compounds used for eliminating a wide range of infections in human and other animal systems. Many chemotherapeutically important sulpha drugs like sulphadiazine, sulphathiazole, sulphamerazine and so forth, possess SO_2NH moiety, which is an important toxophoric function [2]. The heterocyclic compounds with both sulphur and nitrogen atoms in the ring system have also been used in the synthesis of biologically active complexes. It is however noteworthy that the biological activity gets enhanced on undergoing complexation with metals. The complex formation between metals ions and sulpha drugs has attracted much attention recently due to their biological importance. Bult and Klasen [3] reported the structures of silver sulfonamides. The coordination of silver to sulfadiazine was through the nitrogen of SO_2NH group, if the substituent is phenyl, acetyl or 2-pyrimidyl group. In case, where the substituent is 2-thiazolyl or 2-pyridinyl group the coordination was through nitrogen of the substituent. Casanova et al. [4] synthesized single-crystal complex of $[\text{Zn}(\text{sulfathiazole})_2]\text{H}_2\text{O}$. The sulfathiazole was found to act as a bidentate ligand, chelates to two Zn ions as a bridge through the N thiazole and N amino atoms. Rudzinski et al[5] prepared several Sulfonamide schiff base complexes of selenium(IV) and tellurium(IV). Selenium coordinated through azomethine nitrogen, hydroxyl oxygen of the sulphonamide schiff base with chloride ion of the selenium salt to complete octahedral structure, while tellurium coordination site is only azomethine nitrogen, with chloride ion of the tellurium salt to complete the octahedral structure. These two complexes proved to be biologically active as evidenced by pharmacological tests. Garcia-Raso et al. [6] synthesized single crystal of zinc-sulfamethoxazole complex $[\text{Zn}(\text{sulfamethoxazolato})_2(\text{pyridine})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. The geometry around Zn(II) ion can be described as a slightly distorted compressed octahedron. Two pyridine and two isoxazole N atoms are located in the equatorial plane and two oxygen atoms of two water molecules are placed in the apical positions. In continuation of our studies [7-12] on synthesis of metal complexes of biologically important ligands, we reported the synthesis, characterization and biological studies of some 3d metal complexes of sulphadimidine.

Material and Methods

Materials and Instrumentation

All reagents and chemicals were used as obtained from Aldrich. Elemental Analysis was performed at Medac Ltd, Brunel science centre, Egham, United Kingdom. IR spectra were obtained as KBr disc on a Pelkin Elmer FTIR spectrophotometer. Metal Analyses

were carried out on Alpha 4 Atomic Absorption spectrophotometer. $^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded with a Bruker AMX-200 Spectrometer in DMSO- d_6 ($\delta = 2.60$ ppm). Chemical shifts for proton resonances are reported in ppm (δ) relative to tetramethylsilane. Mass spectra were recorded on a micromass platform spectrometer and kratos concept IS instrument using DMSO as solvent. UV-Vis spectra were obtained on Aquamate v4.60 spectrophotometer. Magnet susceptibility measurements of the complexes were determined at room temperature by the Gouy method. Mercury tetrathiocyanatocobaltate (II) $\text{Hg}[\text{Co}(\text{NCS})_4]$ was used as calibrant.

Synthesis

Synthesis of $[\text{Co}(\text{SAD})_2\text{Cl}_2]$

Aqueous solution of $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.474 g, 2 mmol) in distilled water (10 mL) was added drop wise to alkaline solution of sulphadimidine (1.112 g, 4 mmol) initially at pH 9. The pH of the solution dropped to 7.3 and the resulting mixture was stirred magnetically for some hours until colour change was noted. The reaction mixture was left to stand overnight protected from light. The volume was then reduced by heating. The pinkish precipitate complex formed was centrifuged, washed with distilled water several times and dried under vacuum. Yield 80%, Mwt = 721.9, mp > 300 °C, Anal. Calcd. for $[\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{O}_4\text{S}_2\text{CoCl}_2]$: C, 39.80; H, 4.16; N, 5.15; Co, 8.16. Found: C, 39.89; H, 4.31; N, 15.38; Co, 8.13. IR (KBr, cm^{-1}): 3553, 3449, 3365, 3256, 3156, 1640, 1585, 1498, 1379, 1245, 1126, 981, 880, 676, 600, 549. UV-Vis (DMSO) λ , nm: 452, 535, 575. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 11.51 H (2a), 6.49 H (5a), 7.25 H (2b'), H (6b), 6.51 H (3b), H (5b) 2.18 CH_3 .

Synthesis of $[\text{Cu}(\text{SAD})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$

Aqueous solution of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.340 g, 2 mmol) in distilled water (10 mL) was added drop wise to alkaline solution of sulphadimidine (1.112 g, 4 mmol) initially at pH 9. The pH of the solution dropped to 6.3 and the resulting mixture was stirred magnetically for some hours until colour change was noted. The reaction mixture was left to stand overnight protected from light. The volume was then reduced by heating. The brownish solid complex formed was centrifuged, washed with distilled water several times and dried under vacuum. Yield: 91%. Mwt = 653.55. mp > 310 °C, Anal. Calcd. for $[\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_4\text{S}_2\text{Cu}]$: C, 44.07; H, 4.59; N, 17.14, Cu, 9.72. Found: C, 43.90, H, 4.50; N, 17.18; Cu, 9.80. IR (KBr, cm^{-1}): 3448, 3359, 3164, 1640, 1595, 1557, 1501, 1142, 1079, 982, 879, 674, 596, 558. UV-Vis (DMSO) λ , nm: 813. MS (positive Cl-methane): M/Z, (Relative intensity): 96 (100), 126 (24), 151 (3), 172 (3), 190 (10), 259 (9), 279 (3), 156 (2), 359 (4).

Synthesis of $[\text{Ni}(\text{SAD})_2\text{Cl}_2\text{H}_2\text{O}]$

Aqueous solution of $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.474 g, 2 mmol) in distilled water (10 mL) was added drop wise to alkaline solution of sulphadimidine (1.112 g, 4 mmol) initially at pH 9. The pH of the solution dropped to 8.1 and the resulting mixture was stirred magnetically for some hours until colour change was noted. The reaction mixture was left to stand overnight protected from light. The volume was then reduced by heating. The Greenish solid complex formed was centrifuged, washed with distilled water several times and dried under vacuum. Yield: 84%. Mwt = 701.69. MP > 300 °C. Anal. Calcd. for $[\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_4\text{S}_2\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$: C, 41.16; H, 4.00; N, 16.00; Ni, 8.39. Found: C, 41.34; H, 4.13; N, 16.13; Ni, 8.34. IR (KBr, cm^{-1}): 3500, 3270, 1594, 1497, 1378, 1265, 1143, 1006, 973, 880, 668, 598, 547. UV-Vis (DMSO) λ , nm: 425, 450, 550.

Synthesis of $[\text{Cd}(\text{SAD})_2\text{Br}_2]$

Aqueous solution of $\text{CdBr}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.688 g, 2 mmol) in distilled water (10 mL) was added drop wise to alkaline solution of sulphadimidine (1.112 g, 4 mmol) initially at pH 9. The pH of the solution dropped to 6.7 and the resulting mixture was stirred magnetically for some hours until colour change was noted. The reaction mixture was left to stand overnight protected from light. The volume was then reduced by heating. The white solid complex obtained was centrifuged, washed with distilled water several times and dried under vacuum. Yield: 76%. Mwt = 825.8. mp > 300 °C. Anal. Calcd. for $[\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_4\text{S}_2\text{CdBr}_2]$: C, 34.87; H, 3.15; N, 13.56; Cd, 13.56. Found: C, 34.97; H, 3.28; N, 13.40; Cd, 13.64. IR (KBr, cm^{-1}): 3540, 3506, 3462, 3290, 1637, 1598, 1583, 1246, 1143, 979, 883, 677, 598, 558. UV-Vis (DMSO) λ , nm: 256, 284.

Synthesis of $[\text{Fe}(\text{SAD})_3](\text{H}_2\text{O})_3$

Aqueous solution of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.540 g, 2 mmol) in distilled water (10 mL) was added drop wise to alkaline solution of sulphadimidine (1.112 g, 4 mmol) initially at pH 9. The pH of the solution dropped to 6.0 and the resulting mixture was stirred magnetically for some hours until colour change was noted. The reaction mixture was left to stand overnight protected from light. The volume was then reduced by heating. The Brownish solid complex obtained was centrifuged, washed with distilled water several times and dried under vacuum. Yield: 72%. Mwt = 940.85. MP > 310 °C. Anal. Calcd. For $[\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{N}_{12}\text{O}_9\text{S}_3\text{Fe}]$: C, 45.92; H, 4.78; N, 17.86; Fe, 5.94. Found: C, 46.10; H, 4.92; N, 17.73; Fe, 5.89. IR (KBr, cm^{-1}): 3441, 3342, 3060, 1639, 1596, 1435, 1246, 1190, 972, 681, 553, 457. UV-Vis (DMSO) λ , nm: 310, 350.

Synthesis of $[\text{Mn}(\text{SAD})_2\text{Cl}_2]$

Aqueous solution of $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.396 g, 2 mmol,) in distilled water (10 mL) was added drop wise to alkaline solution of sulphadimidine (1.112 g, 4mmol) initially at pH 9. The pH of the solution dropped to 7.4 and the resulting mixture was stirred magnetically

for some hours until colour change was noted. The reaction mixture was left to stand overnight protected from light. The volume was then reduced by heating. The brownish solid complex obtained was centrifuged, washed with distilled water several times and dried under vacuum. Yield: 68%. M.wt = 679.93. mp > 320 °C. Anal. Calcd. for $[C_{24}H_{26}N_8O_4S_2MnCl_2]$: C, 42.32; H, 3.82; N, 16.47; Mn, 8.08. Found: C, 42.04; H, 3.96; N, 16.38; Fe, 8.00. IR (KBr, cm^{-1}): 3542, 3459, 3368, 3158 1639, 1599, 1584, 1558, 1345, 1245, 1140, 979, 883, 677, 599, 550, 510. UV-Vis (DMSO) λ , nm: 316, 375, 410.

Evaluation of Stability Constants of The Complexes.

The stability constant of metal complexes of sulphadimidine were evaluated. The stability constant of Cu(II)SAD, Ni(II) SAD, Fe(III)SAD, Cd(II)SAD, Co(II)SAD by spectrophotometric method using procedure of Hilderbrand and Benesi [13] modified in a previous works [14,15].

A series of seven solutions were prepared with constant concentration of metal ion [Mo] and variable ligand [Lo] concentration at pH 7.4 with ionic strength (0.1M KNO_3). The reaction mixture was stirred continuously and allowed to stand for 15 minutes. The absorbance of each of the mixture was taken at λ_{max} previously determined using UV-Vis spectrophotometer Aquamate V4.60. The stability constant β was determined using Hilderbrand and Benesi equation $Mo/A = 1/\beta \epsilon c (1/Lo) + 1/\epsilon c$. Plot of Mo/A versus 1/Lo gave slope $1/\beta \epsilon c$ from which β (Stability constant) can be evaluated.

Detection of the Antibacterial Activity

The antibacterial activities of the ligands and metal complexes were done by the well diffusion method described by Colins [16], Obaleye and Famurewa [17]. The nutrient agar medium (Peptone beef extract NaCl and agar-agar) and 5mm diameter paper discs (whatman No. 1) were used. The compounds were dissolved in DMSO in 50 and 100 ppm concentration. The filter paper discs were soaked in different solution of the compounds, dried and then placed in the Petri dishes previously seeded with the test organisms (*E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumonia*) obtained from Kwara Chemical Ltd, Ilorin, Nigeria. The plates were incubated for one to three days at 37 °C and the inhibition zone around each disc was measured in mm using Zone Reader. The average zone of inhibition in millimeter was determined from the readings taken in triplicate (Table 6). DMSO was used as a control.

Results and Discussion

Physical properties

The interaction of sulphadimidine with metal salts resulted in the formation of complexes with the formula $M(SAD)_2Cl_2 \cdot nH_2O$, where SAD is sulphadimidine and M is the

metal ion.

The complexes are stable, non hygroscopic, insoluble in most organic solvent, but soluble in DMSO. The complexes were dissolved in DMSO and the molar conductivity values of 10^{-3} M solution at 25 °C of the complexes are in the range $3.0\text{--}5.0 \Omega^{-1}\text{mol}^{-1}\text{cm}^2$. It is obvious from these data that complexes are non-electrolytes. The physical properties and elemental analysis agreed well, with the formation of complexes. The results of elemental analyses for all the complexes were in good agreement with the theoretical requirement of their compositions. Infrared, electronic spectra, $^1\text{H-NMR}$ and mass spectrometry support the formation of the above compounds. $\text{Co}(\text{SAD})_2\text{Cl}_2$ and sulphadimidine were further characterized by $^1\text{H-NMR}$ while $[\text{Cu}(\text{SAD})_2 (\text{H}_2\text{O})_2]$ was characterized by mass spectrometry.

The test for halide ion with AgNO_3 solution was negative indicating that halide ion is inside the coordination sphere of the central metal [18]. Co (II), Mn (II), and Ni (II) sulphadimidine complexes consist of metal ion which coordinates through amino nitrogen of the terminal NH_2 group and oxygen of sulphoxide of the two molecules of sulphadimidine ligand [19] and two halide ions to form octahedral structure while Cd (II) coordinates with sulphadimidine through amino nitrogen of the terminal NH_2 group with two bromine ions to complete tetrahedral structure. Involvement of the terminal amino group in the coordination to the metal ion in the complexes was confirmed by the non-formation of any product when metal complexes were reacted with phenylisocyanate due to the non-availability of a primary amino group to react with phenylisocyanate [20]. These findings are not very surprising because terminal amino groups are among common metal-binding loci despite their high pK and amino nitrogen donors make much larger contributions to the enthalpy of complexation. Also there is strong ligand field effect of nitrogen. In Cu (II) sulphadimidine complex, copper ion coordinates through both pyrimidinic nitrogen (heterocyclic nitrogen) and sulfonamidic nitrogen of the two molecules of sulphadimidine. Fe (III) coordinates to three molecules of sulphadimidine through heterocyclic nitrogen (pyrimidinic nitrogen) and sulfonamidic nitrogen, with three molecules of water outside the coordination sphere. The proposed structures of the Cd (II), Ni (II), Co (II), Cu (II), Mn (II) and Fe (III) sulphadimidine complexes are shown in figures 1-4.

FT-IR spectra

The IR data of the spectra of sulphadimidine ligand and its complexes are presented in Table 1. The IR spectra of the complexes were compared with those of the free ligand in order to determine the coordination sites that may be involved in chelation. The bands due to νNH_2 that appeared at 3441 and 3343 cm^{-1} were shifted to higher frequencies or lower frequencies (3553 and 3448 cm^{-1} for Co (II) SAD, 3543 and 3368

cm^{-1} for Mn (II) SAD, 3540 and 3505 cm^{-1} for Cd (II) SAD and 3500, 3270 cm^{-1} for Ni (II) SAD) with respect to the ligand. The calculated values $\nu^* \text{NH}_2 = \nu \text{ s} + \nu \text{ as}/2$ for all these complexes were found to be greater than 70.

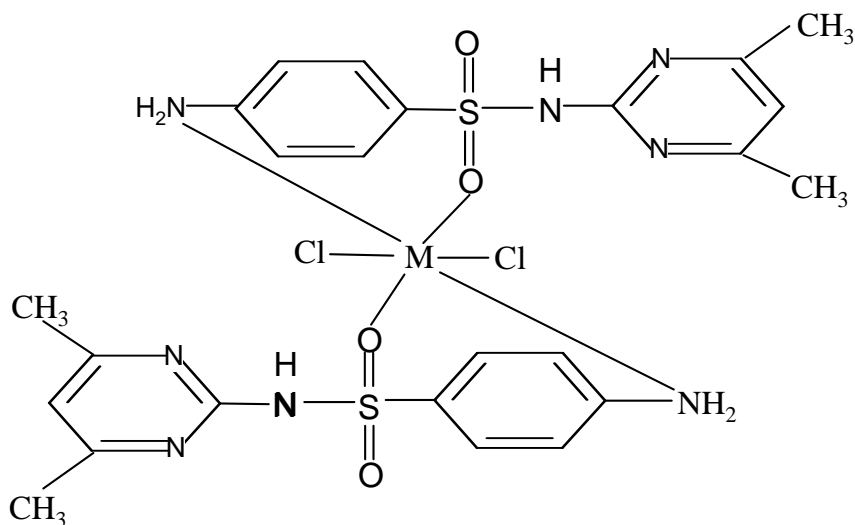


Figure 1. Proposed structures of metal (II) sulphadimidine complex (M = Co (II), Mn (II), Ni (II)).

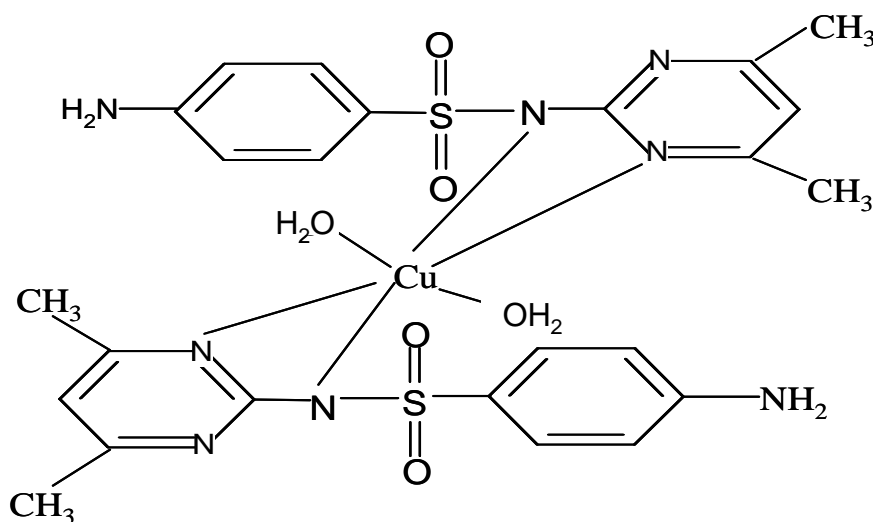


Figure 2. Proposed structure of copper (II) sulphadimidine complex.

These results indicate that NH_2 group is involved in coordination. This is in agreement with previous studies by Bult and Klasen [3]. The effect of coordination of metal ions on sulfonamide nitrogen atom on SO_2 symmetrical and asymmetrical stretching modes resulted in shifting of this band to lower wave number by about (26-81 cm^{-1}) while the $\nu\text{S-N}$ shifted by about 8 cm^{-1} to lower wave numbers in all these complexes. These observations confirm coordination of metal ion (Co (II), Ni (II), Cd (II) and Mn (II) through amino nitrogen in NH_2 and oxygen atom of sulfoxide ($\text{S}=\text{O}$). The IR

spectra of the ligand displays two sharp bands around 3442 and 3325 cm^{-1} , assignable to asymmetric and symmetric NH_2 group modes, respectively which remain at almost the same positions in the Fe (III) and Cu (II) SAD complexes suggesting that the amino group is not involved in chelation. The peak observed at 1595 cm^{-1} is ascribed to $\nu\text{C}=\text{N}$ stretch in the free ligand of sulphadimidine.

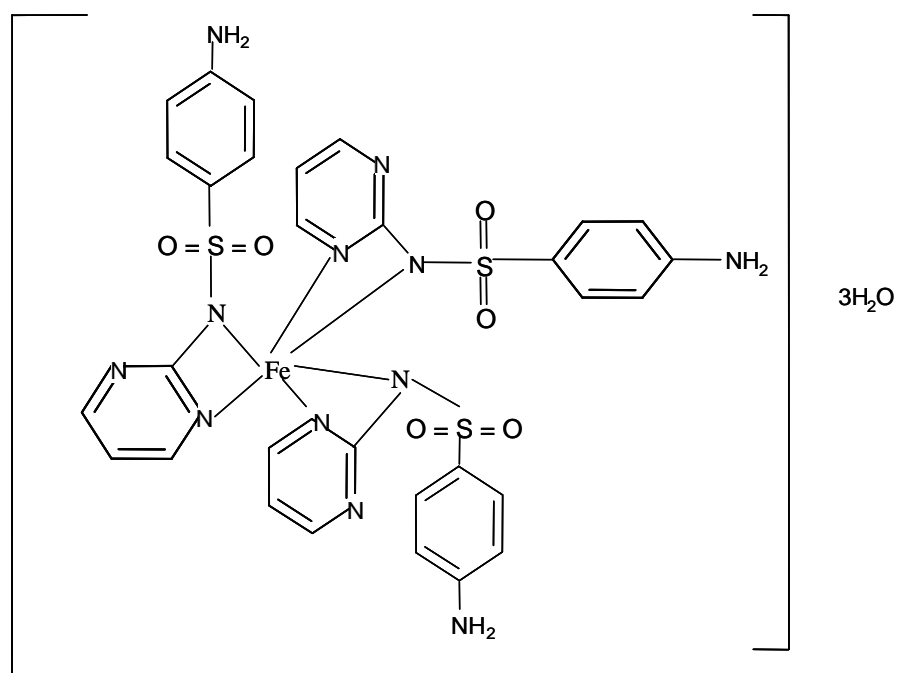


Figure 3. Proposed structure of iron (III) sulphadimidine complex.

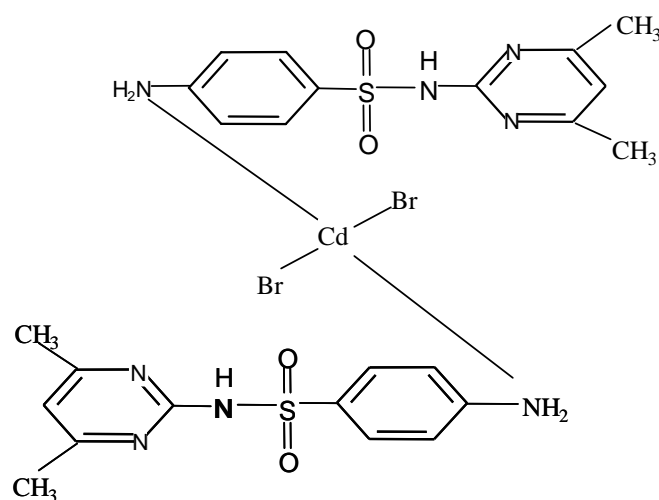


Figure 4. Proposed structure of cadmium (II) sulphadimidine complex.

Table 1. Selected Infra Red bands (cm^{-1}) for sulphadimidine and its metal complexes.

Complexes/ ligand	νNH_{2n} asym, sym	$\nu\text{C=N}$	νSO_2 asym sym	$\nu\text{S-N}$	$\nu_{\text{N-H}}(\text{SO}_2\text{NH})$	$\nu\text{M-N}$	$\nu\text{M-X}$
Sulphadimidine	3442s 3343s	1639s 1596s	1326w 1147vs	973s	3243s	-	
[Co(SAD) ₂ Cl ₂]	3553m 3449m 3156	1594s 1585w	1245vs 1126m	981s	3156	549m	676s
[Ni(SAD) ₂ Cl ₂]H ₂ O	3500b,w 3270b,m	1594s		973m	3154	547s	
[Mn(SAD) ₂ Cl ₂]	3542m 3368m 3158m	1639w 1599s 1584m	1245vs 1141s	979s	3282	550s	677s
[Cu(SAD) ₂ (H ₂ O) ₂]	3448m 3359m	1640w 1595m 1557w	1256s 1141s	982m	-	558m	674s
[Cd(SAD) ₂ Br ₂]	3540m 3506s	1637w 1583m	1246s 1143s	-	3290	558m	677m
[Fe(SAD) ₃] 3H ₂ O	3441s 3342s	1640vs 1595vs	1325w 1190s	972vs	-	553s.	681s

W = weak, s = strong, vs =verystrong, b =b road, m = medium, asym = asymmetric, sym = symmetric.

This peak was shifted to lower wave number by about 10-26 cm^{-1} in the Fe (III) and Cu (II) SAD complexes, indicating the participation of the pyrimidine nitrogen in coordination. The IR data revealed that pyrimidine nitrogen and nitrogen in SO_2NH may be the only sites of coordination of Fe (III) complex. The frequency $\nu\text{N-H}$ (3242 cm^{-1}) attributed to SO_2NH in the sulphadimidine is subjected to little or no change in Co (II), Ni (II), and Cd (II) complexes, confirming that sulfonamido nitrogen is not involved in coordination, but this band disappeared completely in Cu (II) SAD and Fe (III) SAD complexes, as a result of deprotonation of the SO_2NH moiety [11]. This further substantiates the coordination of metal ion at this site. In the far IR, the non-ligand bands observed around 547–599 cm^{-1} have been assigned to $\nu\text{M-N}$ and $\nu\text{M-X}$ stretching [1].

Electronic spectra

The electronic spectra of sulphadimidine and its complexes are presented in Table 2. The electronic spectrum in DMSO of sulphadimidine gave absorption band at (36496 cm^{-1}) 274 nm, the band is assigned to $\pi\text{-}\pi^*/n\text{-}\pi^*$. The cadmium ion has its 5d orbital completely vacant. Two bands (39063 cm^{-1}) 256 nm ($\pi\rightarrow\pi^*$) and (35211 cm^{-1}), 284 nm ($n\rightarrow\pi^*$) are observed in Cd (II) complex. The same bands are observed in Cd(SAD)₂Br₂, as expected no extra bands were observed for this complex, ¹S spectroscopic term respectively. Extra bands have been observed for (Ni (II), Co (II), Mn (II), Fe (III) and Cu (II) complexes, which have been attributed to d-d transition. The Mn (II) complex

show three bands at (31646 cm^{-1}) 316 nm assigned to $\pi \rightarrow \pi^*$, (26666 cm^{-1}) 375 nm attributed to $n \rightarrow \pi^*$ and (24691 cm^{-1}) 410 nm assigned to metal ligand charge transfer. No d-d transition is expected for both Cd (II) and Mn (II) complexes. The electronic configuration of $\text{Fe}(\text{SAD})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ is d^5 . Transitions attributed to $n \rightarrow \pi^*$, and metal ligand charge transfer occur at (32258 cm^{-1}) 310 nm, (28571 cm^{-1}) 350 nm. The electronic configuration of $\text{Co}(\text{SAD})_2\text{Cl}_2$ is d^7 with spectroscopic ground term 4F . The complex showed three bands in the visible region. The absorption band at (22124 cm^{-1}) 452 nm may be assigned to $^4T_{1g} \rightarrow ^4T_{1g}(\text{P})$, the second band (18692 cm^{-1}) 535 nm is assigned to $^4T_{1g} \rightarrow ^4A_{2g}$ and third band (17391 cm^{-1}) 575 nm is attributed to $^4T_{1g} \rightarrow ^4T_{2g}$. The electronic configuration of $[\text{Ni}(\text{SAD})_2\text{Cl}_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ is d^8 and a spectroscopic ground term is 3F . The absorption band at (23529 cm^{-1}) 425 nm is assigned to $^3A_{2g} \rightarrow ^3T_{1g}(\text{P})$, a second band at (22222 cm^{-1}) 450 nm is assigned to $^3A_{2g} \rightarrow ^3T_{1g}$ and the third band centered at about (18182 cm^{-1}) 550 nm is assigned to $^3A_{2g} \rightarrow ^3T_{2g}$. The assignments are in conformity with the proposed octahedral geometry for the complex.

As expected, Cu (II) complex showed a broad band at (12561 cm^{-1}) 865 nm attributed to $^2E_g \rightarrow ^2T_{2g}$.

Table 2. Electronic spectra of sulphadimidine and its metal complexes.

Complex /ligand	Wavelength(nm)	Energies cm^{-1}	Assignment
Sulphadimidine	274	36496	$\pi \rightarrow \pi^* / n \rightarrow \pi^*$ overlap
[Co(SAD) ₂ Cl ₂]	452	22124	$^4T_{1g} \rightarrow ^4T_{1g}(\text{P})$
	535	18692	$^4T_{1g} \rightarrow ^4A_{2g}$
	575	17391	$^4T_{1g} \rightarrow ^4T_{2g}$
[Ni(SAD) ₂ Cl ₂]·H ₂ O	425	23529	$^3A_{2g} \rightarrow ^3T_{1g}(\text{P})$
	450	22222	$^3A_{2g} \rightarrow ^3T_{1g}$
	550	18182	$^3A_{2g} \rightarrow ^3T_{2g}$
[Fe(SAD) ₃]·3H ₂ O	310	32258	$n \rightarrow \pi^*$
	350	28571	MLCT
[Cu(SAD) ₂ (H ₂ O) ₂]	830	12048	$^2E_g \rightarrow ^2T_{2g}$
[Cd(SAD) ₂ Br ₂]	256	39063	$\Pi \rightarrow \pi^*$
	284	35211	$n \rightarrow \pi^*$
[Mn(SAD) ₂ Cl ₂]	316	31646	$\pi \rightarrow \pi^*$
	375	26666	$n \rightarrow \pi^*$
	410	24691	MLCT

Magnetic susceptibility

Magnetic moments of each of the complexes are given in Table 3. Examination of these data reveals that magnet moment of 0.4 B.M for Cd (II) complex confirms that the complex is essentially diamagnetic. The magnetic moment found for Co (II), Cu (II), Ni

(II), Mn (II) complexes are 4.54, 2.24, 3.85 and 4.87 B.M respectively these values suggest octahedral geometry which is in good agreement with data of electronic transition. Fe (III) complex has magnetic moment of 5.75 B.M the value is approximate to that found in literature for d^5 high spin complex [1].

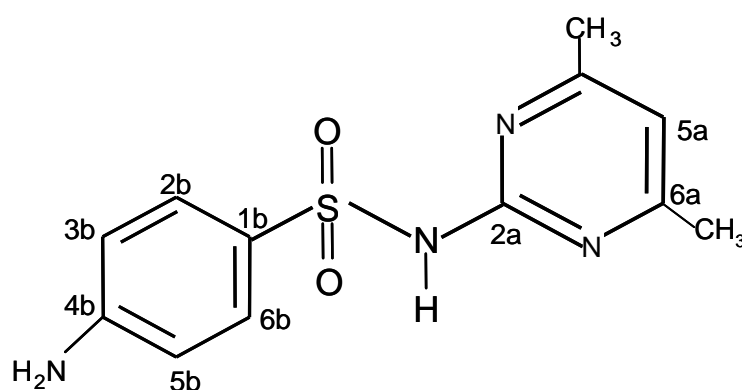
Table 3. Magnetic susceptibility and Conductivity Measurement of Sulphadimidine metal complexes.

Complexes	Magnetic moment $\mu(B.M)$	Conductivity $Ohm^{-1} cm^2 mol^{-1}$
[Co(SAD) ₂ Cl ₂]	4.54	3.4
[Cu(SAD) ₂ (H ₂ O) ₂]	2.24	4.6
[Ni(SAD) ₂ Cl ₂].H ₂ O	3.85	5.0
[Mn(SAD) ₂ Cl ₂]	4.87	3.5
[Cd(SAD) ₂ Br ₂]	0.4	3.2
[Fe(SAD) ₃](H ₂ O) ₃	5.75	4.8

Proton NMR spectra of sulphadimidine and [Co (SAD)₂ Cl₂]

The ¹H-NMR Spectra of the sulphadimidine and Co (II) complex and the chemical shifts of the different types of proton are listed in Table 4.

The spectra of the complex are examined in comparison with that of sulfadimidine. All signals of the complex shifted to high frequency as compared with those of the ligand. The only one that is not affected is the peak of the proton of the SO₂ NH (sulfonamidic nitrogen) at 11.15 ppm which remains in the same position, suggesting no interaction of NH with the metal ion.



The Upfield shift of H (3b)/H5b) by about 0.14 ppm substantiates the involvement of NH₂ groups in coordination, whereas the upfield shift of H (2b)/H(6b) (7.74 ppm to 7.25 ppm) could be related to the proximity of the Co (II) which can be explained by a direct interaction in solid state, between metallic ion and the sulfoxide oxygen atom.

Table 4. $^1\text{H-NMR}$ of Sulphadimidine and Co(II) Sulphadimidine Complex.

<i>Assignment</i>	$^1\text{H-NMR}$ <i>Sulphadimidine</i>	$^1\text{H-NMR}$ [<i>Co (SAD)₂ Cl₂</i>]
NH	11.15br	11.15
H (5a)	6.84	6.49
H2b/H6b	7.74	7.25
H3b/H5b	6.65	6.51
NH ₂	6.06	-

Mass Spectroscopy of [Cu(SAD)₂(H₂O)₂]

The mass spectra, relevant m/z ratios and tentative assignments of [Cu(SAD)₂(H₂O)₂] are shown in Table 5. The mass spectra data confirm that the complexes were present, when supported by our additional analyses. The formulae [Cu(SAD)₂(H₂O)₂] is in agreement with the mass spectral data. The complex shows two important peaks at $m/z = 279$ and 359 , corresponding to sulphadimidine ion and CuOH₂[SAD]⁺. An intense peak at $m/z = 96$ was observed as result of loss of SO₂NH($m/z = 79$) and pyrimidine ($m/z = 104$) from sulphadimidine ion. Loss of two methyl groups ($m/z = 30$) from sulphadimidine as a result of fragmentation gave fragment ion $m/z = 251$. The peaks $m/z = 126$ (C₆H₆NS) and $m/z = 156$ (C₆H₆NO₂S) were formed from loss of $m/z = 153$ (C₆H₇N₃O₂) and $m/z = 123$ (C₆H₇N₃) from sulphadimidine ion, respectively. The peak at $m/z = 172$ was obtained as a result of loss of pyrimidine group from sulphadimidine. All these peaks showed an evidence of complex formation.

Stability Constant of the Metal-Drug Interaction In Aqueous Solution

The results of stability constants and hence reactivity of the sulphadimidine ligand with metal ions follow the trend Cu (II) > Fe (III) > Ni (II) > Co(II) > Cd (II). The stability constant is log 6.31, 5.93, 5.29, 4.63 and 3.92 and the graph is shown in Fig. 5.

The stability constants were found to be inversely proportional to the ionic radius of metals. The order indicates that β values increase with decreasing ionic radius of the metals. The gradual decrease clearly showed that Irving William[21] rule is strictly obeyed for all the complexes in solution. The most stable are the Cu (II) complexes and this is due to Jahn-Teller distortion. The Cd (II) complex is least stable and the reason for this is consistent with the fact that their CFSE = 0. Cd is d⁰ system. This finding is in agreement with the literature [22].

The data also reveals that Fe³⁺ formed more stable complex with sulphadimidine compared to other metal ions except Cu (II). The higher stability of Fe³⁺ complex of the drugs may be explained on the basis of difference in charge of the metal ions. The high positive charge on the iron permits a closer approach of the ligand and better electrostatic attraction. This result in the formation of more stable complex with the ligand. However, a general rule is that trivalent metals form strong bonds than divalent and monovalent

ions [23]. The stability constant data revealed that concomitantly administration of sulphadimidine with preparation containing these metals may reduce drug efficacy. The stability constant data revealed that this ligand may be used as antidote or chelating agent for medical treatment of metals overload or poisoning [24].

Table 5. Mass spectrum assignment for $[\text{Cu}(\text{SAD})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$

<i>M/z</i>	<i>Relative intensity (%)</i>	<i>Assignment</i>
279	2	M.H^+
251	7	$\left[\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2 \right]^{\oplus}$
156	23	$\left[\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2 \right]^{\oplus}$
126	2	$\left[\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{S} \right]^{\oplus}$
96	100	$\left[\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_5 \right]^{\oplus}$
359	3	$\left[\text{Cu}(\text{OH})_2 \left(\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2 \right) \right]^{\oplus}$
151	3	$\left[\text{Cu} \left(\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_5 \right) \right]^{\oplus}$
172	3	$\left[\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NH} \right]^{\oplus}$

Antibacterial Screening

The antibacterial screening data are presented in Table 6. The antibacterial activities of the ligands and their complexes were tested on Gram positive bacteria: *Staphylococcus aureus* and Gram negative bacteria: *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli*. The antibacterial activities of the complexes were evaluated by

measuring inhibition zone observed around the tested materials.

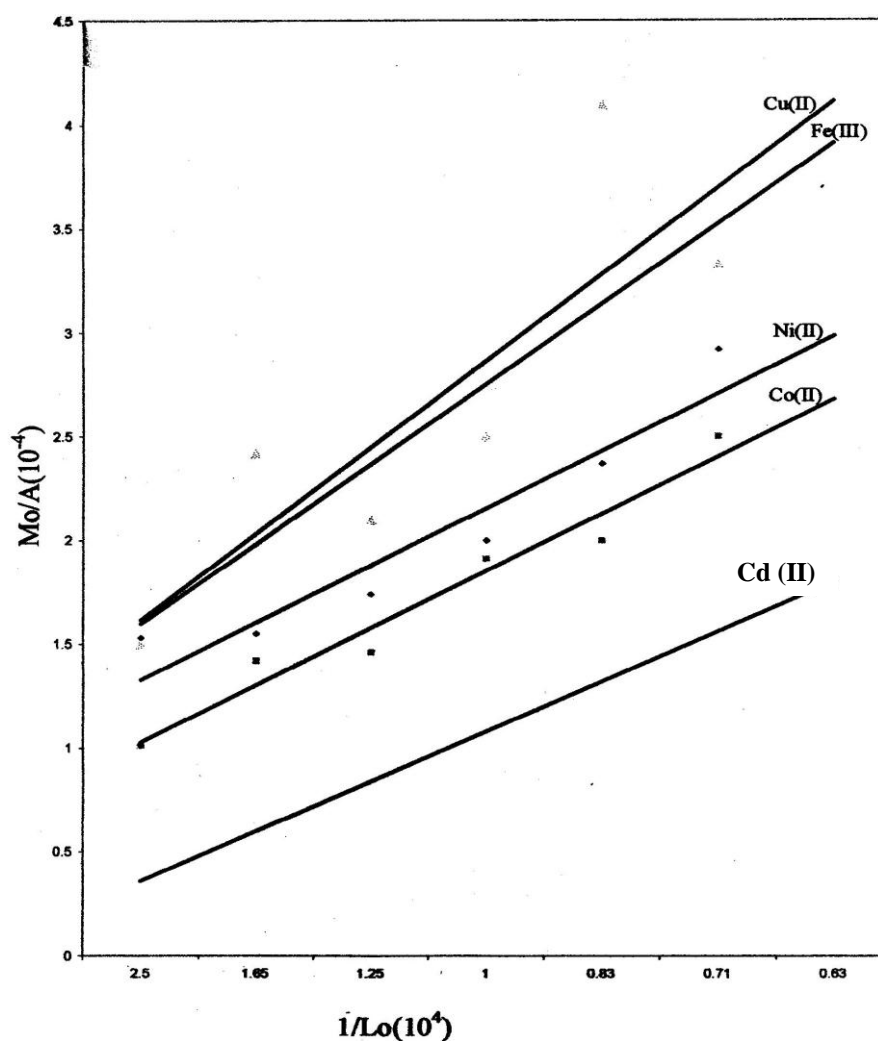


Figure 5. Stability constant of sulphadimidine metal complexes.

The increase of the zone of inhibition for metal complexes when compared with corresponding ligands as shown in Table 6 is an indication that the metal complexes are able to decrease the population of bacterial species. It also an indication that the metal complexes are more effective than their corresponding ligand. The results are in agreement with the finding of Casanova et al. [4]. They reported that metal chelates of sulfa drugs were more bacteriostatic than the drugs themselves. This is significant in the light of increasing bacterial resistance to antibacterial drugs. The chelation increases the lipophilic nature of the central atom which subsequently favour its permeation through the lipid layer of the cell membrane [25]. The chelation theory account for the increased activities of the metal complexes. The chelation reduces considerably the polarity of the metal atom mainly because of the partial sharing of its positive charge with the donor group and possible p electron delocalization within the whole chelating ring [26]. The increase in lipophilic character of these complexes seems to be responsible for their

enhanced antibacterial activity. It may be suggested that these complexes deactivate various cellular enzymes, which play a vital role in various metabolic pathways of these microorganisms. It has also been proposed that the ultimate action of the toxicant is the denaturation of one or more proteins of the cell, which as a result, impairs normal cellular processes. Since the metal complexes inhibit the growth of microorganisms, it is assumed that the production of enzymes is being affected and hence the microorganism is unable to utilize the food for itself or the intake of nutrient in suitable forms decrease and consequently the growth of microorganism is arrested, while the higher concentration proves fatal [27].

The result shows that most of the compounds possess higher inhibitory activity against the bacterial species at 100ppm concentration than at 50 ppm concentration.

Table 6. Antibacterial screening data of the ligands and their complexes

Ligand/Complexes	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>K. Pneumonia</i>	
	50 ppm	100 ppm	50 ppm	100 ppm	50 ppm	100 ppm
SAD	14 + 0.97 ^a	20 + 1.20 ^a	14 + 0.98 ^a	16+ 1.11 ^a	12 + 1.00 ^a	18 + 0.96 ^a
[Co(SAD) ₂ Cl ₂]	18 + 1.11 ^b	20 + 1.23 ^a	15 + 1.04 ^a	18+ 1.18 ^a	12 + 0.96 ^a	20 + 1.06 ^a
[Cu(SAD) ₂ (H ₂ O) ₂]	16 + 1.12 ^b	25 + 1.27 ^b	15 + 1.08 ^a	17+ 1.23 ^a	15 + 0.98 ^a	23 + 1.50 ^b
[Ni(SAD) ₂ Cl ₂]H ₂ O	19 + 1.19 ^b	23 + 1.85 ^a	17 + 1.11 ^a	22+ 1.40 ^b	15 + 1.01 ^a	21 + 1.60 ^a
[Mn(SAD) ₂ Cl ₂]	16 + 1.08 ^b	22 + 1.90 ^a	15 + 1.12 ^a	21+ 1.08 ^b	22 + 1.05 ^b	24 + 1.95 ^b
[Cd(SAD) ₂ Br ₂]	19 + 1.31 ^b	23 + 1.92 ^a	17 + 1.18 ^a	20+ 1.88 ^a	22 + 1.31 ^b	20 + 1.09 ^a
Fe(SAD) ₃ (H ₂ O) ₃	20 + 1.84 ^b	25 + 2.00 ^b	18 + 1.31 ^a	25+ 1.89 ^b	21 + 2.00 ^b	16 + 0.86 ^b

Values are mean of 3 replicates \pm SD. Values carrying superscripts different from their parent ligand for each microorganism are significantly different ($P < 0.05$).

Conclusion

The complexes were characterized by melting point/decomposition temperature, solubility, conductivity measurement, elemental analyses, UV-Vis and IR spectroscopies, mass spectrometry. In all the complexes, the ligand is bidentate, sulphadimidine coordinates with metal ions either through pyrimidine N and sulfonyl N atom or through NH₂ group and oxygen atom of the sulphoxide. The complexes are powdery and attempt to obtain single crystals suitable for X-ray crystallographic analysis failed. All the complexes have octahedral geometry except Cd (II) sulphadimidine which has tetrahedral geometry. The free ligand and its respective metal chelates were screened against bacteria to assess their potential as antimicrobial agent. The complexes showed greater activity against the three micro-organisms when compared to parent compound. The stability constant data revealed the possibility of using the ligand as antidote or

chelating agent for medical treatment of metals overload or poisoning.

Acknowledgements

ACT and JAO appreciate the financial support of Science and Technology Education Post Basic Project (Step B) and University of Ilorin, Nigeria.

References and Notes

- [1] Obaleye, J. A. *Nigerian Journal Pure and Applied Sciences* **1996**, *11*, 441.
- [2] Jain, M.; Singh, R. V. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2006**, *ID13734*, 1.
- [3] Bult, A.; Klasen, H. A. *J. Pharm. Sci.* **1978**, *67*, 284.
- [4] Casanova J.; Alzuet, G.; Ferrer, S.; Borrás, J.; García-Granda, S.; Pérez-Carreno, E. *J. Inorg. Biochem.* **1993**, *51*, 689.
- [5] Rudzinski, W. E.; Aminabhavi, T. M.; Biradar, N. S.; Patil, C. S. *Inorg. Chim. Acta* **1982**, *67*, 177.
- [6] Garcia-Raso, A.; Fiol, J. J.; Rigo, S.; Lopez-Lopez, A.; Molins, E.; Espinosa, E.; Borrás, E.; Alzuet, G.; Borrás, J.; Castineiras, A. *Polyhedron* **2000**, *19*, 991.
- [7] Obaleye, J. A.; Tella, A. C.; Arise, O. R. *Advances in natural and applied Sciences* **2009**, *3*, 43.
- [8] Obaleye, J. A.; Caira, M. R.; Tella, A. C. *J. Chem. Crystallogr.* **2007**, *37*, 707.
- [9] Obaleye, J. A.; Caira, M. R.; Tella, A. C. *Anal. Sc.* **2008**, *24*, 63.
- [10] Ogunniran, K. O.; Tella, A. C.; Alensela, M.; Yakubu, M. T. *Afr. J. Biotech.* **2007**, *6*, 1202.
- [11] Obaleye, J. A.; Caira, M. R.; Tella, A. C. *Struct. Chem.* **2009**, *20*, 859.
- [12] Obaleye, J. A.; Tella, A. C.; Caira, M. R. In: *Crystal Structures of Some Antimalarial Metal complexes (A Chapter in Chemical Crystallography Book)* Published by Nova Springer. *In Press*.
- [13] Benesi, H. A.; Hilderbrand, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703.
- [14] Lamsa, M.; Kuokkanen, T. *J. Phy. Org. Chem.* **1996**, *9*, 21.
- [15] Rose, N. J.; Drago, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 6138.
- [16] Collins, C. H. *Microbiological methods*, 3rd ed. Butterworths and Co. Ltd. 1980.
- [17] Obaleye, J. A.; Famurewa, O. *Bios. Res. Comm.* **1989**, *1*, 87.
- [18] Obaleye, J. A.; Balogun, E. A.; Adeyemi, O. G. *Biokemistri* **1999**, *9*, 23.
- [19] Garcia-Raso, A.; Fiol, J. J.; Martorell, A. L.; Quiros, M. *Polyhedron* **1997**, *16*, 1613.
- [20] Durosinmi, L. M.; Ojo, I. A. O.; Ige, J. A. *Nig. J. Chem. Res.* **1996**, *1*, 53.
- [21] Irving, M.; William, R. J. *Nature* **1948**, *162*, 746.
- [22] Saha, N.; Kar, S. K. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1979**, *41*, 1233.
- [23] Rabindra, V. B.; Reddy, P.; Malleswara, R. *Inorg. Chim. Acta* **1986**, *125*, 191.
- [24] Orvig, C.; Abrahams, M. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2201.
- [25] Chaudhary, A. S.; Singh, R. *Bol. Soc. Quim.* **2002**, *47*, 203.
- [26] Baluja, S.; Solanke, A.; Kachhadia, N. *J. Iran. Chem. Soc.* **2006**, *4*, 312.
- [27] Fahmi, N.; Jadon, S. C. S.; Singh, R. V. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1993**, *81*, 133.

Excitation and ionization energies of substituted anilines calculated with density functional theory

Yuji Takahata^{*a,b}, Alberto dos S. Marques^a, Luiza G. Pereira^a

^aSchool of Engineering, Amazonas State University, Av. Darcy Vargas, 1200, Parque 10 - CEP 69065-020, Manaus, Amazonas, Brazil.

^bDepartment of Chemistry, University of Campinas-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, CEP 13084-862, Campinas, São Paulo, Brazil.

Received: 15 December 2009; accepted: 24 April 2010. Available online: 03 May 2010.

ABSTRACT: Valence electron singlet excitation energies (VEExE), valence electron ionization energies (VEIE), core electron binding energies (CEBE), and non-resonant X-ray emission energies of substituted anilines and related molecules were calculated using density functional theory (DFT). The energy calculations were done with TZP basis set of Slater Type Orbitals. PW86x-PW91c, turned out to be the best XC functional among eight functionals tested for time dependent DFT (TDDFT) calculation of the singlet excitation energies of the substituted anilines. Using the XC functional, average absolute deviation (AAD) from experiment was 0.223 eV for eighteen cases with maximum absolute deviation of 0.932 eV. The valence electron ionization energies of the substituted benzenes were calculated by Δ SCF method with PW86x-PW91c. AAD from experiment was 0.21 eV. The CEBEs were calculated with the previously established method, named as scheme 2003. Δ CEBE(SMS), sum of mono substituted (SMS) CEBE shift, and mutual interference effect (MIE) were defined and their values were calculated. Magnitude of MIE provides the degree of mutual interference between two substituents in a phenyl ring. Average absolute value of MIE was ca. 0.1 eV for the three isomers of phenetidine. Using the calculated valence electron ionization energies and the core electron binding energies of one of the phenetidines, some X-ray emission energies were calculated.

Keywords: singlet excitation energy; ionization energy; CEBE; Density Functional Theory; substituted anilines

Introduction

Accurate theoretical calculation of electronic spectra helps in understanding and interpreting experimentally observed ones. The density functional theory has been widely used to calculate not only ground state energy of systems but also transition energies

* Corresponding author. E-mail: taka@iqm.unicamp.br

through the use of the time dependent density functional theory. When one uses DFT and TDDFT, one has to choose appropriate exchange and correlation functional to get the best possible results. There is no universal exchange and correlation functional that serves for any situation. Very recently, Jacquemin et al. [1] published results of an extensive TDDFT benchmark study for singlet-excited states using a very extended set of organic molecules testing 29 functionals of five major categories: LDA, GGA, meta-GGA, GH, and LCH. With the optimal functionals, they obtained mean absolute deviations smaller than 0.25 eV. PBE0 and LC- ω PBE(20) [2], for instance, provided a mean absolute error of 0.14 eV for the 228 states related to neutral organic dyes. The electronic spectrum of molecules has a strong multideterminantal nature. Transition wavelengths to excited-states presenting a doubly excited character or a significant charge-transfer nature are traditionally poorly estimated. Recently long-range-corrected hybrids (LCH) have been developed to correct this deficiency [3]. Mirashi et al. [4] obtained experimental electronic absorption spectra of some substituted anilines in vapor phase and polar and non-polar solvents. Jana and Ganguly observed UV absorption and emission spectra of *o*-, *m*-, and *p*-phenetidines (Figure 1 A-C) in non-polar and hydrogen bonding solvents at room temperature (liquid state solvent) [5]. UV photoelectron spectra (UPS) of substituted benzenes (Figure 1 D, E) were observed by Klasinc et al. [6].

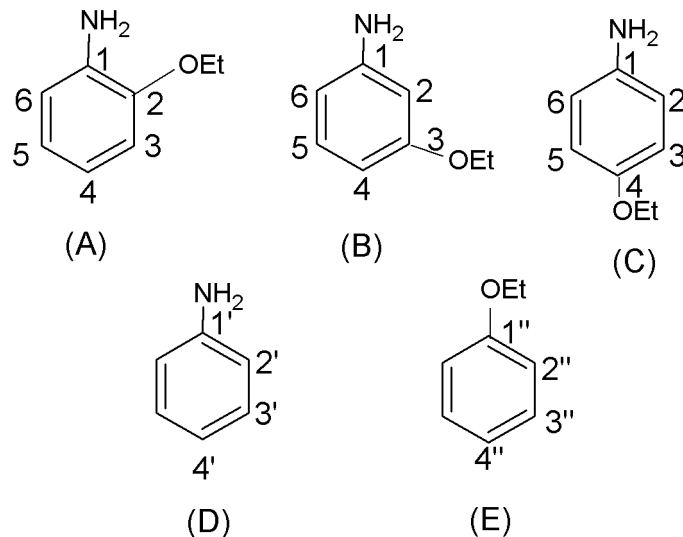


Figure 1. (A) *o*-phenetidine, (B) *m*-phenetidine, (C) *p*-phenetidine, (D) aniline, (E) ethoxybenzene.

The object of the present work is to calculate valence electron singlet excitation energies, valence electron ionization energies, core electron binding energies, and non-resonant X-ray emission energies of some of the substituted anilines and related molecules using density functional theory. First, we search for an appropriate exchange and correlation functional to calculate singlet excitation energies of the substituted

anilines. The calculated excitation energies are compared with the observed ones. The selected exchange-correlation functional is used to predict gas phase excitation energies of the phenetidines and analyze their observed UV spectra in non-polar solvent [5]. Second, Valence electron ionization energies of some substituted benzenes are calculated and compared with the observed ones [6] in order to evaluate accuracy of the calculation. Third, core electron binding energies of the three isomers: o-, m-, and p-phenetidines (Figure 1 A, B, C) are calculated. CEBE is a convenient physical quantity to study substituent effect [7, 8]. Finally, transition energies corresponding to non-resonant X-ray emission of the phenetidines are calculated using the VEIEs and CEBEs.

Material and Methods

Method of calculation

Geometry optimization of the ground state neutral molecules was performed with GAUSSIAN program package [9], using the Hartree-Fock (HF) method with the basis set known as 6-31G(d). The optimized geometries were used for all the energy calculations. All the energy calculations were done using the Amsterdam Density Functional (ADF) program [10]. In all the ADF calculations, basis set used was triple-zeta polarized (TZP) Slater type basis set. The TZP basis set consists of two 1s Slater type orbital (STOs), three 2s and 2p STOs and one 3d STO. For calculation of the excitation energies, we used time-dependent DFT. Eight typical exchange-correlation (XC) energy functionals available in the ADF package were chosen and tested for calculation of the excitation energies of the substituted anilines. They are listed bellows:

- (1) BP86: this is equivalent to Becke(exchange) [11] + Perdew (correlation) [12] together.
- (2) PW91: this is equivalent to PW91x [13] + PW91c [13] together.
- (3) mPBE: this is equivalent to mPBEx [14] + PBEc [15] together.
- (4) PW86x [16] + PW91c.
- (5) BLYP: this is equivalent to Becke (exchange) + LYP (correlation) [17].
- (6) OLYP: this is equivalent to OPTX (exchange) [18] + LYP (correlation).
- (7) LB94: this refers to the XC functional of Van Leeuwen and Baerends [19].
- (8) SAOP: the statistical average of orbital potentials [20, 21].

The first six functionals, (1) – (6), are Generalized Gradient Approximation (GGA) type and the last two, (7) and (8), are asymptotically correct XC potentials.

The core electron binding energies (CEBEs) of carbon atoms in the phenetidines were calculated using density functional theory with Scheme 2003 [22].

$$\Delta E_{KS} (\text{PW86-PW91})/\text{TZP} + C_{rel} // \text{HF}/6-31G^*. \quad (\text{Scheme 2003})$$

ΔE_{KS} (= CEBE) is the difference in the total Kohn-Sham(KS) energies calculated by Amsterdam Density Functional for the core-ionized cation and for the neutral parent molecule. The TZP basis set was found to be the most cost effective resulting average absolute deviation from experiment of 0.16 eV for 59 CEBE cases. STO's are especially suited to represent inner core electronic structure. The functional combination is the Perdew-Wang 1986 exchange functional [16] and the Perdew-Wang 1991 correlation functional [23]. The relativistic corrections [24] can be estimated by an empirical equation 1,

$$C_{rel} = KI_{nr}^N \quad (1)$$

where I_{nr} is the non relativistic CEBE and C_{rel} is the relativistic correction. When both C_{rel} and I_{nr} are in eV, $K = 2.198 \times 10^{-7}$ and $N = 2.178$. In case of carbon atom, C_{rel} takes the value 0.05 eV. Substituent effect of a ring carbon atom in substituted benzene is estimated by CEBE shift (ΔCEBE) which is defined as,

$$\begin{aligned} \Delta\text{CEBE} (\text{substituent effect}) \\ = \text{CEBE (C atom in Ph-X)} - \text{CEBE (C atom in Ph-H)} \end{aligned} \quad (2)$$

The vertical, valence electron ionization energies were calculated with almost the same method as the Scheme 2003, namely the ΔSCF method. Only difference is that the relativistic correction, C_{rel} , was not included for the calculated valence electron IEs.

Results and Discussion

Valence Electron Excitation Energy

The valence electron singlet-singlet (singlet) excitation energies of seventeen substituted anilines in isolated form were calculated using the eight different XC functionals. There are two or three observed bands reported for each molecule [4]. When the observed lowest energy band is compared with the calculated one, there is no ambiguity in assignment. However, there are ambiguities in assigning the second and higher energy bands comparing calculated spectra. This is the reason why we compare theory with experiment for only the lowest excitation band. In Table 1, the calculated lowest excitation energy of each molecule is compared with the corresponding experimental value obtained in gas phase [4].

Average absolute deviations (AADs) obtained from the total of 17 molecules are listed. They lie between 0.2 and 0.3 eV. The lowest AAD value, 0.223 eV was obtained with the PW86x-PW91c functional. The 2nd, 3rd, and 4th lowest AADs are 0.227 eV, 0.229 eV, and 0.230 eV that were obtained with BP86, mPBE, and PW91, respectively. The

three AADs are very close to each other. The largest AAD obtained among the eight XC functionals tested is 0.298 eV, which was obtained with OLYP. The two asymptotically correct XC potentials, SAOP and LB94, resulted AADs of 0.272 eV and 0.288 eV that belong to the worst three results among the eight XC functionals tested. Maximum absolute deviation (MAD) is listed in the last line of the table. MADs resulted from meta-nitroaniline, $m\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$, for all the eight XC functionals were tested. The MADs are as large as ca. 0.9 eV or more. Absolute deviation from experiment for *para*-nitroaniline is ca. 0.5 eV which is also large. The eight XC functionals failed to calculate accurate excitation energies of the nitroanilines. If AADs are calculated with only 14 compounds excluding the three nitroanilines (**15**, **16**, **17**), The AAD of PW86x-PW91c drops from 0.223 to 0.146 eV (The second line from the bottom in Table 1). This is a substantial improvement. AAD reduces substantially when the nitroanilines are excluded for all the remaining cases as shown in Table 1. In the case of LB94, AAD drops from 0.288 eV with nitroanilines to 0.141 eV without the three nitro compounds. The difference is quite substantial. LB94 results accurate excitation energies for substituted anilines except for the nitroanilines, for which it fails badly. We conclude that the best XC functional is PW86x-PW91c. BP86, mPBE, and PW91 are almost as good as the best one. It is interesting to note that PW86x-PW91c is also the best XC functional for calculating CEBE [22]. Singlet excitation energies corresponding to the first transition band of *o*-, *m*-, and *p*-phenetidines, in vacuum, were calculated using PW86x-PW91c (the second column in Table 2).

Since observed UV absorption spectra of the molecules were measured in cyclohexane [5], the calculated transition energies cannot be compared directly with the observed ones. Relation between excitation energies in vacuum (or in gas phase), $\Delta E(\text{vacuum})$, and the one in a solvent, $\Delta E(\text{solvent})$, can be given by eq. 3:

$$\Delta E(\text{vacuum}) = \Delta E(\text{solvent}) + WD \quad (3)$$

where WD stands for solvent effect.

Mirashi et al. [4] observed UV absorption spectra of *o*-, *m*-, and *p*-methoxyanilines in vapor as well as in cyclohexane. Average solvent effect of 0.116 eV, WD in eq. 3, of these three compounds in cyclohexane was obtained. Since methoxyaniline and phenetidine (ethoxyaniline) are very similar molecules, one can assume that solvent effect of phenetidines can be approximated by that of methoxyanilines. With the calculated $\Delta E(\text{Vacuum})$ s and the solvent effect, 0.116 eV, one can estimate transition energies of the three phenetidines in cyclohexane using eq.3. The resultant values are listed in the 3rd column of Table 2. The last column lists observed

Table 1. Evaluation of the eight exchange-correlation functionals for calculation of the lowest excitation energies, in eV, of the substituted anilines.

	Order	band	Obs.[4] Vapour	Calc.							
				1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th
	Compound			PW86x-PW91c	BP86	mPBE	PW91	BLYP	SAOP	LB94	OLYP
1	C ₆ H ₅ NH ₂	Lb	4.488	4.503	4.522	4.524	4.513	4.499	4.629	4.454	4.414
2	C ₆ H ₅ CH ₃	Lb	4.679	5.138	5.184	5.186	5.175	5.142	5.183	5.028	5.208
3	C ₆ H ₅ OH	Lb	4.851	5.166	5.188	5.190	5.179	5.144	5.216	5.056	5.211
4	C ₆ H ₅ OCH ₃	Lb	4.756	4.771	4.792	4.792	4.785	4.772	4.927	4.751	4.844
5	C ₆ H ₅ NO ₂	CT	5.207	5.293	5.320	5.302	5.309	5.327	5.153	5.545	5.387
6	o-H ₃ CC ₆ H ₄ NH ₂	Lb	4.54	4.568	4.589	4.577	4.567	4.468	4.681	4.511	4.344
7	m-H ₃ CC ₆ H ₄ NH ₂	Lb	4.653	4.448	4.469	4.463	4.455	4.437	4.572	4.407	4.353
8	p-H ₃ CC ₆ H ₄ NH ₂	Lb	4.613	4.381	4.400	4.399	4.390	4.375	4.500	4.334	4.277
9	o-HOC ₆ H ₄ NH ₂	Lb	4.533	4.423	4.496	4.393	4.364	4.204	4.612	4.433	4.060
10	m-HOC ₆ H ₄ NH ₂	Lb	4.463	4.559	4.581	4.577	4.567	4.468	4.691	4.489	4.316
11	p-HOC ₆ H ₄ NH ₂	Lb	4.157	4.335	4.353	4.352	4.345	4.332	4.471	4.331	4.300
12	o-H ₃ COC ₆ H ₄ NH ₂	Lb	4.451	4.472	4.510	4.471	4.456	4.351	4.625	4.443	4.205
13	m-H ₃ COC ₆ H ₄ NH ₂	Lb	4.414	4.527	4.550	4.545	4.536	4.493	4.665	4.462	4.331
14	p-H ₃ COC ₆ H ₄ NH ₂	Lb	4.24	4.073	4.092	4.089	4.083	4.077	4.258	4.101	3.966
15	o-O ₂ NC ₆ H ₄ NH ₂	Lb	3.501	3.202	3.220	3.217	3.210	3.172	3.118	2.841	3.228
16	m-O ₂ NC ₆ H ₄ NH ₂	Lb	3.8	2.868	2.891	2.899	2.872	2.849	2.763	2.394	2.917
17	p-O ₂ NC ₆ H ₄ NH ₂	Lb	4.246	3.720	3.747	3.747	3.731	3.703	3.680	3.406	3.758
AAD(17)	1 to 17		0	0.223	0.227	0.229	0.230	0.241	0.272	0.288	0.298
AAD(14)	1 to 14		0	0.146	0.155	0.157	0.155	0.163	0.188	0.141	0.245
MAD	m-O ₂ NC ₆ H ₄ NH ₂			0.932	0.909	0.901	0.929	0.951	1.037	1.406	0.883

Table 2. Singlet excitation energies, in eV, of *o*-, *m*-, and *p*-phenetidines.

Molecule	Calc.	Calc.	obs.[5]
	vacuum	Solv.Effect (-0.116 eV)	CycloHexane
<i>o</i> -phenetidine	4.455	4.339	4.310
<i>m</i> -phenetidine	4.527	4.411	4.350
<i>p</i> -phenetidine	4.066	3.950	4.080
AAD ^a		0.073	(0)

a. Average Absolute Deviation (AAD)

Table 3. Calculated and observed⁶ valence electron ionization energies, in eV, of some substituted benzenes.

Molecule	PhOMe		PhNH ₂		PhMe		PhOH		PhNO ₂		<i>o</i> -Phenet ^a	<i>m</i> -Phenet	<i>p</i> -Phenet
	Calc.	Obs.	Calc.	Obs.	Calc.	Obs.	Calc.	Obs.	Calc.	Obs.	Calc.	Calc.	Calc.
HOMO	8.16	8.39	7.88	8.02	8.84	8.78	9.00	8.61	9.30	9.88	7.22	7.45	7.10
HOMO-1	9.17	9.22	9.09	9.12	9.17	9.00	xxx ^b	9.33	xxx		8.17	7.89	8.80
HOMO-2	10.53		10.42	10.78	11.01	11.45	10.35		10.63	11.03	xxx	9.51	8.94
HOMO-3	10.59		11.14		11.07	11.45	11.58	11.6	10.82	11.16	10.15	10.29	10.25
HOMO-4	11.36	11.06	11.61	11.88	11.53	11.86	11.66	11.6	xxx		10.48	10.41	10.46
HOMO-5	11.59	11.55	12.34	12.48	12.46	12.01	12.01	12.13	12.17		10.94	11.12	10.99
HOMO-6	12.07	12.33	13.18		12.84	13.29	xxx	12.59	xxx		xxx	11.19	11.34
HOMO-7	12.90	12.56	xxx				13.51	13.49	12.92	12.68	11.38	11.37	11.70
HOMO-8	xxx ^b	12.76	13.46						14.17	13.49	12.23	12.07	12.05
HOMO-9	xxx		14.63	14.28					xxx				
HOMO-10	13.85	13.99	xxx						14.66	14.99			
HOMO-11	14.59	14.28	15.90	15.74									
HOMO-12	14.86	14.88	17.70										
HOMO-13	16.20	15.78											
HOMO-14	17.35	17.36											

a. Phenet = Phenetidine

b. xxx indicates that value was not obtained due to non convergence of SCF.

values. The estimated transition energies are close to the observed values. AAD of the estimated values is 0.073 eV.

Valence Electron Ionization Energy

Since PW86x-PW91c is the best XC functional to calculate the valence electron excitation energies of the substituted benzenes and CEBEs[22], we expect that it can also be a good functional for calculating valence electron ionization energies. The VEIEs were calculated with the Δ SCF method that can be described as following:

$$\Delta E_{KS} (\text{PW86-PW91})/\text{TZP //HF/6-31G(d)}.$$

Where ΔE_{KS} (= VEIE), TZP was used for basis set. Geometry was optimized with HF/6-31G(d). Table 3 lists the calculated VEIEs of some substituted benzenes together with observed ones.

In majority of the cases, SCF calculation of cation converged. However, there were cases where SCF did not converge. Non convergence of SCF is indicated by xxx in Table 3. The VEIEs due to only several highest occupied molecular orbitals are listed for the most of the molecules. Assignment of observed UPS bands using the calculated VEIEs involves some ambiguity especially for higher energy bands. There is no ambiguity in assigning the lowest energy PE spectrum band, because it corresponds to ionization from the highest occupied molecular orbital (HOMO). Assignment of the second lowest band is also possible. It involves one level bellow to HOMO (HOMO-1). Table 4 lists the two lowest observed PE bands and the calculated VEIEs due to HOMO and HOMO-1.

Table 4. Calculation of average absolute deviation (AAD) of valence electron ionization energies, in eV, for mono substituted benzenes using only HOMO and HOMO-1.

	Molecule	Orbital	Calc.	Obs.[6]
1	PhNH ₂	HOMO	7.88	8.02
2		HOMO-1	9.09	9.12
3	PhCH ₃	HOMO	8.84	8.78
4		HOMO-1	9.17	9
5	PhOH	HOMO	9.00	8.61
6	PhOMe	HOMO	8.16	8.39
7		HOMO-1	9.17	9.22
8	PhNO ₂	HOMO	9.30	9.88
AAD(1-8)			0.21	0
AAD(1-7)			0.15	0
MAD ^a	PhNO ₂		0.58	

a. Maximum absolute deviation

Average absolute deviation of the eight cases is 0.21 eV. The maximum absolute deviation is 0.58 eV which is due to PhNO₂. If PhNO₂ is excluded in the list, AAD becomes

0.15 eV. It is interesting to observe that the AADs of Table 4 is almost identical to those obtained in Table 1 in the column of PW86x-PW91c. The XC functional results AAD of ca. 0.22 eV both in calculation of valence electron excitation energy (Table 1) and ionization energy (Table 4). If the nitro compounds are excluded for the statistics, AADs drop to 0.15 eV in Tables 1 and 4. It is noteworthy the fact that AAD for calculating CEBE with PW86x-PW91c is 0.16 eV [22].

Core electron binding energy

Table 5 lists calculated CEBE, Δ CEBE (eq. 2), in eV, of ring carbons of mono (Ph-X) and *o*-, *m*- and *p*-phenetidines (Figure 1 A-C). Calculated and observed [25] CEBEs, in eV, for C₁, C₂, C₃ and C₄ of Ph-NH₂ are 291.39 (291.29), 289.99 (289.85), 290.17 (290.25), 289.81 (289.85), in which observed values are in parentheses.

Average absolute deviation is 0.09 eV. The calculated CEBEs reproduce the observed values well. We expect similar accuracy to the calculated CEBEs of the remaining molecules in Table 5. Figure 2 shows calculated Δ CEBE of Ph-NH₂ and Ph-OEt.

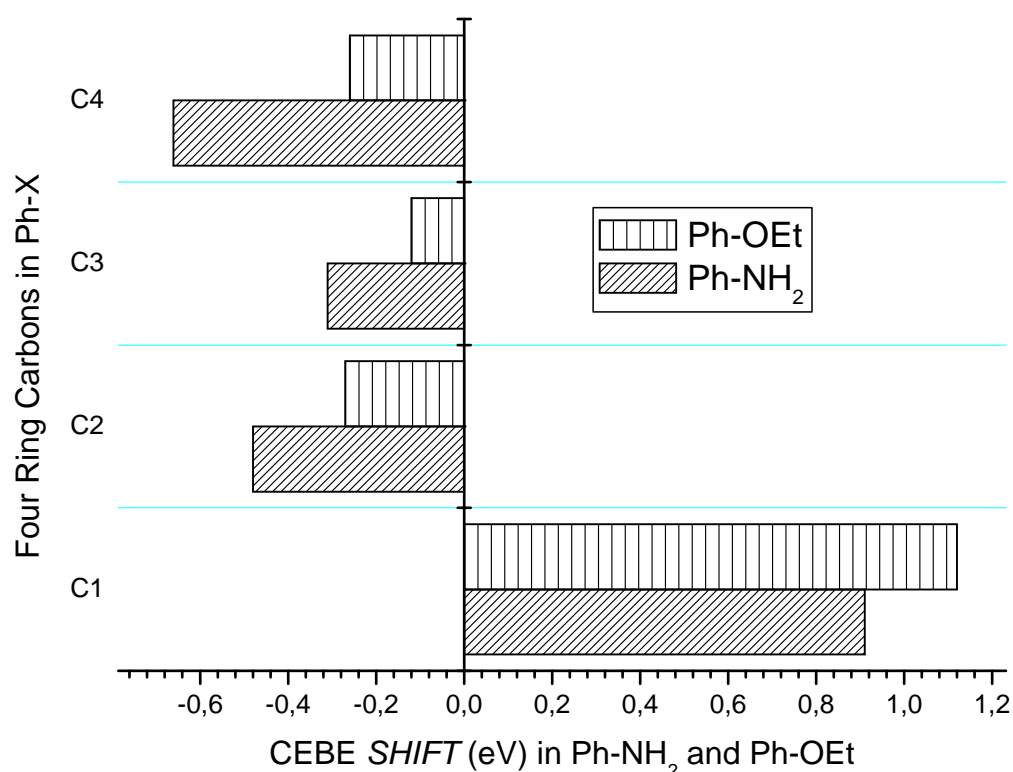


Figure 2. Δ CEBE (eV) of four ring carbons, C₁ = Ipsos, C₂ = *ortho*, C₃ = *meta*, and C₄ = *para* in Ph-NH₂ and Ph-OEt.

The Δ CEBEs of the two molecules have negative values at C₂ (*ortho*), C₃ (*meta*) and C₄ (*para*) indicating that NH₂ and OEt are of electron donating. The electron donating

power of NH_2 is almost twice as great to that of OEt. We assume that ΔCEBE of the di-substituted (X-Ph-Y) benzenes (Figure 1 A-C) is a consequence of cumulative of two ΔCEBE s of mono-substituted Ph-X (Figure 1 D), mono-substituted Ph-Y (Figure 1 E) and mutual interference effect (MIE). This assumption can be expressed by Eq. 4.

Table 5. Calculated CEBE, ΔCEBE and ΔCEBE (SMS), sum of mono substituted (SMS) CEBE shift, and mutual interference effect (MIE), in eV, of mono (Ph-X) and di-substituted benzene (X-Ph-Y), where X and Y = NH_2 and OEt.

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
	CEBE	ΔCEBE	ΔCEBE (SMS)	MIE (3)-(4)
PhNH ₂				
1	291.39	0.91		
2	289.99	-0.48		
3	290.17	-0.31		
4	289.81	-0.66		
Ph-OEt				
1	291.59	1.12		
2	290.21	-0.27		
3	290.35	-0.12		
4	290.22	-0.26		
<i>o</i> -PHENETIDINE				
1	290.99	0.52	0.64	-0.13
2	291.33	0.85	0.64	0.21
3	289.86	-0.62	-0.58	-0.04
4	289.61	-0.86	-0.79	-0.07
5	289.70	-0.77	-0.79	0.01
6	289.75	-0.73	-0.58	-0.15
AAD ^a				0.10
<i>m</i> -PHENETIDINE				
1	291.19	0.72	0.79	-0.07
2	289.61	-0.86	-0.75	-0.12
3	291.52	1.04	0.81	0.23
4	289.58	-0.90	-0.93	0.03
5	290.01	-0.46	-0.43	-0.03
6	289.61	-0.87	-0.74	-0.13
AAD				0.10
<i>p</i> -PHENETIDINE				
1	291.20	0.73	0.65	0.07
2	289.96	-0.52	-0.60	0.08
3	290.00	-0.48	-0.58	0.10
4	291.02	0.54	0.46	0.08
5	290.00	-0.48	-0.58	0.10
6	289.96	-0.52	-0.60	0.08
AAD				0.09

a. Average absolute deviation

$$\Delta\text{CEBE}(\text{X-Ph-Y}) = \Delta\text{CEBE}(\text{Ph-X}) + \Delta\text{CEBE}(\text{Ph-Y}) + \text{MIE} \quad (4)$$

$$\Delta\text{CEBE}(\text{SMS}) = \Delta\text{CEBE}(\text{Ph-X}) + \Delta\text{CEBE}(\text{Ph-Y}) \quad (5)$$

Eq.5 defines sum of mono substituted (SMS) CEBE shift. If MIE=0, one gets $\Delta\text{CEBE}(\text{X-Ph-Y}) = \Delta\text{CEBE}(\text{SMS})$. According to Eq.4, we can express ΔCEBE s of six ring carbons of *o*-phenetidine, for instance, by following six equations:

$$C_1 = C_{1'} + C_{2''} + \text{MIE}_1 \quad (4.1)$$

$$C_2 = C_{2'} + C_{1''} + \text{MIE}_2 \quad (4.2)$$

$$C_3 = C_{3'} + C_{2''} + \text{MIE}_3 \quad (4.3)$$

$$C_4 = C_{4'} + C_{3''} + \text{MIE}_4 \quad (4.4)$$

$$C_5 = C_{3'} + C_{4''} + \text{MIE}_5 \quad (4.5)$$

$$C_6 = C_{2'} + C_{3''} + \text{MIE}_6 \quad (4.6)$$

In Table 5, $\Delta\text{CEBE}(\text{SMS})$ s and MIEs corresponding to the Eq. 4.1 to 4.6 are listed in the columns denoted as $\Delta\text{CEBE}(\text{SMS})$ and MIE for *o*-phenetidine. In a similar manner, $\Delta\text{CEBE}(\text{SMS})$ s and MIEs for *m*-phenetidine and *p*-phenetidine were calculated and listed in this table.

The value of MIE at C_5 in *o*-phenetidine (Figure 1 A) is 0.01eV. This indicates that mutual interference between the two substituents is almost zero. It may be that the substituent effect of X diminishes that of Y. MIE is as large as 0.21 eV at C_2 in the molecule. This implies that mutual interference between the two substituents is large. MIE is ca. 0.1 eV at every carbon atom in the ring of *p*-phenetidine indicating uniform mutual interference effect of the two substituents. This may be due to a consequence of high symmetry of the molecule. Average absolute values (AAV) of MIE of *o*-phenetidine is 0.10 eV. AAVs for *m*-phenetidine and *p*-phenetidine are 0.10 and 0.09 eV respectively. We conclude that average absolute value of MIE in phenetidines is ca. 0.1eV.

Non-Resonant X-ray Emission

Non-resonant X-ray emission is the result of a valence electron dropping to a core-hole. The energy of the X-ray emission is simply the difference between VEIE(listed in Table 3) and CEBE (listed in Table 5). Table 6 lists some calculated energies, in eV, of the X-ray emission for aniline and phenetidines. Only those that originate HOMO, HOMO-4, HOMO-8 are listed in the table for the sake of brevity. Experimentally, the X-ray emission is related to near edge X-ray absorption fine structure (NEXAFS).

Table 6. Some calculated none-resonant X-ray emission spectra, in eV, of aniline and phenetidines.

Atom	NEXAFS		
	HOMO	HOMO-4	HOMO-8
PhNH ₂			
1	283.51	279.78	277.92
2	282.11	278.39	276.53
3	282.29	278.56	276.70
4	281.93	278.20	276.35
<i>o</i> -PHENETIDINE			
1	283.77	280.51	278.76
2	284.10	280.85	279.10
3	282.63	279.38	277.63
4	282.39	279.14	277.38
5	282.48	279.22	277.47
6	282.53	279.27	277.52
<i>m</i> -PHENETIDINE			
1	283.74	280.78	279.12
2	282.16	279.20	277.54
3	284.07	281.10	279.44
4	282.13	279.17	277.50
5	282.56	279.60	277.94
6	282.16	279.20	277.54
<i>p</i> -PHENETIDINE			
1	284.10	280.74	279.15
2	282.86	279.49	277.91
3	282.90	279.53	277.95
4	283.92	280.55	278.97
5	282.90	279.53	277.95
6	282.86	279.49	277.91

Conclusion

PW86x-PW91c, is the best XC functional among the eight functionals tested for TDDFT calculation of singlet excitation energy of the substituted anilines. Using the XC functional, average absolute deviation from experiment is 0.223 eV for the eighteen cases with the maximum absolute deviation of 0.932 eV which resulted from *m*-nitroaniline (Table 1). The largest AAD among the eight is 0.298 eV, which resulted from OLYP. Large errors are registered in the three isomers of nitroanilines with all the eight XC functional tested. If the nitroanilines are excluded in the statistics, AADs drop to ca.0.15 eV. Valence electron ionization energies of the substituted benzenes were calculated by the Δ SCF method with PW86x-PW91c. AAD evaluated from eight cases is 0,21 eV which is close to the corresponding value obtained for the calculation of the excitation energy. CEBEs and Δ CEBEs of *o*-, *m*-, and *p*-phenetidines and related mono substituted benzenes were calculated. Δ CEBE(SMS), sum of mono substituted (SMS) CEBE shift and mutual interference effect (MIE) were defined and their values were

calculated. The magnitude of MIE provides the degree of mutual interference between the two substituents. Average absolute value of MIE is ca. 0.1 eV for the three isomers. Using the calculated valence electron ionization energies and the core electron binding energies of one of the phenetidines, some X-ray emission energies were calculated.=

The numbers of cases used to evaluate the AADs, 0.223 eV for the valence electron single excitation energies and 0.21 eV for valence electron ionization energies of the substituted anilines are seventeen and eight, respectively. These numbers of the cases are rather limited. The conclusions obtained based upon these numbers may not be very general. However, it is interesting to observe that the values of our two AADs, 0.223 and 0.21 eV, are very close to 0.25 eV that is the AAD obtained by the benchmark study of singlet excitation energies using a very extended set of organic molecules.

Acknowledgements

We thank Dr. José Luis de Souza Pio of Amazonas State University. YT expresses his gratitude to Dr. Delano P. Chong for sending a preprint of his work on calculation of transition energies of *p*-nitroaniline. The authors acknowledge Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) of Brazil for research fellowships, 304751/2006-5 for YT and 302440/2005-4 for ADSM. ADSM also thanks Ministério da Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq) for financial support from (553292/2005-6, CT/AMAZÔNIA/MCT/CNPq).

References and Notes

- [1] Jacquemin, D.; Wathelet, V.; Perpète, E. A. Adamo, C. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 2420.
- [2] Vydrov, O. A.; Scuseria, G. E. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 234109.
- [3] Weintraub, E.; Henderson, T.M.; Scuseria, G. E. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 754.
- [4] Mirashi, P. L. S.; Varkhede, R. S.; Kunte, R. S. *Indian J. Pure & Appl. Phys.* **1990**, *28*, 565.
- [5] Jana, P.; Ganguly, P. *Spectrochimica Acta*, **1993**, *49A*, 1515.
- [6] Klasinc, L.; Kovač. B.; Güsten, H. *Pure & Appl. Chem.* **1983**, *55*, 289.
- [7] Takahata, Y. *Int. J. Quantum Chem.* **2008**, *108*, 2326.
- [8] Takahata, Y.; Marques, A.M.; Custodio, R. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theochem.2009.09.015>
- [9] Frisch, M. J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.G.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Keith, T.A.; Peterson, G.A.; Montgomery, J.A.; Ragavachari, K. ; Al-Laham, M.A.; Zakrzewski, V.G.; Ortiz, J.V.; Foresman, J.B.; Cisolwsi, J.; Stefanov, B.B.; Nanayakkara, A.; Peng, C.Y.; Ayara, P.Y.; Chen, W. ; Wong, M.W. ; Andres, J.L.; Replogle, E.S; Gomperts, .R. ; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Binkley, J.S. ; Defrees, D.J; Baker, J.; Stewart, J.P; Head-Gordon, .M.; Gonzalez, C.; Pople, J.A. Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA,

1995. Gaussian 03, Revision B.05, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.
- [10] ADF Program System, release 2004.01: see <http://www.scm.com>.
- [11] Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098.
- [12] Perdew, J. P. *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8822.
- [13] Perdew, J. P.; Chevary, J. A.; Vosko, S. H.; Jackson, K. A.; Pederson, M. R.; Sing, D. J.; Fiolhais, C. *Phys. Rev. B* **1992**, *46*, 6671.
- [14] Adamo, C.; Barone, V. *J. Chem. Phys.* **1996**, *116*, 5933.
- [15] Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3865.
- [16] Perdew, J. P.; Wang, Y. *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8800.
- [17] Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
- [18] Handy, N. C.; Cohen, A. J. *Mol. Phys.* **2001**, *99*, 403.
- [19] van Leeuwen, R.; Baerends, E. J. *Phys. Rev. A* **1994**, *49*, 2421.
- [20] Schipper, P. R. T.; Gritsenko, O. V.; van Gisbergen, S. J. A.; Baerends, E. J. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 1344.
- [21] Gritsenko, O. V.; Schipper, P. R. T.; Baerends, E. J. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *302*, 199.
- [22] Takahata, Y.; Chong, D. P. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2003**, *133*, 69.
- [23] Perdew, J. P.; Wang, Y. *Phys. Rev. B* **1992**, *45*, 13244.
- [24] Chong, D. P. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 1842.
- [25] Ohta, T.; Fujikawa, T.; Kuroda, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, *48*, 2017.

Assessment of genetically modified soybean crops and different cultivars by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis

Glauca Braz Alcantara^{a*}, Andersson Barison^b, Maiara da Silva Santos^c, Luís P. S. Santos^d, José F. F. de Toledo^e and Antonio Gilberto Ferreira^c

^aInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, P.O. Box 131, CEP 74001-970, Goiânia/GO, Brazil.

^bDepartamento de Química, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-990, Curitiba/PR, Brazil.

^cDepartamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, P.O. Box 676, CEP 13565-905, São Carlos/SP, Brazil.

^dCentro Federal de Educação Tecnológica do Maranhão, Av. Getúlio Vargas, 04, CEP 65030-000, São Luis/MA, Brazil.

^eEmbrapa Soja/Embrapa, Rod. Carlos João Strass, P.O. Box 231, CEP 86001-970, Londrina/PR, Brazil.

Received: 04 February 2010; revised: 29 March 2010; accepted: 29 March 2010.
Available online: 03 June 2010.

ABSTRACT: This paper describes the potentiality of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy associated to chemometric analysis for assessment of conventional and genetically modified soybean crops. Recently, genetically modified organisms have been queried about their influence on the environment and their safety as food/feed. In this regard, chemical investigations are ever more required. Thus three different soybean cultivars distributed in transgenic Roundup ReadyTM soybean and their conventional counterparts were directly investigated by FT-IR spectroscopy and chemometric analysis. The application of PCA and KNN methods permitted the discrimination and classification of the genetically modified samples from conventional ones when they were separately analysed. The analyses showed the chemical variation according to genetic modification. Furthermore, this methodology was efficient for cultivar grouping and highlights cultivar dependence for discrimination between transgenic and non-transgenic samples. According to this study, FT-IR and chemometrics could be used as a quick, easy and low cost tool to assess the chemical composition variation in genetically modified organisms.

Keywords: soybean; FT-IR; chemometrics; transgenic; genetically modified organisms

Introduction

* Corresponding author. E-mail: glabraz@quimica.ufg.br

Modified organisms, such as agricultural crops, have usually been developed for various purposes, including resistance to pests, herbicides or harsh environmental conditions, improved product shelf life and increased nutritional value [1, 2]. Whereas the use of genetically modified (GM) organisms has seen a great increase in agriculture and food science, their cultivation and commercialization have caused an enormous public debate [3]. The acceptance of new food technologies, especially of genetically modified foods, has recently attracted much attention in research, principally because food authentication is a constant concern of consumers and the food industry [4].

Due to improved production and lower agrochemical use, the supporters defending transgenic cultivars claim that they are more beneficial than the original ones and are substantially equivalent in chemical composition to non-transgenic cultivars. On the other hand, opponents to transgenic cultivars maintain that their cultivation involves many risks, such as potential allergenicity due to novel protein expression and transference of antibiotic resistance from marker genes, etc [5]. Moreover, although transgenic products are almost identical to the former ones, there are studies demonstrating that some variations could cause nutritional and toxicological consequences [6].

In this regard, many studies have shown that the general attitude towards the application of genetic modification in food production is negative [7-9]. GM products are commonly less well accepted than their conventional counterparts and the insurance of food composition influences the quality certification.

On the other hand, the herbicide tolerant Roundup Ready™ soybean (RR soybean) developed to improve resistance to glyphosate herbicide became commercially available in 1996 and is a successful example in commercialization of a genetically modified organism [4, 10]. Since then, several studies have described its assessment, although few papers have approached the chemical content differences between the transgenic soybean and its conventional counterparts, such as the detection and separation of RR soybeans from conventional soybeans using some chemometric models and near-infrared spectroscopy (NIR) [11, 12] or Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (FT-IR-PAS) [13].

GM products contain an additional trait encoded by an introduced gene(s), which generally produces additional protein(s) that confers the trait of interest. Raw material (e.g. grains) and processed products (e.g. foods) derived from GM crops might thus be identified by testing for the presence of introduced DNA, or by detecting expressed novel proteins encoded by the genetic material [14]. However, other methods have been developed about chemical evaluation and detection of genetically modified organisms in food crops, such as corn/maize [15, 16] and tomatoes [17-20].

Amongst the diverse techniques applied for food evaluation, direct investigations applied to intact samples can be presented as a great alternative. In this context, Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy can be a useful analytical technique which reduces the drawbacks connected to sample pretreatment, such as extraction, purification and the time rate for the analysis. Moreover, FT-IR spectroscopy and chemometric analysis have been demonstrated as a relevant application in highly similar matrices [21]. Both have been much used in food quality control, mainly to detect adulteration and/or geographical origin in manufactured products including wine, honey and apple juices [22]. On the other hand, FT-IR spectroscopy is a well established technique that provides highly specific molecular information of a wide range of compounds used in different fields. Recently, FT-IR technique has also been used to distinguish transgenic from conventional products [18]. FT-IR spectrometers are not precise enough to detect compounds at the DNA concentration level, though spectral differences caused by structural changes accompanying the genetic modification might be measurable [11]. Furthermore, a combination of spectroscopy and chemometric methods, adopted in order to handle the overwhelming size and complexity of data, can highlight the chemical differences between samples and provide quantitative and qualitative information [23].

Therefore, the objective of this study is to use FT-IR spectroscopy and chemometrics to distinction between different cultivars of genetically modified and conventional soybean crops. Furthermore, this report describes a simple and efficient method to provide information on the differences in chemical composition between conventional and genetically modified soybeans.

Material and Methods

Samples

Three different soybean cultivars A (BRS 133), B (BRS 134) and C (EMBRAPA 59), comprising the genetically modified (GM) version and its respective conventional version (CV), were analyzed. Both GM and CV versions of each cultivar were obtained from Embrapa Soybean (Brazilian Corporation for Agricultural Research – Soybean Center). The genetic modification of all transgenic samples was executed to induce the improvement in resistance to Roundup™ herbicide (transgenic soybean variety tolerant to glyphosate).

The soybean plants were cultivated in pairs in an experimental greenhouse, with exactly the same environmental conditions to ensure that all alterations observed were related to the genetic modification and not to any other factors. Besides, it has been demonstrated that plants cultivated at different conditions could be discriminated by

chemometric analyses [24]. The dry seeds were harvested and powdered in a mortar after the removing the pericarp. No other sample manipulation was carried out for spectroscopic analysis.

FT-IR Analysis

All FT-IR spectra were acquired with 32 scans in a Bruker Equinox/55 spectrometer in the region of 4000 to 400 cm^{-1} with a spectral resolution of 4 cm^{-1} . KBr disks were prepared using 1:99 mg powdered soybean samples and dry potassium bromide, respectively, which produced translucent pellets. Fifteen replicates from different KBr pellets, which they were arisen from the same powdered amount of seeds, were analyzed for each kind of sample.

Chemometric Analysis

Principal components analysis (PCA) is used to obtain a lower dimensional graphical representation which describes the variation in a data set. In PCA, a new set of axes are defined and constructed so that a maximum amount of variation is described in a minimum number of axes. Since it reduces the dimensions required to visualize the data, PCA is a powerful method for studying multidimensional data sets and is an excellent tool for preliminary data exploration [25]. In this study, PCA was used to examine data sets for expected or unexpected clusters, including the presence of outliers.

To perform PCA analysis, all FT-IR spectra were converted into ASCII files and were then exported to Pirouette™ (Infometrix, USA) and the bands related to water absorption (4000-3000 cm^{-1}) and noisy regions (2800-1800 cm^{-1} and 900-400 cm^{-1}) were removed from FT-IR spectra, before statistical analysis, in order to ensure that chemometric models are not based on spectral differences in these regions. Finally, PCA was performed for data exploration. After PCA, k-Nearest Neighbor (k-NN) models were constructed and applied to classify ten new samples consisting of GM and CV soybeans, using the same wavenumbers as the PCA.

Samples were analysed in two ways: differences between GM and CV soybeans (for each cultivar and all cultivars together) and between cultivars (only CV and GM, separately) were evaluated. Therefore, six data matrices $X_{m,n}$ (m =lines and n =columns) were generated for chemometric analysis: i) matrix 30x613 of "cultivar A" samples (GM versus CV); ii) matrix 30x613 of "cultivar B" samples (GM versus CV); iii) matrix 30x613 of "cultivar C" samples (GM versus CV); iv) matrix of all GM and CV cultivars 90x613; v) matrix 45x613 of different CV cultivars and finally, vi) matrix 45x613 of different GM cultivars.

Results and Discussion

Spectral data for multivariate analysis

The FT-IR spectra of genetically modified soybean crops (GM) and their unmodified controls (conventional, CV) presented high similarity without any pronounced differences. An example of FT-IR spectra of the GM and CV samples is reported in Fig. 1. FT-IR spectral data essentially displayed signals of soybean oil, phospholipids and proteins (Fig. 1). According to the literature, phospholipids and triglycerides have shown a high spectral overlapping in FT-IR spectra due to their high molecular similarity [26]. Therefore, as FT-IR analyses were performed from the intact material (without any sample pre-treatment), the compound derivatives of soybean oil (triglycerides and phospholipids) and proteins were detected.

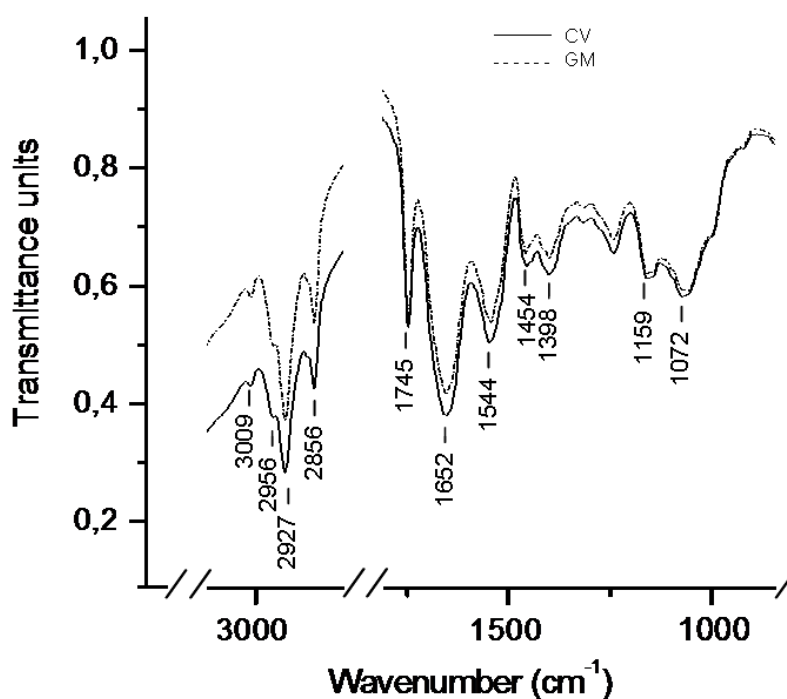


Figure 1. FT-IR spectral profile of conventional (CV) and genetically modified (GM) soybean samples with assignment of absorption bands.

FT-IR spectra showed intense bands which correspond to phospholipids: alkane bands corresponding to symmetric CH_2 , asymmetric CH_2 , asymmetric CH_3 stretching and CH_2 scissoring vibrational modes at 2856, 2927, 2956 and 1454 cm^{-1} , respectively; carbonyl stretching vibration, located at 1745 cm^{-1} ; and the highly overlapped PO_2^- and P-O-C infrared active vibrations centered around 1544 and 1072 cm^{-1} . On the other hand, several bands were attributed as soybean oil spectrum (triglycerides) including the carbonyl C=O stretching band at 1745 cm^{-1} , the C=C stretching vibration at 1652 cm^{-1} and the CH_2 and CH_3 scissoring vibrations at 1454 and 1398 cm^{-1} , and the intense C-O stretching bands at 1159 and 1072 cm^{-1} . Absorption bands located at 2854, 2956 and 3009 cm^{-1} arose from symmetric CH_2 stretching and asymmetric CH_3 and CH_2 stretching,

respectively. The OH stretching vibration possibly overlapped the alkenes C-H stretching vibrations. While lipid components may show response at 1544 and 1652 cm^{-1} , the two bands in question also correspond to the well-known amide II and amide I bands, which are very strong in virtually all proteins.

All these above regions of FT-IR spectra were used in chemometric analysis.

Chemometric analysis of GM v CV soybean

Chemometric analyses of the FT-IR spectral data set from GM and CV soybean seeds were carried out to evaluate the genetic modification and its effect on the metabolic profile.

Thus PCA was performed on the four data sets of FT-IR: "cultivar A", "cultivar B", "cultivar C" and "all cultivars together". For all PCA, some preprocessing were tested and the best results were obtained when \log_{10} , multiplication by -1 and first derivative were applied to the samples. \log_{10} followed by multiplication by -1 were used to transform transmittance in absorbance spectra, and the first derivative was applied to correct some remaining baseline imperfections [27]. The variables were then mean centered and the cross validation was applied in the chemometric analysis. These conditions were used in all PCA performed in this study.

PCA of the FT-IR spectra of the "cultivar A" data set showed the separation between GM and CV seeds (Fig. 2). This analysis presented only one GM soybean replicate was allocated out of its group, it was considered an outlier and after excluding the outlier, the data were obtained with 87.48% total variance. CV soybean samples of "cultivar A" were located on the positive side of the PC2 axis while GM samples were located on the negative side of the PC2 axis. Examination of PC1 and PC2 loadings of FT-IR data indicated that this separation occurred due to spectral domains situated at about 1544 and 1652 cm^{-1} , corresponding to two bands of amide (amide II and amide I), or P-O-C and alkene C=C vibrations, respectively, suggesting a chemical variation in protein/oil soybean contents. According to the literature [1], new proteins are expected to be found in GM organisms, consequently, in Fig. 2, it was shown by this chemical variation.

PCA of "Cultivar B" showed a good distinction between GM and CV species (Fig. 3). No outliers were found in PCA analysis and the total variance was 81.45%. CV samples of "cultivar B" were located on the more positive side of the PC1 and PC2 axis, while GM soybean samples were located on the more negative side. The loadings of these FT-IR data suggested that bands of CH_3 and CH_2 stretching vibrations (at 2856, 2927, 2956 and 1454 cm^{-1}) were decisive for allocation of GM samples. Some contribution of loadings corresponding to the P-O-C bond (1544 cm^{-1}) was observed in GM and CV

separation of "cultivar B" samples. Furthermore, these vibrations may be also applied to amide of proteins. Therefore, according to this result, it was confirmed that the aliphatic chain of phospholipids/oil and protein contents were again relevant for distinction between GM and CV soybean.

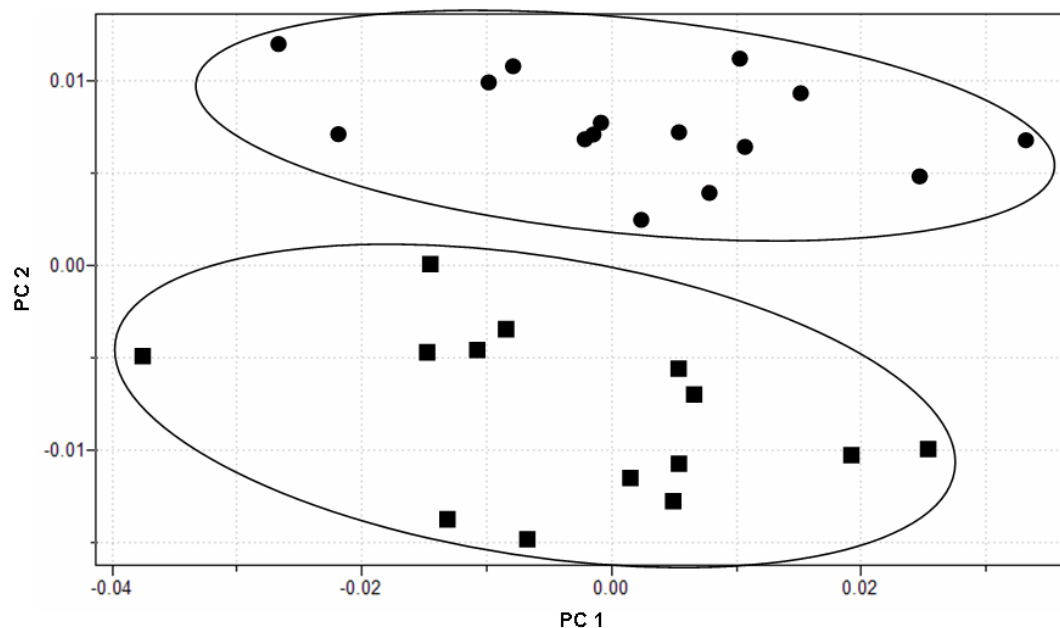


Figure 2. PCA score plot of FT-IR data from "cultivar A", showing the distinction between CV (●) and GM (■) soybean. PC1vPC2, 66.88 and 20.60%, respectively.

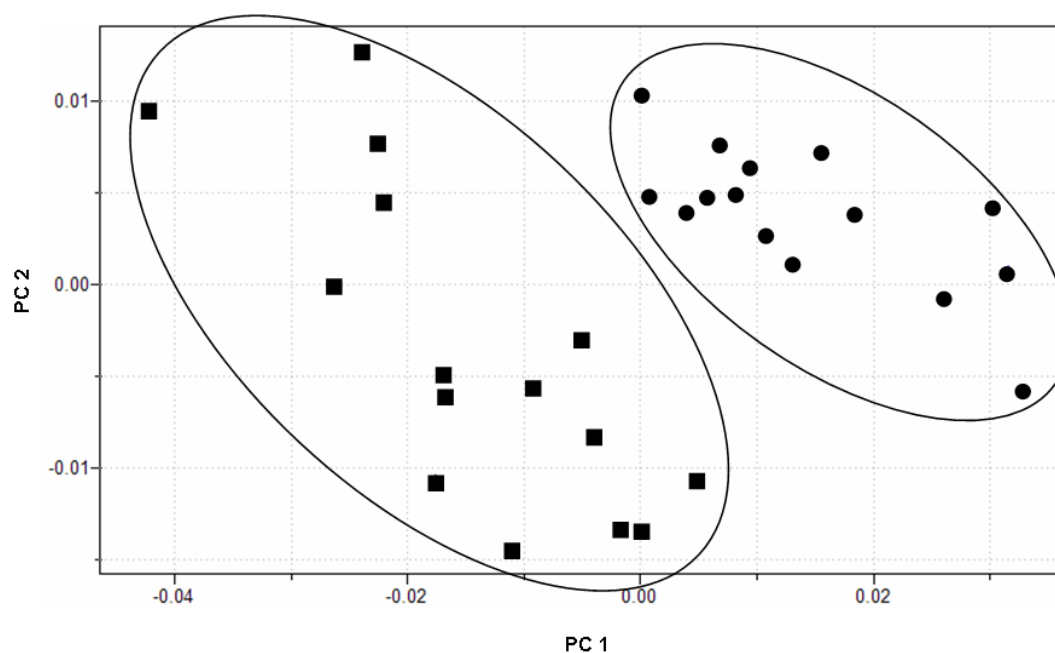


Figure 3. PCA score plot of FT-IR data from "cultivar B", showing the distinction between CV (●) and GM (■) soybean. PC1vPC2, 69.53 and 11.92%, respectively.

PCA of "Cultivar C" demonstrated a satisfactory separation between GM and CV

species (Fig. 4). This analysis showed four outliers (two CV and two GM) and after excluding the outliers, the data were obtained with 86.46% variance. Fig. 4 shows that the CV samples of "cultivar C" were located on the more positive side of the PC1 and PC2 axes, while those from GM samples were located on the more negative side of the PC1 and PC2 axes. The same discrimination profile was observed for "cultivar B". The assessment of PC1 and PC2 loadings of "cultivar C" showed the influence of absorptions at 1652 cm^{-1} (amide I) for CV samples and absorptions at 1745 and 1544 cm^{-1} (C=O and amide II, respectively) for GM samples. These results corroborated the relevant influence of protein contents for transgenic soybean distinction.

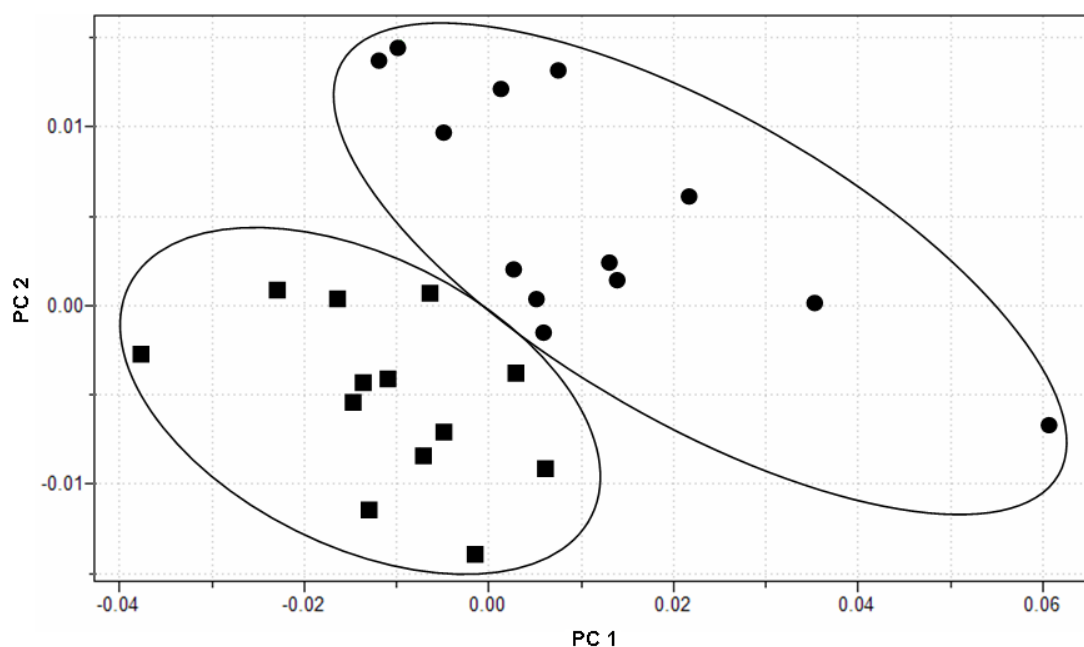


Figure 4. PCA score plot of FT-IR data from "cultivar C", showing the distinction between CV (●) and GM (■) soybean. PC1vPC2, 74.05 and 12.41%, respectively.

The three data sets described above were extremely satisfactory for discrimination between conventional (CV) and genetically modified (GM) soybean species. These interpretations could not be carried out from visual analysis of FT-IR spectra alone. Therefore, chemometric analyses were essential to this assessment.

These results are in agreement the study published by Mounts and coworkers (1996) [28], where the oils obtained from GM soybeans and non-GM soybeans showed some difference in chemical content. Nevertheless, without DNA detection, we have described the differences of protein content in GM soybean by means of FT-IR and chemometric analysis. Besides, this information can be accessed directly from intact seeds, without any sample pre-treatment.

Although soybean genetic modification was evaluated according to cultivars, a

combined analysis was also carried out. The data of all cultivars were pooled and a new PCA was run. PC1 until PC4 were investigated, better results were found to PC1xPC2 combination though. The PCA of "all cultivars together" showed some differentiation between CV and GM samples on the PC2 axis (Fig. 5). The preponderance of GM samples was observed on the more negative side of PC2, while the CV samples were observed on the more positive PC2 side. Therefore, after analysis of all cultivars together, it was inferred that the genetic modification in soybean grains was more easily detected by FT-IR and chemometric analysis when the cultivars were analyzed separately.

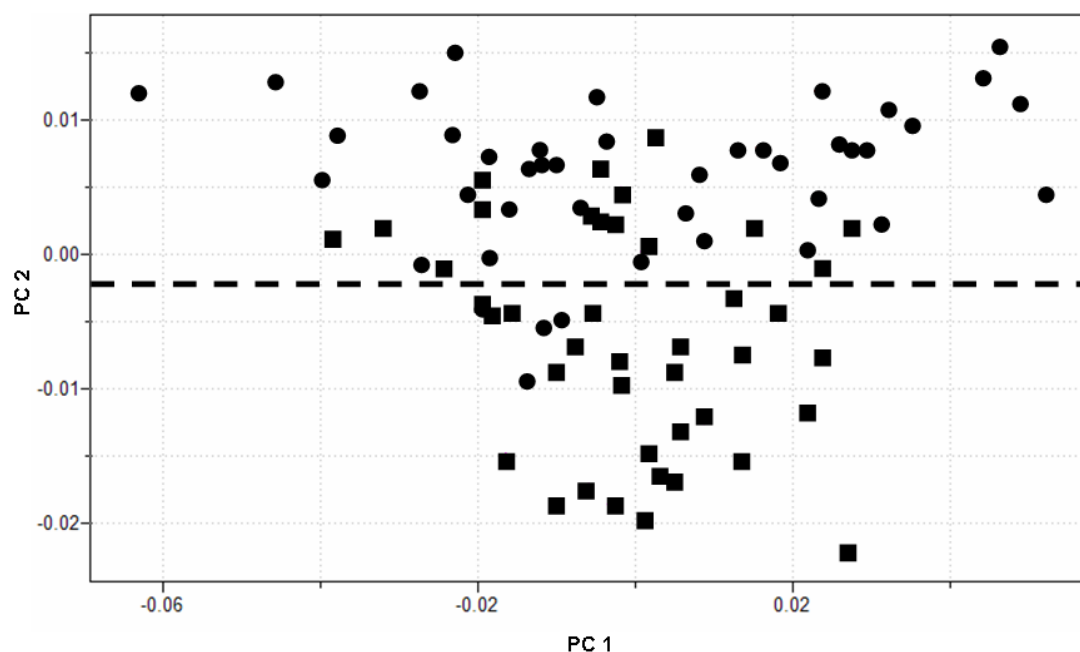


Figure 5. PCA score plot of FT-IR data from "all cultivars together", showing the distinction between CV (●) and GM (■) soybean. PC1vPC2, 71.46 and 12.58%, respectively.

Prediction of GM and CV samples was performed by the KNN method, in which an unknown pattern was classified according to the majority of the votes of its K^{th} nearest neighbors in the n -space [29]. The same preprocessing as in PCA was applied in the KNN analysis. Thus, for KNN classification, new FT-IR spectra of twenty replicates of each cultivar (ten GM and ten CV) were acquired and submitted to the KNN chemometric method. When six nearest neighbors (6-NN) were used, no prediction misses could be detected for "cultivar A" and "cultivar B". However, for "cultivar C" a single miss was found which corresponded to the GM sample. Therefore, KNN was shown to be an excellent method to predict/identify GM soybean crops, since 100% samples from cultivars A and B and 95% from cultivar C were correctly classified. However, when the different cultivars are evaluated together or in mixture, the KNN method can not be efficient to predict with exaction, according to results showed in Figure 5.

In this regard, all results demonstrated the potentiality of medium FT-IR and chemometrics for genetically modified soybean analysis, as well as the NIR spectroscopy [11, 12] and FT-IR-PAS [13].

Chemometric analysis of different soybean cultivars

A parallel investigation was performed evaluating only the soybean cultivars. Thus, FT-IR spectra from the three CV cultivars (A, B and C), and those from the three GM cultivars were separately subjected to chemometric analysis by PCA.

Comparatively, the three different CV cultivars showed a better separation in PCA scores plot (Fig. 6a) than GM cultivars (Fig. 6b). Absorptions corresponding to the phospholipid and aliphatic chain were again highlighted as loadings for this discrimination. Therefore, the genetic modification in soybean samples allowed the closeness between cultivars suggesting that cultivar discrimination through FT-IR and chemometrics may be more difficult.

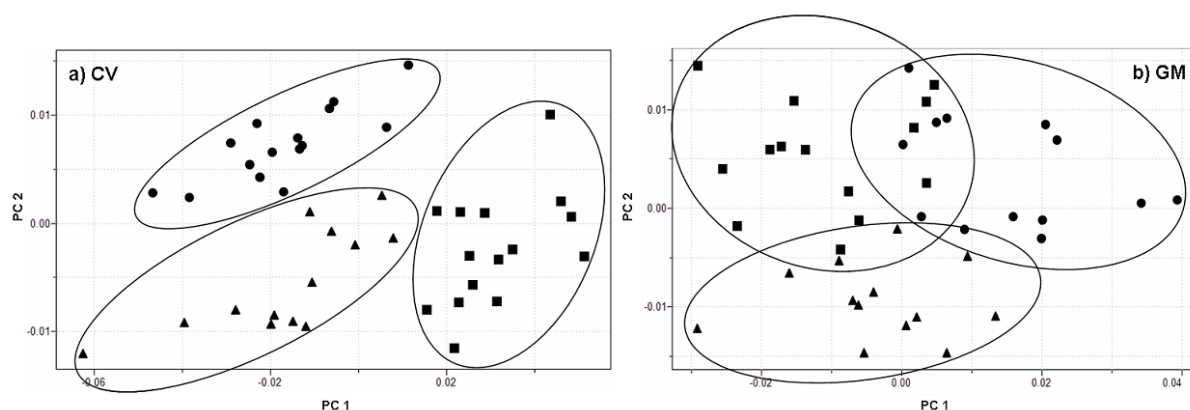


Figure 6. PCA scores plot of FT-IR data from a) CV soybean samples (PC1vPC2, 85.45 and 5.64%, respectively); and b) GM soybean samples (PC1vPC2, 60.94 and 16.76%, respectively), showing the distinction between cultivars A (●), B (■) and C (▲).

Considering de fact that transgenic and non-transgenic cultivars are different soybean varieties, the results showed above (Figure 6) were in concordance to those results about the distinction between GM and CV samples (Figures 2 to 4), when each cultivar were separately evaluated, which may be considered two different varieties of soybean.

Conclusion

In summary, FT-IR spectroscopy associated to chemometric analysis was shown to be an excellent tool to assess the chemical composition variation and to distinguish between GM and CV soybean crops. From PCA, the variations in phospholipids, triglyceride and protein content were highlighted as essential for metabolic distinction

between soybean samples. The KNN method was able to recognize GM or CV samples from their FT-IR spectra, when different cultivars were separately analyzed. In addition, the simple PCA analysis of FT-IR spectra also permitted sample discrimination according to different cultivars. Therefore, due to the easy of use and low cost of this technology, FT-IR analysis and chemometric methods are very attractive tools available to be applied in analysis to get rapid answers on the evaluation and detection of genetically modified organisms, especially GM soybean.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Institutions CNPq, CAPES and FAPESP, for financial support and fellowships.

References and Notes

- [1] Gachet, E.; Martin, G. G.; Vigneau, F.; Meyer, G. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *9*, 380.
- [2] García-Villalba, R.; Leon, C.; Dinelli, G.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Garcia-Cañas, V.; Cifuentes, A. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1191*, 164.
- [3] König, A.; Cockburn, A.; Crevel, R. W. R.; Debruyne, E.; Grafstroem, R.; Hammerling, U.; Kinber, I.; Knudsen, I.; Kuiper, H. A.; Peijnenburg, A. A. C. M.; Penninks A. H.; Poulsen, M.; Schauzu, M.; Wal, J. M. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 1047.
- [4] James, D.; Schmidt, A.; Wall, E.; Green, M.; Masri, S. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5829.
- [5] Phipps, R. H.; Beever, D. E. *J. Anim. Feed Sci.* **2000**, *9*, 543.
- [6] Aumaitre, A.; Aulrich, K.; Chesson, A.; Flachowsky, G.; Piva, G. *Livest. Prod. Sci.* **2002**, *74*, 223.
- [7] Tenbült, P.; De Vries, N. K.; van Breukelen, G.; Dreezens, E.; Martijn, C. *Appetite* **2008**, *51*, 129.
- [8] Saba, A.; Vassallo, M. *Food Qual. Pref.* **2002**, *13*, 13.
- [9] Bredahl, L. *J. Consum. Policy* **2001**, *24*, 23.
- [10] Eapen S. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 162.
- [11] Roussel, S. A.; Hardy, C. L.; Hurburgh, C. R.; Rippke, G. R. *Appl. Spectrosc.* **2001**, *55*, 1425.
- [12] Alishahi, A.; Farahmand, H.; Prieto, N.; Cozzolino, D. *Spectrochim. Acta, Part A* **2010**, *75*, 1.
- [13] Caires, A. R. L.; Teixeira, M. R. O.; Suárez, Y. R.; Andrade, L. H. C.; Lima, S. M. *Applied Spectroscopy* **2008**, *62*, 1044.
- [14] Ahmed, F. E. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 215.
- [15] Rui, Y. K.; Luo, Y. B.; Huang, K. L.; Wang, W. M.; Zhang, L. D. *Spectrosc. Spect. Anal.* **2005**, *25*, 1581.
- [16] Manetti, C.; Bianchetti, C.; Bizzarri, M.; Casciani, L.; Castro, C.; D'Ascenzo, G.;

- Delfini, M.; Di Cocco, M. E.; Laganà, A.; Miccheli, A.; Motto, M.; Conti, F. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 3187.
- [17] Le Gall, G.; Colquhoun, I.; Davis, A. L.; Collins, G. J.; Verhoeyen, M. E. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2447.
- [18] Xie, L.; Ying, Y.; Ying, T. *J. Food Eng.* **2007**, *82*, 395.
- [19] Xie, L.; Ying, Y.; Ying, T. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4645.
- [20] Xie, L.; Ying, Y.; Ying, T.; Yu, H.; Fu, X. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *584*, 379.
- [21] Alcantara, G. B.; Honda, N. K.; Ferreira, M. M. C.; Ferreira, A. G. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *595*, 3.
- [22] Reid, L. M.; O'Donnell, C. P.; Downey G. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 344.
- [23] Michelini, E.; Simoni, P.; Cevenini, L.; Mezzanotte, L.; Roda, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 355.
- [24] Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B. *Chemometrics: A Practical Guide*, 1st ed. New York: John Wiley & Sons, 1998.
- [25] Bailey, N. J. C.; Oven, M.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Zenk, M. H. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 851.
- [26] Kuligowski, J.; Quintás, G.; Esteve-Turrillas, F. A.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1185*, 71.
- [27] Pirouette™, *Multivariate Data Analysis, Pirouette User Guide*, version 3.11. Infometrix Inc., Woodinville, 2003.
- [28] Mounts, T. L.; Abidi S. L.; Rennick, K. A. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 581.
- [29] Kowalski, B. R.; Bender, C. F. *Anal. Chem.* **1972**, *44*, 1405.

Review

Ensaio analítico baseado em quimiossensores cromogênicos e fluorogênicos para a detecção de cianeto

Vanderléia Gava Marini, Lizandra Maria Zimmermann e Vanderlei Gageiro Machado*

Departamento de Química, Universidade Regional de Blumenau, CP 1507, Blumenau, SC, Brasil, 89010-971.

Received: 21 November 2009; revised: 14 March 2010; accepted: 05 April 2010.
Available online: 29 April 2010.

Analytical assays based on chromogenic and fluorogenic chemosensors for the detection of cyanide

ABSTRACT: Cyanide (CN^-) is an anion well-known for its toxicity, being a chemical agent often related to cases of homicide and suicide. Despite being responsible for the toxicity of many animals and plants, it is used in several industrial activities, with innumerable implications in terms of the environment. Due to its high toxicity, the maximum level of CN^- concentration allowed by the World Health Organization in potable water is $1.7 \mu\text{mol/L}$. This low concentration limit requires methods of visual detection and quantitative determination which are ever more sensitive, simple, reliable, and economical. Advancements in the field of chromogenic and fluorogenic chemosensors for anionic analytes have led to the development of several methodologies for the detection of CN^- . Therefore, this review aims to present the main strategies that have been used in the study of quantitative and naked-eye detection of CN^- by means of chromogenic and fluorogenic chemosensors. Aspects related to CN^- , such as its reactivity, toxicity, applications, and implications in different domains of knowledge, are presented. Recent work involving the development of chemosensors for CN^- based on acid-base reactions, chemodosimeters, chromoreactants, and competition assays is also described. In addition, recent studies that make use of nanotechnology to develop strategies for the detection of CN^- are also discussed, as well as the prospects envisioned in this field.

Keywords: cyanide; supramolecular analytical chemistry; chemosensors

Introdução

Nos últimos anos, uma larga variedade de quimiossensores, baseados na química

* Corresponding author. E-mail: gageiro@furb.br

supramolecular e em ferramentas nanotecnológicas, tem sido desenvolvida com o intuito de solucionar problemas analíticos ligados à detecção visual e quantitativa de diferentes espécies químicas com importância em diversas áreas, tais como em processos químicos, industriais, em ciências biomédicas e do meio ambiente [1–19]. A concepção de um quimiossensor para uma determinada espécie química a ser analisada fundamenta-se no estudo de uma unidade receptora adequada, ligada por meio de um espaçador, ou interagindo por meio do uso de alguma estratégia não-covalente, a uma unidade sinalizadora. Enquanto na unidade receptora ocorre o reconhecimento do analito-alvo, o sítio de sinalização é responsável pela detecção da espécie reconhecida. Se o sítio de sinalização é um grupo cromóforo, verifica-se que a complexação do analito à unidade receptora do quimiossensor perturba a unidade cromofórica, causando uma alteração no sinal óptico original, ou seja, uma mudança de coloração na solução. Essa mudança permite assim a detecção visual e mesmo quantitativa da espécie que se deseja analisar. Caso a unidade sinalizadora seja um fluoróforo, o analito, ao se ligar ao quimiossensor modificará a sua capacidade para fluorescer.

A utilização de estratégias analíticas para a detecção de analitos por meio de quimiossensores cromogênicos vem sendo extensivamente utilizada por causa da simplicidade, confiabilidade e do baixo custo da técnica empregada enquanto os quimiossensores fluorogênicos apresentam também a vantagem adicional de permitirem a detecção quantitativa de analitos em concentrações bastante reduzidas. Assim, a ampla variedade de estratégias que vem sendo investigada tem permitido a detecção de analitos em diferentes situações, tais como: (a) de intermediários-chave em processos catalíticos; (b) de poluentes ambientais; (c) de espécies biologicamente relevantes para seu monitoramento na corrente sanguínea; (d) na sinalização de eventos bioquímicos e para o acompanhamento de espécies em tempo real; e (e) no controle de qualidade de bebidas e de alimentos.

A área dos quimiossensores tem recebido uma influência muito forte da química supramolecular [20], que pode ser definida como a química dos sistemas informados [21, 22], e tem por base os estudos, inspirados em processos biológicos, que vêm sendo explorados sistematicamente desde o fim da década de sessenta sobre os complexos do tipo receptor-substrato. A área faz ainda bastante proveito de outra vertente supramolecular que tem interessado a muitos grupos de pesquisa na atualidade, que envolve a noção de que é possível a construção em escala molecular e nanométrica de dispositivos moleculares e supramoleculares que apresentam aptidão para executar uma série de funções. Assim, a síntese orgânica pode ser empregada como ferramenta para a formação de blocos de construção moleculares que encerram em sua estrutura a informação necessária para o exercício de várias funções integradas, as quais no presente caso envolvem não apenas o reconhecimento de uma espécie (ou mesmo o

reconhecimento simultâneo de várias espécies), como ainda, em seguida, a um evento de sinalização da(s) espécie(s) que se deseja(m) detectar. O enorme interesse atual por esse campo do conhecimento levou, recentemente, Anslyn a cunhar o termo “Química Analítica Supramolecular” [23], o qual abrangeria todo o corpo de conhecimento que envolve a pesquisa por dispositivos que interagem seletivamente com um determinado analito, simultaneamente à mudança em um sinal óptico (Figura 1).

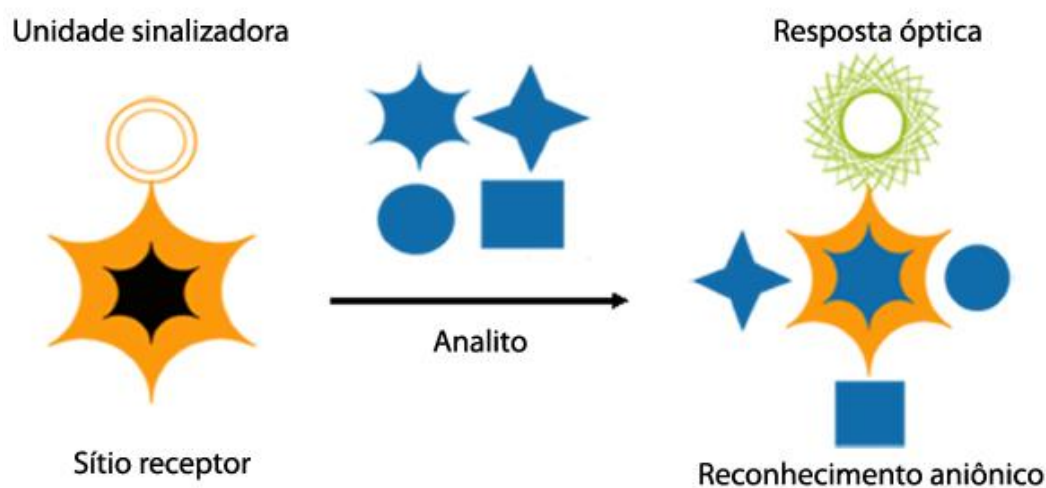


Figura 1–Representação geral para o funcionamento de um quimiossensor cromogênico ou fluorogênico.

Dentre os diversos analitos-alvo para os quais os métodos de análise fundamentados em quimiossensores têm sido planejados, merece destaque as espécies aniônicas, devido à sua importância para os mais diversos campos de conhecimento. A química do reconhecimento e detecção dos ânions começou a ser desenvolvida sistematicamente em anos recentes, muito tempo após os estudos pioneiros relativos aos estudos similares relacionados com os cátions. São diversas as razões que podem ser apontadas e todas elas remetem para a maior complexidade da química dos ânions, tais como a sua topologia mais complexa, pois diferentemente da maioria dos cátions comumente encontrados, os ânions podem apresentar as mais variadas geometrias. Muitas espécies aniônicas dependem do pH para existirem (por exemplo: HSO_4^- e SO_4^{2-} ; HCO_3^- e CO_3^{2-} ; H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} e PO_4^{3-}). Merece ser salientado que os receptores que vêm sendo classicamente planejados para os cátions não puderam ser empregados como receptores para os ânions, o que levou e tem levado os grupos de pesquisa da área a um esforço maior no planejamento de receptores adequados para as diferentes classes de ânions.

O íon cianeto (CN^-) é um ânion bastante reconhecido pela sua toxidez, a qual o

transformou em um agente químico bastante empregado pelos vilões em livros de literatura policial, além de compor o cenário de capítulos trágicos da História, tais como durante a Segunda Guerra Mundial, quando foi empregado nos assassinatos em campos de concentração. Encontra-se presente em muitos dramas pessoais, em casos de morte por homicídio e suicídio. A sua letalidade levou vários estados norte-americanos a adotá-lo para a execução de criminosos nas câmaras de gás. Além de ser responsável pela toxidez de muitas plantas e animais, ele é utilizado em inúmeras atividades industriais, naturalmente com inúmeras implicações ao meio ambiente.

Devido à alta toxicidade do CN^- , o limite de concentração permitido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é de $1,7 \mu\text{mol/L}$ de CN^- no abastecimento de água potável [24]. Os baixos limites exigidos demandam métodos de detecção e determinação cada vez mais sensíveis. Desde a metade do século passado, têm sido propostos e testados muitos métodos analíticos para a determinação qualitativa e quantitativa de CN^- [24]. As desvantagens são os laboriosos pré-tratamentos das amostras, a utilização de condições especiais para a reação, bem como a baixa tolerância para a presença de outros ânions. Além disso, a maioria desses métodos é demorada e necessita de laboratórios bem equipados [24]. Os testes mais recentes para a detecção de CN^- usam a técnica da voltametria, fundamentada na reação que acontece no eletrodo, com a oxidação do mercúrio e a formação imediata de um íon solúvel. Assim, uma onda voltamétrica é obtida com uma corrente de difusão proporcional à concentração do CN^- [25]. Também já são conhecidos testes com respostas colorimétricas baseados em reações de CN^- na presença de formadores de quelatos para gerar, com ácido pícrico e em sistemas fechados para evitar erros por perdas de ácido cianídrico, um complexo colorido que pode ser medido espectrofotometricamente [26]. Mesmo aparelhos medidores de CN^- podem ser encontrados, tais como fotômetros eletrônicos, baseados em um método clássico da piridina-pirazolona disposto no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, pelo qual a reação entre o reagente e o CN^- produz uma coloração azul. A resposta óptica é então detectada por uma fotocélula e traduzida quantitativamente no visor, de modo prático e rápido, em concentrações dadas em mg/L [27]. No entanto, as pesquisas na área de detecção aniônica têm contribuído para o aprimoramento das técnicas de modo a se tornarem cada vez mais práticas, com um número reduzido de equipamentos, de mais baixo custo e confiáveis do ponto de vista analítico.

O presente trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão das principais estratégias que vêm sendo utilizadas para a detecção visual e quantitativa de CN^- no campo dos quimiossensores cromogênicos e fluorogênicos. Serão apresentados trabalhos recentes envolvendo a área dos quimiossensores baseados em reações do tipo ácido-base, quimiossímetros, cromorreagentes e em ensaios de competição. Estudos recentes

que façam uso da nanotecnologia para a montagem de estratégias de detecção para o ânion também serão abordados, assim como as perspectivas para a área. A seguir, serão traçadas considerações sobre aspectos do ânion CN^- , tais como a sua reatividade, toxidez, aplicações e implicações em diferentes áreas.

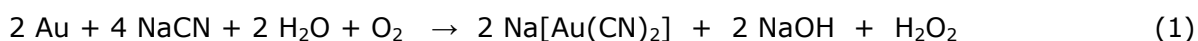
O cianeto: toxidez, ocorrência, aplicações e implicações

O ser humano, no seu dia-a-dia, está exposto a baixas concentrações de CN^- . A exposição a esse ânion, em baixas concentrações, pode acontecer pela ingestão de alimentos cianogênicos e pela inalação da fumaça do cigarro ou proveniente da queima de alguns plásticos [28]. Por exemplo, a concentração de CN^- no sangue total é aproximadamente 2,5 vezes maior, em média, nos fumantes do que em não-fumantes [29]. Os efeitos combinados do CN^- e do monóxido de carbono, formados em incêndios, contribuem para a hipóxia tecidual por diferentes mecanismos, sendo as principais causas de mortes em vítimas de incêndios [29]. Uma vez que a exposição ao CN^- é inevitável, muitos organismos vivos, incluindo o ser humano, desenvolveram vias metabólicas que lhes permitem fazer a desintoxicação dessa espécie química [29]. A eliminação do CN^- pode ocorrer pela sua detoxificação ao ser metabolizado no fígado, por meio da sua transformação em tiocianato, em presença da enzima rodanase. O tiocianato formado é menos tóxico, sendo eliminado por via renal com um tempo de meia-vida de eliminação de 2,5 dias em pacientes com função renal normal [28]. Outra via de menor metabolização envolve a ligação do CN^- à hidroxocobalamina para formação da cianocobalamina (vitamina B_{12}), que é excretada na urina. Pequenas quantidades de CN^- que ainda não foram metabolizadas podem ser excretadas pela respiração, urina e transpiração. O CN^- não metabolizado tem um odor de amêndoas amargas que às vezes é detectado no ar ou no conteúdo gástrico da vítima por envenenamento [29]. Esses mecanismos podem desintoxicar apenas quantidades pequenas de CN^- , 0,017 mg/kg do peso corporal médio por minuto [29].

A concentração de CN^- entre 0,5–3,5 mg/kg de massa corpórea é letal para os seres humanos dependendo fortemente da forma de exposição, absorção e distribuição. A sua absorção ocorre através dos pulmões, trato gastrointestinal e pela pele [24]. Com a exposição a concentrações elevadas de CN^- , ocorre hiperpnéia inicial (15 segundos após a exposição), devido ao efeito do CN^- sobre os órgãos quimiorreceptores, seguido de perda de consciência (30 segundos após a exposição). Esse quadro evolui para a apnéia (3–5 minutos após a exposição), cessação da atividade cardíaca (5–8 minutos após a exposição) e morte. Em exposição a baixas concentrações ou quantidades letais via oral ou percutânea, os efeitos são mais lentos para se desenvolver. Por exemplo, após a ingestão de uma dose letal de CN^- , o acidentado pode ter 15 a 30 minutos de tempo de sobrevivência durante o qual pode ser administrado um antídoto [29]. A razão

para a toxidez do CN^- se deve ao fato de que ele, ao ser absorvido, forma um complexo com os íons Fe^{3+} presentes no centro ativo da enzima citocromo-oxidase. A ligação do CN^- à enzima interrompe a cadeia de transporte de elétrons, o que interfere na capacidade dos tecidos para utilizar o oxigênio e, conseqüentemente, formar o trifosfato de adenosina (ATP) [28, 29]. Desse modo, o CN^- impede o bom funcionamento das mitocôndrias. Com a deficiência no mecanismo de utilização de oxigênio, as células são forçadas a recorrer ao metabolismo anaeróbico. O metabolismo aeróbico produz uma grande quantidade de ATP através da cadeia de transporte de elétrons, enquanto o metabolismo anaeróbico produz apenas uma pequena quantia, levando à redução da disponibilidade de ATP, resultando em disfunção celular e morte [29]. Assim, os tecidos com os mais elevados requisitos de oxigênio (cérebro, coração e pulmões) são os mais afetados pela intoxicação aguda [30]. O tratamento da intoxicação com o CN^- precisa ser rápido para ser eficaz. Ele é dirigido no sentido da reversão da ligação do ânion com a citocromo-oxidase com o uso de antídoto que contém nitrito de sódio, tiosulfato de sódio e nitrito de amila [28, 29], a fim de que a desintoxicação ocorra rapidamente.

O CN^- é amplamente utilizado em áreas industriais devido às suas excelentes propriedades químicas. Estima-se que anualmente sejam manufaturados mundialmente cerca de 2,6 milhões de toneladas de produtos à base de CN^- . Aproximadamente 20% da produção mundial de CN^- , ou seja, cerca de 0,6 milhões de toneladas, é utilizada na mineração. Cerca de 95% dessa parte da produção é empregada na lixiviação de ouro e prata [31]. No caso da mineração do ouro, o ânion forma um complexo estável com o metal, $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$, que é solúvel em água, de acordo com a reação representada a seguir (Eq. 1):



O ouro presente na solução pode assim ser recuperado por adsorção sobre carbono, atendendo às necessidades da metalurgia [30]. Os 5% restantes da parte empregada em mineração são utilizados em grande parte como agente depressor em operações de flotação, visando à separação de metais como cobre, chumbo, molibdênio e zinco.

A maior parte da produção mundial de CN^- , cerca de 80%, é utilizada na indústria de corantes, quelantes, tintas e pigmentos, indústrias de plásticos, fibras e detergentes, na produção de fármacos, pesticidas e herbicidas, galvanoplastia e como fumigante [29, 31].

A aplicação de CN^- na pesca, embora proibida na maioria dos países, devido aos graves impactos sobre o meio ambiente e os pescadores, ainda ocorre em muitos países [32], sendo usada para a captura de peixes vivos para serem colocados em aquários ornamentais e de restaurantes, por ser uma técnica simples e eficaz [33]. A utilização de

CN^- é extremamente destrutiva, uma vez que este íon envenena não apenas o peixe, como também todo o ecossistema dos recifes de corais. Assim, a pesca com CN^- provoca a destruição de milhares de hectares de recife de corais a cada ano [33] e, além das preocupações ambientais, essa prática também se encontra associada a um grave impacto sobre a saúde dos pescadores. Muitos deles têm sofrido de paralisia e/ou morreram em consequência dos seus esforços para perseguir peixes valiosos em águas profundas [32]. Considerando-se todas as implicações que cercam esse artifício ilegal utilizado para a pesca, os governos estão cada vez mais à procura de meios para fazer valer a legislação e regulamentar testes para a detecção de CN^- . É preciso ressaltar que a detecção do CN^- em peixes é bastante difícil, pois, uma vez incorporado pelo peixe, é rapidamente convertido em tiocianato e excretado. A meia-vida do CN^- é extremamente curta no metabolismo dos peixes. Assim, urge encontrar metodologias confiáveis e ultrasensíveis para a detecção de CN^- em peixes [33].

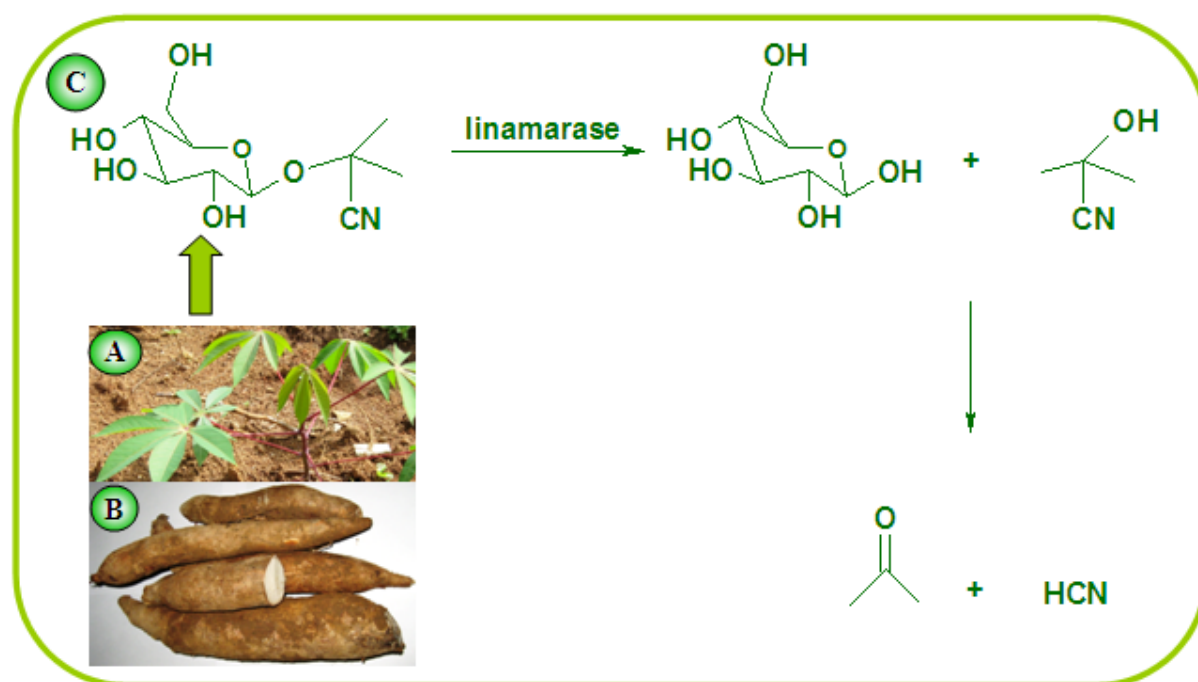


Figura 2 – Mandioca: (A) planta, (B) raízes e (C) representação esquemática para a rota de liberação do CN^- por meio da hidrólise dos glicosídeos cianogênicos presentes nas raízes.

Outro grande problema de intoxicação por CN^- está no consumo de alimentos com concentrações elevadas desse ânion. Mais de 2000 espécies têm sido demonstradas serem cianogênicas [34]. A mandioca é provavelmente a mais conhecida das plantas cianogênicas em razão de sua ampla distribuição em países tropicais, sendo o nome dado a uma planta do gênero *Manihot* largamente conhecida por apresentar raízes comestíveis [24, 35–38]. Os glicosídeos cianogênicos (linamarina e lotaustralina) presentes nos tecidos da planta, ao sofrerem hidrólise por ação enzimática da linamarase endógena ou

microbiana, liberam o ácido cianídrico [24, 39], conforme mostrado na Figura 2.

Na sua forma bruta, pode atingir concentrações de CN^- acima de 100 mg/kg [40]. As diversas variedades da planta dividem-se, de acordo com o teor de CN^- , em *M. utilissima* (aipim) e em *M. esculenta* (mandioca brava). Enquanto o aipim, por apresentar muito baixos teores de CN^- é consumido cozido ou frito, a mandioca brava é imprópria para ser consumida diretamente, podendo atingir concentrações de CN^- acima de 100 mg/kg [40] e deve ser processada a fim de remover das raízes o HCN fixado na forma de cianidrina. O seu beneficiamento leva a uma variedade importante de produtos, tais como o álcool combustível, a farinha, o polvilho, a tapioca e a fécula. A mandioca representa um alimento de importância fundamental para mais de 500 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma fonte de calorias por excelência. A mandioca também tem um excelente potencial como alimento para o gado, na indústria farmacêutica e na indústria química, na produção de materiais têxteis, madeira compensada, papel e cerveja, entre outros produtos [24, 41]. Segundo dados de 2008, o Brasil produz cerca de 26 milhões de toneladas de mandioca por ano, sendo o segundo produtor mundial, atrás da Nigéria [36]. As famílias brasileiras com faixa de renda de menos de um salário mínimo despendem em torno de 10% da despesa anual em alimentação no consumo de mandioca e seus derivados, dado esse que vem a ratificar a importância do produto para as classes de renda mais baixa [40]. Na África subsaariana, a falta de recursos para a saúde e a alimentação, a baixa escolaridade e a falta de informações em geral levam a um quadro em que a mandioca e seus derivados são os principais alimentos, fazendo com que a maioria dos problemas de saúde seja fortemente relacionada com o seu consumo [39]. As conseqüências das intoxicações por glicosídeos cianogênicos são diversas. Uma delas atinge o sistema nervoso e é chamada de neuropatia atáxica tropical (NAT), sendo observada em certas áreas da Nigéria e Tanzânia. Essa síndrome é representada por uma mielopatia, atrofia óptica bilateral, surdez bilateral e polineuropatia. Acompanhando a NAT podem ocorrer a doença de Parkinson, degeneração cerebelar, psicoses e demência [34]. Outro grande problema que é ocasionado pela intoxicação grave pelo CN^- são os surtos de uma paralisia debilitante e irreversível dos membros inferiores em crianças e em mulheres na idade fértil, que recebe a denominação de Konzo. Além disso, alguns indivíduos afetados ocasionalmente podem queixar-se de visão desfocada e, em alguns casos extremos pode sobrevir a morte [42, 43]. Esses problemas são mais observados nas regiões da África onde se concentram populações mais expostas ao CN^- veiculado pelos alimentos e com níveis sócio-econômicos mais baixos, principalmente com os grupos humanos que enfrentam quadros de desnutrição [39]. Por outro lado, nos países da América Latina, onde há grande consumo de mandioca para a alimentação humana e animal, a situação é muito diferente e mesmo nas regiões em que ocorrem bolsões de desnutrição os casos

comprovados de intoxicação por consumo de mandioca e seus derivados são raros e a sua comprovação é discutível [39].

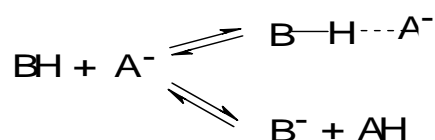
A mandioca brava precisa ser tratada por meio de uma série de etapas que envolvem o seu cozimento em água, imersão em água por longo tempo e secagem, justamente para remover o seu caráter tóxico. Realizado o procedimento, uma quantidade impressionante de resíduos é gerada, a chamada manipueira, que é um líquido de cor amarelada com alto teor de CN^- [24, 37]. Estima-se que cerca de 250 L de manipueira são gerados para cada tonelada de mandioca processada [24]. O despejo da manipueira nos rios representa um fator de poluição preocupante pela sua toxidez, levando à intoxicação de seres humanos e à morte de peixes e outros seres vivos. Assim, o desenvolvimento de metodologias simples e confiáveis de análise de CN^- ganha importantes contornos, sendo fundamental para a detecção visual e quantitativa de CN^- : (a) na raiz da mandioca, para verificar de forma simples, sem testes dispendiosos, se a mesma trata-se da mandioca mansa ou brava; (b) nos alimentos processados, tais como a farinha e a fécula, para avaliar se os alimentos produzidos são seguros para serem consumidos; e (c) na avaliação do teor de CN^- na manipueira a fim de dar um tratamento correto à mesma e também para utilizá-la de forma mais adequada, considerando-se que ela é bastante promissora, por exemplo, como inseticida, praguicida, fertilizante, na produção de vinagre, tijolos e sabão.

Normalmente, os níveis de CN^- em fontes naturais de água são insignificantes, mas o tratamento inadequado de efluentes pode representar uma fonte importante de contaminação. Assim, mais de 30 grandes emissões acidentais de efluentes contendo CN^- foram relatadas em todo o mundo desde 1975, representando uma ameaça para o meio ambiente [31, 44, 45]. No Brasil, podem ser relatados os problemas de poluição: (a) da baía de Babitonga, localizada próxima ao pólo industrial em Joinville (SC), onde indústrias de galvanoplastia descartaram efluentes com elevados teores de metais pesados e CN^- ; (b) do córrego de Jacu (MG), que foi contaminado pela lavra da Serra Luís Soares e (c) a geração de 9,0 toneladas/dia de lama contendo CN^- e metais pesados de cerca de 300 indústrias de galvanoplastia na cidade de Limeira (SP) [31].

Quimiossensores fundamentados em reações ácido-base e/ou em interações por ligações de hidrogênio

Uma importante classe de quimiossensores para o reconhecimento e detecção seletiva de ânions é baseada em interações por ligações de hidrogênio (LH) entre a unidade receptora no quimiossensor e a espécie aniônica [18, 24]. Esses quimiossensores apresentam em sua estrutura grupos doadores de prótons como OH, NH e SH, com os quais os ânions podem interagir fortemente, por transferência completa de próton, ou mais fracamente, por meio de LH, conforme ilustrado por Bioichi et al.

(Esquema 1) [46]. Em ambas as situações, a interação quimiossensor-ânion provoca mudanças de coloração ou de fluorescência que sinalizam a presença do analito. Essa estratégia de detecção faz uso das observações feitas por Steiner [47] de que os processos envolvendo LH podem ser interpretados como processos de transferência de próton incipientes e que para LH fortes essas reações encontram-se em um estado muito avançado. Considerando-se que os ânions apresentam diferentes basicidades, é razoável supor que cada ânion vá interagir de forma diferente com o quimiossensor, levando a respostas ópticas diferenciadas. É comum que nesses processos ocorra transferência de próton em duas etapas distintas, sendo que na primeira etapa ocorre a interação por LH do quimiossensor com o ânion e a partir de um segundo equivalente do ânion obtém-se a desprotonação da unidade de sinalização, constituindo a segunda etapa do processo, sendo que nesse caso são formadas espécies do tipo $[AHA]^-$, cuja formação e estabilidade têm sido relatadas por meio de estudos teóricos [48].

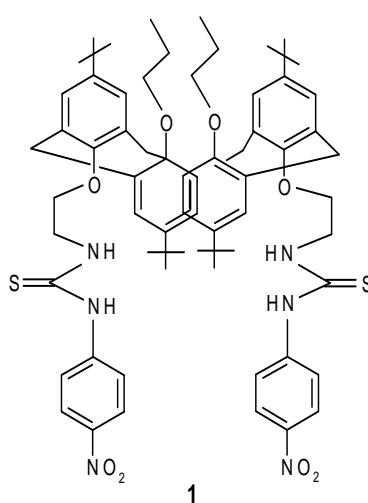


Esquema 1

Muitos dos quimiossensores para o CN^- estudados até o presente momento fazem uso de interações quimiossensor-ânion por meio de LH e, como consequência, apresentam seletividade pequena em relação a outros ânions [49]. A fim de que a seletividade seja atingida faz-se necessário que se considere a capacidade diferenciada do CN^- para interagir com o quimiossensor planejado em comparação com outros ânions, tais como sua basicidade, a sua maciez e a sua energia de hidratação. Além disso, modificações estruturais podem ser feitas no quimiossensor com o objetivo de modificar a sua acidez, o que sem dúvida alterará a sua capacidade para interagir com os ânions.

Babu et al. [50] sintetizaram o composto **1**, baseado no calix[4]areno, apresentando em sua estrutura um sítio de reconhecimento composto por quatro grupos tiouréia doadores de elétrons e dois grupos aceitadores de elétrons do tipo *p*-nitrofenil como unidades sinalizadoras. A presença dos grupos aceitadores de elétrons aumenta a acidez dos prótons nas tiouréias e, conseqüentemente, aumenta a interação com o ânion através de LH. Foi mostrado que as soluções do composto **1** em tetraidrofurano apresentam uma banda com λ_{max} em 343 nm. Quando a solução foi tratada com CN^- , apareceu uma nova banda apresentando um λ_{max} igual a 476 nm, o que corresponde ao aparecimento de uma coloração vermelha na solução. Do mesmo modo, uma nova banda apresentando $\lambda_{\text{max}} = 443$ nm foi observada no caso do ânion AcO^- , levando a solução a

apresentar uma coloração amarela. Isso indica que os ânions CN^- e AcO^- interagiram com o quimiossensor **1** de modo diferente. A capacidade de ligação de **1** com esses ânions foi investigada por meio de titulações do quimiossensor com cada ânion e acompanhando-se pela técnica de UV-vis. Com a adição do CN^- sobre a solução de **1**, o máximo de absorção em 343 nm diminuiu e surgiu uma nova banda com máximo em 476 nm, com um ponto isobéstico em 403 nm. Quando o CN^- entra em contato com o composto **1**, ocorre transferência intermolecular de próton do nitrogênio da tiouréia para o ânion. Já para o AcO^- , ao entrar em contato com o composto **1** ocorre somente formação de LH. A estequiometria pelo método de variação contínua confirma a formação de LH do complexo **1**: AcO^- , obtendo-se uma estequiometria 1:2. Com adição de água ao sistema, o quimiossensor torna-se seletivo para o CN^- [50].

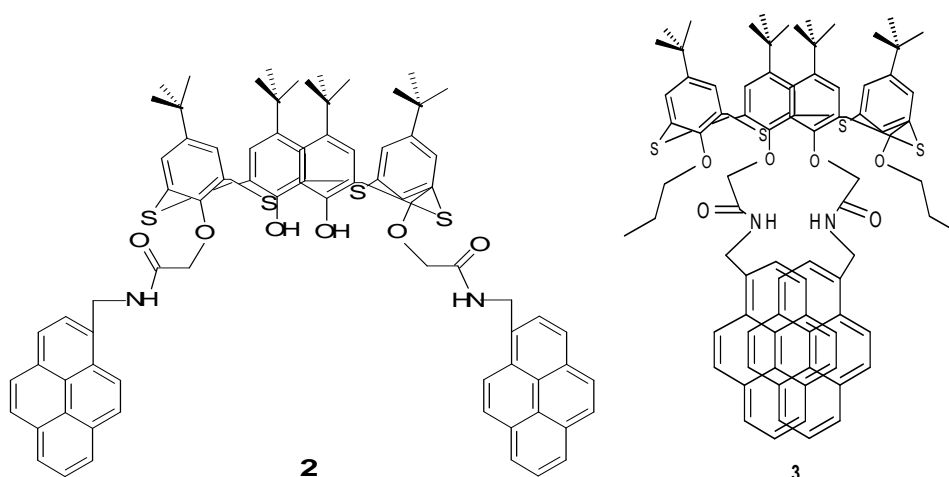


Em outro trabalho, os quimiossensores fluorogênicos **2** e **3** foram sintetizados com base no tiocalix[4]areno possuindo na estrutura o pireno como fluoróforo. Todos os experimentos foram feitos usando-se soluções dos quimiossensores em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1, v/v), para as quais foram acrescentados diferentes cátions e ânions. Dentre os vários analitos estudados, os sistemas foram capazes de detectar seletivamente o Cu^{2+} e o CN^- . Assim, os compostos **2** e **3** podem ser considerados quimiossensores fluorogênicos com potencial bifuncional para Cu^{2+} e CN^- [51].

Recentemente, foi demonstrado que os corantes **4a-6a** são coloridos em acetonitrila e mediante protonação as soluções tornam-se incolores para os corantes **5a** e **6a** e amarelo-pálido para a solução do corante **4a** [52]. O quimiossensor **5b** diante de uma série de ânions apresentou mudança de coloração para CN^- , F^- e com menor extensão para H_2PO_4^- . Para os quimiossensores cromogênicos **4b** e **6b**, somente o CN^- e F^- foram responsáveis pelo reaparecimento da cor original dentre vários ânions estudados. A maior eficiência de **4b** e **6b** se deve à sua menor acidez.

O planejamento de quimiossensores para ânions, incluindo F^- e CN^- , geralmente

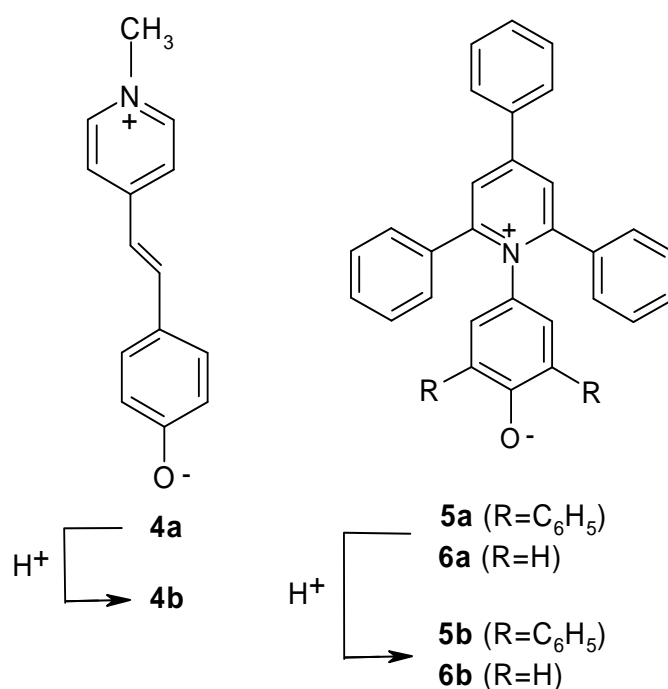
apresentam resposta qualitativa muito semelhante para os dois ânions. É conhecido que o F^- , o $H_2PO_4^-$ e o AcO^- apresentam altas energias de hidratação ($\Delta G^{\circ}_{hidr} = -465$ kJ/mol para o F^- e $H_2PO_4^-$ e $\Delta G^{\circ}_{hidr} = -365$ kJ/mol para o acetato), enquanto o CN^- apresenta um menor valor de energia de hidratação ($\Delta G^{\circ}_{hidr} = -295$ kJ/mol) [53, 54]. Assim, a seletividade pode ser atingida aumentando-se a polaridade do meio com adições de água ao sistema, pois se pode esperar que ânions como o F^- , o AcO^- e o $H_2PO_4^-$ tenham uma maior redução no seu potencial nucleofílico ou de basicidade comparado com o CN^- em um meio de maior polaridade. Assim, com a adição de pequenas quantidades de água às soluções dos compostos **4b–6b**, conseguiu-se atingir a seletividade para o ânion CN^- em relação aos outros ânions também detectados em acetonitrila, devido à forte solvatação preferencial do F^- e $H_2PO_4^-$ pela água através de LH, que os impede de atuar eficientemente como bases [52].



Os compostos **4b–6b** também foram estudados em triclorometano com a mesma série de ânions [55]. No entanto, a mudança no microambiente de solvatação das espécies com o uso de um solvente fracamente doador de LH modifica o perfil das titulações. Isso se deve ao fato de que os grupos piridínico e fenólico dos compostos na sua forma protonada tornam-se menos solvatados pelo solvente. Os sistemas ficam coloridos diante da adição de CN^- e F^- para os compostos **4b–6b** e com $H_2PO_4^-$ para a solução contendo o composto **5b** e com menor intensidade na solução do composto **6b**, sugerindo dessa forma que **4b** é menos ácido do que os piridiniofenolatos protonados **5b** e **6b**. Isso pode estar relacionado com o fato da merocianina **4a** e os piridiniofenolatos **5a** e **6a** serem estruturalmente diferentes, embora com os mesmos grupos doadores e aceitadores de elétrons em sua estrutura. Em um solvente como o triclorometano, o papel da estrutura da base conjugada é fundamental, a fim de promover a estabilização da carga negativa sobre o grupo fenolato [55].

O sistema em triclorometano foi ainda utilizado para avaliar se um dos compostos (**4b–6b**) apresentaria viabilidade para a detecção de CN^- em meio aquoso [55]. O

composto **6b** foi o que melhor atendeu às exigências para um quimiossensor funcionar em sistema bifásico ($\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$). O conjunto foi capaz de detectar seletivamente CN^- em meio aquoso.



O composto 2,4-dinitrodifenilamina (**7**) foi estudado em DMSO na presença de vários ânions [56]. Entre os vários ânions estudados, ocorre mudança de cor para F^- , CN^- , AcO^- e H_2PO_4^- . Somente os quatro ânions básicos foram capazes de desprotonar o quimiossensor, causando o reaparecimento da banda original em 498 nm, sendo que para uma mesma concentração dos ânions o F^- provocou o retorno total da banda na forma desprotonada do corante. Um efeito semelhante ocorre com o CN^- , mas com uma pequena diminuição no efeito máximo de absorbância, seguido pelo AcO^- e depois pelo H_2PO_4^- . Com adição de 4,3% de água ao meio, atingiu-se seletividade alta para o CN^- , entre os quatro ânions, como pode ser visto na Figura 3 [56].

Sun et al. sintetizaram uma série de seis nitroanilidas (**8-13**), modificando a posição dos grupos elétron-retiradores [49]. Realizou-se o estudo do composto **8** em diferentes misturas DMSO: H_2O [9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1 (v/v)]. Para a mistura DMSO: H_2O 9:1, o composto **8** apresenta uma banda de absorção com máximo em 441 nm para os ânions CN^- , F^- e AcO^- . A maior seletividade para o CN^- só é atingida com a solução de **8** em DMSO: H_2O 1:1. Isso indica que a seletividade para o CN^- é muito influenciada pela água. Em DMSO: H_2O (1:1), ânions como o F^- e AcO^- interagem através de LH com a água e essa solvatação leva a uma diminuição da sua capacidade para atuarem como bases. Já o CN^- tem uma capacidade relativamente fraca para formar LH comparado ao F^- e AcO^- e uma forte capacidade nucleofílica. A fim de obter o

conhecimento sobre o efeito de grupos substituintes sobre a interação e seletividade para o CN^- , estudos foram feitos utilizando-se os compostos **9–12** em sistema DMSO:H₂O (1:1). De forma semelhante ao observado anteriormente para **8**, uma alta seletividade ocorreu para CN^- . No entanto, constantes de ligação de menor magnitude foram obtidas para as amidas **9–12** na presença de CN^- em comparação com **8**, indicando uma pobre sensibilidade destes compostos para o CN^- . Para o composto **13** não houve mudança espectral diante dos ânions estudados [49].

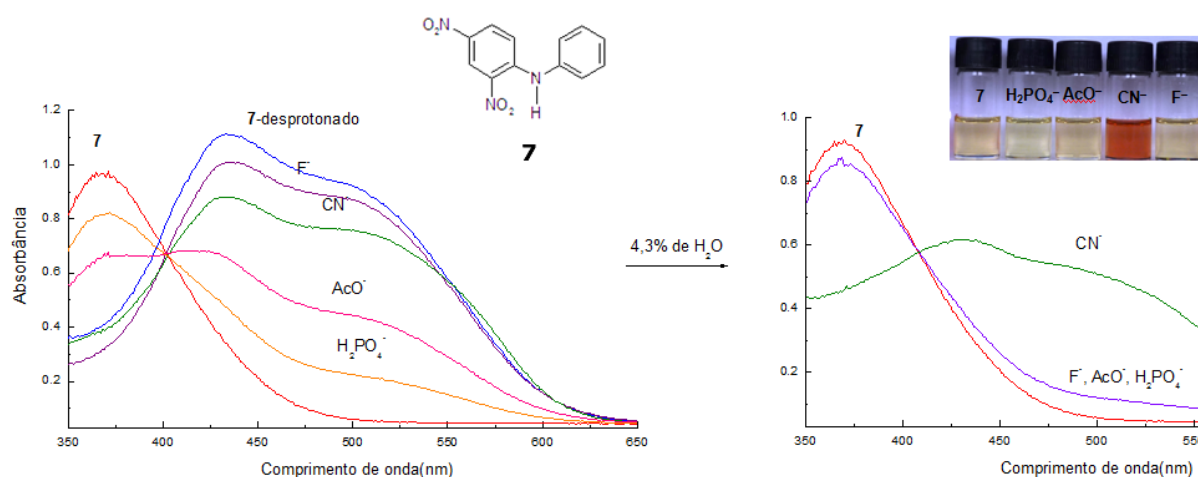
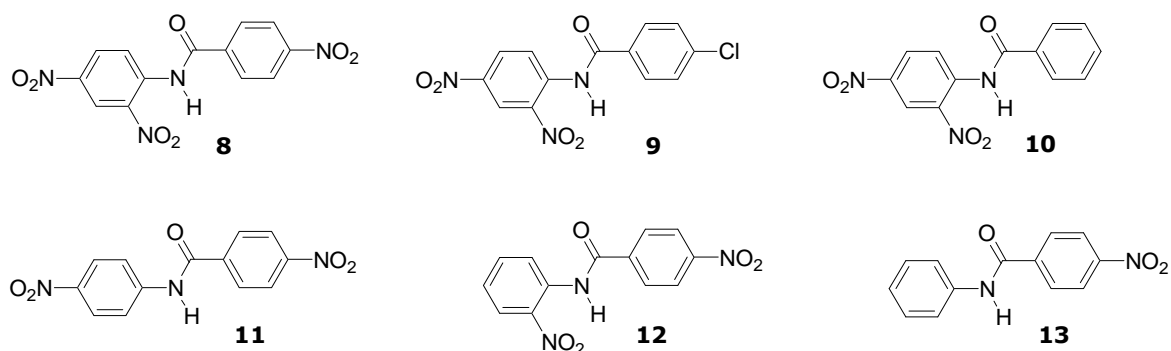
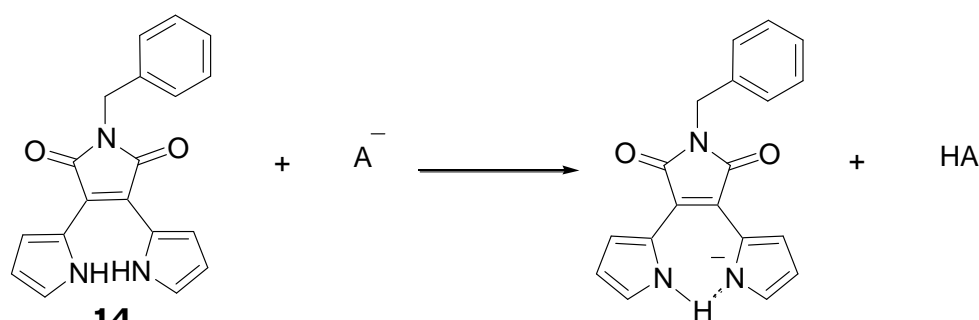


Figura 3 – Conjunto de espectros no UV-vis do composto **7** com a adição dos ânions em DMSO e com 4,3% de água.



Lin et al. sintetizaram o quimiossensor **14**, que apresenta dois grupos pirróis, a fim de examinar o efeito da estrutura do quimiossensor sobre a capacidade para detectar espécies aniônicas [57]. O composto **14** apresenta três grandes bandas de absorção na região de 250–550 nm. A transição eletrônica que ocorre em uma faixa de energia mais baixa, entre 455 e 520 nm, é do tipo $n-n^*$, apresentando transferência de carga significativa. A transição eletrônica de HOMO para LUMO ocorre devido à presença dos grupos doadores de elétrons (pirróis) e aceitadores de elétrons (carbonilas da maleimida). Ao mesmo tempo, verifica-se que **14** é fluorescente com um máximo de intensidade de emissão de fluorescência em 646 nm e um rendimento quântico (ϕ) de

7%. No espectro de emissão de **14**, a intensidade da banda em 646 nm diminuiu gradualmente com o aumento da concentração do ânion F^- . Na presença de 25 equivalentes de F^- , a intensidade de emissão de **14** reduz para <10% do valor inicial. Na presença de CN^- , a solução do composto **14** apresentou uma mudança de cor de vermelha para azul, muito semelhante ao observado para o F^- . A banda de absorção no λ_{max} em 580 nm aumentou junto com a diminuição no λ_{max} em 516 nm. A banda de emissão de fluorescência em 646 nm foi efetivamente extinta pelo CN^- . A forte basicidade dos ânions F^- e CN^- levou à abstração de um próton do grupo NH pirrólico em **14**, com formação de um monoânion estabilizado por LH intramolecular (Esquema 2) [57].



Esquema 2

Um aspecto comum aos quimiossensores cromogênicos baseados em estratégias do tipo ácido-base está relacionado ao fato de que a estrutura do composto pode ser alterada para modificar a sua acidez a fim de que ânions mais básicos possam ser reconhecidos e detectados. É importante ainda observar que os efeitos observados com esses sistemas não estão limitados a certo ânion, mas também podem ser causados por espécies agindo como bases suficientemente fortes, o que poderia ser considerado como sendo uma limitação no emprego desses sistemas [55].

Cromorreagentes e fluororreagentes para o CN^-

Uma estratégia que vem recebendo atenção nos últimos anos, para a detecção de CN^- , envolve o uso de cromo e fluororreagentes, os quais se baseiam em reações reversíveis do quimiossensor com o analito [58]. Dois princípios de transmissão óptica são observados nessa estratégia (Figura 4): **(A)** a ligação covalente reversível entre o cromorreagente e o analito aniônico provoca mudanças na deslocalização eletrônica do cromóforo e, conseqüentemente, alterações na coloração; **(B)** quando um grupo fluoróforo está ligado ao reagente por um espaçador, ocorre efeito de fluorescência mediante o bloqueio da transferência eletrônica fotoinduzida (TEF) [18, 58].

Uma grande parte dos cromo e fluororreagentes para a detecção seletiva de ânions, como o CN^- , envolve a formação de ligação covalente reversível entre um

ionóforo e um ânion. Kim et al. desenvolveram um sistema baseado na trifluoroacetofenona para a detecção de CN^- [59]. O sistema detecta o ânion pela formação de uma ligação covalente reversível, envolvendo a formação de um aduto entre o ânion e um ionóforo, que é estabilizado por uma LH intramolecular (Esquema 3) [59].

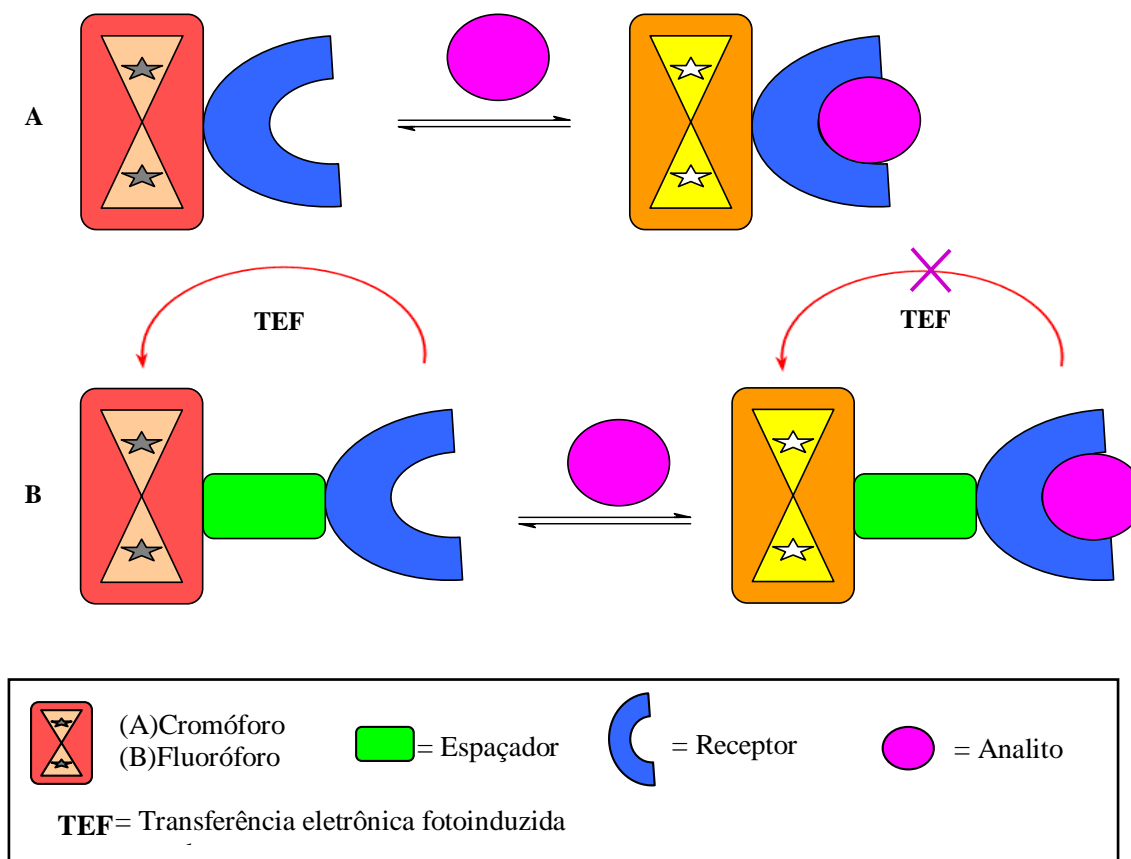
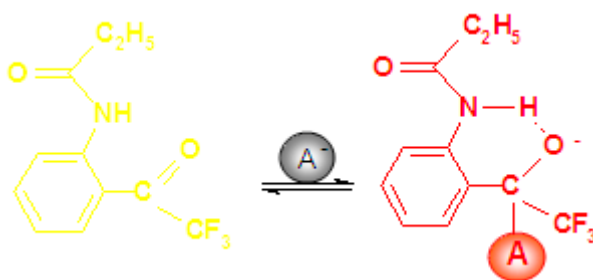


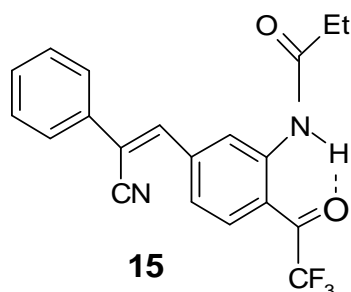
Figura 4– Representação esquemática para o funcionamento de **(A)** um cromorreagente e **(B)** um fluororreagente fundamentado no bloqueio da TEF se um analito é adicionado ao meio.



Esquema 3

Em outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa, o quimiossensor **15** foi utilizado em acetonitrila, obtendo-se uma emissão de fluorescência com $\lambda_{\text{max}} = 476 \text{ nm}$ [60]. Com a adição de uma série de ânions, observou-se maior mudança na intensidade de fluorescência para o CN^- , seguido por AcO^- e F^- , com alteração espectral muito pequena para outros ânions. Assim, o quimiossensor **15** detecta ânions através de um processo

reversível envolvendo a formação de um aduto entre **15** e o ânion. A seletividade para o CN^- pode ser obtida usando-se um solvente doador de LH, nesse caso uma mistura metanol: H_2O (9:1). Como os ânions F^- e AcO^- têm uma grande capacidade para serem solvatados pelo meio doador de LH, a seletividade para o CN^- é facilmente atingida [60].



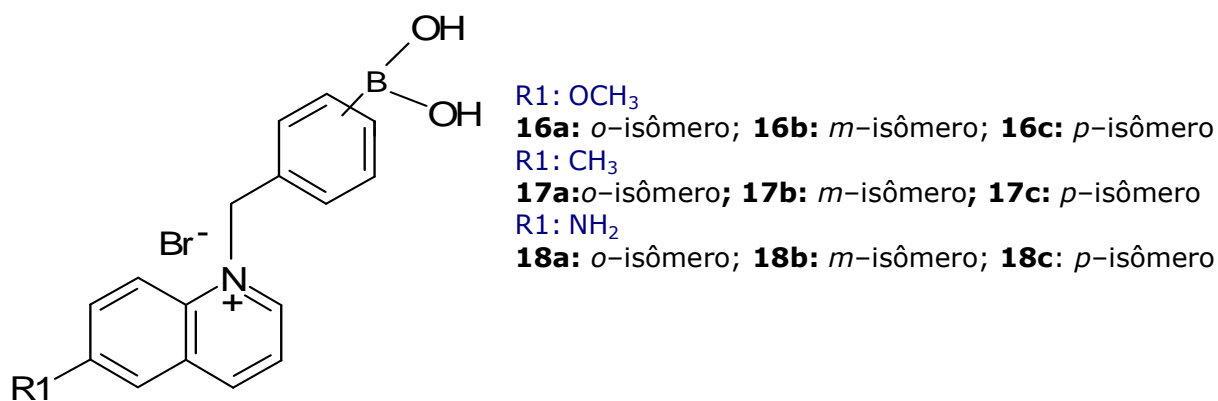
Os ácidos borônicos são unidades de reconhecimento eficientes, em especial para monossacarídeos e para o ânion CN^- [61, 62]. A capacidade do grupo ácido borônico de interagir com uma base, como o CN^- , envolve a formação de um complexo formado pela ligação covalente do ânion com o átomo de boro no ácido borônico. Muitos trabalhos têm utilizado ácidos borônicos como unidades de reconhecimento em quimiossensores cromogênicos e fluorogênicos para CN^- [61–64]. Badugu et al. estudaram uma série de compostos contendo o grupo ácido borônico para detecção de CN^- em sistemas aquosos, com sensibilidade para a detecção por fluorescência em concentrações nos níveis fisiologicamente letais ($< 20 \mu\text{mol/L}$). O quimiossensor planejado foi capaz de detectar o ânion na faixa de $1\text{--}30 \mu\text{mol/L}$, mesmo na presença de interferentes em meio aquoso. A funcionalidade do quimiossensor se explica pelo fato do CN^- complexar-se com moléculas derivadas de ácidos borônicos e essa complexação acarreta a diminuição da transferência de carga intramolecular que ocorre na unidade de sinalização fluorescente [63, 64].

O mesmo grupo de pesquisa estudou nove quimiossensores fluorogênicos para o CN^- contendo o ácido borônico em sua estrutura molecular. Todos os sistemas foram preparados em meio aquoso. Os quimiossensores **16a–c** foram excitados em 345 nm e com a adição de CN^- a um valor máximo de $100 \mu\text{mol/L}$ foi observado que a intensidade de emissão de fluorescência na região de 450 nm diminuiu. O isômero **16b** mostrou uma resposta muito mais forte para CN^- , com uma mudança de intensidade de emissão de fluorescência de 10 vezes com $20 \mu\text{mol/L}$ de CN^- . Essas respostas são muito encorajadoras e sugerem o uso desses isômeros para a detecção de CN^- em níveis fisiológicos. Além disso, **16b** pode encontrar aplicações para a detecção quantitativa de CN^- em vítimas de incêndio, onde os níveis desse analito excedem o limite de concentração letal de $20 \mu\text{mol/L}$.

Da mesma forma que os quimiossensores **16a–c**, os compostos **17a–c**

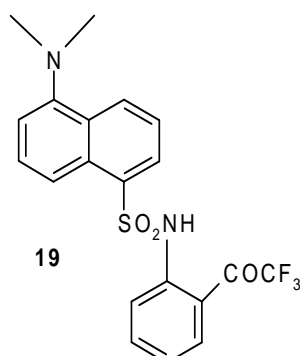
mostraram uma diminuição notável na intensidade de fluorescência com concentrações muito pequenas de CN^- . O composto **17b** mostra diminuição na intensidade de emissão de fluorescência em cerca de 12 vezes na presença de $30 \mu\text{mol/L}$ de CN^- , sendo ideal para o monitoramento de CN^- livre em níveis fisiológicos, com constantes de dissociação de 16,7, 16,9 e $15,9 \mu\text{mol/L}$ para **17a**, **17b** e **17c**, respectivamente. Curiosamente, a resposta óptica para **16b** com $75 \mu\text{mol/L}$ de CN^- é duas vezes melhor quando comparada com aquela obtida para o quimiossensor **17b**. O melhor resultado para **16b** pode ser atribuído à diferença na capacidade de doar elétrons entre os grupos metil e metoxi na posição seis do anel quinolínico e à carga eletrônica resultante no centro de nitrogênio quaternário heterocíclico. Isso também se reflete nos rendimentos quânticos dos quimiossensores, pois **16b** tem $\phi = 0,51$, enquanto o isômero **17b** apresenta $\phi = 0,025$.

Para o quimiossensor **18a**, com o aumento da concentração de CN^- a absorvância para a banda com máximo em 388 nm diminui, enquanto aumenta o valor da absorvância para a banda com máximo em 340 nm. Todos os três isômeros **18a-c** apresentaram respostas semelhantes para o CN^- [64]. Com o aumento da concentração do ânion, diminui a banda de emissão de fluorescência em 546 nm e ocorre um aumento na banda de emissão com máximo em 450 nm, que é atribuída à emissão do complexo quimiossensor: CN^- . Os quimiossensores **18a-c** podem ser utilizados para a determinação de CN^- em concentrações menores que $20 \mu\text{mol/L}$ [63, 64].



O quimiossensor **19** apresenta um grupo trifluoroacetil (TFA) como unidade receptora e um grupo dansil (5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonil) como unidade sinalizadora [65]. Suas propriedades fotofísicas foram avaliadas em acetonitrila, exibindo uma emissão de fluorescência com máximo em 530 nm. A seletividade do quimiossensor foi examinada pela adição de diferentes ânions, tendo sido observado que o CN^- induziu um aumento na intensidade de fluorescência em cinco vezes em relação ao quimiossensor livre, o que ainda foi acompanhado de uma mudança hipsocrômica. Já para o AcO^- e F^- foi verificado um aumento na intensidade de fluorescência em um fator de duas vezes, com a mesma mudança hipsocrômica, enquanto o H_2PO_4^- produziu um

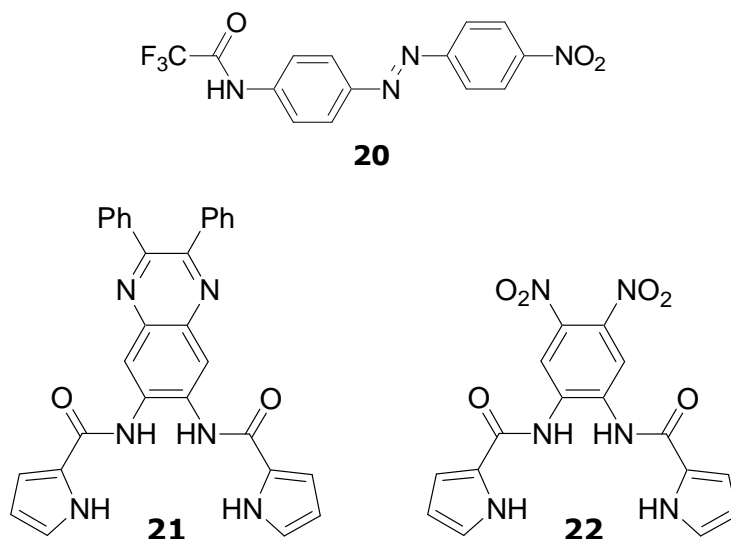
aumento muito pequeno na intensidade de fluorescência e outros ânions testados não produziram quaisquer mudanças espectrais. A fluorescência observada é atribuída à formação de um aduto receptor:ânion, estabilizado por LH intramolecular [65].



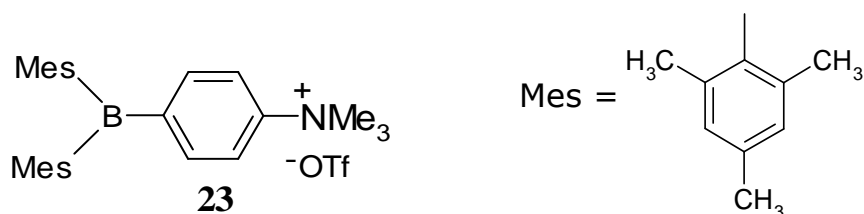
Niu et al. desenvolveram um quimiossensor cromogênico baseado no composto **20** [66]. A mudança de cor, em acetonitrila, foi possível pela adição dos ânions nucleofílicos CN^- , F^- , AcO^- , H_2PO_4^- e HSO_4^- , os quais atacam o carbono eletrofílico da carbonila. Para atingir a seletividade por CN^- , o sistema foi investigado em misturas de acetonitrila com água. Assim, respostas diferenciadas foram obtidas quando da adição de 2,5%, 7,5% e 10% de água. Em acetonitrila, cinco dos doze ânions testados (CN^- , F^- , AcO^- , H_2PO_4^- e HSO_4^-) provocaram mudança de cor no meio, de incolor para alaranjada. Com 2,5% de água a mudança de cor ocorreu somente para os sistemas contendo CN^- , F^- e AcO^- . Com 5% de água foi possível inibir a interferência de F^- e AcO^- e com 7,5 e 10% a seletividade para o CN^- se tornou ainda maior, mesmo com um excesso dos ânions que poderiam ser interferentes. A explicação está baseada na forte habilidade dos ânions F^- , AcO^- , H_2PO_4^- e HSO_4^- para estabelecerem LH com a água e, por isso, sofrerem uma redução significativa na atividade nucleofílica. Por outro lado, o CN^- manteve as constantes de ligação, relativamente altas, mesmo com 10% de água. Os resultados mostraram que o limite de detecção fica abaixo de $5 \mu\text{mol/L}$ quando o CN^- se encontra em misturas entre 2,5 e 5% de água em acetonitrila, evidenciando que o quimiossensor é seletivo e apresenta sensibilidade para detectar CN^- em meio aquoso [66].

A capacidade de **21** e **22** para complexar espécies aniônicas foi testada por meio das técnicas de UV-vis e de fluorescência em uma solução de acetonitrila: H_2O (9:1, v/v). Dentre 12 ânions testados para **21** e **22**, ocorreu resposta espectral apenas para o CN^- com uma mudança de coloração para o quimiossensor **21** de incolor para amarela e mudança de fluorescência de azul para verde. Para o composto **21**, com adição de CN^- , ocorreram três novas bandas em 299, 372 e 428 nm e três pontos isobésticos em 293, 360 e 391 nm indicando uma conversão completa em todo processo da titulação e o máximo de fluorescência de **21** mostrou um deslocamento batocrômico de 425 nm para 476 nm com um ponto isobéstico em 476 nm. Para o composto **22** a absorção espectral

com adição de CN^- surgiu em 465 nm. Através de estudos com análise pela técnica de Job para os compostos **21** e **22** constatou-se uma estequiometria quimiossensor:ânion do tipo 1:2. O composto **22** também foi estudado com adição de água à acetonitrila, sendo que a resposta colorimétrica para o CN^- persistiu até 50% de água. A seletividade superior para o CN^- em meio semi-aquoso é promissora para a detecção do ânion em amostras aquosas [66].

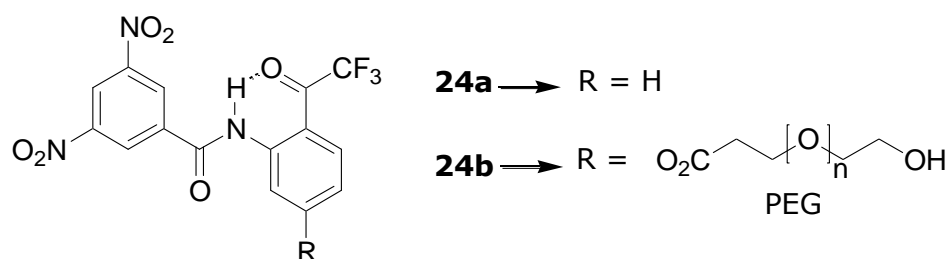


Uma solução do composto **23** foi preparada em $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 60:40 (v/v) em pH 7, apresentando uma banda de absorção com máximo em 320 nm ($\epsilon_{320} = 9104 \text{ L/mol cm}$). Com a adição de diversos ânions, ocorreu a seletividade para o CN^- . A análise da curva de titulação indicou que a constante de ligação de **23** com CN^- foi igual a $(3,9 \pm 0,1) \times 10^8 \text{ L/mol}$. As propriedades incomuns da ligação do CN^- com **23** podem ser atribuídas aos efeitos coulômbicos favoráveis, que aumentam a acidez de Lewis do átomo de boro e levam ao fortalecimento da interação do quimiossensor com o CN^- [67].



Ahn et al. recentemente estudaram o quimiossensor **24a**, que usa um grupo 3,4-dinitrofenil como cromóforo e um grupo *o*-CATFA como receptor para o reconhecimento aniônico através de ligação covalente reversível [68]. Quando o composto **24a** foi tratado com CN^- em acetonitrila, apareceram duas novas bandas apresentando λ_{max} em 433 nm e 533 nm com mudança de cor de incolor para laranja. Já os ânions F^- , AcO^- e H_2PO_4^- apresentaram uma pequena absorção se comparados com o CN^- e com mudança

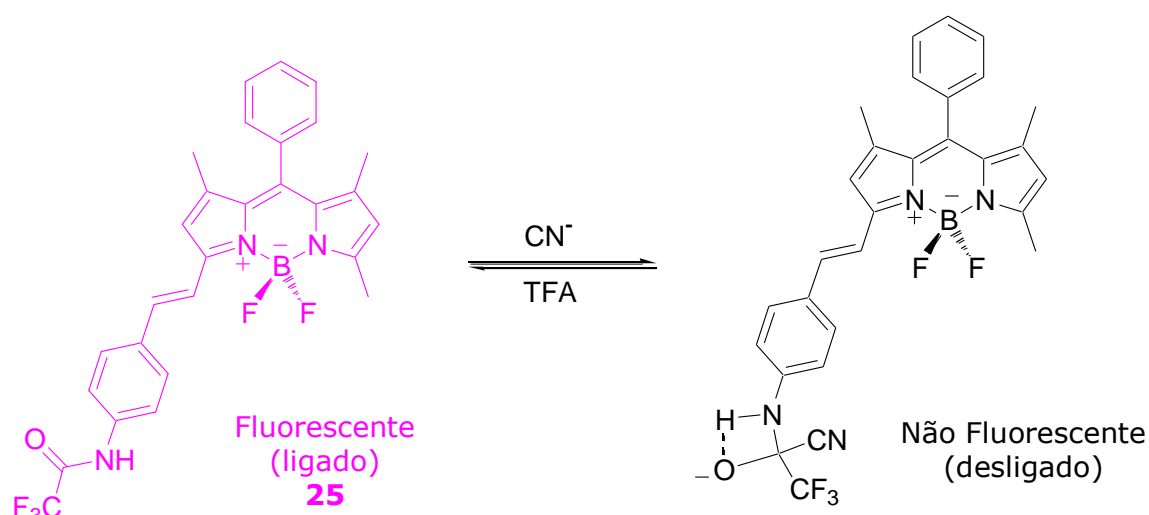
de cor para laranja e os ânions como HSO_4^- , SCN^- , Cl^- e Br^- não apresentaram qualquer alteração de cor. Um resultado mais interessante para a detecção do CN^- foi alcançado usando-se uma mistura de solventes $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (10:1), sendo que nesse meio outros ânions concorrentes como F^- , AcO^- e H_2PO_4^- são completamente discriminados, pois formam fortes LH com o meio que os solvata, ficando, portanto, incapazes de formar o aduto correspondente. Já o CN^- , por ser um pobre aceitador de LH e apresentar forte afinidade com o carbono da carbonila do grupo TFA, resultou na mudança de coloração. A formação do aduto entre **24a** e cada um dos ânions foi acompanhada por espectroscopia de RMN de ^1H . Como esperado, o sinal referente ao aduto decresce na ordem $\text{CN}^- > \text{F}^- > \text{AcO}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^-$, que está de acordo com os resultados obtidos pelos espectros de absorção. A formação do aduto foi também verificada por espectrofotometria no infravermelho. Para obter os parâmetros termodinâmicos para o processo de ligação entre **24a** e as espécies aniônicas, foi realizada a titulação calorimétrica isotérmica. Os dados sugerem que todos os processos de ligação são regidos por mudança de entalpia favorável, acompanhados por menor variação de entropia, conforme a formação do aduto covalente nas mesmas condições. Os dados mostram uma estequiometria 1:1 para o CN^- . Para avaliar **24a** como quimiossensor cromogênico para o CN^- , foi realizada titulação na região do UV-vis em metanol: H_2O (10:1). O resultado mostrou que o limite de detecção de CN^- por **24a** foi estimado ser cerca de $3 \mu\text{mol/L}$. Uma modificação sintética foi efetuada ao se introduzir uma cadeia de poli(etilenoglicol), que é solúvel em solventes orgânicos usuais e também em água, à estrutura molecular do composto. Obteve-se assim o sistema polimérico **24b**, que também mostrou uma mudança significativa no espectro do UV-vis apenas para CN^- e mudança muito pequena para outros ânions em uma solução aquosa tamponada (pH 8,2, tampão Tris). Os resultados demonstraram seu potencial para ser aplicado no desenvolvimento de novos dispositivos ópticos para a detecção visual de CN^- [68].



Os boradiaindacenos (BODIPY) são fluoróforos bem conhecidos pelos seus elevados rendimentos quânticos e grandes absorvidades molares, atraindo a atenção especialmente pelo seu potencial para a detecção de ânions [69]. Assim, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com derivados dos corantes BODIPY como unidades de detecção em quimiossensores cromogênicos e em especial fluorogênicos.

Akkaya et al. sintetizaram um quimiossensor cromo e fluorogênico derivado de

BODIPY para a detecção e seletividade do CN^- [69]. A adição desse ânion à solução do composto **25** em acetonitrila resultou na mudança de coloração com o aparecimento de uma banda com máximo de absorvância em 594 nm e uma diminuição na intensidade de emissão de fluorescência em 571 nm (Esquema 4). A emissão de fluorescência só foi restaurada pela adição do ácido trifluoroacético (TFA). A interação do quimiossensor com CN^- também foi demonstrada em uma matriz polimérica, representando uma nova estratégia para a detecção de CN^- em materiais poliméricos [69].

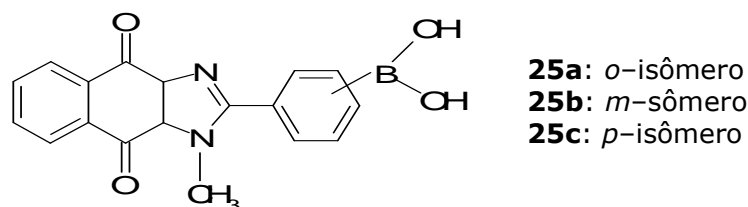


A associação de uma naftoquinona, um sítio de sinalização, com um ácido borônico, por meio de um espaçador imidazólico, forneceu os isômeros **25a-c** [69]. Na mistura DMSO:H₂O (50% HEPES pH 7,4, em 0,1 mol/L de NaCl) os quimiossensores **25a-c** formaram uma solução amarela, com máximos de absorção em 338 e 387 nm. Além disso, todos os quimiossensores apresentaram luminescência característica com máximos de emissão diferentes em 562, 565 e 572 nm para os isômeros orto, meta e para, respectivamente. Com a adição de 500 equivalentes de uma série de ânions a cada um dos três compostos, foi observada uma banda de emissão de fluorescência com alta intensidade em 460 nm com a adição de CN^- para os quimiossensores **25b** e **25c**, enquanto o composto **25a** mostrou uma pequena resposta óptica na presença do CN^- . Os compostos **25a-c** também foram estudados em um sistema micelar com CTAB. Pela adição de 50 $\mu\text{mol/L}$ de uma série de ânions foi verificada a detecção de CN^- em baixas concentrações (50 $\mu\text{mol/L}$) para **25b** e **25c** [70].

Planejamento de quimiossensores para a detecção do CN^-

As possibilidades e estratégias para a detecção do CN^- vão se ampliando, considerando as vantagens e desvantagens de cada processo, sempre visando aperfeiçoar a condição de sensibilidade e seletividade. A ideia de um quimiossensor está baseada na combinação de um ânion altamente nucleofílico, tal como o CN^- , com

um sítio de ligação deficiente de elétrons em uma molécula ou sistema supramolecular, ocasionando uma reação química irreversível (Figura 5). Os fatores determinantes para o monitoramento de tal processo são as mudanças na coloração ou na emissão de fluorescência do sistema [5, 18].



Três tipos de quimiodosímetros podem ser estabelecidos conforme a interação do CN^- com o quimiossensor: (a) o ânion pode se ligar covalentemente ao quimiodosímetro, levando a uma variação na coloração ou na banda de emissão; (b) o ânion interage com o quimiodosímetro, catalisando uma reação química que conduz à variação espectral e (c) o ânion reage com o quimiodosímetro liberando um grupo de saída cromogênico ou fluorogênico [5, 18].

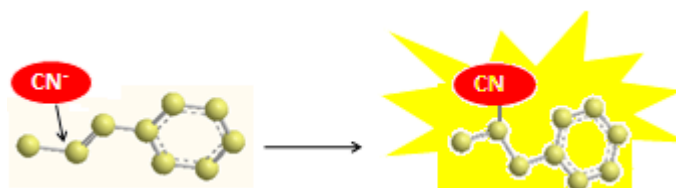


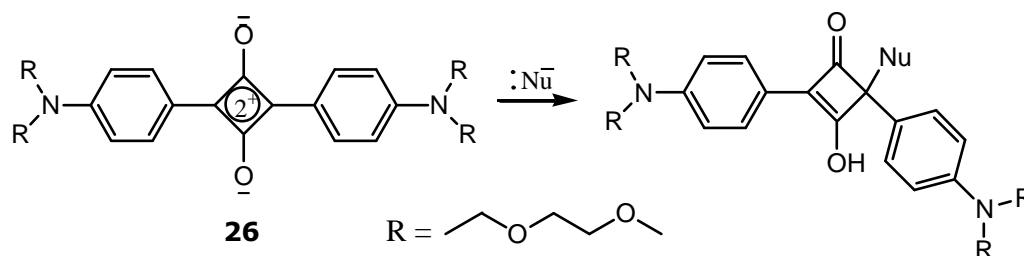
Figura 5. Modelo de um quimiodosímetro, pelo qual o CN^- ataca o quimiossensor formando uma ligação química irreversível, o que provoca mudanças espectrais.

A estratégia via reação química reduz substancialmente a competição em meio aquoso, constituindo-se em uma potencialidade para a detecção de ânions nesse meio. Além disso, apresenta vantagem em relação à seletividade, por envolver reações rápidas nas condições experimentais, produzindo respostas específicas de coloração ou fluorescência com um efeito cumulativo relacionado com a concentração do analito.

Os quimiodosímetros para a detecção de CN^- apresentados em trabalhos recentes estão baseados em estruturas derivadas de esquaraínas [71], sais de pirílio [72, 73], subftalocianinas [74], oxazinas [75], triazinas [65], rearranjo do grupo benzil [76], e outros quimiossensores que apresentam potencial para a transferência de próton intramolecular, estabilizando o composto que contém a ligação com CN^- [77–79], como é o caso de cumarinas com grupos salicilaldeído para o reconhecimento aniônico [78].

As esquaraínas agem seletivamente na detecção do CN^- , o que é explicado pela sua atuação nucleofílica diante de centros elétron-deficientes na estrutura do quimiossensor **26** (Esquema 5). O composto forma uma solução azul em acetonitrila, a

qual se torna incolor somente na presença de CN^- . Os demais ânions testados não modificaram a coloração do meio. O CN^- também deixa a solução incolor em sistema $\text{H}_2\text{O}:\text{acetonitrila}$ 80:20 v/v em pH 9,5, com um limite de detecção na faixa de 0,1 ppm [71].



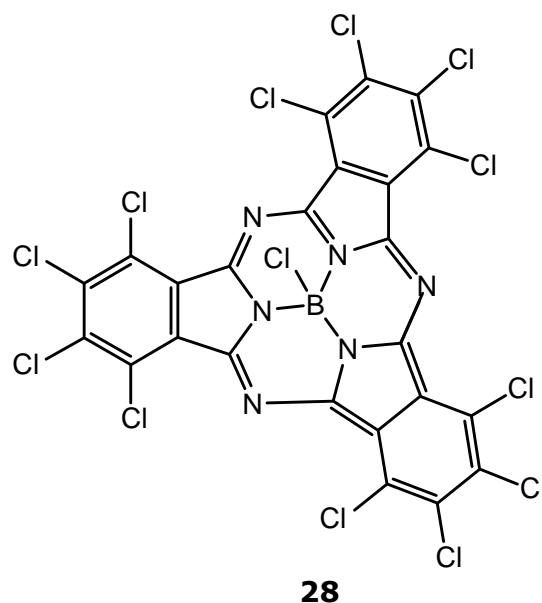
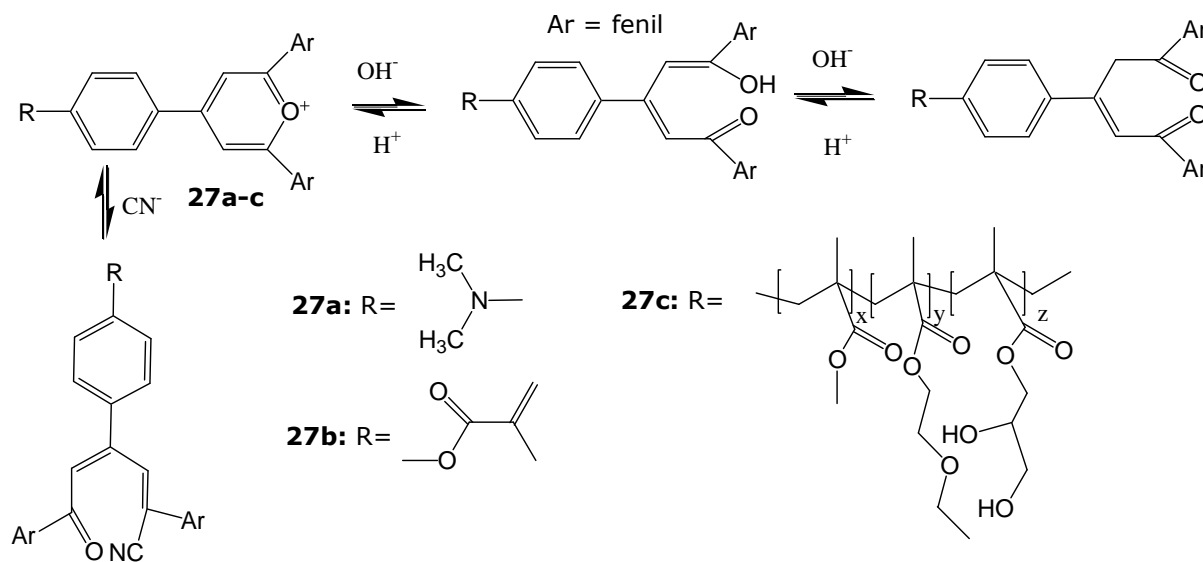
Esquema 5

O quimiossensor **27a-c** é um sal de pirílio que pode ser usado para a preparação de quimiodosímetros para a detecção de ânions com características nucleofílicas, devido à presença de um grupo aceitador de elétrons [73]. Em meio básico, o anel de pirílio rompe-se, dando origem a uma dicetona. Esse processo pode ser reversibilizado em meio ácido (Esquema 6) [72]. Por isso, resultados interessantes foram obtidos para CN^- , ânion de reconhecida nucleofilicidade, por meio de reação de adição nucleofílica a diferentes estruturas de sais de pirílio, inclusive com estruturas poliméricas (**27c**) em meio aquoso. O CN^- rompe o anel de pirílio, provocando mudança de coloração no meio [73].

Os quimiossensores também podem detectar um maior número de ânions com características nucleofílicas semelhantes. É o caso do quimiossensor **28**, derivado de uma subftalcianina, que se mostrou capaz para detectar F^- , CN^- , H_2PO_4^- e o AcO^- em acetonitrila, deixando o meio incolor. Entretanto, a seletividade para o CN^- é atingida com adição de 1 a 5% de água. Em última análise, com 5% de água o sistema torna-se específico para o CN^- . Isso acontece porque as constantes de ligação são drasticamente reduzidas por efeito de solvatação por meio de LH, mesmo com pequenas quantidades de água, para os ânions F^- , H_2PO_4^- e AcO^- [74].

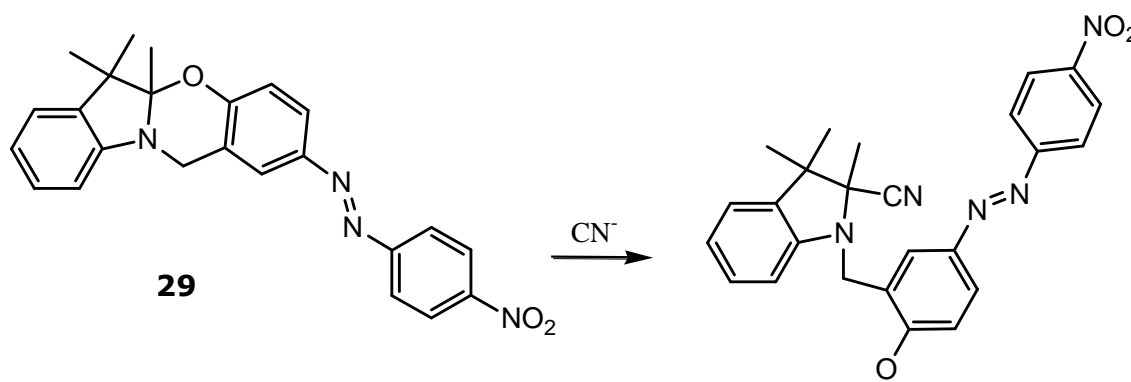
Considerando-se que muitos ânions apresentam funções de natureza química e biológica, principalmente em meios aquosos, é de fundamental importância o avanço no desenvolvimento de quimiossensores que atendam a essa necessidade. Assim, foram planejados ensaios em sistemas bifásicos usando-se o composto **29** em fase orgânica. O princípio de funcionamento desse quimiossensor é baseado no ataque do ânion CN^- , rompendo o anel oxazínico, dando origem a um produto solúvel em solvente orgânico que apresenta em sua estrutura molecular um grupo 4-nitrofenilazofenolato colorido (Esquema 7). O ânion, em fase aquosa na forma de NaCN , foi detectado quando

transferido para a fase orgânica com auxílio de um agente carreador, no caso o cloreto de tetra-*n*-butilamônio, após o sistema ser submetido à agitação, o que provocou mudanças de coloração no meio orgânico [75].

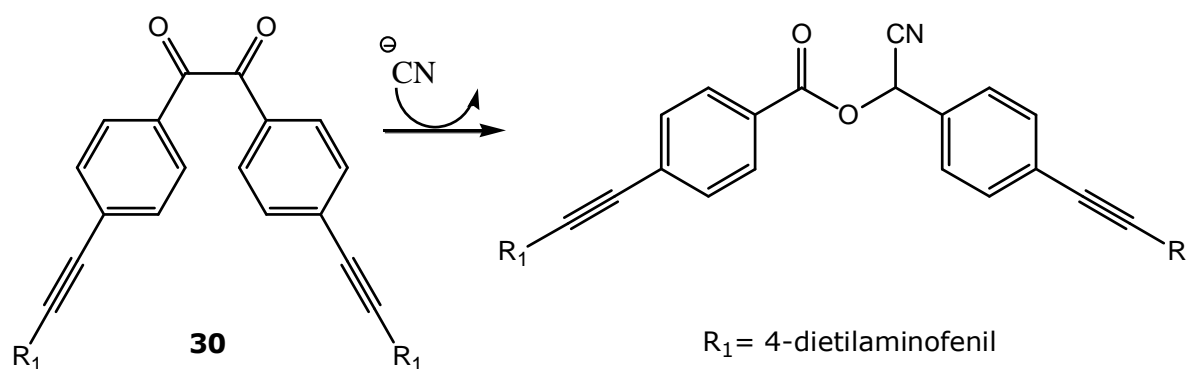


Uma reação de rearranjo no grupo benzil pôde ser monitorada quando o composto **30** (Esquema 8), dissolvido em acetato de etila, foi tratado com CN^- na forma de um sal de tetra-*n*-butilamônio. A solução amarelada tornou-se incolor e fluorescente sob exposição a uma lâmpada UV depois da adição de três equivalentes do CN^- . Por espectrofotometria de UV-vis foi possível a observação de uma variação batocrômica de 56 nm. Outros ânions foram adicionados ao sistema contendo **30**, incluindo OH^- , F^- , N_3^- , AcO^- , Cl^- , HSO_4^- e H_2PO_4^- e não provocaram mudanças espectrais. Trata-se de uma seletividade excepcional, já que vários ânions de caráter básico semelhante ao CN^- foram

comparados [76].



Esquema 7

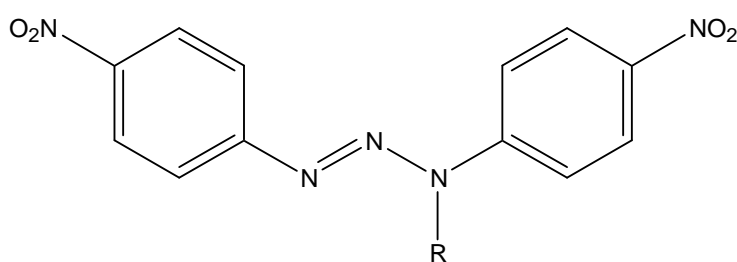


Esquema 8

Uma reação de substituição acíclica nucleofílica, envolvendo o composto **31** com ânions nucleofílicos, como o CN^- e F^- , fez o sistema em acetonitrila mudar de amarelo para púrpura intensa. Os ânions AcO^- e H_2PO_4^- também mudaram a coloração do meio, mas com menor intensidade. A explicação para o resultado obtido está fundamentada na afinidade dos ânions nucleofílicos pelo grupo *N*-acetil da triazina (**31**). A discriminação dos ânions F^- e CN^- foi alcançada usando-se uma mistura de solventes doadores de LH metanol: H_2O (10:1), sendo que nesse meio somente o CN^- provoca mudanças de coloração, uma vez que o F^- , o H_2PO_4^- e o AcO^- têm o seu potencial nucleofílico reduzido pelas interações que estabelecem com o meio [65].

Um grande avanço na detecção de CN^- está no desenvolvimento de quimiossensores do tipo desliga-liga ("off-on") que apresentam mudanças colorimétricas e de fluorescência em sistemas microfluídicos [77, 80]. Tais sistemas constituem-se em uma alternativa interessante para o monitoramento de processos químicos em células vivas. Há um crescente interesse no acompanhamento de reações químicas em

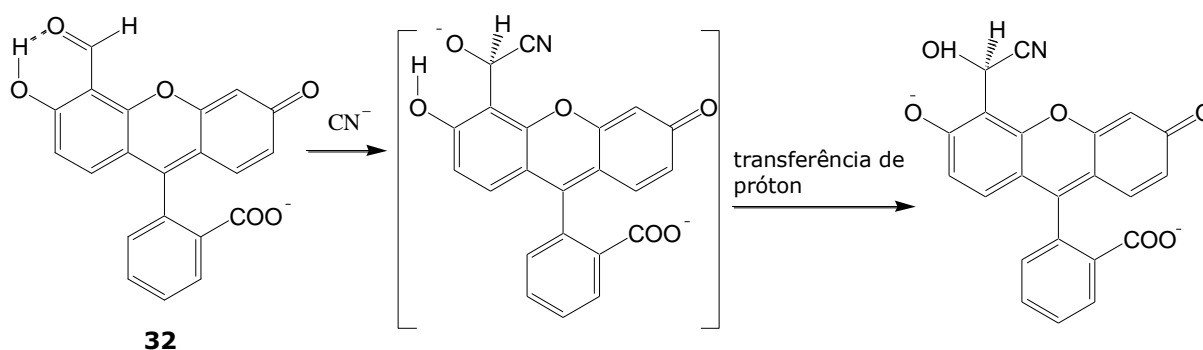
dispositivos microfluídicos, os quais apresentam um ou mais canais com dimensão inferior a 1 mm, de modo que se possa ter uma condição para fluxo laminar [77]. Dentre as vantagens na elaboração desses sistemas está o baixo consumo do fluido, um melhor controle dos processos, menor dispêndio de tempo e a elaboração de sistemas compactos e paralelos [77, 81]. Kwon et al. [77] discutem que um dos grandes desafios nos sistemas de fluxo laminar é a obtenção de uma mistura rápida e eficiente já que depende do lento processo de difusão molecular. Por isso, novos tipos de dispositivos para micromisturas têm sido desenvolvidos para aperfeiçoar os sistemas de microfluidos [81]. Essas técnicas reforçam a ideia do planejamento de microlaboratórios, também conhecidos como "laboratórios em um chip", muito em voga no meio científico da atualidade.



31 R = COCH₃

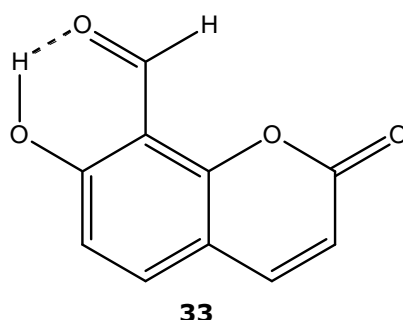
Uma proposta de plataforma microfluídica seletiva para o CN⁻ é apresentada baseando-se na resposta fluorescente do quimiodosímetro **32**. Vários ânions foram testados em acetonitrila:H₂O (9:1, v/v, HEPES, pH = 7,4) e constatou-se que somente o CN⁻ provocou um grande aumento na intensidade de fluorescência do composto **32**. Tal seletividade é explicada pela nucleofilicidade do CN⁻ para atacar o grupo aldeído no quimiossensor [77], uma vez que o grupo carbonila pode ser estabilizado por LH intramolecular pela hidroxila vizinha, conforme o Esquema 9.

O sistema foi analisado em meio aquoso e uma mudança na emissão em 500 nm do tipo desliga-liga foi observada. Além de o CN⁻ provocar uma resposta seletiva (fluorescência verde), também provocou mudanças de coloração no meio [77]. A aplicação para a obtenção de imagens em células vivas é resultado da pesquisa. Assim, uma linha de células humanas, os queratinócitos, HaCaT, foi incubada com 20 μmol/L do quimiossensor **32** por uma hora a 37 °C. Após a lavagem com solução salina tamponada (pH fisiológico) e tratamento com 20 μmol/L de NaCN observaram-se imagens de fluorescência, de contraste por interferência diferencial (DIC) e a fusão de ambas as técnicas de imagens. A resposta de fluorescência verde, obtida das imagens, foi resultado da interação do composto **32** com o CN⁻ presente nas células HaCaT. Sequencialmente, os estudos foram conduzidos em dispositivos microfluídicos, comprovando o potencial para a detecção de CN⁻ em células vivas [77].



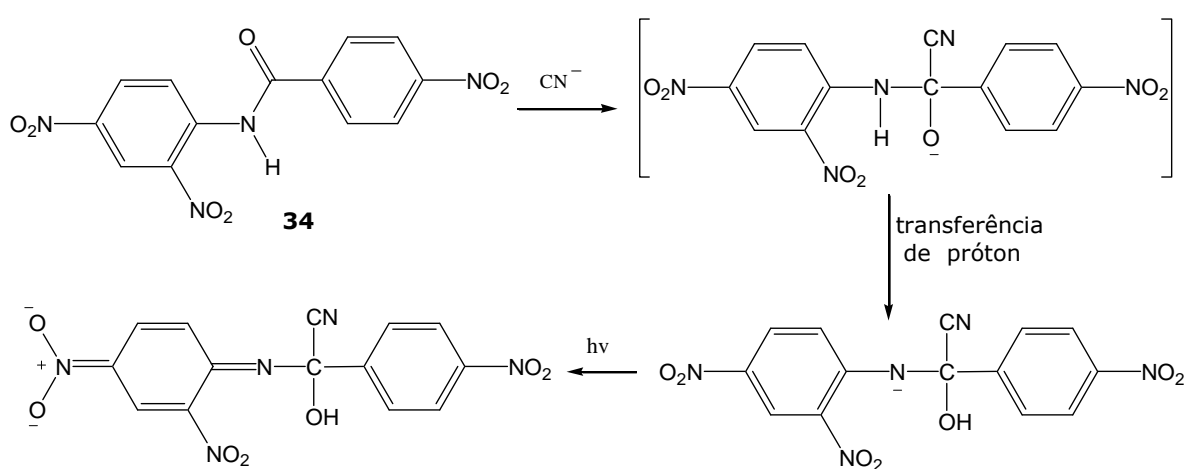
Esquema 9

A ideia de adição nucleofílica do CN^- em uma estrutura molecular que tem uma hidroxila vizinha a uma carbonila de aldeído também foi explorada por Hong et al. em uma cumarina modificada sinteticamente como um quimiossímulo (33). O ânion alcóxido, formado após a adição do CN^- , é em seguida protonado por transferência de próton intramolecular, sendo intensamente fluorescente [78]. Assim, o ataque nucleofílico do CN^- foi acompanhado de um efeito hipercrômico e pelo aumento da fluorescência em $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$, tendo sido observado experimentalmente através de titulação com o composto 33 em meio aquoso (HEPES, pH 7,4). Através de estudos com análise pela técnica de Job, constatou-se uma estequiometria quimiossímulo:ânion do tipo 1:1. Considerando-se que vários outros ânions também foram testados em meio aquoso, conclui-se que a elevada seletividade obtida para o CN^- deve-se a sua capacidade nucleofílica distinta nesse meio. A detecção visual também produziu uma resposta seletiva para o CN^- (fluorescência verde) quando o quimiossímulo foi excitado em 365 nm. Estudos adicionais *in vivo* em microplacas levaram à obtenção de imagens fluorescentes em células vivas tratadas com CN^- na presença do composto 33 [78].



Os trabalhos realizados em meio aquoso ganham força no campo da detecção aniônica e, tratando-se de adição nucleofílica, o CN^- apresenta respostas espectrais muito semelhantes para diferentes sistemas quimiossímulo com características desejáveis no planejamento de um quimiossensor aniônico eficiente: uma resposta específica e competição reduzida do meio aquoso. É o que tem constatado Guo et al. [79] com o estudo de quimiossensores que apresentam grupos cromóforos nitroanilínicos

e um grupamento amida ativado para a detecção de CN^- , como o composto **34**. O sistema foi investigado em $\text{DMSO-H}_2\text{O}$ 1:1. A elevada afinidade do CN^- pelo grupo carbonila resultou em uma reação de adição nucleofílica, seguida de transferência de próton intramolecular (Esquema 10). A formação do aduto foi confirmada por espectrometria de massa. Os estudos quantitativos foram realizados pela técnica de UV-vis acompanhando-se o decréscimo da banda de absorção com máximo em 305 nm e aparecimento simultâneo de uma banda com máximo em 405 nm, com formação de um ponto isobéstico, atingindo o efeito máximo com vinte equivalentes de CN^- . Os estudos de Job indicaram uma estequiometria quimiossensor:ânion do tipo 1:1. O limite de detecção foi de $1,74 \mu\text{mol/L}$ e, assim, a estratégia apresentada pode ser útil para o monitoramento de CN^- em amostras de água.

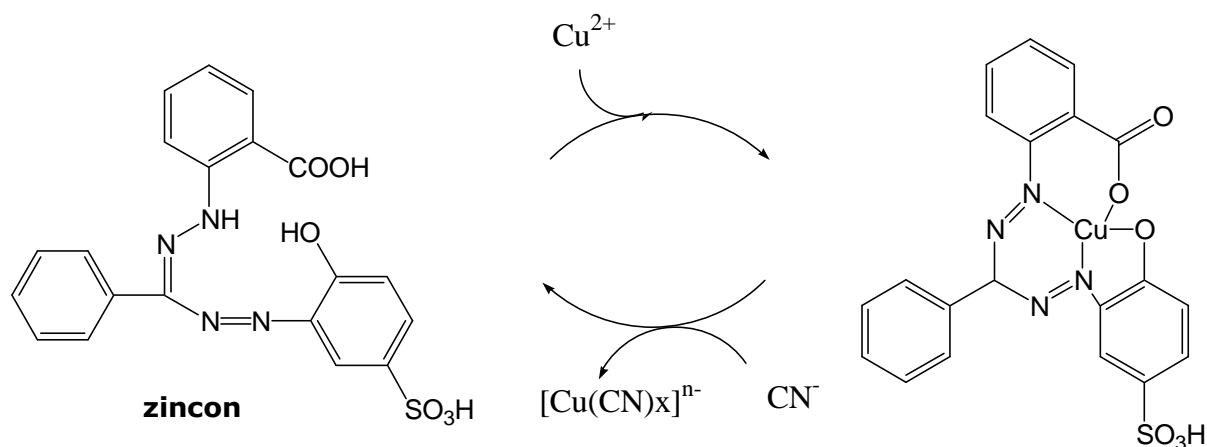


Esquema 10

Quimiossensores baseados em ensaios de competição

Outra estratégia que vem sendo investigada está baseada na propriedade do CN^- para atuar como ligante em complexos constituídos por vários metais de transição. Nesse caso, o metal forma, inicialmente, um complexo com uma espécie que atua como unidade sinalizadora que é responsável por mudanças de coloração ou fluorescência em solução [82, 83]. A funcionalidade se justifica quando a constante de estabilidade do complexo entre CN^- e o íon metálico for maior quando comparada àquela entre o metal e a molécula indicadora [82]. Fica assim estabelecido um cenário de competição entre a molécula indicadora e o CN^- pelo íon metálico presente, o que leva ao desenvolvimento de ensaios analíticos supramoleculares de competição ou de deslocamento [5, 17, 18]. Assim, um composto conhecido como *zincon*, que forma complexos com cobre e zinco, foi investigado diante da adição de Cu^{2+} e CN^- , constatando-se um processo de conversão cíclica acompanhado de mudança na cor, conforme o Esquema 11. A adição de Cu^{2+} a uma solução aquosa de *zincon* provocou mudanças no espectro de UV-vis. À medida que aumenta a quantidade de Cu^{2+} diminui a banda de absorção com máximo

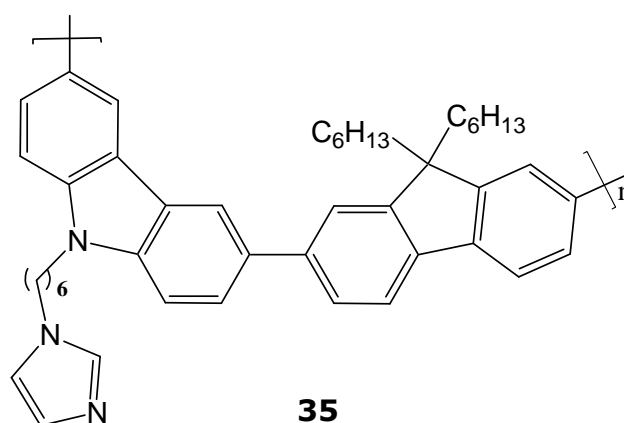
em 463 nm, enquanto aumenta a absorvância em 600 nm. A banda em 463 nm desaparece completamente quando a concentração de Cu^{2+} atinge $2,2 \times 10^{-5}$ mol/L, indicando a formação do complexo com o íon metálico. O ciclo se reverte pela adição de CN^- provocando uma variação na absorvância ($A - A_0$) de 0,345 quando a concentração do ânion atinge um valor de 1,04 ppm (40 $\mu\text{mol/L}$).



A ideia acima descrita apresenta várias vertentes e diferentes estudos têm sido realizados a fim de se obter uma detecção de CN^- com maior sensibilidade e seletividade. Por isso, pesquisas recentes apresentam inúmeras alternativas, tais como quimiossensores que contêm polímeros conjugados que exibem resposta de fluorescência [83]. Nessa ótica, um polifluoreno funcionalizado com um grupo imidazol (**35**) foi testado como quimiossensor aniônico. O composto **35** apresenta uma forte emissão luminescente quando em solução de THF, vindo a sofrer um efeito de supressão na intensidade de emissão de fluorescência diante da adição de Cu^{2+} . Os resultados mostraram que o grupo imidazol, ligado à cadeia polimérica principal, transfere energia de forma eficiente, a partir do polímero conjugado, para os íons Cu^{2+} , constituindo um quimiossensor polimérico para íons metálicos. A detecção aniônica, nesse caso, é dada pelo efeito desliga-liga, uma vez que o CN^- reverte a luminescência inicial devido à formação de um complexo com íons Cu^{2+} com constante de estabilidade maior que aquela do metal com o composto **35**. Nesse trabalho, também foi verificado que o limite de detecção de CN^- foi abaixo de 0,31 ppm (11,9 $\mu\text{mol/L}$), o que torna essa estratégia viável para aplicações práticas.

Pelo princípio de detecção aniônica do tipo desliga-liga outro trabalho desenvolvido por Chung et al. foi planejado para a detecção de CN^- em meio aquoso em pH 7,4 [80]. Inicialmente, o quimiossensor (derivado da fluoresceína) forma complexo com o Cu^{2+} através de grupos carboxilato e fenolato, com a ocorrência de supressão da fluorescência [80]. A reversibilidade do efeito de fluorescência acontece pela adição de

CN⁻, que se liga ao Cu²⁺ para a formação de Cu(CN)₂ e a espécie fluorescente é deixada livre no meio. Estudos adicionais foram realizados com o quimiossensor fluorescente em plataformas microfluídicas para análises ambientais de baixo custo dentro e fora do laboratório. Assim, o complexo fluoresceína-Cu²⁺ foi introduzido em microcanais de fluxo laminar. Imagens de fluorescência verde foram obtidas à medida que o CN⁻ era misturado com o complexo formado pelo quimiossensor com o metal. Para a aplicação *in vivo*, o nematódeo *Caenorhabditis elegans* foi incubado. Esses nematódeos são usados em estudos de toxicidade do meio aquático, uma vez que habitam a água intersticial do solo, sendo por isso considerados organismos ideais para testar a toxicidade de resíduos industrial e municipal em meio aquático. Os nematódeos, previamente incubados somente com o quimiossensor e Cu²⁺, não apresentaram fluorescência, enquanto que uma fluorescência de elevada intensidade foi constatada com a adição de 12,48 até 124,8 μmol/L de CN⁻ [80].



Smith et al. [84] observaram que o CN⁻ e o F⁻ são produzidos em reações de hidrólise de gases de guerra como é o caso de uma subclasse de agentes neurotóxicos organofosfatados [85], conhecidos como agentes G, dentre os quais se destacam o *Soman* que produz F⁻ e o *Tabun* que produz CN⁻. A proposta dos pesquisadores é baseada em um polímero éter difluorovinileno aromático que incorpora com periodicidade unidades cromóforas quelantes de metal a partir de 5,5'-diestiril-2,2'-bipiridina. Este polímero apresenta um forte efeito ionocrômico e ionoluminescente em resposta a metais de transição. O metalopolímero com Zn²⁺ age como um indicador fluorescente seletivo para o F⁻, enquanto que o metalopolímero com Cu²⁺ produz um aumento na intensidade de fluorescência diante da adição de F⁻ e CN⁻ em um meio de THF [84].

Estratégias de detecção de CN⁻ ligadas à nanotecnologia

A nanotecnologia tem contribuído enormemente na melhoria dos padrões de detecção de espécies iônicas e moléculas neutras, delineando novas concepções, perspectivas e superando problemas desafiadores com o planejamento de

quimiossensores altamente especializados [86], inclusive para ânions [87–89]. Apontam para esse caminho os estudos de Jiang e Yu [88], que destacam técnicas baseadas em nanopartículas de prata para a detecção, com sensibilidade e seletividade, de ânions inorgânicos em água, a partir de uma concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

Uma vasta linha de trabalhos com quimiossensores tem sido explorada com uso de nanopartículas metálicas, tais como o ouro e a prata. Já é bem conhecido que a solubilidade em água desses metais pode ser atingida com a adição de CN^- , devido à formação de complexos solúveis, sendo por isso uma estratégia largamente utilizada em setores da hidrometalurgia, em práticas já tidas como convencionais. Mais recentemente, o CN^- também tem sido adotado em áreas como a nanociência para diversos fins, dentre eles a preparação de polímeros revestidos por nanoestruturas [90, 91].

Shang et al. [90] desenvolveram um método fluorescente simples, capaz de detectar CN^- pela dissolução da Rodamina B, adsorvida em nanopartículas de ouro, por um processo de decapagem, resultado da adição de CN^- ao sistema. A Rodamina B é um fluoróforo que exibe forte efeito de fluorescência, é fotoestável, solúvel em água e ainda, quando positivamente carregada, pode ser facilmente adsorvida em superfícies de nanopartículas de ouro estabilizadas por citrato, via interação eletrostática. Quando as nanopartículas de ouro ficam envoltas pela Rodamina B, o sistema fluoresce fracamente devido à eficiência na transferência de energia do fluoróforo para as nanopartículas de ouro. O efeito de filtro interno também contribui para a diminuição da fluorescência, mas em menor extensão. Na presença de CN^- , as nanopartículas são gradualmente dissolvidas e a fluorescência é restaurada. Estudos mostraram que diante de concentrações baixas de CN^- , a fluorescência aumentou significativamente, mas nenhuma mudança na forma do espectro de emissão foi constatada, o que indica que a fluorescência é resultado da Rodamina B livre e não de algum efeito causado pelo CN^- sobre a Rodamina B, na ausência de nanopartículas de ouro. Vários outros ânions foram testados e nenhum provocou efeito semelhante ao CN^- [90].

Em outro trabalho, Dong e Shang [91] apresentaram um ensaio fluorescente para CN^- e peróxido de hidrogênio baseado no efeito de filtro interno, causado por nanopartículas de metais. Foi destacado que as nanopartículas de ouro apresentam grande eficiência para provocar supressão de fluorescência através de processos de transferência de energia ou de elétrons. Igualmente, as nanopartículas de metais, como ouro e prata, também podem provocar aumento na intensidade de emissão, desde que seja mantida certa distância entre as nanoestruturas do metal e o fluoróforo. Assim, seja por efeito de supressão ou realce de fluorescência é necessário que haja conexão, com distância e geometria favoráveis, entre as nanopartículas e o grupo que fluoresce. Nessa perspectiva, os autores destacam que os ensaios fluorescentes com nanopartículas

têm sido planejados de forma que essas nanoestruturas estejam diretamente ou indiretamente ligadas ao fluoróforo. Entretanto, isso torna o processo mais lento e complicado, limitando suas aplicações. A alternativa proposta é fundamentada no efeito de filtro interno das nanopartículas de metais, as quais modulam a emissão de fluorescência do fluoróforo, absorvendo a energia de excitação e/ou emissão, dispensando a necessidade de o fluoróforo estar ligado à espécie moduladora de absorção, tornando o sistema mais simples e flexível. Uma vez que as alterações na absorbância são traduzidas em mudanças exponenciais na fluorescência do fluoróforo, há que se considerar que ocorre um aumento na sensibilidade do método somente pelo acompanhamento da absorbância. O ensaio fluorescente consiste de dois modos, liga e desliga, sendo o primeiro resultado da adição de CN^- sobre um sistema com o fluoróforo envolto por nanopartículas de ouro. O ânion complexa-se com as nanopartículas do metal, causando a decapagem da molécula fluorescente, diminuindo a absorbância das nanopartículas de ouro e, conseqüentemente do efeito de filtro interno. No segundo modo (desliga), acontece o efeito oposto, porque o analito, H_2O_2 , provoca o crescimento catalítico das nanopartículas de ouro em torno da molécula fluorescente [91].

Conclusões e Perspectivas

A utilização generalizada do CN^- levanta uma série de preocupações ambientais, pelo fato desse ânion não ser decomposto facilmente no meio ambiente. A necessidade de detecção do CN^- se justifica, dentre outras razões, pela sua elevada toxicidade para os seres vivos, sendo uma espécie química que se encontra ligada a situações de suicídio, assassinatos e ações terroristas, constituindo-se em um verdadeiro perigo industrial e ocupacional, mesmo em pequenas quantidades. A exposição ao CN^- , em baixas concentrações, pode acontecer pela ingestão de alimentos cianogênicos e pela inalação da fumaça do cigarro ou proveniente da queima de alguns plásticos [28].

A necessidade de baixos níveis de CN^- em água a fim de garantir a sua potabilidade torna necessário o desenvolvimento de métodos para a detecção desse ânion em meios aquosos [60–64, 92, 93]. Esses métodos requerem que o CN^- presente não seja mascarado por outras espécies químicas com características semelhantes, como é o caso do F^- [67, 94–96]. Daí o desafio para o desenvolvimento de quimiossensores que possam discriminar, dentre os analitos que estejam no mesmo ambiente, o que se deseja detectar de forma seletiva [75]. É preciso ainda ser apontado que o HCN apresenta um pK_a de 9,22 [97], o que faz com que os sais apresentando CN^- em sua estrutura formem em água HCN caso o pH do meio seja neutro ou ácido. Esse aspecto representa assim uma dificuldade adicional para o desenvolvimento de quimiossensores ópticos para a detecção desse ânion.

Uma das áreas que tem avançado bastante nos últimos anos nos âmbitos

analíticos de detecção é a química forense, uma vez que ela exige testes rápidos e confiáveis [98]. É comum, por exemplo, órgãos de investigação disporem de kits para a detecção de substâncias narcóticas através de testes que produzam respostas colorimétricas. Assim, o desenvolvimento de testes de detecção de CN^- , que sejam rápidos, simples, confiáveis e fundamentados em resposta colorimétrica ou fluorimétrica, são de grande importância para a elucidação de diversos casos da alçada criminal.

Nos últimos anos, muitas ações de alcance mundial têm sido tomadas no campo da segurança pública no sentido de neutralizar a ação de grupos terroristas, que dentre outros métodos de combate poderiam fazer uso de artefatos da guerra química contra alvos civis. Assim, o desenvolvimento de métodos fluorogênicos e cromogênicos para a detecção de CN^- tem apresentado interesse adicional pelo potencial para a detecção não apenas de HCN, mas também de gases neurotóxicos de guerra [85, 99] como no exemplo do *Tabun*, um conhecido agente organofosforado, que leva à formação de CN^- ao ser hidrolisado [100].

Os quimiossensores, considerando-se aspectos como funcionalidade e versatilidade, devem permitir o desenvolvimento de estratégias para facilitar a detecção de ânions em sistemas biológicos, em análises físico-químicas, ambientais e outras [9, 10, 14, 67]. As possibilidades vão se expandindo e é notável um apelo à interdisciplinaridade na explicação da funcionalidade e na projeção de técnicas de caráter mais prático e viável, apontando para inúmeras perspectivas no que se refere ao estudo de quimiossensores aniônicos com elevada especificidade e seletividade, qualidade e segurança nos resultados, conforme as exigências contemporâneas [94, 101, 102]. Além disso, com os avanços no entendimento da química das estruturas iônicas, torna-se mais fácil explicar os comportamentos dos novos materiais, bem como concebê-los, levando-se em consideração as especificidades envolvendo as atrações iônicas e a estabilidade energética [103], o que esclarece a funcionalidade de sistemas biológicos, por exemplo, no que tange à existência de pares iônicos e o respectivo efeito de solvatação [104]. Nessa perspectiva, os ensaios de laboratório para quimiossensores cromo e fluorogênicos progrediram para os mais diversos campos, com importantes contribuições analíticas que vão desde os simples indicadores de pH [105] até os atuais e sofisticados testes que funcionam em escala nanométrica [106], em sistemas planejados em nível molecular e supramolecular [13, 23, 107–109].

Pode-se dizer que os grandes avanços no desenvolvimento de quimiossensores baseados na nanotecnologia buscam inspirações na capacidade sensorial natural dos seres vivos. Por isso, as técnicas reafirmam idéias há muito tempo conhecidas como a do modelo “chave e fechadura” de Emil Fischer, baseadas no princípio da complementaridade, mas inovam no que tange à capacidade de detecção de várias

espécies a partir de uma mesma matriz, cada qual com um sinal óptico ou eletrônico diferenciado. Para tanto, novas técnicas vão se consolidando para a interpretação dos dados obtidos, com o uso dos recursos da quimiometria [23, 110, 111]. Os quimiossensores aniônicos dispostos em matrizes poliméricas têm se tornado uma opção interessante, considerando a praticidade e a confiabilidade dos resultados [84, 106], para serem utilizados em diversas áreas.

Concluindo, a Química Analítica Supramolecular, com seu enfoque multidisciplinar, segue o seu crescimento vertiginoso, por meio do desenvolvimento de estratégias analíticas ancoradas nos princípios da Química Supramolecular e nas ferramentas nanotecnológicas. O conhecimento sempre maior sobre as interações receptor-substrato e sobre as propriedades ópticas de novos materiais, aliado à compreensão crescente da química no plano nanométrico e dos métodos quimiométricos, tem dotado os pesquisadores de um arsenal de informações que têm permitido a detecção das mais diversas espécies com interesse analítico, como é o caso do CN^- , com potencial de aplicação em diversas áreas, tais como em indústria, medicina, bioquímica, química forense e meio ambiente.

Agradecimentos

Os autores desejam expressar o seu agradecimento à Capes, ao CNPq e à FAPESC pelas bolsas concedidas e também à FURB e ao INCT-Catálise pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] Löhr, H. G.; Vögtle, F. *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 65.
- [2] *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*, Czarnik, A. W. (Ed.), ACS Symposium Series 538, Washington: American Chemical Society, **1993**.
- [3] Machado, V. G.; Machado, C.; Nascimento, M. da G.; Rezende, M. C. *Quim. Nova* **1996**, *19*, 523.
- [4] Wiskur, S. L.; Ait-Haddou, H.; Lavigne, J. J.; Anslyn, E. V. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 963.
- [5] Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419.
- [6] Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 267.
- [7] Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3081.
- [8] Suksai, C.; Tuntulani, T. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 192.
- [9] Mohr, G. J. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1082.
- [10] Mohr, G. J. *Anal. Biochem. Chem.* **2006**, *386*, 1201.
- [11] Suksai, C.; Tuntulani, T. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *255*, 163.
- [12] Prodi, L. *New J. Chem.* **2005**, *29*, 20.
- [13] Kubik, S.; Reyheller, C.; Stüwe, S. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2005**, *52*, 137.
- [14] Gunnlaugsson, T.; Glynn, M.; Tocci, G. M.; Kruger, P. E.; Pfeffer, F. M. *Coord.*

- Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3094.
- [15] Callan, J.F.; de Silva, A. P.; Magri, D. C. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8551.
- [16] Magri, D. C.; Vance, T. P.; de Silva, A. P. *Inorg. Chim. Acta* **2007**, *360*, 751.
- [17] Nguyen, B. T.; Anslyn, E. V. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3118.
- [18] Zimmermann–Dimer, L. M.; Machado, V. G. *Quim. Nova* **2008**, *31*, 2134.
- [19] Cho, D. G.; Sessler, J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1647.
- [20] Lehn, J. M. *Supramolecular Chemistry – Concepts and Perspectives*. Wiley–VCH Verlag, 1996.
- [21] Lehn, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 4763.
- [22] Lehn, J. M. *Rep. Prog. Phys.* **2004**, *67*, 249.
- [23] Anslyn, E. V. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 687.
- [24] Zelder, F. H.; Mannel–Croisé, C. *Chimia* **2009**, *63*, 58.
- [25] Seffrin, R. C. A. S.; Costa, E. C.; Borges, L.; Borges, V. C.; do Nascimento, P. C.; Dequech, S. T. B.; Sausen, C. D. *Biotemas* **2008**, *21*, 143.
- [26] Wolf, H.; Bilger E. *Processo para determinação colorimétrica da concentração de cianeto em soluções aquosas*. PI8706527-0, 1987. Disponível em: <http://www.patentesonline.com.br/processo-para-determinacao-colorimetrica-da-concentracao-em-cianeto-de-solucoes-aquosas-33298.html#more>. Acesso em 25/11/2009.
- [27] Disponível em: http://www.hannabrasil.com/produtos?page=shop.browse&category_id=1110 Acesso em 25/11/2009.
- [28] Nelson, L. J. *Emerg. Nurs.* **2006**, *32*, S8.
- [29] Baskin, S. I.; Brewer, T. G.; In: *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*, Sidell, F.; Takafuji, E. T.; Franz, D. R. (Eds.), Washington: TMM publications, **1997**, cap. 10.
- [30] Donato, D. B; Nichols, O.; Possingham, H.; Moore, M.; Ricci, P. F.; Noller, B. N. *Environ. Internat.* **2007**, *33*, 974.
- [31] Dutra, A. J. B.; Sobral, L. G. S.; Lemos, F. de A.; dos Santos, F. H. S. *REM – Revista Escola de Minas* **2002**, *55*, 267.
- [32] Halim, A. *Ocean & Coastal Management* **2002**, *45*, 313.
- [33] Mak, K. K. W.; Yanase, H.; Renneberg, R. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, *20*, 2581.
- [34] Midio, A. F.; Martins, D. I. *Toxicologia de alimentos*. 1ª ed., São Paulo: Varela, **2000**, cap. 2.
- [35] Agatemor, C. *Electronic J. Environ. Agric. Food Chem.* **2009**, *8*, 189.
- [36] Disponível em: <http://cepa.epagri.sc.gov.br/>. Acesso em 25/11/2009.
- [37] Cartilha SEBRAE: O aproveitamento sustentável da manipueira (Disponível em: <http://www.rts.org.br/noticias/destaque-2/arquivos/cartilha.pdf>. Acesso em 25/11/2009).
- [38] Formentini, H. M. Manipueira no controle de *Meloidogyne incognita* e no rendimento da figueira (*Ficus carica* L.) cv. Roxo de Valinhos no oeste paranaense. Dissertação de mestrado, UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2009.

- [39] Coultate, T. P. *Alimentos: a química de seus componentes*. 3ª. ed., traduzido por: Frazzon, J.; Soares, L. H. B.; Medina, L. F. C.; Heck, J. X., Porto Alegre: Artmed, **2004**, cap. 10.
- [40] Chisté, R. C.; Cohen, K. O.; Oliveira, S. S. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2007**, *27*, 437.
- [41] Furtado, J. L. B.; Bezerra, C. W. B.; Marques, E. P.; Marques, A. L. B. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2007**, *27*, 694.
- [42] Maziya-Dixon, B.; Dixon, A. G. O.; Adebowale, A. R. A. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2007**, *42*, 969.
- [43] Cumbana, A.; Mirione, E.; Cliff, J.; Bradbury, J. H. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 894.
- [44] Männel-Croisé, C.; Zelder, F. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 1272.
- [45] Gavin, H.; Monhemius, A. J. *Journal of Cleaner Production* **2006**, *14*, 1158.
- [46] Boiocchi, M.; Del Boca, L.; Gómez, D. E.; Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Monzani, E. J. *Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16507.
- [47] Steiner, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 48 [*Angew. Chem.* **2002**, *114*, 50].
- [48] Gronert, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10258.
- [49] Sun, Y.; Wang, G.; Guo, W. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3480.
- [50] Babu, J. N.; Bhalla, V.; Kumar, M.; Singh, H. *Lett. Org. Chem.* **2006**, *3*, 787.
- [51] Kumar, R.; Bhalla, V.; Kumar, M. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8095.
- [52] Zimmermann-Dimer, L. M.; Machado, V. G.; *Dyes Pigments* **2009**, *82*, 187.
- [53] Marcus, Y. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1991**, *87*, 2995.
- [54] Dickins, R. S.; Parker, D.; In: Gloe, K. (Ed.), *Macrocyclic Chemistry: Current Trends and Future Perspectives*, Dordrecht: Springer, **2005**, p. 121.
- [55] Zimmermann-Dimer, L. M.; Reis, D. C.; Machado, C.; Machado, V. G. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 4239.
- [56] Marini, V. G.; Zimmermann-Dimer, L. M.; Machado, V. G. *Spectrochim. Acta, Part A* **2010**, *75*, 799.
- [57] Lin, Z.; Chen, H. C.; Sun, S. S.; Hsu, C. P.; Chow, T. J. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5216.
- [58] Mohr, G. J. *Sens. Actuators, B* **2005**, *107*, 2.
- [59] Kim, Y. K.; Lee, Y. H.; Lee, H. Y.; Kim, M. K.; Cha, S.; Ahn, K. H. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4003.
- [60] Lee, H.; Chung, Y. M.; Ahn, K. H. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5544.
- [61] Badugu, R.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. *Dyes Pigments* **2005**, *64*, 49.
- [62] Badugu, R.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3635.
- [63] Badugu, R.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *522*, 9.
- [64] Badugu, R.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. *Anal. Biochem.* **2004**, *327*, 82.
- [65] Chung, Y. M.; Raman, B.; Kim, D. S.; Ahn, K. H. *Chem. Commun.* **2006**, 186.
- [66] Niu, H. T.; Jiang, X.; He, J.; Cheng, J. P. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6521.
- [67] Hudnall, T. W.; Gabbai, F. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11978.
- [68] Kim, D. S.; Chung, Y. M.; Jun, M.; Ahn, K. H. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4849.
- [69] Ekmekci, Z.; Yilmaz, M. D.; Akkaya, E. U. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 461.
- [70] Jamkratoke, M.; Ruangpornvisuti, V.; Tumcharern G.; Tuntulani T.;

- Tomapatanaget, B. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3919.
- [71] Ros-Lis, J. V.; Martínez-Máñez, R.; Soto, J. *Chem. Commun.* **2002**, 2248.
- [72] Jiménez, D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Ros-Lis, J. V.; Benito, A.; Soto, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9000.
- [73] García, F.; García, J. M.; García-Acosta, B.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J. *Chem. Commun.* **2005**, 2790.
- [74] Ros-Lis, J. V.; Martínez-Máñez, R.; Soto, J. *Chem. Commun.* **2005**, 5260.
- [75] Tomasulo, M.; Sortino, S.; White, A. J. P.; Raymo, F. M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 744.
- [76] Sessler, J. L.; Cho, D. G. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 73.
- [77] Kwon, S. K.; Kou, S.; Kim, H. N.; Chen, X.; Hwang, H.; Nam, S. W.; Kim, S. H.; Swamy, K. M. K.; Park, S.; Yoon, J. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4102.
- [78] Lee, K. S.; Kim, H. J.; Kim, G. H.; Shin, I.; Hong, J. I. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 49.
- [79] Sun, Y.; Wang, G.; Guo, W. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *65*, 3480.
- [80] Chung, S. Y.; Nam, S. W.; Lim, J.; Park, S.; Yoon, J. *Chem. Commun.* **2009**, 2866.
- [81] Nguyen, N.; Wu, Z. *J. Micromech. Microeng.* **2005**, *15*, R1.
- [82] Lou, X.; Zhang, L.; Qin, J.; Li, Z. *Chem. Commun.* **2008**, 5848.
- [83] Li, Z.; Lou, Z.; Yu, H.; Li, Z.; Qin, J. *Macromolecules* **2008**, *41*, 7433.
- [84] He, S.; Iacono, S. T.; Budy, S. M.; Dennis, A. E.; Smith, D. W. Jr.; Smith, R. C. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 1970.
- [85] Giusti, L. A.; Machado, V. G. *Orbital* **2009**, *1*, 101.
- [86] Liu, J.; Lu, Y. *Nature Protocols* **2006**, *1*, 246.
- [87] Youk, K. S.; Kim, K. M.; Chatterjee, A.; Ahn, K. H. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3652.
- [88] Jiang, X. C.; Yu, A. B. *Langmuir* **2008**, *24*, 4300.
- [89] Minami, T.; Kaneko, K.; Nagasaki, T.; Kubo, Y. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 432.
- [90] Shang, L.; Jin, L.; Dong, S. *Chem. Commun.* **2009**, 3077.
- [91] Shang, L.; Dong, S. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1465.
- [92] Yang, Y. K.; Tae, J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5721.
- [93] Chow, C. F.; Lam, M. H. W.; Wong, W. Y. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 8387.
- [94] Kim, S. Y.; Hong, S. J. I. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3109.
- [95] Anzenbacher, P. Jr.; Tyson, D. S.; Jursíková, K.; Castellano, F. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6232.
- [96] Miyaji, H.; Sessler, J. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 154.
- [97] Albert, A.; Serjeant, E. P. *The determination of ionization constants: A laboratory manual*, 3^a ed., Nova York: Chapman e Hall, **1984**, cap. 9, p.163.
- [98] Brettell, T. A.; Rudin, N.; Saferstein, R. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2877.
- [99] Delfino, R. T.; Ribeiro, T. S.; Figueroa-Villar, J. D. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 407.
- [100] Yang, Y. C.; Baker, J. A.; Ward, J. R. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1729.
- [101] García-Acosta, B.; García, F.; García, J. M.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; San-José, N.; Soto, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2429.
- [102] Schottel, B. L.; Chifotides, H. T.; Dunbar, K. R. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 68.

- [103]McCarty, R. S.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2188.
- [104]Collins, K. D.; Neilson, G. W.; Enderby, J. E. *Biophys. Chem.* **2007**, *128*, 95.
- [105]Gouveia-Matos, J. A. M. *Química Nova na Escola* **1999**, *10*, 6.
- [106]Coll, C.; Casasús, R.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Amorós, P. *Chem. Commun.* **2007**, 1957.
- [107]Whitesides, G. M.; Mathias, J. P.; Seto, C. T. *Science* **1991**, *254*, 1312.
- [108]Machado, V. G.; Baxter, P. N. W.; Lehn, J. M. *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 431.
- [109]Lehn, J. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1990**, *29*, 1304.
- [110]Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 481.
- [111]Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 338.

Developing the enzyme-machine analogy: a non-mathematical approach to teaching Michaelis-Menten kinetics

Simon Brown*

School of Human Life Sciences, University of Tasmania, Locked Bag 1320, Launceston, Tasmania 7250, Australia.

Received: 10 October 2009; accepted: 31 March 2010. Available online: 29 April 2010.

ABSTRACT: *The behavior of enzyme-catalyzed reactions is not made clear to many students by the standard mathematical description of enzyme kinetics. An enzyme-machine analogy is described that has made the details of the Michaelis-Menten mechanism and the associated kinetics more accessible with minimal use of mathematics. Students taught using the analogy appear to have fewer of the misconceptions than those taught using a more mathematical approach.*

Keywords: *analogy; enzyme kinetics; machine; teaching*

Introduction

Enzymes are often described as molecular machines [1], for example the F_0F_1 -ATP synthase has been compared to a Wankel rotary engine [2] and other enzymes are also reminiscent of machines [3]. The actual and potential nanobiotechnological applications of biomacromolecules simply reinforce the idea that the enzyme-machine (E-M) analogy is more than just a metaphor [4].

However, analogies must be developed and used carefully because they can engender significant misconceptions [5]. Orgill and Bodner [6] suggested that good analogies are simple, easy to remember and based on familiar analogue concepts, and that they should be used on the introduction of a difficult or challenging concept that cannot be visualized, but not when the target concept is overwhelming or has to be memorized. To be most effective, the elements of an analogy must be made clear and its

* Corresponding author. E-mail: Simon.Brown@utas.edu.au

limitations need to be explained.

Students find enzyme kinetics a challenging topic. This is unsurprising given that the concepts are expressed mathematically [7,8] and rely on several ideas that are particularly difficult for students (such as the mole concept and kinetic theory [9]), and the molecular processes can not be visualized directly. However, it is much less daunting if the student *understands* and does not feel the need to *remember*. The E-M analogy is simple, based on a familiar analogue concept, and helps to promote student comprehension and minimizes the pressure to memorize. Moreover, it can be used to link enzyme kinetics with other aspects of protein function, such as ligand binding and regulation. While the E-M analogy has been used before [10,11], it has yet to be fully developed, as I do here.

The Michaelis-Menten mechanism for the conversion of S ($[S] = s$) to P is



and the standard equations derived from it [12] are $v = k_{cat}c = V_{max}s/(K_m + s)$, where $K_m = (k_{-1} + k_{cat})/k_1$ is the Michaelis constant and the maximum rate of reaction is $V_{max} = k_{cat}e_t$, where e_t is the total enzyme concentration ($= e + c$, where e and c are the concentrations of E and ES, respectively). These equations appear to be simple, but many students struggle to see their implications. This is a result of the intrinsic challenges of chemistry [9] and the limited mathematical skill and confidence of many biology students [7,8], which reflects a more general decline in mathematical literacy [13-16]. For example, many students incorrectly define K_m as $1/2V_{max}$, when it is 'obvious' that K_m must have units of concentration in order to be able to add s and K_m . Moreover, it follows from the Michaelis-Menten equation that if $s = K_m$, then $v = 1/2V_{max}$. Anyone capable of this basic mathematical analysis should not make the mistake of defining K_m as $1/2V_{max}$, but it may be easy to make this error if the relationship has to be memorized.

Such difficulties prompted me to develop the machine analogy to provide a more intuitive way of teaching basic Michaelis-Menten kinetics that does not rely on understanding the underlying mathematics, but helps many students. While this is clearly not an original idea, I have not seen it developed, as it is here, to include some features of enzyme kinetics that many students find relatively mysterious, while limiting the development of misconceptions.

Premises of the enzyme-machine analogy

Very many biochemistry teachers will have suggested that an enzyme is similar to a machine, because it brings the protein into a realm with which students are familiar and because machine metaphors are common in biology [17]. Here, the analogy is based

on the following premises:

- a. A single enzyme corresponds to one machine and several enzymes are analogous to a factory containing the corresponding number of identical machines.
- b. Each enzyme-machine (E-M) repeatedly converts a specific S into a specific P in the same way, and at the end of the cycle is ready to carry out the task again.
- c. There are two warehouses in which are stored the raw material (substrate or S) and finished product (product or P), corresponding to the medium in which the reaction takes place.
- d. The S nearest the E-M is removed from the warehouse before the S that is further away, but the S is equidistant from each E-M. A high concentration of S (s) is taken to be related to a smaller distance between S and the E-M.
- e. The P is instantly removed from the vicinity of the E-M to prevent its accumulation interfering with further processing of S to P.

This model (summarized in table 1) illustrates several properties of the Michaelis-Menten mechanism and can be extended easily to incorporate concepts such as channeling.

Implications of the enzyme-machine analogy

1. The enzyme is a catalyst. In general, machines carry out tasks that a person could do given enough skill, time, energy and raw materials, but the machine does so much more rapidly and is not altered in the process. Similarly, an enzyme carries out a reaction that could, in principle, happen in its absence, but it does so much more quickly than would be the case in its absence. For example, ATP hydrolyses very slowly in solution ($k < 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, [18]), but in the presence of F_1 -ATP synthase the rate increases at least 10^5 -fold ($k > 800 \text{ s}^{-1}$, [19]), similarly, in the absence of carbonic anhydrase, the hydration of CO_2 is very slow ($k = 0.0375 \text{ s}^{-1}$, [20,21]), but in the presence of the enzyme the reaction is accelerated 10^7 -fold ($k = 8.1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, [22]). Neither enzyme is changed by the reaction catalyzed.

2. An enzyme has a specific catalytic mechanism. Like any machine, an enzyme carries out the same process repeatedly (unless something unusual happens). The mechanism (summarized by the Michaelis-Menten model) involves (i) the raw material being transported to the E-M, (ii) loading the E-M with raw material ($\text{S} + \text{E} \rightarrow \text{ES}$), (iii) the release of raw material from the E-M ($\text{ES} \rightarrow \text{E} + \text{S}$), and (iv) the conversion of the raw material into product and its release from the E-M ($\text{ES} \rightarrow \text{E} + \text{P}$). Naturally, phase (iv) is likely to involve several steps even for a simple manufacturing process, and, similarly, the enzymatic step summarizes some mechanochemical steps (Segel [23])

provides a comprehensive collection of various models, including these).

Table 1: Summary of the enzyme-machine analogy.

Characteristic	Enzyme	Machine
catalytic action	<ul style="list-style-type: none"> accelerates reactions not changed by the reaction 	<ul style="list-style-type: none"> generally accelerates a process that could be done manually given enough time, skill, energy and resources at the end of the cycle it is returned to the initial state
specific mechanism	<ul style="list-style-type: none"> $S + E \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$ 	<ul style="list-style-type: none"> repeated cycle of movements or processes
conservation of materials	<ul style="list-style-type: none"> $e_t = e + c$ $s_0 = s + c + p$ 	<ul style="list-style-type: none"> number of machines in the factory does not change stores of raw materials, products and material being processed are constant
activity increases with the supply of raw materials	<ul style="list-style-type: none"> $v = V_{\max} s / (s + K_m)$ 	<ul style="list-style-type: none"> the more materials, the shorter time a machine has to wait between cycles, but an upper limit is determined by the processing time
activity rises with the number of E-Ms	<ul style="list-style-type: none"> $V_{\max} = k_{\text{cat}} e_t$ 	<ul style="list-style-type: none"> the more machines, the greater the productivity
V_{\max} is approached asymptotically	<ul style="list-style-type: none"> $c/e_t = s / (s + K_m) < 1$ 	<ul style="list-style-type: none"> a machine must be free of materials before more can be loaded, so there is always a free machine, on average
K_m is independent of E-M number	<ul style="list-style-type: none"> $K_m = (k_{-1} + k_{\text{cat}}) / k_1$ 	<ul style="list-style-type: none"> the K_m is a property of each machine, so the factory has the same K_m
K_m reflects the affinity of E-M for S	<ul style="list-style-type: none"> $K_m = (k_{-1} / k_1) + (k_{\text{cat}} / k_1)$ $= (K_1)^{-1} + (k_{\text{cat}} / k_1)$ 	<ul style="list-style-type: none"> if the machine tends to load raw material more often than it unloads it, then the proportion of time spent processing raw materials is greater
K_m is inversely related to the efficiency of E-M	<ul style="list-style-type: none"> $\phi = k_{\text{cat}} / K_m$ is the first order rate constant for the reaction ($v/e_t \approx \phi s$) 	<ul style="list-style-type: none"> as K_m increases, the proportion of time a machine spends processing materials decreases
inhibition	<ul style="list-style-type: none"> inhibitors bind to E, ES or either, with different effects on K_m and V_{\max} 	<ul style="list-style-type: none"> a machine can be slowed by loading the wrong material and/or by loading material when the machine is operating
channeling	<ul style="list-style-type: none"> in multienzyme complexes, P is 'fed' directly to the next E 	<ul style="list-style-type: none"> in a factory with a production line, the product of one machine is passed to the next in the line

In solution, the frequency with which S encounters E depends on their proximity, which is related to the concentration of each, and on their interactions with the solvent and each other [24]. In the machine analogy, the frequency with which the raw materials are transported to the machine depends on the distance between S and each machine: the smaller the distance (corresponding to a greater concentration), the more rapidly the machine can be supplied with input.

On average, the binding of S to E to form ES takes a certain amount of time (the

average lifetime of E is $\tau_E = (k_1s)^{-1}$ [25]) and the degradation of ES ($ES \rightarrow E + S$ and $ES \rightarrow E + P$) takes another set period of time (the average lifetime of ES is $\tau_{ES} = (k_{-1} + k_{cat})^{-1}$ [25]). However, S may be released from ES as well as converted to P. The probability of the release of S ($ES \rightarrow E + S$) rather than P ($ES \rightarrow E + P$) depends on the relative sizes of k_{-1} and k_{cat} , respectively.

Of course, this model is an idealization in at least two respects. First, some enzymes do not carry out the same process every catalytic cycle either because of the possibility of binding different substrates (for example, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase can either carboxylate or oxygenate ribulose 1,5-bisphosphate yielding different products [26] and cytochrome P450s also utilize different substrates [27]). Second, even those enzymes that catalyze a single reaction need not do so at the same rate because the proteins are in various states [28,29] or because the kinetics can be modified by environmental conditions [30]. However, these phenomena might also be found in some machines. As a machine ages, it may not behave as it did when new and, even with maintenance, will have to be replaced eventually.

If the assumption of identical machines is relaxed, temporarily, to allow for mechanical failure, repair and, ultimately, replacement, then it is reasonable that some E-Ms will be replaced or have been serviced more recently than others. This implies that there might well be a range of values of k_1 , k_{-1} and k_{cat} , and therefore of K_m and V_{max} , just because of the inevitable aging of each E-M.

3. Conservation of materials ($e_t = e + c$ and $s_0 = s + p + c$). Unless some of the machines are removed (for repair, for example) then the total number of machines in the factory remains the same, even if they are in different states (E rather than ES, for example). Similarly, unless some of the P is dispatched from the warehouse, the total amount of materials ($= s + p + c$) cannot change. In biotechnological applications, the enzymes might be bound to a resin in a column and the substrate loaded onto the column and product removed from the bottom of the column, in which case the material is not conserved in the reaction volume.

4. Activity (v and V_{max}) increases with e_t and s . The more E-Ms there are operating in the factory, the more rapidly will P accumulate in the warehouse. Conversely, if some of the E-Ms are removed or incapacitated (by inhibition or from disrepair), the productivity (the product accumulated by the factory per unit time or v) will decline. This is consistent with the reduction in v associated with inhibition which is considered below.

If the E-M does not have to wait for the raw material (S) to be delivered, then the process can be carried out more frequently than if the E-M has to wait for raw materials. Put another way, the shorter the waiting time of each E-M for the input of raw materials, the closer to maximum productivity will the factory operate. Since the transfer of raw materials to the E-M relates to the distance between S and the enzyme, which corresponds to s (as described above), up to a certain point, the greater the stockpile of raw materials, the less time any machine will have to wait for its supply. Implicit in this idea are two other concepts:

- a. the speed of processing is independent of s (that is, the catalytic step takes a particular time once S is bound to the enzyme, as discussed above), and
- b. V_{\max} is approached when the supply of S is no longer limiting, rather this is a limitation arising from the supply of unoccupied enzyme (that is E rather than ES), a point that will be considered further below.

5. Maximum activity (V_{\max}) is a limit rather than a rate that can be achieved.

An E-M cannot start another cycle (bind S) until P has been released because S binds to the same site from which P is released. This means that there must be an empty active site at one point during each catalytic cycle otherwise a new S cannot bind to the enzyme (this is explicit in the Michaelis-Menten mechanism: $S + E \rightarrow ES$). No matter how rapidly the E-M carries out the task, this must be true, which means that the probability of an E-M being in the ES state is less than 1 ($\tau_{ES}/(\tau_E + \tau_{ES}) = s/(s + K_m) < 1$).

6. The K_m is independent of e_t . If there are no raw materials ($s = 0$), then no E-M will be occupied in converting S to P ($c = 0$ and $e = e_t$), but as the supply increases, so too does the proportion of time that the E-M can be occupied ($c \rightarrow e_t$ and so $e \rightarrow 0$). Somewhere between these two extremes, there is a particular $s (= K_m)$ at which each E-M will be occupied (or unoccupied) half of the time (so $c = e = 1/2e_t$), so each E-M will be converting S to P at half of the maximum rate ($v = 1/2V_{\max}$). If $s = K_m$, $k_1K_m = (k_{-1} + k_{\text{cat}})$ and $\tau_E = \tau_{ES}$, so the E-M is occupied (or unoccupied) half of the time.

Providing that raw materials are supplied to a machine at an appropriate rate (corresponding to an appropriate s , as described above, equal to K_m), it will be occupied only half of the time (that is, 50% of the time it will be involved in converting S to P). This rate of supply depends on the length of time the E-M is involved in the conversion of S to P (τ_{ES}), rather than the number of E-Ms (e_t). The same is true for each machine in a factory of identical machines, the longer the catalytic cycle takes, the fewer raw materials required. In a factory of identical machines, the same can be said for each machine, so the K_m is independent of e_t .

Even if this argument does not help some students, most will accept that K_m is a

property of each individual E-M, since it depends only on the three rate constants (k_1 , k_{-1} and k_{cat}). Subject to the possibility of E-Ms of different ages, every E-M has the same K_m and so does the population, irrespective of how many there might be.

The K_m is often said to be related to the affinity of E for S, by which is meant the tightness of the binding of S by E [31,32], and to the efficiency ($\phi = k_{cat}/K_m$) of the enzyme [33]. Strictly, K_m reflects the affinity of E for S when $k_{-1} \gg k_{cat}$ (in which case $K_m \approx k_{-1}/k_1$), otherwise the interpretation is more complicated. The link with affinity is based on the first (reversible) step of the Michaelis-Menten mechanism which relates to S binding (equation (1)) and has an equilibrium constant $K_1 = k_1/k_{-1}$ (for the reaction as written in equation (1)). The larger K_1 , the greater is c/e for a given s , which implies that E binds S more 'tightly' than would be the case if K_1 were smaller, equivalently, the higher the frequency of rejection (k_{-1} compared with k_1), the lower the affinity of the machine for raw materials. Since $K_m = (k_{-1} + k_{cat})/k_1 = K_1^{-1} + k_{cat}/k_1$, a large K_1 corresponds to a smaller K_m and a smaller s required to keep E occupied half of the time. Obviously, if a machine rarely unloads the raw material, then that raw material is bound tightly or with relatively high affinity.

7. Inhibition is the specific inactivation of enzymes. A machine may cease to operate if (i) defective or inappropriate raw materials are loaded, (ii) an attempt is made to load material before it is ready or (iii) either of these. The first case corresponds to competitive inhibition in which an inhibitory compound (I) binds to E (but not to ES). The greater the proportion of normal raw materials (S) to defective materials (I), the more frequently the E-M will carry out a normal cycle (V_{max} is not affected by I), but the presence of I decreases the efficiency with which the E-M is loaded, increasing K_m . The second case corresponds to noncompetitive inhibition in which I binds to ES (but not to E). Since the E-M binds the raw material normally, K_m is unaffected, but an E-M to which I is bound is inactive and increasing the supply of S does not overcome this effect (so V_{max} is reduced). The third case is simply a combination of the first two possibilities so I binds to either E or ES (so it is known as mixed inhibition).

Conclusion

Biochemistry, like chemistry and physiology, is a demanding discipline [9, 34, 35] and, partly because much of it deals with what cannot be seen directly, is rich in analogies. Students find enzyme kinetics challenging, which is unsurprising given that it is based on several of the concepts that Sirhan [9] identified as particular sources of difficulty for students (for example the mole concept, kinetic theory, thermodynamics and intermolecular forces), involves mathematics [7,8] and the molecular processes can not be visualized directly (for example, even where it is possible to 'watch' a single molecule in operation, the molecular processes involved must be inferred from

experiment [36]). This has necessitated the development of analogies [37-39] to assist students to comprehend molecular processes.

The E-M analogy outlined here (summarized in Table 1) is simple, easy to remember and based on a familiar analogue concept. The analogy is developed here more fully than it has previously been. Moreover, it is effective in that it helps students *understand* the concepts rather than having to *remember* them. For example, it almost eliminated the $K_m = \frac{1}{2}V_{max}$ misconception.

Acknowledgements

I would like to thank the many students whose questions provoked this work.

References and Notes

- [1] Alberts, B. *Cell* **1992**, 92, 291.
- [2] Yoshida, M.; Muneyuki, E.; Hisabori, T. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, 2, 669.
- [3] Perham, R. N. *Ann. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 961.
- [4] Knoblauch, M.; Peters, W. S. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, 61, 2497.
- [5] Spiro, R. J.; Feltovich, P. J.; Coulson, R. L.; Anderson, D. K. "Multiple analogies for complex concepts: antidotes for analogy-induced misconception in advanced knowledge acquisition," Center for the Study of Reading, 1988.
- [6] Orgill, M. K.; Bodner, G. *Chem. Educ. Res. Practice* **2004**, 5, 15.
- [7] Phoenix, D. A. *J. Biol. Educ.* **1999**, 34, 3.
- [8] Tariq, V. In *Diagnostic testing for mathematics*; MathsTEAM, Ed.; Learning and Teaching Support Network: Birmingham, 2003.
- [9] Sirhan, G. J. *Turkish Sci. Educ.* **2007**, 4, 2.
- [10] Fischer, E. *Ber. Deutsch Chem. Gesellsch.* **1894**, 27, 2985.
- [11] Koshland, D. E., Jr *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, 44, 98.
- [12] Briggs, G. E.; Haldane, J. B. S. *Biochem. J.* **1925**, 19, 338.
- [13] Hunt, D. N.; Lawson, D. A. *Teach. Math. Appl.* **1996**, 15, 167.
- [14] Lawson, D. *Teach. Math. Appl.* **1997**, 16, 151.
- [15] Engineering Council "Measuring the mathematics problem," Engineering Council, 2000.
- [16] Todd, K. L. *Math. Today* **2001**, 37, 152.
- [17] Paton, R. C. *Biol. Philosophy* **1992**, 7, 279.
- [18] de Meis, L.; Suzano, V. A. *FEBS Lett.* **1988**, 232, 73.
- [19] Nakamoto, R. K.; Ketchum, C. J.; Kuo, P. H.; Peskova, Y. B.; Al-Shawi, M. K. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1458, 289.
- [20] Gibbons, B. H.; Edsall, J. T. *J. Biol. Chem.* **1963**, 238, 3502.
- [21] Ho, C.; Sturtevant, J. M. *J. Biol. Chem.* **1963**, 238, 3499.
- [22] Zhang, X.; Hubbard, C. D.; van Eldik, R. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 9161.
- [23] Segel, I. H. *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*; Wiley-Interscience: Chichester, 1993.

- [24] Benson, S. W. *The foundations of chemical kinetics*; McGraw-Hill Book Company, Inc.: New York, 1960.
- [25] Sines, J. J.; Hackney, D. D. *Biochem. J.* **1987**, *243*, 159.
- [26] Farquhar, G. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1979**, *193*, 456.
- [27] Omiecinski, C. J.; Rimmel, R. P.; Hosagrahara, V. P. *Toxicol. Sci.* **1999**, *48*, 151.
- [28] Flomenbom, O.; Velonia, K.; Loos, D.; Masuo, S.; Cotlet, M.; Engelborgh, Y.; Hofkens, J.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M.; Van der Auweraer, M.; de Schryver, F. C.; Klafter, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 2368.
- [29] Brown, S. *ICFAI J. Biotech.* **2008**, *2*, 51.
- [30] Minton, A. P.; Wilf, J. *Biochem.* **1981**, *20*, 4821.
- [31] Henri, V. C. *R. Acad. Sci.* **1902**, *135*, 916.
- [32] Michaelis, L.; Menten, M. L. *Biochem. Z.* **1913**, *49*, 333.
- [33] Alberty, R. A.; Hammes, G. G. *J. Phys. Chem.* **1958**, *62*, 154.
- [34] Wood, E. J. *Biochem. Ed.* **1990**, *18*, 170.
- [35] Michael, J. *Adv. Physiol. Educ.* **2007**, *31*, 34.
- [36] Engel, A.; Müller, D. J. *Nature Struct. Biol.* **2000**, *7*, 715.
- [37] Helser, T. L. *J. Chem. Ed.* **1992**, *69*, 137.
- [38] Abel, K. B.; Halenz, D. R. *J. Chem. Ed.* **1992**, *69*, 9.
- [39] Cardoso, F. S.; Dumpel, R.; da Silva, L. B. G.; Rodrigues, C. R.; Santos, D. O.; Cabral, L. M.; Castro, H. C. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2008**, *36*, 120.