

CONTRIBUIÇÃO À IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS PURÍNICOS E PIRIMIDÍNICOS DE INTERESSE BIOLÓGICO

CARVALHO, A.*
MOLINARI, R.**

á

EQ/41

CARVALHO, A.; MOLINARI, R. Contribuição à identificação de compostos purínicos e pirimidínicos de interesse biológico. *Ecl. Quím.*, São Paulo, 4: 65-9, 1979.

RESUMO: Algumas características espectrais e cromatográficas de 76 compostos purínicos e pirimidínicos, relacionados às bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos, foram estabelecidas visando contribuição à análise e identificação desses compostos.

UNITERMOS: Compostos purínicos e pirimidínicos. Identificação em bactéria.

INTRODUÇÃO

A identificação de compostos purínicos e pirimidínicos torna-se cada vez mais importante à medida que cresce a importância dos ácidos nucleicos.

Entre os métodos de estudo destes compostos estão a cromatografia em papel e a espectrofotometria no ultravioleta.

O objetivo deste trabalho foi determinar as características de um grande número destes compostos frente à cromatografia ascendente em papel, usando diferentes solventes, e seus espectros de absorção na região do ultravioleta, como uma extensão a dados encontrados na literatura⁽¹⁻²⁾.

MATERIAL E MÉTODOS

Técnica e solventes para cromatografia ascendente em papel

S₂ — álcool metílico, ácido clorídrico concentrado (d = 1,19) e água destilada (7 : 2 : 1), segundo KIRBY⁽⁴⁾.

Cubas cromatográficas: Foram utilizadas cubas cilíndricas de vidro com 15 cm de diâmetro por 45 cm de altura, contendo 200 ml de solvente.

Técnica: As amostras eram aplicadas em tiras de papel Watman n.º 1 de 12 cm de largura por 38 cm de altura. As aplicações eram feitas com pipetas graduadas de 0,1 ml sobre uma linha a 3 cm da extremidade inferior do papel.

Solventes: Foram utilizados dois solventes (S₁ e S₂) com as seguintes composições:

S₁ — álcool isopropílico 65% (V/V)
— ácido clorídrico 2,0 N
(concentrações finais), segundo WYATT⁽³⁾.

Os pontos de aplicação marcados sobre a linha equidistavam-se de 2 cm; igual medida era mantida em relação às margens.

* Professor Assistente Doutor junto ao Departamento de Química Tecnológica do Instituto de Química da UNESP.

** Professor Titular junto ao Departamento de Química Tecnológica do Instituto de Química da UNESP.

Depois de corrido o cromatograma, marcava-se a posição da frente do solvente e deixava-se secando ao ar durante aproximadamente 15 horas, segundo WYATT⁽³⁾.

As posições das várias manchas eram assinaladas sob radiação ultravioleta e os valores de Rf eram determinados.

Determinação dos espectros de absorção: Mancha em pequenas pedações de aproximadamente 2 x 2 mm e extraía-se em 3,0 ml de ácido clorídrico 0,10N durante 5 horas, com agitação ocasional, conforme processo semelhante ao utilizado por WYATT⁽³⁾, o qual, entretanto, utilizou 5,0 ml de ácido clorídrico 0,10N e não definiu o tempo de extração.

Determinava-se, a seguir, o espectro de absorção de cada eluato no intervalo 210-320nm, contra uma referência ("Branco") preparada do mesmo modo, usando-se para cada caso uma área de

papel equivalente, recortada à mesma altura, numa região do cromatograma em que não se aplicara nenhuma amostra⁽³⁾.

Processo de identificação: A identificação de compostos purínicos e pirimidínicos é feita por comparação dos seus valores de Rf nos solventes S₁ e S₂ e dos seus máximos de absorção com os valores correspondentes obtidos para as substâncias de referência.

Feita esta identificação preliminar, o componente em estudo e a referência com a qual se identifica são cromatografados em paralelo nos dois solventes e determinados os espectros correspondentes. Os resultados obtidos servem para confirmar, ou não, a identificação inicial.

Pode ser feito também um estudo dos espectros, utilizando-se o método de AYRES⁽⁵⁾ da superposição das curvas espectrais, para os compostos identificados e suas respectivas referências.

Abreviaturas utilizadas:

- (A) — mancha do cromatograma absorvente no ultravioleta.
- (F) — mancha do cromatograma fluorescente no ultravioleta.
- λ — comprimento de onda.
- AMP (5') — ácido adenílico(5') ou monofosfato de adenosina(5').
- ADP (5') — difosfato de adenosina(5').
- ATP (5') — trifosfato de adenosina(5').
- GMP (5') — ácido guanílico(5') ou monofosfato de guanosina(5').
- GDP (5') — difosfato de guanosina(5').
- CMP (5') — ácido citidílico(5') ou monofosfato de citidina(5').
- UMP (5') — ácido uridílico(5') ou monofosfato de uridina(5').
- IMP (5') — ácido inosínico(5') ou monofosfato de isonina(5').
- NAD — dinucleotídeo de adenina e nicotinamida.
- NADP — fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida.
- d-AMP(5') — ácido desoxiadenílico(5') ou monofosfato de desoxiadenosina(5').
- d-GMP(5') — ácido desoxiguanílico(5') ou monofosfato de desoxiguanosina(5').
- d-CMP(5') — ácido desoxicitidílico(5') ou monofosfato de desoxicitidina(5').
- 5-metil-d-CMP(5') — ácido 5-metildesoxicitidílico(5').
- TMP(5') — ácido timidílico(5') ou monofosfato de timidina(5').
- ε — coeficiente de extinção.

TABELA I — Características dos Compostos Purínicos

COMPOSTO	Aspecto	S ₁	Rf	S ₂	λ _{max} (nm)	ε _{max}
NAD.3.5H ₂ O	(A)	0,13		0,18	255	12,2
2,6-diamino purínea, semissulfato. 0,5H ₂ O	(F)	0,18		0,19	241	7,1
					281	7,5
NADP, sal monossódico. 3,5H ₂ O	(A)	0,19		0,29	257,5	13,3
d-GMP(5'), sal dissódico. 3,5H ₂ O	(F)	0,22		0,21	248	11,2
guanina	(F)	0,24		0,18	249	9,8
xantina	(F)	0,24		0,28	264	9,0
2'-desoxiguanosina	(F)	0,25		0,22	247,5	8,7
7-metilguanina	(F)	0,28		0,25	250	9,3
inosina	(A)	0,29		0,33	248	10,1
N(2)-acetilguanina	(F)	0,30		0,24	253,5	11,1
2-aminopurina	(F)	0,30		0,27	220	22,0
					315	2,8
2,6-dimercaptopurina	(F)	0,30		0,28	255	2,9
					297,5	4,4
guanosina	(F)	0,30		0,34	247,5	8,8
hipoxantina	(A)	0,31		0,29	248	9,7
ácido úrico	(A)	0,32		0,20	231,5	3,4
					283,5	4,5
d-AMP(5'), sal dissódico. 3H ₂ O	(A)	0,33		0,34	260	10,7
adenina	(A)	0,34		0,31	262,5	12,5
2-mercaptoadenina, sulfato	(A)	0,34		0,31	272,5	3,0
1-metiladenina	(A)	0,35		0,43	260	9,1
IMP(5'), sal sódico. 5H ₂ O	(A)	0,35		0,45	248,5	9,9
GDP(5'), sal trissódico	(F)	0,36		0,45	251,5	8,1
GMP(5'). H ₂ O	(F)	0,37		0,46	250	3,3
adenosina	(A)	0,38		0,39	262	14,6
N(2)-dimetilguanina	(F)	0,39		0,39	256	17,0
2'-desoxiadenosina	(A)	0,41		0,40	262,5	11,1
ADP(5'). 3H ₂ O	(A)	0,42		0,52	260	18,5
8-azaguanina	(F)	0,43		0,42	250	7,4
1-metiladenosina	(A)	0,43		0,54	261	9,6
ATP(5'), sal dissódico. 4H ₂ O	(A)	0,45		0,56	258,5	13,2
1-metilinosina	(A)	0,46		0,58	250	9,1
AMP(5'). H ₂ O	(A)	0,48		0,50	260	12,4
N(6)-metiladenina	(A)	0,50		0,49	267,5	12,2
N(6)-metiladenosina	(A)	0,54		0,60	267,5	11,5
N(6)-dimetiladenina	(A)	0,55		0,58	275	11,8
6-metilmercaptapurina	(A)	0,57		0,55	220	6,0
					296	10,6
N(6)-dimetiladenosina	(A)	0,59		0,73	275	11,7
N(6)-γ, γ-dimetiladenina	(A)	0,89		0,78	265	10,9
N(6)-γ, γ-dimetiladenosina	(A)	0,89		0,83	266	12,2

TABELA II — Características dos Compostos Pirimidínicos

COMPOSTO	Aspecto	Rf		λ_{max} (nm)	ϵ_{max} mM
		S ₁	S ₂		
5-hidroxiuracil	(F)	0,05	0,06	240	25,4
citosina	(A)	0,48	0,44	300	19,9
citidina	(A)	0,49	0,52	275	9,9
pseudouridina	(A)	0,51	0,50	279	12,3
5-metilcitidina	(A)	0,51	0,57	263,5	9,3
5-metilcitosina, cloridrato	(A)	0,52	0,57	286	19,8
CMP (5')	(A)	0,52	0,58	282,5	8,0
2-tiocitosina	(A)	0,53	0,47	278,5	12,9
				225	11,6
				276	14,9
5-nitrouracil	(A)	0,54	0,52	235	4,2
				297,5	5,3
3-metilcitidina, metilsulfato	(A)	0,55	0,69	277,5	11,4
5-hidroximetilcitosina	(A)	0,56	0,53	279	7,2
ácido orótico. H ₂ O	(A)	0,59	0,54	280	1,8
5-metilpiridina	(A)	0,59	0,72	250	1,1
d-CMP (5'), sal dissódico. 2.5H ₂ O	(A)	0,62	0,67	280	10,1
5-metil, 2-tiocitosina	(A)	0,63	0,62	225	9,8
				277,5	13,8
6-azauracil	(A)	0,63	0,64	258	5,5
2'-desoxicitidina, cloreto	(A)	0,65	0,68	278	7,2
5-metil-d-CMP (5')	(A)	0,65	0,71	287,5	16,4
2-amino, 4-hidroxi, 6-metilpirimidina	(A)	0,67	0,65	220	8,4
				257,5	8,1
uracil	(A)	0,69	0,59	257,5	6,9
2-tiouracil	(A)	0,69	0,64	267,5	10,6
uridina	(A)	0,69	0,65	261	8,9
6-metilmercaptouracil	(A)	0,69	0,70	268,5	10,1
6-metil, 2-tiouracil	(A)	0,69	0,71	267,5	9,4
UMP (5'), sal dissódico. 4.5H ₂ O	(A)	0,71	0,73	261	8,2
5-iodouracil	(A)	0,72	0,62	282	5,5
5-bromouracil	(A)	0,72	0,62	275	6,1
ácido 5-metilorótico	(F)	0,74	0,61	282,5	3,8
5-fluoruracil	(A)	0,74	0,66	264	5,8
4,4'-ditiouridina	(A)	0,75	0,67	262,5	5,0
6-metiluracil	(A)	0,75	0,74	260	10,1
2-amino, 4,6-dimetilpirimidina	(F)	0,77	0,81	222,5	10,3
				296	5,3
timina	(A)	0,80	0,70	264	6,7
ditiouracil	(A)	0,82	0,63	278,5	5,4
2'-desoxiuridina	(A)	0,82	0,82	262	6,9
TMP (5'), sal dissódico. 1.5H ₂ O	(A)	0,85	0,81	267	9,2
timidina	(A)	0,85	0,84	268,5	7,6
3-metiluridina	(A)	0,89	0,84	261,5	19,6

RESULTADOS

Tempo de corrida dos cromatogramas: Os resultados obtidos com os compostos purínicos estão condensados na Tabela I e com os compostos pirimidínicos na Tabela II.

Temperatura — 25°C
S₁ — 24 horas
S₂ — 8 horas

DISCUSSÃO

As características espectrais (λ_{max} e ϵ_{max}) e os valores de Rf em dois sistemas de cromatografia em papel permitem a caracterização e a quantificação dos compostos de interesse biológico estudados neste trabalho.

Os dados coletados originaram-se de tentativa de identificação dessa classe de compostos que, em condições determinadas, acumulam-se em caldos de cultura de microrganismos⁽⁶⁾.

Com a aplicação da cromatografia ascendente em papel associada à espectrofotometria ultravioleta, no estudo de derivados de nucleosídeos e nucleotídeos poderá ser confirmada através da hidrólise destes compostos e da procura das bases correspondentes.

A identificação de nucleosídeos e nucleotídeos poderá ser confirmada através da hidrólise destes compostos e da procura das bases correspondentes.

EQ/41

CARVALHO, A.; MOLINARI, R. Contribution to the identification of purine and pyrimidine compounds of biological interest. *Ecl. Quím.*, São Paulo, 4: 65-9, 1979.

SUMMARY: Some spectral and chromatographic data of 76 purine and pyrimidine compounds related to the nucleic acid bases were determined as a contribution to their analyses and identification.

UNITERMS: Purines and pyrimidines. Identification in biological material.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. R. M. C., DAWSON; D. C., ELLIOTT; W. H., ELLIOTT e K. M., JONES. *Data for Biochemical Research*. London, Oxford University Press, 1959.
2. J. G., GRASSELLI e W. M., RITCHEY. *Atlas of Spectral Data and Physical Constants for Organic Compounds* (2nd Edition). Cleveland, CRC Press Inc., 1975, Vol. I-VI.
3. G. R., WYATT. *Biochem. J.* 48: 584 (1951).
4. K. S., KIRBY. *Biochim. et Biophys. Acta*, 18: 575 (1955).
5. G. H., AYRES. *Quantitative Chemical Analysis*. New York, Harper & Row, 1964.
6. A., CARVALHO e R., MOLINARI. *Rev. Bras. Tecnol.*, 7(3), 289 (1976).
7. A., CARVALHO e R., MOLINARI. FFCL de Araraquara, 1973.

Recebido para publicação em 09-02-1979.