

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

LIGIANE RIOS GOUVEA

**Complexos Metálicos de Fluorquinolonas:
Síntese, Atividade Biológica e Estudos do Mecanismo de Ação**

Belo Horizonte

2013

UFMG-ICEX/DQ. 974^a

T. 440^a

LIGIANE RIOS GOUVEA

**Complexos Metálicos de Fluorquinolonas:
Síntese, Atividade Biológica e Estudos do Mecanismo de Ação**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Belo Horizonte

2013

Gouvea, Ligiane Rios
G719c Complexos metálicos de fluorquinolonas [manuscrito]
2013 : síntese, atividade biológica e estudos do mecanismo
T de ação / Ligiane Rios Gouvea. 2013.
 xvii, 128 f. : il.

Orientadora: Letícia Regina de Souza Teixeira.
Coorientador: Paulo Jorge Sanches Barbeira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.
Inclui anexos.

1. Química inorgânica - Teses 2. Antibióticos - Teses 3. Complexos metálicos - Teses 4. Mecanismo de ação (Bioquímica) - Teses I. Teixeira, Letícia Regina de Souza, Orientadora II. Barbeira, Paulo Jorge Sanches, Coorientador III. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



"Complexos Metálicos de Fluorquinolonas: Síntese, Atividade Biológica e
Estudos do Mecanismo de Ação"

Ligiane Rios Gouvea

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Leticia R. S. Teixeira

Profa. Leticia Regina de Souza Teixeira - Orientadora
UFMG

Paulo Jorge Sanches Barbeira

Prof. Paulo Jorge Sanches Barbeira - Coorientador
UFMG

Gaspar Díaz Muñoz

Prof. Gaspar Díaz Muñoz
UFMG

Gilson de Freitas Silva

Prof. Gilson de Freitas Silva
UFMG

Alzir Azevedo Batista

Prof. Alzir Azevedo Batista
UFSCAR

Renata Galvão de Lima

Prof. Renata Galvão de Lima
UFBA

Belo Horizonte, 26 de julho de 2013.

O trabalho descrito nesta tese foi realizado sob a orientação da Profa. Letícia Regina Teixeira e coorientação do Prof. Paulo Jorge Sanches Barbeira.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Quinolonas e fluorquinolonas	1
1.2 Complexação a metais	5
1.3 O câncer	7
1.4 A doença de chagas	8
1.5 Interação com alvos biológicos	10
1.6 Fluorescência	12
1.6.1 Constante de ionização	17
2. OBJETIVOS E RELEVÂNCIA	19
3. METODOLOGIA	21
3.1 Reagentes, solventes e soluções	21
3.2 Equipamentos	21
3.3 Síntese	23
3.3.1 Síntese dos complexos de Au(III) de norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) e esparfloxacin (SPAR)	23
3.3.2 Síntese dos complexos de Zn(II) de norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFLO) e esparfloxacin (SPAR)	24

3.3.3	Síntese do precursor $[ZnCl_2(phen)]$ e do complexo de Zn(II) de norfloxacin contendo 1,10-fenantrolina (phen)	26
3.3.4	Síntese dos complexos de Mn(II) de norfloxacin (NOR) e esparfloxacin (SPAR)	27
3.4	Estudos espectroscópicos dos complexos de Au(III), Zn(II) e Mn(II) com a norfloxacin	30
3.4.1	Determinação da constante de ionização da norfloxacin e seus complexos de Zn(II)	31
3.4.2	Interação com alvos biológicos	31
3.5	Voltametria	33
3.6	Testes biológicos	34
3.6.1	Toxicidade frente às formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas do <i>Trypanosoma Cruzi</i>	34
3.6.2	Toxicidade frente às linhagens tumorais A20, B16-F10, K562, MCR-5 e L919	35
3.6.3	Bactérias e fungos	36
4.	Complexos de Au(III) de algumas fluorquinolonas: síntese, caracterização, testes de atividade biológica e estudos de interação com alvos biológicos	38
4.1	Dados de microanálise e medidas de condutividade	38
4.2	Espectroscopia na região do infravermelho	39
4.3	Análise termogravimétrica	41
4.4	Ressonância magnética nuclear	42
4.5	Estudos de interação dos complexos de Au(III) de algumas fluorquinolonas e seus ligantes com a albumina bovina	44
4.6	Estudos de interação dos complexos de Au(III) de algumas fluorquinolonas com o DNA	49
4.7	Toxicidade dos complexos de Au(III) frente as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas do <i>Trypanosoma Cruzi</i>	53
4.8	Toxicidade dos complexos de Au(III) frente as linhagens tumorais A20, B16-F10, K562, MCR-5 e	54

5. Complexos de Zn(II) de algumas fluorquinolonas: síntese, caracterização, testes de atividade biológica, determinação das constantes de ionização e estudos de interação com alvos biológicos	58
5.1 Dados de microanálise e medidas de condutividade	58
5.2 Espectroscopia na região do infravermelho	60
5.3 Análise termogravimétrica	63
5.4 Ressonância magnética nuclear	63
5.5 Estudos de fluorescência da norfloxacin e seus complexos de Zn(II)	65
5.6 Estudos de interação dos complexos de Zn(II) de norfloxacin com a albumina bovina	67
5.7 Estudos de interação dos complexos de Zn(II) de norfloxacin com o DNA	73
5.8 Toxicidade dos complexos de Zn(II) frente às formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas do <i>Trypanosoma Cruzi</i>	75
5.9 Atividade antibacteriana e antifúngica	77
6. Complexos de Mn(II) de algumas fluorquinolonas: síntese, caracterização, testes de atividade biológica e estudos de interação com alvos biológicos	80
6.1 Dados de microanálise e medidas de condutividade	80
6.2 Espectroscopia na região do infravermelho	81
6.3 Análise termogravimétrica	82
6.4 Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	83
6.5 Voltametria cíclica	85
6.6 Estudos de interação dos complexos de Mn(II) de esparfloxacin com a albumina humana	86
6.7 Atividade antibacteriana e antifúngica	92

7. CONCLUSÕES	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXOS	106

DEDICATÓRIA

“À Deus, aos meus pais,
à Ane Laura e ao Anderson.”

AGRADECIMENTOS

À Deus

O principal responsável por este trabalho.

À minha orientadora e coorientador

Profa. Dra. Letícia Regina Teixeira,

Prof. Dr. Paulo Jorge Sanches Barbeira,

Pela experiência, apoio e dedicação no desenvolvimento de todas as etapas desta jornada.

Aos colaboradores deste trabalho

Pelo trabalho em parceria realizado. Em especial à Dra. Sônia R. W. Louro.

Aos professores da pós-graduação e graduação

Pelo conhecimento transmitido.

À FAPEMIG e CNPq

Pelo apoio financeiro.

À UFMG

Por permitir o uso das instalações para a realização deste trabalho.

Aos Funcionários da UFMG

Pela colaboração no desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho.

À todos os colegas da pós-graduação

Pois juntos trilhamos uma etapa importante de nossas vidas.

Aos amigos e colegas

Pela vibração em relação a esta jornada. Em especial à Darliane A. Martins, Meiriane C. F. Soares e Marcelo M. Viana.

Aos meus pais

Pela confiança e apoio.

À minha irmã

Pela amizade e interminável colaboração.

Ao Anderson

Pela motivação, força e paciência.

COMPLEXOS METÁLICOS DE FLUORQUINOLONAS: SÍNTESE, ATIVIDADE BIOLÓGICA E ESTUDOS DO MECANISMO DE AÇÃO

RESUMO

Neste trabalho, três complexos de Au(III) das fluorquinolonas norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) e esparfloxacin (SPAR) foram obtidos e caracterizados com técnicas físico-químicas e espectroscópicas: $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**). Nestes complexos, NOR, LEVO e SPAR estão coordenados de forma neutra e bidentada ao Au(III), através dos átomos de nitrogênio do anel de piperazina, que é um modo incomum de coordenação para esta classe de compostos. Dois íons cloreto ocupam os sítios de coordenação restantes.

A atividade citotóxica das fluorquinolonas e seus complexos de Au(III) foram testadas utilizando as linhagens tumorais A20 (Linfoma murino), B16-F10 (Melanoma murino), K562 (Leucemia mielóide humana) e como células normais (controle) utilizou-se a linhagem estabelecida MCR-5 (fibroblasto de pulmão humano) e L919 (Fibroblasto de pulmão murino). Todos os complexos foram mais ativos que seus ligantes livres correspondentes. O complexo $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**) foi selecionado para a fragmentação do DNA e análise de ciclo celular.

Titulações espectroscópicas com calf-thymus DNA (CT DNA) mostraram que os complexos podem se ligar ao CT DNA, provavelmente por um contato externo (ligação eletrostática ou sulco, resultante do empilhamento dos pares de bases na dupla hélice). Os complexos apresentam boa interação com a albumina do soro bovino (BSA), com valores de constante de ligação relativamente elevadas.

Complexos de Zn(II) com norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFLO) e esparfloxacin (SPAR) na ausência ou na presença de 1,10-fenantrolina (fen) foram obtidos e caracterizados. Em todos os complexos, os ligantes foram coordenados através dos oxigênios da carbonila da cetona e do grupo carboxílico. Geometrias tetraédricas foram propostas para $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**4**), $[\text{ZnCl}_2(\text{OFLO})]$ (**5**), $[\text{ZnCl}_2(\text{SPAR})]$ (**6**) e geometria octaédrica para $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**8**).

As constantes de ionização dos complexos de Zn(II) com a NOR foram calculadas já que a atividade biológica dos fármacos depende do seu valor de pH. A interação desses complexos com CT DNA sugere que os complexos de Zn(II) podem ligar-se moderadamente por intercalação entre as bases de DNA.

As interações entre os complexos de Zn(II) com a NOR e albumina do soro bovino (BSA) foram investigadas por espectroscopia de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo, em pH 7,4. Os dados experimentais indicam que ambos os complexos se ligam à BSA por mecanismo estático. O gráfico da equação modificada de Stern-Volmer para o complexo (8) demonstra uma ligação preferencial perto de um dos dois resíduos de triptofano de BSA. As constantes de ligação obtidas (K_b) mostraram que a BSA teve maior afinidade para o complexo (8) do que para o complexo (4). Essa interação preferencial com sítios da proteína pode ser importante para os seus mecanismos de ação biológicos.

A análise *in vitro* dos complexos de Zn(II) e seus ligantes contra as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas, mostrou que o complexo (8) foi o mais ativo contra as formas tripomastigotas da corrente sanguínea.

Atividades antifúngicas e antibacterianas dos complexos de Zn(II) contra várias bactérias e fungos foram realizadas e comparadas com os ligantes NOR, OFLO e SPAR. Os complexos de Zn(II) mostraram uma atividade antimicrobiana mais elevada do que as fluorquinolonas frente ao fungo *Aspergillus niger* e a bactéria *Salmonella typhi*.

Os complexos de manganês, $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (9), $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{H}_2\text{O})_2].3\text{H}_2\text{O}$ (10), $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})].2\text{H}_2\text{O}$ (11) e $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{phen})].3\text{H}_2\text{O}$ (12), foram obtidos da reação do $\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$ com a norfloxacin (NOR) e a esparfloxacin (SPAR). Em todos os casos, a NOR e a SPAR se coordenam na forma neutra ou zwitteriônica ao Zn(II).

O efeito antifúngico e antibacteriano dos complexos (9–12) e seus ligantes foi testado frente a várias bactérias e fungos. Alguns complexos de Mn(II) exibiram alta atividade quando comparados com os ligantes. Estes complexos interagem com albumina sérica humana pelo processo estático. Com os valores obtidos para os parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) inferiu-se que o processo de formação do sistema HSA-complexos de Mn(II) é espontâneo e que as forças de dispersão de London e ligação de hidrogênio desempenharam papéis importantes na estabilização do complexo.

Palavras-chaves: complexos de Au(III), complexos de Zn(II), complexos de Mn(II), interação com albumina sérica bovina, interação com albumina sérica humana, interação com DNA.

FLUOROQUINOLONES' METAL COMPLEXES: SYNTHESIS, BIOLOGICAL ACTIVITY AND MECHANISM OF ACTION STUDIES

ABSTRACT

In this work, three Au(III) complexes of the fluoroquinolones norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) and sparfloxacin (SPAR) were prepared and characterized with physicochemical and spectroscopic techniques: $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**). In these complexes, NOR, LEVO and SPAR act as bidentate neutral ligands bound to Au(III) through the nitrogen atoms of the piperazine ring, which is an unusual mode of coordination for this class of compounds. Two chloride ions occupy the remaining coordination sites.

The cytotoxic activity of the fluoroquinolones and their Au(III) complexes was tested against the A20 (murine lymphoma), B16-F10 (murine melanoma) and K562 (human myeloid leukemia) tumor cell lines as well as the L919 (murine lung fibroblasts) and MCR-5 (human lung fibroblasts) normal cells lines. All complexes were more active than their corresponding free ligands. Complex $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ (**2**) was selected for DNA fragmentation and cell cycle analysis.

Spectroscopic titration with calf-thymus DNA (CT DNA) showed that the complexes can bind to CT DNA, probably by an external contact (electrostatic or groove binding, resulting from stacking of the base pairs in the double helix). The complexes exhibit good binding propensity to bovine serum albumin (BSA) having relatively high binding constant values.

Zn(II) complexes with norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFLO) and sparfloxacin (SPAR) in the absence or in the presence of the 1,10-phenanthroline (phen) were obtained and characterized. In all complexes, the ligands were coordinated through oxygen atoms of the carbonyl group of the ketone and carboxylic acid. Tetrahedral geometries were proposed for $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**4**), $[\text{ZnCl}_2(\text{OFLO})]$ (**5**), $[\text{ZnCl}_2(\text{SPAR})]$ (**6**) and octahedral geometry for $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**8**).

The ionization constants of Zn(II) complexes with the NOR were calculated as the biological activity of the drug depends on its pH value. The interaction of these compounds with CT DNA suggests that the Zn(II) complexes can bind moderately by intercalation between DNA bases.

The interactions between the Zn(II) complexes with the NOR and bovine serum albumin (BSA) were investigated by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy at pH 7.4. The experimental data showed static quenching of BSA fluorescence, indicating that both complexes bind to BSA. A modified Stern-Volmer plot for the quenching by complex (8) demonstrated preferential binding near one of the two tryptophan residues of BSA. The binding constants obtained (K_b) showed that BSA had higher affinity for complex (8) than for complex (4). This preferential interaction with protein sites could be important to their biological mechanisms of action.

The analysis *in vitro* of the Zn(II) complexes and corresponding ligand were assayed against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease and the data showed that complex (8) was the most active against bloodstream trypomastigotes.

Antifungal and antibacterial activities of the Zn(II) complexes were evaluated and compared with the reference drugs SPAR, OFLO and NOR. The Zn(II) complexes showed higher antimicrobial activity than the fluoroquinolones against *Aspergillus niger* and *Salmonella typhi*.

Mn(II) complexes, $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (9), $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{H}_2\text{O})_2].3\text{H}_2\text{O}$ (10), $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})].2\text{H}_2\text{O}$ (11) e $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{phen})].3\text{H}_2\text{O}$ (12), with norfloxacin (NOR) and sparfloxacin (SPAR) were obtained from $\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$. In all cases the NOR and SPAR coordinate in the neutral zwitterionic form to Mn(II).

Complexes (9–12), together with the corresponding ligands were evaluated for their antifungal and antibacterial effects. Some Mn(II) complexes exhibited higher potency than the free ligands. These complexes interacted with human serum albumin by the static process. The values obtained for the thermodynamic parameters (ΔG , ΔH and ΔS) suggested that the formation process of HSA-Mn(II) complexes was spontaneous and that the London forces and hydrogen bonding played important roles in stabilizing the complexes.

Keywords: Au(III) complexes, Zn(II) complexes, Mn(II) complexes, interaction with bovine serum albumin, interaction with human serum albumin, interaction with DNA.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

phen	1,10- fenantrolina
Abs.	absorvância
DNA	ácido desoxirribonucléico
BSA	albumina sérica bovina
CHN	análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio
DEPT	intensificação da distorção por transferência de polarização
IC ₅₀	concentração necessária para inibir 50% da atividade
DMSO	dimetilsulfóxido
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
RPE	ressonância paramagnética eletrônica
HSA	albumina sérica humana
IV	infravermelho
LEVO	levofloxacina
NOR	norfloxacina
OFLO	ofloxacina
r^2	coeficiente de correlação
RMN de ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SPAR	esparfloxacina
TG/DTG	análise termogravimétrica
UV-Vis.	ultravioleta-visível
δ	deslocamento químico
ν	estiramento
λ	comprimento de onda

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura geral das quinolonas.	1
Figura 1.2 - Estruturas do ácido nalidíxico e do ácido pipemídico.	2
Figura 1.3 - Estruturas de diferentes gerações de quinolonas.	3
Figura 1.4 - Representação do equilíbrio protolítico da norfloxacinina nos meios ácido (H_2F^+), neutro (H_2F^+) e alcalino (HF^-), da esquerda para a direita, respectivamente.	5
Figura 1.5 - Representação do ciclo de vida do <i>Trypanossoma cruzi</i>	9
Figura 1.6 - Estruturas de (a) nifurtimox e (b) benzonidazol.	10
Figura 1.7 - Representação da estrutura molecular do ácido desoxirribonucléico, segundo Watson e Crick (1953).	11
Esquema 3.1 – Representação da obtenção do complexo (1).	24
Esquema 3.2 – Representação da obtenção do complexo (2).	24
Esquema 3.3 – Representação da obtenção do complexo (3).	24
Esquema 3.4 – Representação da obtenção do complexo (4).	25
Esquema 3.5 – Representação da obtenção do complexo (5).	25
Esquema 3.6 – Representação da obtenção do complexo (6).	26
Esquema 3.7 – Representação da obtenção do complexo (7).	27
Esquema 3.8 – Representação da obtenção do complexo (8).	27
Esquema 3.9 – Representação da obtenção do complexo (9).	29

Esquema 3.10 – Representação da obtenção do complexo (10).	29
Esquema 3.11 – Representação da obtenção do complexo (11).	29
Esquema 3.12 – Representação da obtenção do complexo (12).	30
Figura 3.1- Representação de microplaca do ensaio antibacteriano e antifúngico com as amostras a uma concentração fixa.	37
Figura 4.1 - Espectros de infravermelho da (a) SPAR e do complexo (B) $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3) em pastilhas de KBr.	40
Figura 4.2 - Modelo de preenchimento espacial da molécula de BSA com resíduos básicos (em azul), resíduos ácidos (em vermelho) e resíduos neutros (em amarelo). (A) vista frontal, (B) vista traseira, (C) lado esquerdo e (D) lado direito (FERREIRA, 2009).	44
Figura 4.3 - Espectros de emissão da BSA na presença de concentrações crescentes de (A) NOR, (B) Complexo (1), (C) LEVO, (D) Complexo (2), (E) SPAR, (F) Complexo (3). $\lambda_{\text{excitação}} = 285 \text{ nm}$. Reta inserida: plotagem de $[(F_0 - F) - 1] \text{ versus } [\text{composto}]$. $\{[\text{BSA}] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ e } [\text{Composto}] = 8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}, \text{ a } 25 \text{ }^\circ\text{C}\}$. Os pontos em vermelho não foram levados em consideração nos cálculos das constantes. As setas mostram as mudanças na emissão da BSA após a adição dos compostos.	46
Figura 4.4 - Estrutura da guanina.	49
Figura 4.5 - Espectros de absorção de (A) NOR, (B) Complexo (1), (C) LEVO, (D) Complexo (2), (E) SPAR, (F) Complexo (3) na ausência e na presença de concentrações crescentes de DNA (período de incubação = 30 minutos). Reta inserida: plotagem de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \text{ versus } [\text{DNA}] \text{ L}^{-1}$. $\{[\text{DNA}] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol e } [\text{Composto}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}, \text{ a } 25 \text{ }^\circ\text{C}\}$. Os pontos em vermelho não foram levados em consideração nos cálculos das constantes. As setas mostram as mudanças na absorção do composto após a adição de CT DNA.	51
Figura 4.6 - Análise da cinética celular da célula B16-F10 frente ao tratamento com o complexo $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3) nas concentrações de 30, 45 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.	56
Figura 4.7 - Eletroforese em gel de agarose de DNA de	56

células B16-F10 tratadas com o complexo $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**), em comparação ao controle negativo. 2×10^6 células foram cultivadas em diferentes concentrações: (1) Lader, (2) Controle negativo, (3) $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, (4) $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (5) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

- Figura 5.1 - Espectros de infravermelho da (A) OFLO e 61
do complexo (B) $[\text{ZnCl}_2(\text{OFLO})]$ (**5**) em pastilha de KBr.
- Figura 5.2 - Espectros de fluorescência da (A) NOR e dos 65
complexos (B) $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**4**), (C)
 $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**8**) em solução aquosa em
diferentes valores de pH. $\{[\text{NOR}] = 8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$,
 $\lambda_{\text{excitação}} = 320 \text{ nm}\}$.
- Figura 5.3 - Curvas de transição entre as espécies 66
zwiteriônica - catiônica (pK_1) e zwiteriônica - aniônica
(pK_2) da NOR e seus complexos de zinco, ao longo da
faixa de pH de 3 a 14.
- Figura 5.4 - Espectros de fluorescência de BSA ($2 \mu\text{mol}$ 68
 L^{-1}) na presença de quantidades crescentes de (A)
 $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**4**) e (B) $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
(**8**) a 25°C . $[\text{Composto}] = 8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7.4.
- Figura 5.5 - Subtrações dos espectros de fluorescência da 69
Figura 5.4 (B): (BSA + complexo (**8**) menos
 $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Inserção: Stern-Volmer
obtidas, a partir da fluorescência em 338 nm, para os
complexos (**4**) e (**8**).
- Figura 5.6 - Gráfico da equação de Stern-Volmer 71
modificada para o complexo $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
(**8**).
- Figura 5.7 - Curvas de decaimento de fluorescência da 72
BSA (excitação em 282 nm, emissão em 338 nm) na
presença de diferentes concentrações do complexo (**8**).
Inserção: contribuição fracionária do maior tempo de vida
em função das concentrações dos complexos (**4**) e (**8**).
- Figura 5.8 - Espectros de absorção de (A) 74
 $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**4**) e (B) $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
(**8**) com quantidades crescentes de CT DNA. Reta
inserida: plotagem de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}] \text{ L}^{-1}$.
 $\{[\text{DNA}] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol}$ e $[\text{Composto}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol}$
 L^{-1} , a 25°C em pH 7,4}. As setas mostram as mudanças
na absorção do composto após a adição de CT DNA.
- Figura 6.1 - Espectros de RPE para os complexos (**9**), 85
(**10**), (**11**) e (**12**) e o $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (pó, temperatura

ambiente).

Figura 6.2 - Voltamogramas cíclicos de: (A) 86 [MnCl ₂ (NOR)(H ₂ O) ₂] (9), (B) [MnCl ₂ (NOR)(phen)] .2H ₂ O (11) e (C) [MnCl ₂ (SPAR)(H ₂ O) ₂].3H ₂ O (10), (D) [MnCl ₂ (SPAR)(phen)].3H ₂ O (12). DMSO, [Composto] = 5,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , [TBABF ₄] = 0,1 mol L ⁻¹ , 0,100 V s ⁻¹ .	86
Figura 6.3 - Espectros de emissão de fluorescência da 87 HSA na presença de concentrações crescentes de (A) complexo (10) e (B) Complexo (12), λ _{excitação} = 280 nm. {[BSA] = 2,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ e [Composto] = 8,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ , a 20°C, pH 7,4}.	87
Figura 6.4 – Gráficos de Stern-Volmer para HSA na 88 presença de concentrações crescentes de (A) Complexo (10) e (B) Complexo (12) para três diferentes temperaturas, λ _{excitação} = 280 nm. {[BSA] = 2,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ e [Composto] = 8,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em pH 7,4}.	88
Figura 6.5 – Gráficos da Equação modificada de Stern- 90 Volmer para a constante de ligação da interação da HSA na presença de concentrações crescentes de (A) complexo (10) e (B) Complexo (12) para três diferentes temperaturas, λ _{excitação} = 280 nm. {[BSA] = 2,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ e [Composto] = 8,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em pH 7,4}.	90
Figura 6.6 - Gráficos de van't Hoff para a interação da 91 HSA na presença de (A) complexo (10) e (B) Complexo (12), λ _{excitação} = 280 nm. {[BSA] = 2,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ e [Composto] = 8,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em pH 7,4}.	91

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Cor, fórmula molecular, massa molar (MM) e rendimento para os complexos de Au(III) com norfloxacin, levofloxacin e esparfloxacin.	23
Tabela 3.2 - Cor, fórmula molecular, massa molar (MM) e rendimento para os compostos de Zn(II) com norfloxacin, ofloxacin e esparfloxacin.	25
Tabela 3.3 - Cor, fórmula molecular, massa molar (MM) e rendimento para os compostos de Zn(II) com 1,10-fenantrolina.	27
Tabela 3.4 - Cor, fórmula molecular, massa molar (MM) e rendimento para os compostos de Mn(II) com norfloxacin e esparfloxacin.	28
Tabela 4.1 - Dados de microanálise (valores calculados entre parênteses), faixa de temperatura de decomposição (°C) e condutividade (Λ , $\mu\text{S cm}^{-1}$) para os compostos de Au(III).	39
Tabela 4.2 - Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das fluorquinolonas e dos complexos de Au(III).	41
Tabela 4.3 - Porcentagens de perda de moléculas de água de hidratação calculadas e obtidas a partir da análise das curvas TG/DTG dos complexos de Au(III).	42
Tabela 4.4 - Principais deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN de ^1H para as fluorquinolonas e seus complexos de Au(III) em DMSO- d_6 , 200 MHz.	42
Tabela 4.5 - Principais deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN de ^{13}C para as fluorquinolonas e seus complexos de Au(III) em CDCl_3 ou DMSO- d_6 , 200 MHz.	43
Tabela 4.6 - Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), constante de supressão dinâmica (k_q) e coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) para a interação das fluorquinolonas e seus complexos de Au(III) com a albumina bovina.	48
Tabela 4.7 - Constantes de ligação (K_b), coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) e porcentagem de hipercromismo para a interação dos complexos de Au(III) e seus ligantes com o DNA.	52

Tabela 4.8 - Valores de IC ₅₀ dos complexos metálicos de Au(III), ligantes e ácido cloroáurico sob formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	53
Tabela 4.9 - Concentrações inibitória (IC ₅₀) dos complexos de Au(III) frente a linhagens tumorais e sadia.	54
Tabela 5.1 - Dados de microanálise (valores calculados entre parênteses), faixa de temperatura decomposição (°C) e condutividade (Λ , $\mu\text{S cm}^{-1}$) para os compostos de Zn(II).	59
Tabela 5.2 - Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das fluorquinolonas e dos complexos de Zn(II).	62
Tabela 5.3 - Porcentagens de perda de moléculas de água de hidratação calculadas e obtidas a partir da análise das curvas TG/DTG dos complexos de Zn(II).	63
Tabela 5.4 - Principais deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN de ¹³ C para as fluorquinolonas e seus complexos de Zn(II) em em CDCl ₃ ou DMSO- <i>d</i> ₆ , 200 MHz.	64
Tabela 5.5 - Constantes de ionização para a norfloxacina e seus complexos de Zn(II).	67
Tabela 5.6 - Constantes de ligação (K_b) (igual a constante de Stern-Volmer, K_{SV}) obtidas para os complexos de Zn(II).	70
Tabela 5.7 - Constantes de ligação (K_b), coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) e porcentagem de hipocromismo para a interação dos complexos de Zn(II) com o DNA.	74
Tabela 5.8 - Valores de IC ₅₀ dos complexos metálicos de Zn(II), ligantes, co-ligante e sal do íon metálico sob formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	75
Tabela 5.9 - Porcentagens de inibição (% inib) dos complexos metálicos de Zn(II), ligantes, co-ligante e sal dos íons metálico frente as bactérias <i>Bacillus cereus</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Salmonella typhi</i> .	78
Tabela 5.10 - Porcentagens de inibição (% inib) dos complexos metálicos de Zn(II), ligantes, co-ligante e sal dos íons metálico frente os fungos <i>Candida albicans</i> ,	78

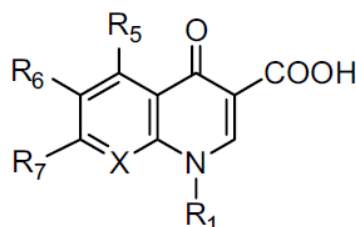
Penicillium citrinum, *Cladosporium cladosporioides*,
Aspergillus niger e *Microsporum gypseum*.

Tabela 6.1 - Dados de microanálise (valores calculados entre parênteses), faixas de temperatura de decomposição (°C) e medidas de condutividade (Λ , $\mu\text{S cm}^{-1}$) para os compostos de Mn(II).	80
Tabela 6.2 - Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das fluorquinolonas e dos complexos de Mn(II).	81
Tabela 6.3 - Porcentagens de perda de moléculas de água de hidratação calculadas e obtidas a partir da análise das curvas TG/DTG dos complexos de Mn(II).	83
Tabela 6.4 - Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), constante de supressão dinâmica (k_q) e coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) para a interação dos complexos de Mn(II) com a albumina humana.	89
Tabela 6.5 - Parâmetros da constante de ligação (K_b), sítios de ligação (n) e coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) para a interação dos complexos de Mn(II) com a albumina humana.	90
Tabela 6.6 - Parâmetros de formação e termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) e determinação da regressão linear (R^2) para a interação dos complexos de Mn(II) com a albumina humana.	91
Tabela 6.7 - Porcentagens de inibição (% inib) dos complexos metálicos de Mn(II), ligantes, co-ligante e sal dos íons metálico frente as bactérias <i>Bacillus cereus</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Salmonella typhi</i> .	93
Tabela 6.8 - Porcentagens de inibição (% inib) dos complexos metálicos de Mn(II), ligantes, co-ligante e sal dos íons metálico frente os fungos <i>Candida albicans</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Microsporum gypseum</i> .	93

1. INTRODUÇÃO

1.1 Quinolonas e fluorquinolonas

As 4-quinolonas ou quinolonas (Figura 1.1) representam uma classe de compostos sintéticos eficazes no tratamento de uma série de infecções, principalmente as de origem bacteriana. Possuem um largo espectro de atividade antimicrobiana, potência elevada, boa disponibilidade biológica, formulações oral e intravenosa e uma baixa incidência de efeitos secundários (EMAMI *et al.*, 2005).



Onde: Quinolonas: X = CH ou C-R₈ e Naftiridinas: X = N.

Figura 1.1 – Estrutura geral das quinolonas.

O desenvolvimento das quinolonas teve início em 1962 com a descoberta do ácido nalidíxico (Figura 1.2, pág. 2) por LESCHER *et al.* Este composto foi utilizado no tratamento de infecções do trato urinário causadas por enterobactérias. Nos anos 70, outros compostos foram sintetizados com uma atividade antimicrobiana discretamente superior à do ácido nalidíxico. No entanto, nenhum destes compostos possuía qualquer atividade contra *Pseudomonas*, anaeróbios e bactérias Gram-positivas. Nesse mesmo período, foi realizada a síntese do ácido pipemídico (Figura 1.2, pág. 2), com a inclusão do grupo piperazínico na posição R₇ (Figura 1.1), o que representou um importante avanço no campo das quinolonas (APPELBAUM e HUNTER, 2000; SILVA e HOLLENBACH, 2010).

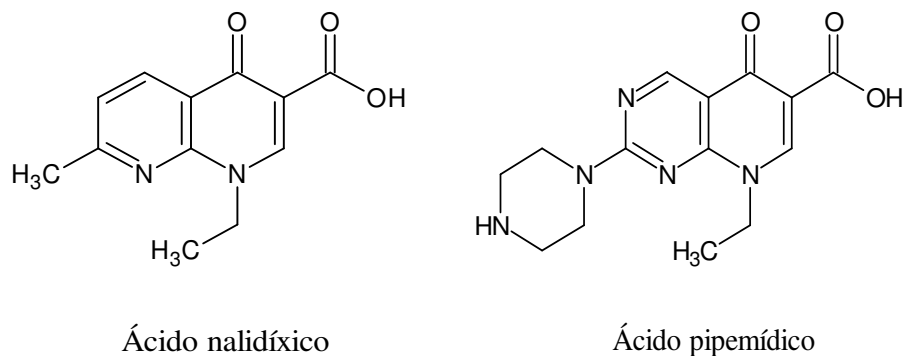
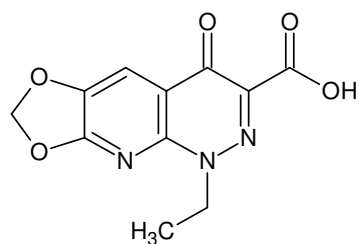


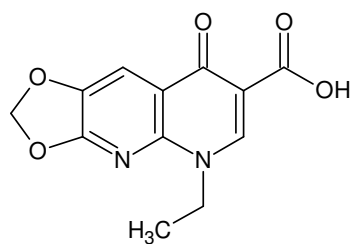
Figura 1.2 – Estruturas do ácido nalidíxico e do ácido pipemídico.

As quinolonas podem ser classificadas nas várias gerações com base no seu espectro de ação. As quinolonas de primeira geração (Figura 1.3, a e b, pág. 3) foram as primeiras sintetizadas e não são fluoradas, com exceção da flumequina. A incorporação de um átomo de flúor na posição R_6 e um grupo piperazínico na posição R_7 (Figura 1.1, pág. 1) gerou as quinolonas de segunda geração que, dentre as mais conhecidas, estão a ciprofloxacina, a ofloxacina e a norfloxacina (Figura 1.3, c, d, e, pág. 3). Os compostos fluorados a partir do ácido nalidíxico geraram as quinolonas de terceira geração, que incluem a grepafloxacina, a gatifloxacina e a tosufloxacina (Figura 1.3, f, g e h, pág. 3). A adição de grupos azabiciclo na posição R_7 (Figura 1.1, pág. 1) gerou a quarta geração de quinolonas (Figura 1.3, i e j, pág. 3) (CAMOZZATO e CAMPOS, 1999).

- 1ª Geração

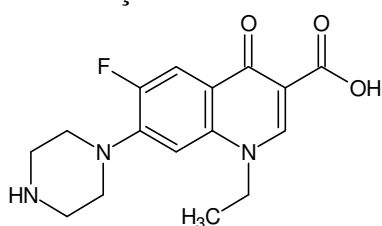


(a) Cinoxacina

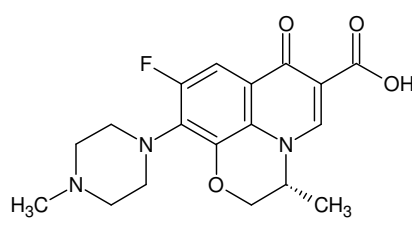


(b) Ácido oxalínico

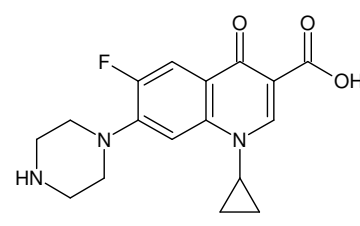
- 2ª Geração



(c) Norfloxacin

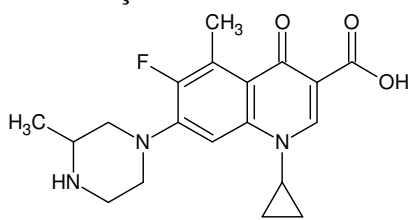


(d) Ofloxacin

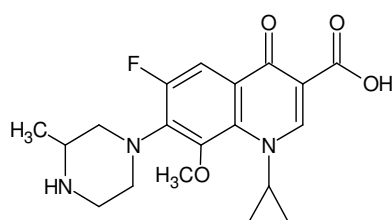


(e) Ciprofloxacin

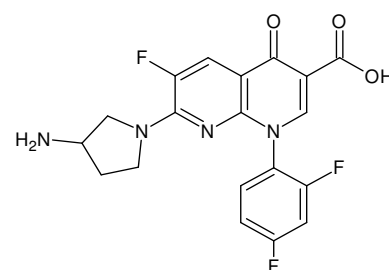
- 3ª Geração



(f) Grepafloxacin

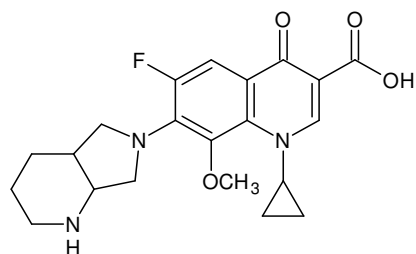


(g) Gatifloxacin

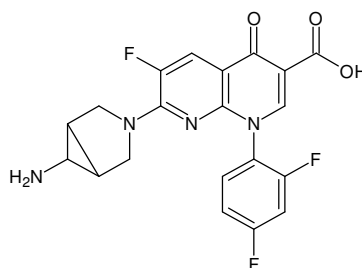


(h) Tosufloxacin

- 4ª Geração



(i) Moxifloxacin



(j) Trovafloxacin

Figura 1.3 – Estruturas de diferentes gerações de quinolonas.

Os compostos de segunda geração surgiram na década de 80 com a inclusão de um átomo de flúor na posição R₆ e um anel piperazina na posição R₇ (Figura 1.1, pág. 1). Estas modificações estruturais aumentaram, consideravelmente, o espectro de ação das quinolonas, dando origem a uma nova classe de compostos chamada fluorquinolonas. Estes compostos possuíam uma maior atividade contra bactérias Gram-negativas, passando a abranger algumas espécies Gram-positivas e atingiram um perfil farmacocinético melhor, com uma atividade antibacteriana mil vezes superior a observada pelo ácido nalidíxico (VIEIRA *et al.*, 2009; SOUSA, 2007).

A norfloxacin, patenteada em 1978, foi a primeira fluorquinolona a ser sintetizada com potente atividade antibacteriana. Posteriormente, outros compostos foram produzidos: ciprofloxacina, esparfloxacina, levofloxacina e ofloxacina, com largo espectro de atividade contra vários microrganismos patogênicos, nos seres humanos e animais (VIEIRA *et al.*, 2009).

Como mencionado anteriormente, as fluorquinolonas são produzidas a partir de alterações nas estruturas das quinolonas. A incorporação de um anel piperazina na posição R₇ torna a molécula ativa às bactérias *Pseudomonas* e a presença de um átomo do flúor na posição R₆ estendem a atividade da molécula a algumas bactérias Gram-positivas. A adição de grupos alquila ao anel piperazina e ao nitrogênio na posição R₁ (Figura 1.1, pág. 1), aumentam a lipossolubilidade e o volume de distribuição dos compostos. Além da atividade antibacteriana e antifúngica, estudos têm identificado que algumas fluorquinolonas inibem a enzima mammalia topoisomerase II, sendo utilizadas no desenvolvimento de fármacos anticâncer e anti-HIV. Estudos *in vitro* com a trovofloxacina mostraram que o antibiótico possui significativa atividade antimalárica (SÁRKÖZY, 2001; ROCHA *et al.*, 2011; HAMZAH *et al.*, 2000).

As fluorquinolonas possuem dois grupos funcionais ionizáveis: um grupo ácido (grupo carboxila) e um grupo básico (amino secundária). Dependendo do pH do meio, as fluorquinolonas (F) podem existir sob as formas:

- (i) Catiônica: H₂F⁺ (em meio ácido);
- (ii) Neutra ou zwitteriônica: HF[±] (em meio neutro ou fracamente ácido);
- (iii) Aniônica: F⁻ (em meio alcalino).

Em pH 7,4 (fisiológico), as quinolonas encontram-se total ou parcialmente ionizadas, sendo a espécie predominante a forma zwitteriônica (MONTERO *et al.*, 1997). O equilíbrio

protolítico das fluorquinolonas para os meios ácido, neutro e alcalino está representado na Figura 1.4 (BARBOSA *et al.*, 1999).

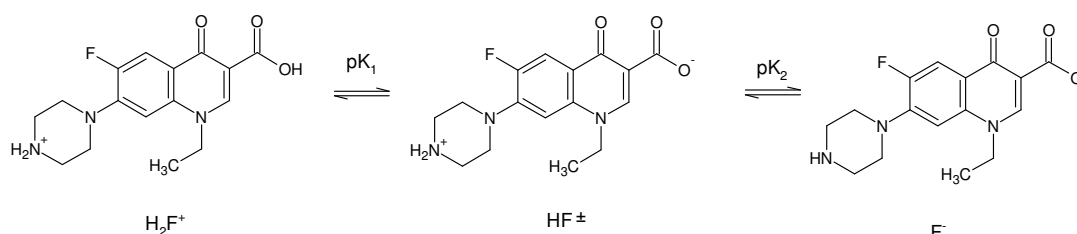


Figura 1.4 – Representação do equilíbrio protolítico da norfloxacina nos meios ácido (H_2F^+), neutro (HF^\pm) e alcalino (F^-), da esquerda para a direita, respectivamente.

1.2 Complexação a metais

Íons metálicos de transição desempenham papéis essenciais em sistemas biológicos, ocorrendo em diversas metaloproteínas. Metais determinam os sítios ativos enzimáticos e agem como facilitadores de oxidação-redução biológica. Geometrias octaédricas distorcidas e tetraédricas são bastante comuns em sistemas biológicos como, por exemplo, para o íon zinco(II). A geometria quadrada, encontrada para complexos de íons metálicos com configuração d^8 , especialmente de Au(III), Ir(I), Pd(II), Pt(II) e Ni(II) em campos ligantes fortes, são menos comuns (KOSTOVA, 2006).

Na literatura, são encontrados numerosos estudos que relatam a complexação de cátions metálicos à fluorquinolonas. Estes estudos, normalmente, estabelecem a estrutura do complexo formado e apontam o efeito dos íons metálicos na atividade antibacteriana (VIEIRA *et al.*, 2009). Segundo ROCHA *et al.* (2011), a natureza do ligante e a sua capacidade em formar um quelato com o metal, favorecem a atividade biológica de complexos metálicos. Além disso, os complexos catiônicos e os dinucleares são mais eficazes, sendo que a natureza do contra-íon também parece interferir na atividade.

O efeito do íon metálico na atividade antibacteriana da norfloxacina pode ser ilustrado pelo trabalho de GAO *et al.* (1995), que mostraram que os complexos de Fe(III) e Zn(II) apresentam atividade superior ao ligante livre contra *Escherichia coli* e *Bacillus dysenteriae*. Testes biológicos utilizando a bactéria *Helicobacter pylori* em complexos de Bi(III) e a

ciprofloxacina mostraram que a atividade dos complexos e dos ligantes são comparáveis, o que possibilita a utilização dos complexos em substituição a fluorquinolona (TUREL *et al.*, 1998).

O aumento da atividade antituberculose foi verificado para um complexo de ciprofloxacina com cobre. Os autores propõem que a formação do complexo facilita o transporte do fármaco, além de que o Cu(II) pode ser facilmente reduzido a Cu(I) produzindo espécies letais para o microrganismo (SAHA *et al.*, 2002).

Na literatura, há alguns estudos que abordam a complexação de Au(III) com diferentes ligantes, inclusive com as fluorquinolonas norfloxacina (NOR), levofloxacina (LEVO) e esparfloxacina (SPAR). REFAT (2007) obteve o complexo $[\text{Au}(\text{NOR})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_3$ e sugeriu tratar-se de um eletrólito 1:3, em que o ligante está coordenado de modo monodentado. A NOR e seu complexo metálico foram testados contra fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Tanto o ligante como o complexo de Au(III) apresentaram atividade moderada.

O zinco é um metal de transição que possui a seguinte distribuição eletrônica: $[\text{Ar}]3d^{10}4s^2$. Devido à perda dos elétrons do subnível 4s, seu estado de oxidação mais comum é +2. O Zn(II) é “macio” se comparado aos demais metais de transição (segundo a classificação de Pearson), provavelmente, devido a não participação dos orbitais *d* nas ligações. O íon metálico troca facilmente de ligante e possui um poder polarizante maior que elementos do grupo 2. O Zn(II) é um bom catalisador de reações ácido-base específicas e se liga fortemente a ligantes proteicos. Possui uma boa afinidade eletrônica, flexibilidade da geometria de coordenação e é inerte quanto à oxirredução. Ele forma complexos tipicamente tetraédricos (por exemplo, $[\text{ZnCl}_4]^{2-}$). Contudo, também são conhecidos complexos com número de coordenação cinco de geometria bipiramidal trigonal ou piramidal e complexos hexacoordenados com ligantes monodentados (SHRIVER *et al.*, 2008; HUHEEY *et al.*, 1993).

Na literatura, encontra-se alguns exemplos de complexos de Zn(II) com diversas fluorquinolonas na proporção metal:ligante de 1:2 e número de coordenação 4 ou 5. GAO *et al.* (1995) sugeriram a estrutura de um complexo com a norfloxacina de geometria tetraédrica, $[\text{Zn}(\text{NOR})_2]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. LIANG-CAI YU *et al.* (2009) sintetizaram um complexo de ofloxacina (OFLO) na mesma proporção e uma molécula de água de coordenação com geometria piramidal quadrada distorcida, $[\text{Zn}(\text{OFLO})_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Outro relevante metal para a química de coordenação é o manganês, devido a sua relevância no papel biológico. Por exemplo, há um centro mononuclear de Mn(II) em um sítio

ativo da superóxido-dismutase, uma enzima que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Na literatura, encontra-se este metal ligado a diversas fluorquinolonas (MODIA e JANIB, 2011). Inclusive, outros membros do nosso grupo de pesquisa, sintetizaram complexos de Mn(II) com as fluorquinolonas NOR e SPAR, assim como estudaram as suas atividades antichagásica (BATISTA *et al.*, 2011).

1.3 O câncer

O câncer é uma doença genética caracterizada pelo crescimento anormal de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) pelo corpo. De modo geral, mutações em genes relacionados com o surgimento de tumores, sejam malignos ou benignos, determinam a ativação de suas funções, as quais passam a ocorrer independentemente da existência de estímulos (REIS, 2006).

A descoberta de novos compostos com atividade antitumoral tem sido a maior prioridade da química medicinal. Na terapia anticâncer, são empregados frequentemente agentes quimioterápicos que interagem com o ácido desoxirribonucléico (DNA), que podem atuar como ligantes de fendas (ou sulcos), alquilantes, clivadores, intercalantes ou agentes com interações mistas (STARCEVIC *et al.*, 2006).

No tratamento de células cancerígenas, o principal objetivo é que ocorra interação do metal dos complexos com o oxigênio dos fosfatos e/ou com as bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucléico. Esta interação depende, principalmente, da estrutura do ligante e/ou da habilidade de segmentação do DNA (SKYRIANOU, 2010).

THADEPALLI *et al.* (2005) avaliaram a atividade citotóxica *in vivo* da trovafloxacina e ciprofloxacina. As cobaias testadas possuíam leucemia e pulmões infectados por *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados mostraram que ambas fluorquinolonas foram eficazes no tratamento da infecção bacteriana. No entanto, somente, a trovafloxacina foi eficaz na prevenção da metástase das células leucêmicas, prologando a sobrevivência dos camundongos.

Atualmente, está em andamento a fase 2 de ensaios clínicos da voreloxina. O composto está sendo testado para uso contra leucemia mielóide aguda e câncer de ovário. A voreloxina é derivado de uma quinolona e inibe a topoisomerase II ao intercalar-se na estrutura do DNA (HAWTIN *et al.*, 2010).

Vários estudos indicam que complexos utilizando Au(III) possuem notável atividade citotóxica para diversas linhagens de células tumorais (NOBILI *et al.*, 2010; BERNERS-PRICE, 2007; GIOVAGNINI *et al.*, 2007).

COSSU *et al.* (1994) sintetizaram três complexos de Au(III), utilizando derivados do imidazol e benzoxazol como ligantes. Após a caracterização dos compostos, foram testadas suas atividades citotóxicas *in vitro*. Para os ensaios foram utilizadas as linhagens tumorais L1210 (células leucêmicas) e A2780 (carcinoma de ovário humano), que são resistentes à cisplatina. Comparativamente, as linhagens tumorais estudadas são menos resistentes aos complexos que a cisplatina e possuem uma boa atividade antitumoral.

Em 2006, GABBIANI *et al.* publicaram a atividade citotóxica *in vitro* de diversos complexos de Au(III) e observaram que compostos contendo o ligante 2,2'-bipiridina possuem relevantes efeitos sobre várias linhagens celulares tumorais humanas.

1.4 A doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). O parasito possui três formas distintas (DIAS e DESSOY, 2009):

- (i) Epimastigota, forma presente no vetor e em cultura axênica;
- (ii) Tripomastigota, forma sanguínea circulante e infectante;
- (iii) Amastigota, forma de replicação intracelular.

No seu ciclo de vida, o barbeiro pica e defeca, ao mesmo tempo. Os tripomastigotas invadem as células, onde se transformam em amastigotas, que se multiplicam assexuadamente dentro das células. Posteriormente, invadem novas células em regiões diferentes do corpo, se multiplicando como amastigotas. Estas formas transformam-se em tripomastigotas e destroem a célula saindo para o sangue. Tripomastigotas sanguíneos são absorvidos pelo inseto em nova picada, que se transformam em epimastigotas, reiniciando o ciclo (Figura 1.5, pág. 9).

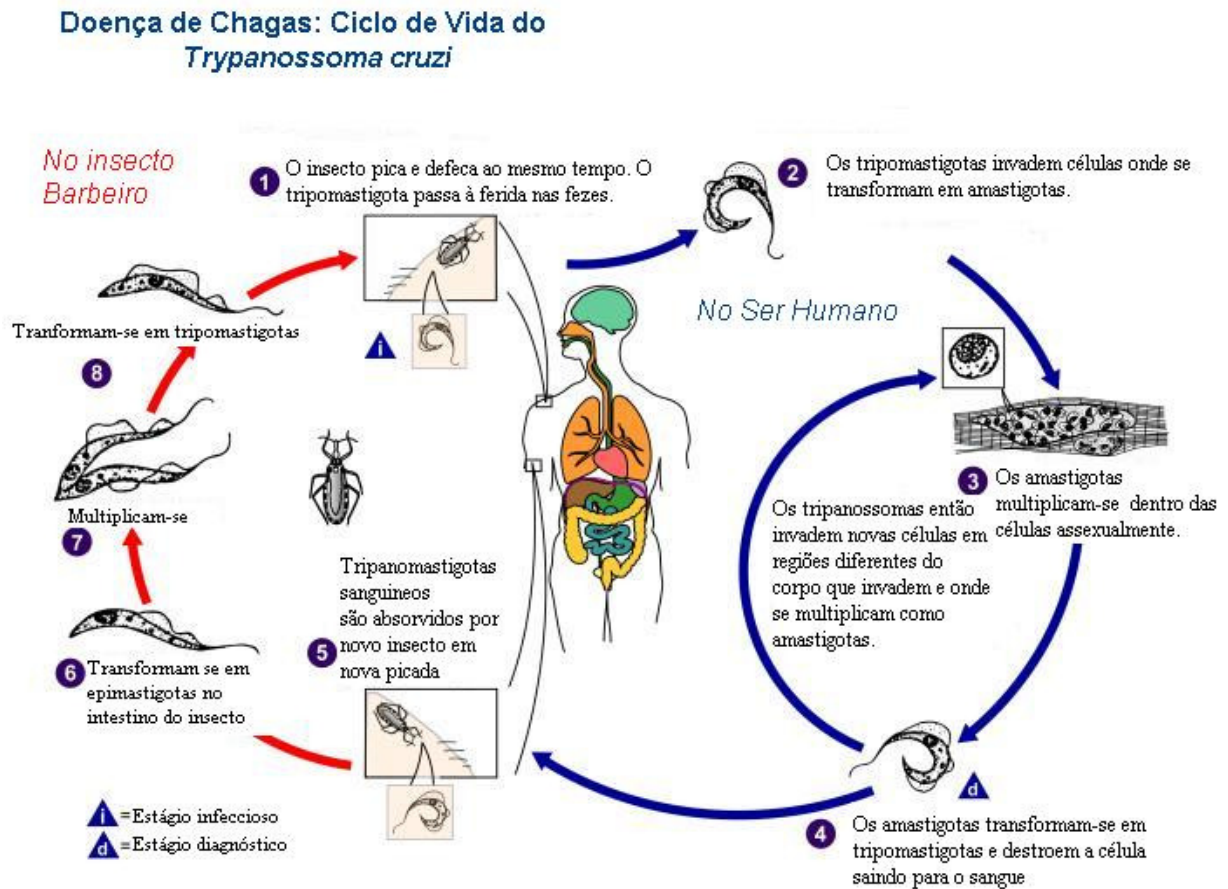


Figura 1.5 – Representação do ciclo de vida do *Trypanossoma cruzi*.

Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma_cruzi.

A doença de Chagas é considerada um problema relevante em vários países da América Latina e, mais recentemente, no sul dos Estados Unidos. Embora hajam esforços bem sucedidos no controle da transmissão vetorial da doença, os resultados não beneficiam diretamente os indivíduos infectados e com manifestações clínicas da doença (DIAS e DESSOY, 2009).

Os únicos fármacos usados na clínica para o tratamento da doença são o nifurtimox e o benzonidazol (Figura 1.6, pág. 10). Estes compostos nitroderivados geram sérios efeitos colaterais, requerem longos períodos de tratamento, além de apresentarem resultados variáveis de acordo com a fase da doença (sendo, em especial, não efetivos para pacientes crônicos), o período de tratamento e dose empregada, a idade e a origem geográfica dos pacientes. Estas limitações justificam a síntese e pesquisa de novos agentes que possam ser efetivos e seletivos

contra este parasito, mas que exerçam baixa toxicidade e cuja produção envolva baixos custos (DIAS e DESSOY, 2009).

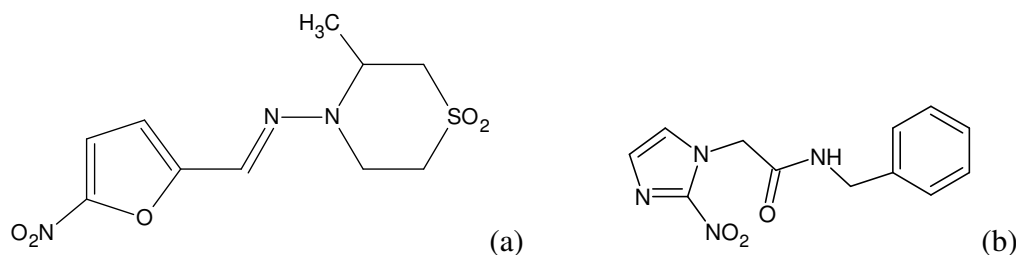


Figura 1.6 - Estruturas de (a) nifurtimox e (b) benzonidazol.

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença deve levar em conta a sua ação biológica. Sua ação pressupõe a interação de uma molécula pequena (ligante) com uma macromolécula (receptor biológico), tipicamente uma proteína de alguma via bioquímica, associada a uma condição da doença ou disfunção em humanos. Além disso, estudos recentes sugerem que as enzimas DNA topoisomerases I e II desempenham papel essencial na replicação do DNA do *T. cruzi*. Portanto, os novos agentes quimioterápicos são baseados na inibição destas isomerases (DIAS e DESSOY, 2009).

1.5 Interação com alvos biológicos

Os resultados da pesquisa sobre a interação entre macromoléculas biológicas e fármacos gera importante informação sobre os sítios de ligação, transporte e o metabolismo de moléculas no corpo humano (GUIZADO, 2007; GÓES FILHO, 2005). O estudo da interação das quinolonas e seus complexos metálicos com as albuminas séricas bovina (BSA) e humana (HSA) e o ácido desoxirribonucléico (DNA) são relatados, frequentemente, na literatura como modelos para o esclarecimento e conhecimento desta interação (JAYABHARATHI *et al.*, 2012; KAMAT, 2005).

A albumina sérica é a proteína mais abundante do soro sanguíneo e possui capacidade de se ligar reversivelmente a uma grande variedade de fármacos, transportando inúmeras substâncias através do sistema circulatório. Em animais superiores, as proteínas são os compostos mais abundantes dos tecidos. A albumina sérica realiza importantes funções fisiológicas como, por

exemplo, transporte, metabolismo e distribuição de vários compostos, inclusive medicamentos (GÓES FILHO, 2005).

A albumina bovina (BSA) é responsável pelo transporte de ácidos graxos, bilirrubina, íons metálicos, hormônios, vitaminas e fármacos, incluindo metalofármacos, e pela manutenção do pH do sangue. Com frequência, utiliza-se a BSA como alvo biológico, devido à sua semelhança estrutural com a HSA (CARDOSO, 2010).

A interação das fluorquinolonas e seus complexos metálicos com a BSA e HSA pode ser avaliada via fluorescência. Neste caso, observa-se supressão de fluorescência dos triptofanos devido às interações com os compostos. Esta técnica mede a força da interação fármaco-proteína e identifica os sítios de ligação. Estas interações podem ser dinâmicas, resultantes de encontros colisionais com transferência de energia entre albumina-complexo, ou estática, resultante da formação de um complexo no estado excitado entre albumina-complexo (CARDOSO, 2010).

O DNA é um alvo importante a ser considerado no desenvolvimento de novos fármacos. A descoberta da estrutura tridimensional do ácido desoxirribonucléico (DNA) por JAMES D. WATSON e FRANCIS H. C. CRICK (1953) causou um grande impacto no meio científico (Figura 1.7).



Figura 1.7 – Representação da estrutura molecular do ácido desoxirribonucléico, segundo Watson e Crick (1953).

O DNA pode interagir com os complexos das fluorquinolonas e seus ligantes de três modos diferentes: interação por intercalação, alquilação e ligação eletrostática externa nas fendas maior e/ou menor do DNA. Os modos de interação com o DNA podem ser avaliados através de titulações espectrofotométricas de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), utilizando-se soluções dos compostos a serem estudados e quantidades crescentes de DNA nesta solução. A técnica mede a força da interação fármaco-proteína e identifica o modo de interação (PARAGINSKI, 2007).

A interação eletrostática ocorre devido à interação dipolo-dipolo entre o metal complexado e o esqueleto de açúcar-fosfato do DNA. Na alquilação, há a formação de ligações cruzadas com os filamentos de DNA, impedindo sua replicação. A intercalação ocorre devido a uma forte interação entre o grupo cromóforo aromático e os pares de bases do DNA. Moléculas intercalantes são moléculas cromóforas aromáticas planas, geralmente, tri ou tetracíclicas, que causam a clivagem do DNA (PARAGINSKI, 2007).

Quando ocorre interação eletrostática ou intercalação entre o DNA e o fármaco, ocorre hipocromismo (diminuição da absorvidade molar) e/ou um batocromismo (desvio para a região do vermelho) da banda de absorção do composto. Já quando ocorre a quebra da estrutura secundária do DNA, observa-se um hipercromismo (aumento da absorvidade molar) e/ou um hipsocromismo (desvio para a região do azul) (PARAGINSKI, 2007; FIRDAUS *et al.*, 2008).

Para o estudo da interação de alvos biológicos com fármacos tem-se utilizado diversas técnicas tais como espectroscopia de fluorescência e ultravioleta-visível.

1.6 Fluorescência

A fluorescência de um ligante (L) pode ser representada pelas Equações 1, 2 e 3:



onde a Equação 1 representa a absorção de radiação, a Equação 2 a emissão de radiação e a Equação 3 um decaimento não radiativo (LAKOWICZ, 2004; OLIVEIRA, 2000).

A fluorescência é diretamente proporcional à concentração do fluoróforo apenas em um número limitado de densidades ópticas (absorvâncias). Uma diminuição da intensidade de fluorescência pode ser causada pelos efeitos de filtro interno. Esse fenômeno ocorre devido à absorção da luz emitida pela amostra. No entanto, em soluções diluídas (absorvâncias menores que 0,1), há uma relação de proporcionalidade entre a intensidade de fluorescência e a concentração do fluoróforo:

$$F = I_0(1 - e^{-\epsilon bc})\phi_f \quad (4)$$

onde,

F = intensidade de fluorescência;

I_0 = intensidade da radiação incidente;

ϵ = constante de absorvidade da espécie;

b = caminho ótico;

c = concentração da espécie;

ϕ_f = rendimento quântico da fluorescência.

A supressão de fluorescência é um processo no qual a intensidade de fluorescência de uma dada espécie diminui devido a processos de transferência de energia, formação de complexos e colisões entre moléculas. Existem dois tipos de supressão de fluorescência: dinâmica (colisional) ou estática. Em ambos os processos é necessário a existência de contato entre o fluoróforo e o agente de supressão (LAKOWICZ e WEBER, 1973; OLIVEIRA, 2000; SANTOS, 2007).

Na supressão estática da fluorescência, ocorre a formação de um complexo não fluorescente no estado fundamental entre o fluoróforo (L) e o agente de supressão (M), que provoca a diminuição da fluorescência. Este processo bimolecular pode ser representado pela seguinte equação (LAKOWICZ e WEBER, 1973; OLIVEIRA, 2000; SANTOS, 2007):



A reação de complexação, entre um ligante (L) fluorescente e um agente de supressão (M) (Equação 5), com a formação de um complexo (ML) não fluorescente, pode ser representada pela Equação 6:



A Equação 6 pode ser descrita por meio da seguinte constante de equilíbrio de complexação (K):

$$K = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (7)$$

onde, [ML], [L] e [M] correspondem às respectivas concentrações em quantidade de matéria das espécies. Sabendo que:

$$[L]_{\text{Total}} = [L] + [ML] \quad (8)$$

$$[M]_{\text{Total}} = [M] + [ML] \quad (9)$$

E considerando que a fluorescência é proporcional à concentração de L, tem-se:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{[L]_{\text{Total}}}{[L]} \quad (10)$$

em que F_0 e F correspondem, respectivamente, à intensidade de fluorescência na ausência e na presença do agente de supressão. Substituindo na Equação (10), $[L]_{\text{Total}}$ pelo seu valor na Equação (8) e [ML] pelo seu valor da Equação (7), obtém-se:

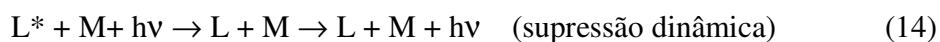
$$\frac{F_0}{F} = \frac{[L] + [ML]}{[L]} = \frac{[L] + K[L][M]}{[L]} = 1 + K[M] \quad (11)$$

Para valores de $[M]_{\text{Total}}$ suficientemente superiores a $[L]_{\text{Total}}$ e/ou para valores de K suficientemente baixos, $[M]$ é aproximadamente igual a $[M]_{\text{Total}}$, sendo possível a Equação (11) ser, aproximadamente, igual a:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[M]_{\text{Total}} \quad (12)$$

sendo a Equação (12) conhecida por Equação Linear de *Stern-Volmer*.

A supressão dinâmica da fluorescência consiste na desativação de fluorescência do estado excitado por colisão do fluoróforo (L) com o agente de supressão (M), durante o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo. Geralmente, após o contato entre ambos, o fluoróforo retorna ao estado fundamental, sem emissão de um fóton e sem qualquer alteração química das moléculas envolvidas (Equações 13 e 14) (LAKOWICZ e WEBER, 1973; OLIVEIRA, 2000; SANTOS, 2007).



A supressão dinâmica de fluorescência também é representada pela Equação Linear de *Stern-Volmer*, semelhantemente, a deduzida para a supressão estática de fluorescência (Equação 12), sendo que o K é substituído por $K_{\text{dinâmico}}$. Esta constante representa uma complexação não efetiva, ou seja, apenas uma constante colisional (formação de [ML]):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{\text{dinâmico}}[M]_{\text{Total}} \quad (15)$$

É importante observar que a linearidade do gráfico que representa a equação de *Stern-Volmer* (Equação 12, pág. 14) não prova a existência de supressão estática de fluorescência, já que a supressão dinâmica de fluorescência também origina um gráfico de *Stern-Volmer* linear. No caso de formação de complexos estáveis, sempre existirá uma componente estática na supressão da fluorescência (LAKOWICZ e WEBER, 1973; OLIVEIRA, 2000).

O método mais eficaz para determinar o tipo de supressão é medir os tempos de semivida de cada um dos processos, utilizando a técnica de fluorescência resolvida no tempo. No entanto, também é possível a sua distinção pela dependência da reação em função da sua temperatura e viscosidade. Sabe-se que a temperaturas elevadas, a viscosidade do meio diminui, aumentando a difusão das moléculas. Como a supressão dinâmica da fluorescência depende da difusão, o aumento de temperatura, aumenta a constante de supressão. Contudo, a uma temperatura mais elevada a estabilidade dos complexos diminui, levando a uma menor supressão estática da fluorescência (LAKOWICZ e WEBER, 1973; OLIVEIRA, 2000; SANTOS, 2007).

No caso de supressão dinâmica da fluorescência pode-se descrever o processo, segundo a equação de *Stern-Volmer*, considerando o tempo de vida do processo (LAKOWICZ e WEBER, 1973; SOUSA, 2007):

$$\frac{F_0}{F} = k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (16)$$

onde,

F_0 = intensidade de fluorescência na ausência do agente de supressão;

F = intensidade de fluorescência na presença do agente de supressão;

k_q = constante bimolecular de velocidade do processo de supressão;

τ_0 = tempo de vida na ausência do agente de supressão;

$[Q]$ = a concentração de agente de supressão.

No caso de supressão estática, a relação entre a intensidade e a concentração do agente de supressão pode ser descrita pela fórmula de constante de ligação (MOHD *et al.*, 2010):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K + n \log [Q] \quad (17)$$

onde,

K = constante de ligação,

n = número de sítios de ligação

Se a variação de entalpia (ΔH) não muda significativamente ao longo da faixa de temperatura estudada, os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔG e ΔS) podem ser determinados a partir das seguintes equações (18), (19) e (20), respectivamente (JAYABHARATHI *et al.*, 2012):

$$\log K = \frac{\Delta H}{2,303RT} + \frac{\Delta S}{2,303R} \quad (18)$$

$$\Delta G = -2,303RT \log K \quad (19)$$

$$\Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T} \quad (20)$$

Os parâmetros termodinâmicos de entalpia (ΔH), de entropia (ΔS) e de energia livre (ΔG) são as principais evidências para determinar o modo de ligação. Se a variação de entalpia (ΔH) e

variação de entropia (ΔS) for positiva há uma interação hidrofóbica entre o fármaco e a proteína. Os valores negativos estão associados à ligação de hidrogênio e as forças de dispersão de London (JAYABHARATHI *et al.*, 2012; FRAGA, 2001, LIU *et al.*, 2002).

Além das constantes de associação/ligação dos alvos biológicos com os fármacos em estudo, é importante conhecer suas propriedades físico-químicas. Estas propriedades influenciam o comportamento *in vivo/in vitro* e o caráter hidro/lipofílico destes compostos. Em especial, pode ser citado a constante de ionização (pK_a), fundamental para compreender a atividade biológica das fármacos em estudo (LUIZ, 2009).

1.6.1 Constante de ionização

A estrutura química de muitos fármacos envolve grupos amino ionizáveis. Em meio ácido, tem-se o equilíbrio abaixo (LUIZ, 2009):



A constante de equilíbrio, K_a , para esta reação pode ser descrita pela Equação (22):

$$K_a = \frac{[H^+][L^0]}{[HL^+]} \quad (22)$$

Ou na forma equivalente:

$$pK_a = pH - \log \frac{[L^0]}{[HL^+]} \quad (23)$$

Para determinar o valor de pK_a , é necessário conhecer as concentrações em solução das espécies neutras e protonadas, em função do pH do meio. Estas concentrações podem ser obtidas por espectroscopia de emissão. O parâmetro espectroscópico utilizado pode ser a intensidade de fluorescência, I_λ , em um determinado comprimento de onda, conforme a equação 24 (pág. 20) (LUIZ, 2009).

$$I_{\lambda} = \frac{I_{\lambda}^0 10^{pH} + I_{\lambda}^+ 10^{pK_a}}{10^{pH} + 10^{pK_a}} \quad (24)$$

onde,

I_{λ} = intensidade de fluorescência em um determinado comprimento de onda;

I_{λ}^0 = intensidade de fluorescência do fármaco desprotonado em um determinado comprimento de onda;

I_{λ}^+ = intensidade de fluorescência do fármaco protonado em um determinado comprimento de onda;

pK = - log da constante de equilíbrio de protonação;

pH = potencial hidrogeniônico.

2. RELEVÂNCIA E OBJETIVOS

As fluorquinolonas são agentes sintéticos utilizados clinicamente desde a década de 60 (APPELBAUM e HUNTER, 2000). No entanto, o uso inadequado desses fármacos aumenta, consideravelmente, a resistência antimicrobiana. Para resolver esse problema, estudos abordam a complexação das fluorquinolonas a íons metálicos como uma possível solução. Em muitos casos, os complexos formados são agentes terapêuticos mais eficientes (VIEIRA *et al.*, 2009). Considerando o exposto, foram obtidos cinco complexos de Zn(II) e quatro complexos de Mn(II), utilizando como ligantes algumas fluorquinolonas, com o objetivo de obter compostos com atividade biológica relevante e que sejam ativos em cepas resistentes aos fármacos livres.

Recentemente, descobriu-se que algumas fluorquinolonas também apresentam atividade antitumoral (HAWTIN *et al.*, 2010). Além disso, estudos que abordam a complexação de Au(III) com diferentes ligantes, apontam que os complexos formados atuam como agentes inibidores de diferentes células tumorais (COSSU *et al.*, 1994). Com o objetivo de associar as propriedades farmacológicas das fluorquinolonas e do íon metálico Au(III), fez-se a síntese de três complexos de Au(III), utilizando como ligantes a norfloxacin (NOR), a levofloxacin (LEVO) e a esparfloxacin (SPAR).

Os complexos de Au(III), Zn(II) e Mn(II) obtidos foram caracterizados por análise elementar e termogravimétrica, medidas de condutividade, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), carbono treze (RMN ^{13}C) e/ou espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

Em seguida, foram feitos testes de citotoxicidade dos complexos de Au(III) e seus ligantes. Com base na importância da doença de Chagas, investigou-se também o efeito da NOR, OFLO, LEVO, SPAR e seus complexos de Zn(II) e Au(III), assim como dos sais dos metais e co-ligante, sob as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas de sangue do *T. cruzi*.

Para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica das fluorquinolonas livres (NOR, OFLO, SPAR), do co-ligante phen, dos complexos de Zn(II) e Mn(II), do ZnCl_2 , do MnCl_2 e do precursor de Zn(II) $\{[\text{ZnCl}_2(\text{fen})]\}$ foram usados os fungos *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger*, *Microsporium gypseum* e as bactérias *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*.

A atividade biológica dos fármacos está diretamente relacionada à sua capacidade de atravessar membranas celulares, de se ligar a proteínas que atuam em nível citoplasmático e/ou de inibir a replicação do DNA. A coordenação de íons metálicos às fluorquinolonas pode facilitar e/ou melhorar o mecanismo de ação dos ligantes livres. A interação dos complexos de Zn(II), de Mn(II) e de Au(III) com macromoléculas biológicas é essencial para compreender seus possíveis mecanismos de ação. Nesse trabalho, escolheu-se como alvos biológicos a albumina bovina (BSA), a albumina humana (HSA) e o DNA. A albumina é a proteína mais abundante do soro sanguíneo e o DNA é o principal alvo de pesquisa para a busca de novos medicamentos. Um parâmetro importante para a avaliação do mecanismo de ação destes compostos é a constante de associação fármaco-alvo. Portanto, estudou-se a interação dos complexos de Zn(II) com a NOR e dos complexos de Au(III) com a BSA e o DNA, utilizando espectroscopia de fluorescência e UV-Vis, respectivamente. Além disso, estudou-se a interação dos complexos de Mn(II) com a SPAR com a HSA.

Além das constantes de associação com alvos biológicos, é extremamente importante conhecer as propriedades físico-químicas dos fármacos. Em especial, pode ser citada a constante de ionização (pK_a). Nesse trabalho, determinou-se as constantes de ionização dos complexos de Zn(II) com a NOR e a phen, assim como descreveu-se suas propriedades fluorescentes espectrais em função do pH.

3. METODOLOGIA

3.1 Reagentes, solventes e soluções

As fluorquinolonas norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO), ofloxacin (OFLO) e esparfloxacin (SPAR) são de procedência *Sigma*. O co-ligante 1,10-fenantrolina (phen) é de procedência *Vetec*. Os sais dos metais utilizados são de procedência *Aldrich*.

Os solventes utilizados nas sínteses são de procedência *Merck*, *Vetec* ou *Synth*.

O tampão utilizado para o preparo de soluções com os ligantes e seus complexos foi preparado a partir de uma solução tampão universal para medidas espectrofotométricas, 0,1 mol L⁻¹, composta por ácido cítrico (*Sigma*), fosfato monobásico de potássio (*Synth*), tetraborato de sódio (*Ecibra*), tris(hidroximetil)aminometano (*Sigma*) e cloreto de potássio (*Synth*), acrescidos da quantidade necessária de uma solução 0,4 mol L⁻¹ de ácido clorídrico (*Nuclear*) ou de uma solução 0,4 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (*Nuclear*) (PERRIN e DEMPSEY, 1974).

3.2 Equipamentos

Balança - As pesagens foram realizadas em uma balança eletrônica modelo AY220 da Shimadzu.

Temperatura de fusão - Para a determinação das faixas de fusão de ligantes e complexos foi utilizado um aparelho digital modelo 430D da Fisatom.

Potenciômetro - Para a determinação do pH das soluções foi utilizado um aparelho digital modelo PG1000 da Gehaka.

Medidas de condutividade - As medidas foram efetuadas a 25 °C, utilizando-se um condutivímetro de bancada modelo Q405M da Quimis. As soluções foram preparadas em *N,N*-dimetilformamida (DMF) na concentração de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. Devido a baixa solubilidade dos complexos de Zn(II), Mn(II) e Au(III), as leituras foram feitas após sonicação por 5 minutos no banho de ultrassom.

Agitador magnético com aquecimento - Na agitação das reações, foi utilizado um agitador modelo 752A da Fisatom.

Análise elementar (CHN) - As porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes nas amostras foram determinadas pelo aparelho PE 2400 CHN Elemental Analyzer (Departamento de Química, UFMG), gás oxigênio para a combustão das amostras e gás nitrogênio para o arraste dos gases gerados na combustão.

Espectroscopia na região do infravermelho (IV) - Os espectros foram obtidos a partir do aparelho Mattson Instruments Galaxy 3000 (Departamento de Química, UFMG) na região de 4500 a 370 cm^{-1} . As substâncias foram incorporadas em 100 mg de KBr, previamente dessecado e pulverizado. A mistura foi prensada em forma de disco transparente, sob pressão de 700 a 1050 kg m^{-2} , originando uma pastilha de concentração 1% massa/massa, que foi utilizada para obtenção dos espectros.

Análise termogravimétrica - As curvas termogravimétricas foram obtidas em uma Termobalança Shimadzu TGA-5H. Foi utilizada atmosfera de ar com razão de fluxo de 50 mL min^{-1} . A razão de aquecimento foi 10 $^{\circ}\text{C}$ e a temperatura final alcançada foi de 750 $^{\circ}\text{C}$.

Ressonância magnética nuclear (RMN) - Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos a partir do espectrômetro BRUKER AVANCE DPX/200 ou 400 (Departamento de Química, UFMG) utilizando como solventes dimetilsulfóxido (DMSO), da marca Aldrich com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) – Os espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) foram obtidos no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), em colaboração com a **Profa. Sônia R. Louro**, do Departamento de Física da PUC-Rio. Utilizou-se um espectrômetro da Bruker ESP300E, com frequência de modulação de 100 KHz, operando em 1,1 mT. As amostras, no estado sólido, em solução aquosa e de dimetilsulfóxido (DMSO) foram medidas utilizando-se tubos de quartzo de diâmetro interno de 3 mm, a temperatura ambiente (para amostras no pó).

Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) – Para os complexos de Au(II), os espectros foram obtidos através de um espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta visível Hewlett Packard 8451 A em cubetas de quartzo de 1 cm de comprimento. Os estudos de DNA com os complexos de Zn(II) foram feitos em um espectrofotômetro Cary 100 Bio (Varian-Agilent). Nos estudos de BSA com esses complexos, foi utilizado o HP 8452A (Varian-Agilent) usando cubetas de quartzo de 1 cm de comprimento, em colaboração com a Profa. Sônia R. Louro do Departamento de Física da PUC-Rio.

Espectroscopia de fluorescência - Para os complexos de Au(III) e cálculos de pKa, os espectros foram obtidos usando-se um espectrofotômetro de emissão Shimadzu RF 5301PC. Para os estudos de interação com BSA-complexos de Zn(II), foi utilizado um espectrofotômetro PTI QM1 (Photon Technology International, Birmingham, NJ). Os estudos de fluorescência resolvida no tempo foram realizados em um IBH-Horiba-Jobin Yvon TCSPC em colaboração com a Profa. Sônia R. Louro. Os espectros de emissão de interação HSA-complexos de Mn(II) foram obtidos em um espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian-Agilent).

3.3 Síntese dos complexos

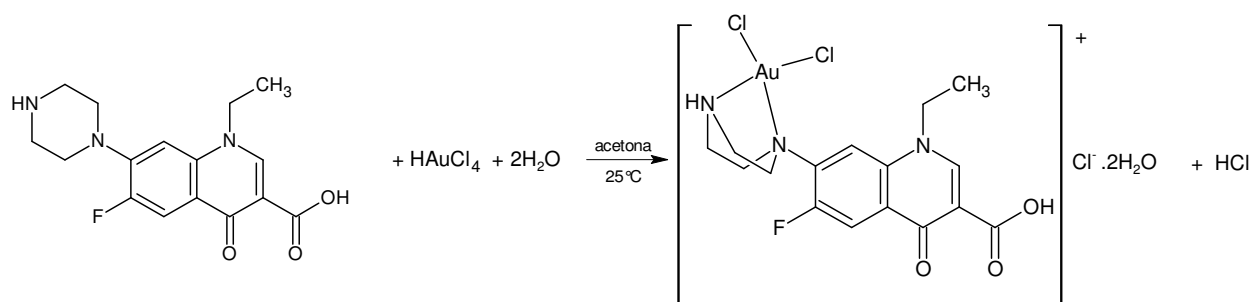
3.3.1 Síntese dos complexos de Au(III) de norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) e esparfloxacin (SPAR)

O complexo de Au(III) com NOR dissolveu-se em um balão de 100 mL de fundo redondo, 0,25 mmol do ligante, usando-se, aproximadamente, 40 mL de acetona. A seguir, 0,25 mmol de ácido cloroáurico (HAuCl₄) dissolvido em, aproximadamente, 10 mL de acetona foi adicionado ao balão de reação. A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente (25°C) por, aproximadamente, 24 horas. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico. Os complexos de Au(III) com LEVO e SPAR foram obtidos usando-se o mesmo procedimento descrito, porém usando metanol como solvente. Três complexos foram obtidos: [AuCl₂(NOR)]Cl₂·2H₂O (**1**), [AuCl₂(LEVO)]Cl₂·2H₂O (**2**) e [AuCl₂(SPAR)]Cl₂·2H₂O (**3**).

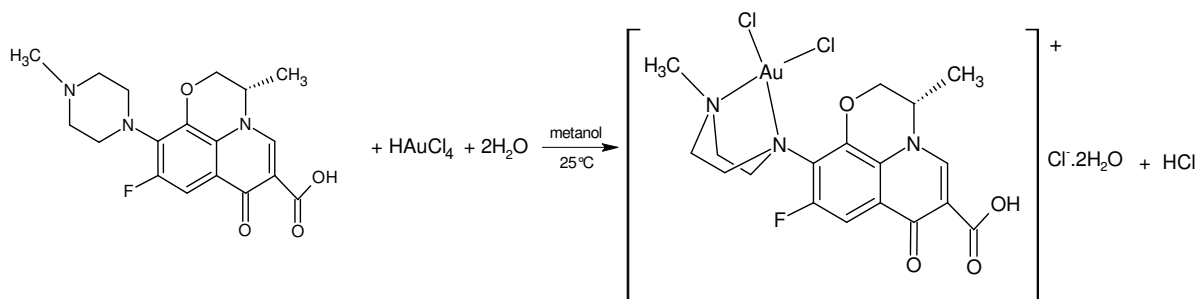
Os complexos obtidos foram caracterizados por análise termogravimétrica e de condutividade, análise elementar de C, H, N, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono (RMN ¹³C). A Tabela 3.1 (pág. 24) apresenta cor, fórmula molecular, massa molar e rendimento para os complexos de Au(III). Os Esquemas 3.1, 3.2 e 3.3 (pág. 24) mostram as representações da obtenção dos complexos.

Tabela 3.1 - Cor, fórmula molecular, massa molar (MM) e rendimento para os complexos de Au(III) com norfloxacin, levofloxacin e esparfloxacin.

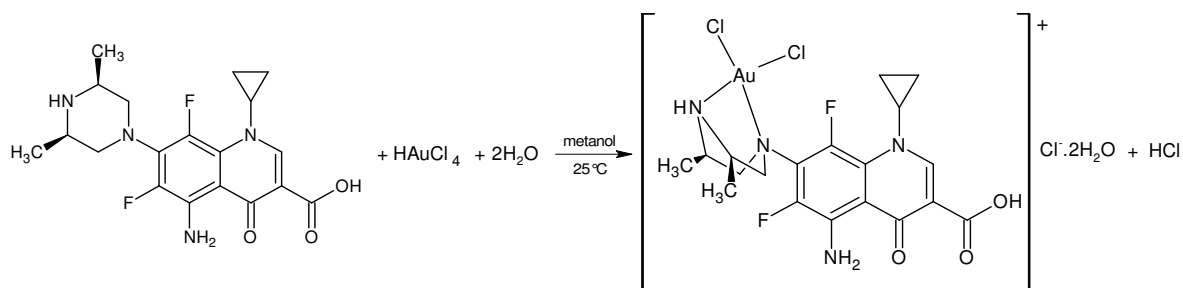
Composto	Cor	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Rendimento (%)
[AuCl ₂ (NOR)]Cl·2H ₂ O (1)	Amarelo	C ₁₆ H ₂₂ AuCl ₃ FN ₃ O ₅	658,7	80
[AuCl ₂ (LEVO)]Cl·2H ₂ O (2)	Marrom	C ₁₈ H ₂₄ AuCl ₃ FN ₃ O ₆	700,7	79
[AuCl ₂ (SPAR)]Cl·2H ₂ O (3)	Marrom	C ₁₉ H ₂₆ AuCl ₃ F ₂ N ₄ O ₅	731,8	92



Esquema 3.1 – Representação da obtenção do complexo (1).



Esquema 3.2 – Representação da obtenção do complexo (2).



Esquema 3.3 – Representação da obtenção do complexo (3).

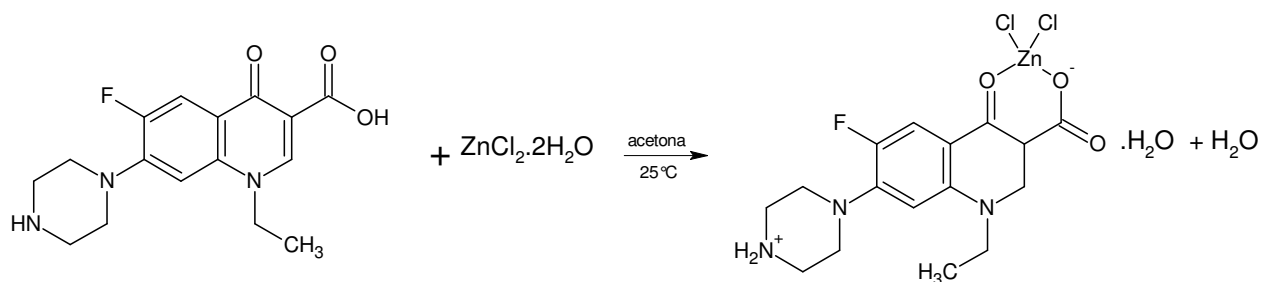
3.3.2 Síntese dos complexos de Zn(II) de norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFLO) e esparfloxacin (SPAR)

O complexo de Zn(II) com a NOR ou com a SPAR dissolveu-se em um balão de 100 mL de fundo redondo, 0,25 mmol do ligante, usando-se, aproximadamente, 40 mL de acetona. Em seguida, 0,25 mmol de cloreto de zinco dihidratado ($\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dissolvido em, aproximadamente, 10 mL de acetona foi adicionado ao balão de reação. A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por, aproximadamente, 24 horas. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico. O complexo de Zn(II) com a OFLO foi obtido usando-se o mesmo procedimento descrito, porém usando metanol como solvente. Três novos complexos foram obtidos: $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**4**), $[\text{ZnCl}_2(\text{OFLO})]$ (**5**) e $[\text{ZnCl}_2(\text{SPAR})]$ (**6**).

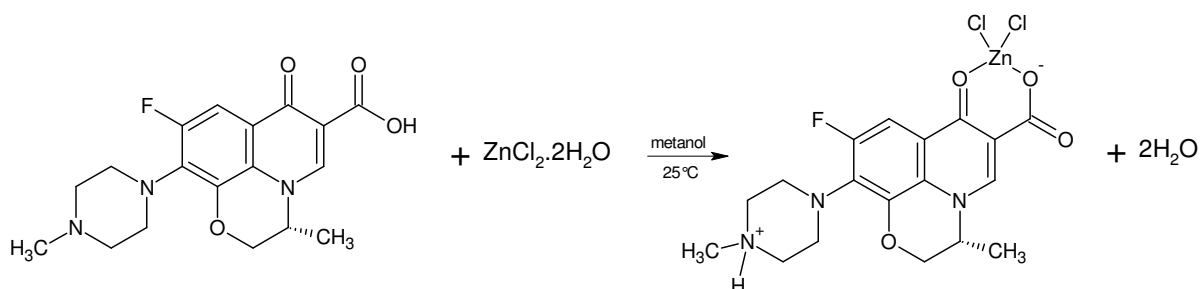
Os complexos obtidos foram caracterizados por análise termogravimétrica e de condutividade, análise elementar de C, H, N, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C). A Tabela 3.2 apresenta cor, fórmula molecular, massa molar e rendimento para os compostos de Zn(II) com a NOR, OFLO e SPAR. Os esquemas 3.4, 3.5 e 3.6 (pág. 26) mostram as representações da obtenção dos complexos.

Tabela 3.2 - Cor, fórmula molecular, massa molar (MM) e rendimento para os compostos de Zn(II) com norfloxacin, ofloxacin e esparfloxacin.

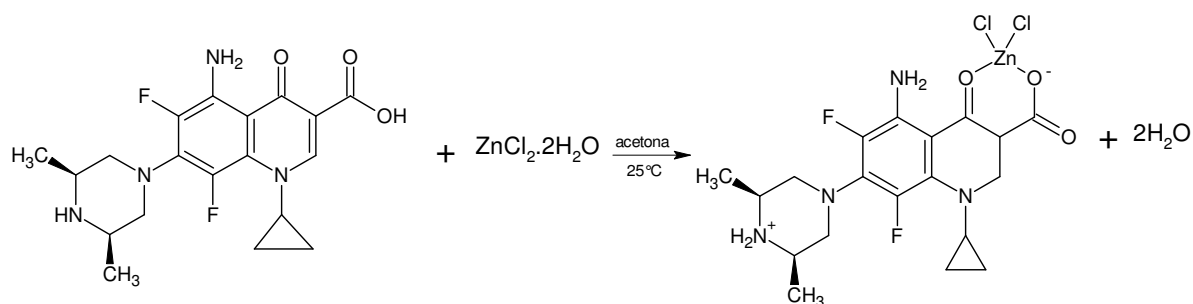
Composto	Cor	Fórmula molecular	MM (g mol^{-1})	Rendimento (%)
$[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4)	Branco	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{FN}_3\text{O}_4\text{Zn}$	473,7	86
$[\text{ZnCl}_2(\text{OFLO})]$ (5)	Branco	$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{FN}_3\text{O}_4\text{Zn}$	497,7	74
$[\text{ZnCl}_2(\text{SPAR})]$ (6)	Branco	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{Zn}$	528,7	60



Esquema 3.4 – Representação da obtenção do complexo (4).



Esquema 3.5 – Representação da obtenção do complexo (5).



Esquema 3.6 – Representação da obtenção do complexo (6).

3.3.3 Síntese do precursor $[ZnCl_2(phen)]$ e do complexo de Zn(II) de norfloxacin contendo 1,10-fenantrolina (phen)

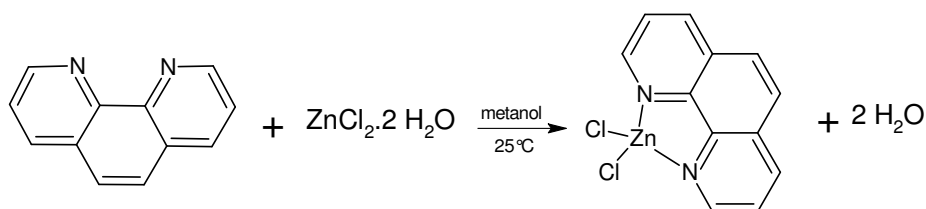
O complexo de Zn(II) com a NOR e a phen, reagiu-se, em um balão de 100 mL de fundo redondo, 0,50 mmol de phen com 0,50 mmol de $ZnCl_2 \cdot 2H_2O$ em, aproximadamente, 40 mL de metanol. A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente ($25^\circ C$) por, aproximadamente, 24 horas. O precursor formado, $[ZnCl_2(phen)]$ (7), foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico. Posteriormente, 0,25 mmol do precursor foi dissolvido em, aproximadamente, 50 mL de acetona e adicionado a 0,25 mmol da norfloxacin, previamente

dissolvida em, aproximadamente, 40 mL do mesmo solvente. A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente (25°C) por, aproximadamente, 24 horas. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico. Um novo complexo foi obtido: $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})].2\text{H}_2\text{O}$ (**8**).

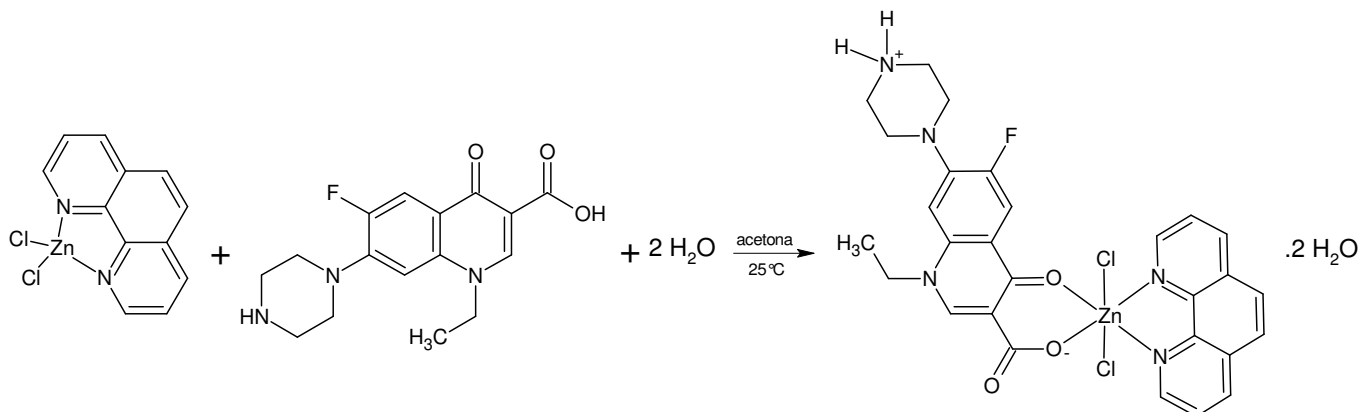
Os complexos obtidos foram caracterizados por medidas de temperatura de fusão e condutividade, análise elementar de C, H, N e análise termogravimétrica, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C). A Tabela 3.3 apresenta cor, fórmula molecular, massa molar e rendimento para os compostos de Zn(II) obtidos. Os esquemas 3.7 e 3.8 mostram as representações da obtenção dos complexos.

Tabela 3.3 - Cor, fórmula molecular, massa molar (MM) e rendimento para os compostos de Zn(II) com 1,10-fenantrolina.

Composto	Cor	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Rendimento (%)
$[\text{ZnCl}_2(\text{phen})]$ (7)	Branco	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_2\text{Zn}$	316,5	89
$[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})].2\text{H}_2\text{O}$ (8)	Amarelo	$\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{FN}_5\text{O}_5\text{Zn}$	671,9	80



Esquema 3.7 – Representação da obtenção do complexo (**7**).



Esquema 3.8 – Representação da obtenção do complexo (**8**).

3.3.4 Síntese dos complexos de Mn(II) de norfloxacin (NOR) e esparfloxacin (SPAR)

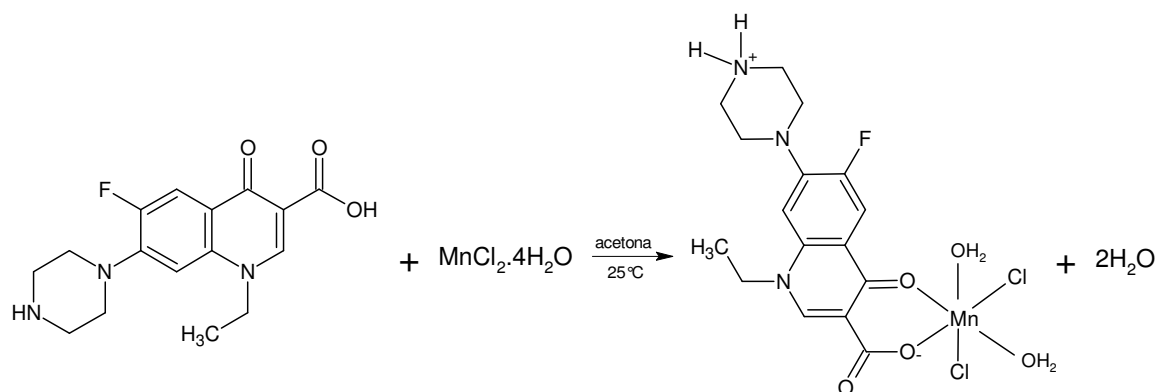
Os complexos de Mn(II) com a NOR ou com a SPAR foram obtidos usando-se o mesmo procedimento descrito para os complexos de Zn(II), porém usando 0,50 mmol do ligante e 0,50 mmol de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, dissolvidos em 50 mL de acetona. Dois complexos foram obtidos: $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**9**) e $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**10**).

Para a adição do co-ligante phen, inicialmente, dissolveu-se 0,25 mmol dos complexos, em um balão de 100 mL de fundo chato com, aproximadamente, 50 mL de metanol. A seguir, foi adicionado 0,25 mmol da phen, previamente dissolvido em 10 mL do mesmo solvente. A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por, aproximadamente, 24 horas. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico. Dois novos complexos foram obtidos: $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**11**) e $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{phen})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**12**).

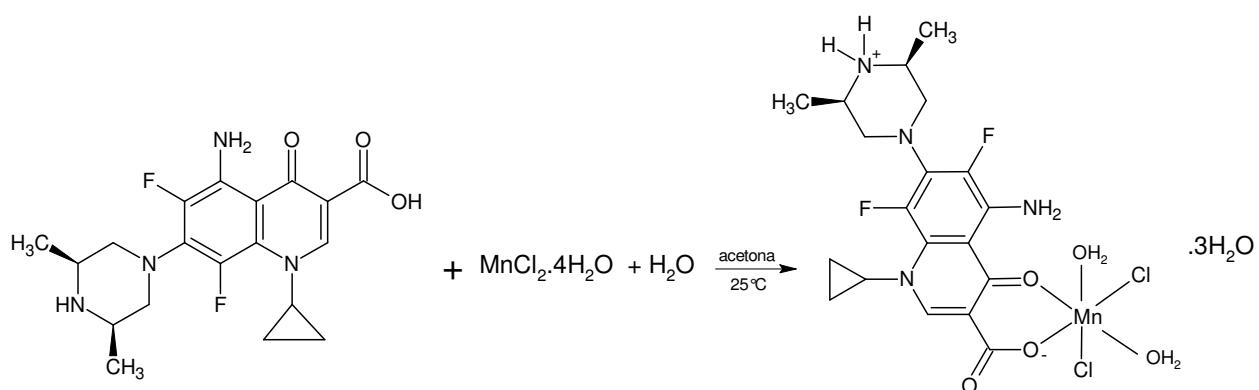
Os complexos obtidos foram caracterizados por análise termogravimétrica e de condutividade, análise elementar de C, H, N, espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). A Tabela 3.4 apresenta cor, fórmula molecular, massa molar e rendimento para os complexos de Mn(II) com a NOR e SPAR. Os esquemas 3.8, 3.9, 3.10 e 3.11 (pág. 29 e 30) mostram as representações da obtenção dos complexos.

Tabela 3.4 - Cor, fórmula molecular, massa molar (MM) e rendimento para os compostos de Mn(II) com norfloxacin e esparfloxacin.

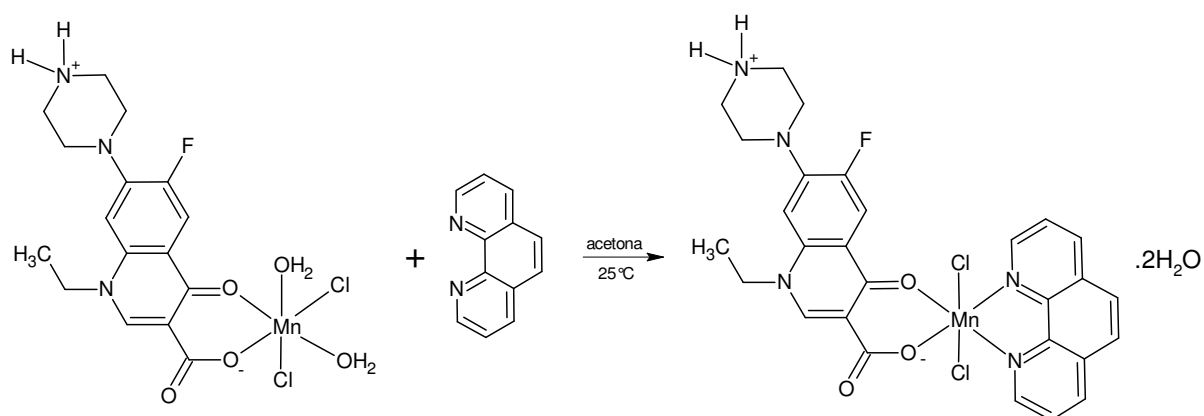
Composto	Cor	Fórmula molecular	MM (g mol^{-1})	Rendimento (%)
$[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (9)	Branco	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{FMnN}_3\text{O}_5$	481,2	80
$[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (10)	Amarelo	$\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{MnN}_4\text{O}_8$	608,3	75
$[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11)	Branco	$\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{FMnN}_5\text{O}_5$	661,4	65
$[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{phen})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (12)	Amarelo	$\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{MnN}_6\text{O}_6$	752,5	57



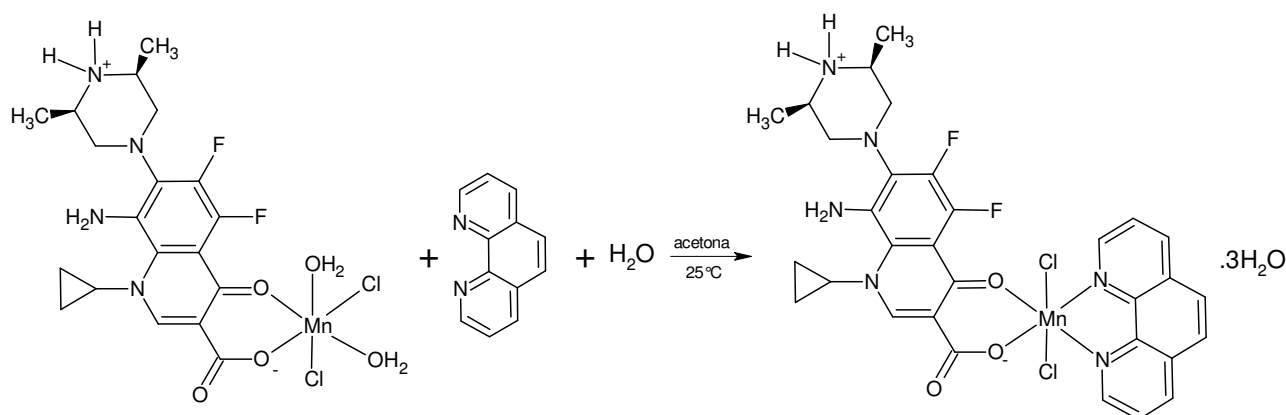
Esquema 3.9 – Representação da obtenção do complexo (9).



Esquema 3.10 – Representação da obtenção do complexo (10).



Esquema 3.11 – Representação da obtenção do complexo (11).



Esquema 3.12 - Representação da obtenção do complexo (12).

3.4 Estudos espectroscópicos dos complexos de Au(III), Zn(II) e Mn(II) com a norfloxacin

Todas as medidas espectroscópicas foram feitas em triplicata. Em todos os casos, foram feitas titulações, sendo que as concentrações iniciais dos titulantes e titulados eram conhecidas. Em todas as medidas, foram feitas correções da concentração das espécies envolvidas, segundo a Equação 25.

$$C_f = \left(\frac{C_i \times v}{V + v} \right) \quad (25)$$

Onde: C_f e C_i são as concentrações finais e iniciais das espécies em solução, respectivamente; V é o volume inicial e v é o incremento de volume a cada ponto.

Como a adição do titulante provoca diluição do sistema e as medidas são proporcionais à concentração das espécies presentes, a absorvância ou a fluorescência foi corrigida a cada adição do titulante. Para a correção das medidas espectroscópicas, utiliza-se a Equação 26.

$$A_{cor} \text{ ou } F_{cor} = A_{obs} \text{ ou } F_{obs} \times \left(\frac{V + v}{V} \right) \quad (26)$$

onde, A_{cor} e F_{cor} são a absorvância e a fluorescência corrigidas, respectivamente; A_{obs} e F_{obs} são a absorvância e a fluorescência obtidas em cada ponto, respectivamente; V é o volume inicial e v é o incremento de volume a cada ponto.

3.4.1 Determinação da constante de ionização da norfloxacin e seus complexos de Zn(II)

A determinação da constante de ionização da NOR e seus complexos de Zn(II) foi realizada por espectroscopia de fluorescência. Os ligantes e complexos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente, as soluções foram diluídas em tampão universal, com o pH ajustado para o valor desejado, na concentração de $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Inicialmente, foram realizadas medidas para determinar o comprimento de onda máximo de emissão dos compostos. Todos os compostos em estudo apresentaram o máximo de emissão no comprimento de onda de 320 nm. Em seguida, medi-se fluorescência da NOR e seus complexos de Zn(II), com excitação de 320 nm, ao longo da faixa de pH de 2 a 13,6. O máximo de emissão ocorreu no comprimento de onda de 415 nm em pH 7. Utilizando este comprimento de onda, os pontos experimentais foram ajustados com o uso da Equação 26 (pág. 30).

3.4.2 Interação com alvos biológicos

Nesse trabalho, estudou-se a interação das fluoroquinolonas e de seus complexos de Zn(II) e Au(III) com a albumina bovina (BSA) e o ácido desoxirribonucléico (DNA), utilizando espectroscopia de fluorescência e UV-Vis, respectivamente. Todas as medidas foram feitas em triplicata. Também foram feitas correções da concentração das espécies envolvidas, a absorvância ou a fluorescência segundo as Equações 25 e 26 (pág.30).

Interação com albumina bovina (BSA) e (HSA)

As interações dos compostos em estudo com a albumina bovina e humana foram feitas por espectroscopia de fluorescência. Os ligantes e complexos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente, as soluções foram diluídas em tampão universal, com o pH ajustado para 7,4, na concentração de $8,0 \times 10^{-6}$

mol L⁻¹. As soluções de BSA e HSA com a concentração 2,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ foram preparadas, diretamente, no mesmo tampão e pH.

Nos experimentos, 2,0 mL da solução de BSA ou HSA, sob agitação magnética, foram tituladas com alíquotas de 0,1 mL das soluções dos compostos em estudo. Após cada adição foram feitas leituras na faixa de 250 a 700 nm, com uma excitação de 285 nm para a BSA e 280 nm para a HSA. Após a adição do fármaco em estudo, observa-se uma supressão de fluorescência dos triptofanos, que a proteína possui em sua estrutura. Esta supressão pode ser descrita pela equação de *Stern-Volmer* (Equação 12, pág. 14). O gráfico (F_0/F vs $[composto]$) é representado por uma reta cujo coeficiente angular da reta é a constante de associação (K_{SV}). Os estudos de fluorescência com a BSA foram feitos a 25 °C e os estudos com a HSA foram feitos em três temperaturas (25 °C, 30 °C e 37 °C).

Interação com DNA *calf-thymus* (CT DNA)

Os estudos de interação dos compostos com CT DNA foram realizadas utilizando espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) de 200 a 800 nm. Os compostos em estudo foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) com a concentração de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. Posteriormente, as soluções foram diluídas em tampão universal, com o pH ajustado para 7,4, para a concentração de 1,2 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ ou 2,5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹.

A concentração do CT DNA foi determinada por UV-Vis utilizando seu coeficiente de extinção ($\epsilon=6600$ L mol⁻¹ cm⁻¹) em 260 nm. As razões entre a absorvância para o CT DNA em 260 e 280 nm foram sempre valores entre 1,8-1,9, indicando que o CT DNA estava suficientemente livre de proteína (SKYRIANOU *et al.*, 2009).

No experimento com CT DNA, 2,0 mL da solução do composto em estudo foi titulado com alíquotas de 0,125 mL da solução do DNA. Após cada adição, houve um período de incubação de 30 minutos, com subsequente varredura de 200 a 800 nm. Os espectros obtidos foram ajustados de acordo com a equação de *Scatchard* (Equação 27, pág. 32) para o cálculo das constantes de ligação (K_b) dos complexos ao DNA.

A constante de ligação (K_b) pode ser obtida pela razão da inclinação com a interseção da reta $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ em função da $[DNA]$ (SKYRIANOU *et al.*, 2010; PARAGINSKI, 2007).

$$\frac{[DNA]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)_q} + \frac{1}{[K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)]} \quad (27)$$

onde,

[DNA] é a concentração do par de bases do DNA,

ε_a = coeficiente de supressão aparente, que corresponde à razão entre a absorvância medida e a concentração de composto em estudo ($A_{obs}/[\text{composto}]$);

ε_b = coeficiente de supressão do composto ligado ao DNA;

ε_f = coeficiente de supressão do composto livre em solução (na ausência de DNA).

3.5 Voltametria

As medidas eletroquímicas, utilizando as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, foram realizadas em um potenciostato/galvanostato μ -Autolab da Eco Chemie, acoplado a um microcomputador que registra e armazena os dados obtidos, utilizando o software de controle GPES 4.9.

Para os estudos voltamétricos, foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro Pyrex® com capacidade total de 5 mL, provida de tampa de teflon com cinco orifícios, para o encaixe do eletrodo de trabalho, eletrodo de referência, eletrodo auxiliar (contra-eletrodo) e entrada e saída para o sistema de borbulhamento de gás N_2 .

Como eletrodo de trabalho foi utilizado carbono vítreo de 1,0 mm² de área geométrica. O eletrodo de referência utilizado foi de Ag/AgCl, em KCl saturado (5,0 mol L⁻¹) e o eletrodo auxiliar foi um fio de platina. Todos os experimentos eletroquímicos foram feitos à temperatura ambiente (25°C).

Para o estudo do comportamento voltamétrico dos complexos de Mn(II) e seus ligantes foi utilizado como solvente DMSO e como eletrólito suporte, solução de tetrafluoroborato de tetrabutilamônio ([TBABF₄]) 0,1 mol L⁻¹ em DMSO.

Antes de iniciar as leituras voltamétricas, o oxigênio dissolvido foi eliminado das soluções borbulhando-se nitrogênio gasoso durante 15 minutos. Esse procedimento de desaeração é importante porque os sinais correspondentes aos processos de oxirredução do oxigênio

dissolvido podem interferir nas curvas voltamétricas a serem obtidas. Essa interferência é devido à alta corrente de fundo (na região catódica) que ocorre na presença de O₂ dissolvido na solução, que mascara a corrente produzida pela espécie eletroativa, dificultando assim a análise.

3.6 Testes biológicos

3.6.1 Toxicidade frente às formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*

Os ensaios de atividade anti-*Trypanosoma cruzi* foram realizados, em colaboração, com a Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro do Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ - RJ. Os testes, *in vitro*, objetivaram verificar a ação das fluorquinolonas e seus complexos sobre as formas evolutivas relevantes para a infecção humana (formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares da cepa Y). As soluções dos compostos foram preparadas na concentração de 50 mmol L⁻¹, utilizando água como solvente e foram armazenadas à 4 °C até a realização dos experimentos. Os ensaios (mínimo de três ensaios) foram realizados, em duplicatas.

As formas tripomastigotas foram obtidas, a partir de punção cardíaca de camundongos suíços previamente infectados (após eutanásia em câmara com saturação de CO₂), durante o pico da parasitemia. A purificação dos parasitos foi realizada por centrifugação diferencial. Para obtenção de células musculares cardíacas (culturas de células de mamífero), ventrículos de corações de embriões de camundongos (linhagem *Swiss Webster*) foram fragmentados e submetidos à dissociação enzimática, seguida de análises ao microscópio óptico para verificar sua viabilidade. Posteriormente, realizou-se a inativação enzimática e, após centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em meio adequado para a manutenção das culturas em atmosfera de CO₂. Os ensaios foram realizados em diferentes condições e com concentrações crescentes dos compostos, com comparação direta com o efeito de benzonidazol (fármaco-referência) (MEIRELLES *et al.*, 1986).

Para analisar o efeito dos fármacos sobre as formas amastigotas (análise *in vitro* sobre formas intracelulares do parasito), após 24 horas de cultivo, cardiomiócitos foram infectados com tripomastigotas sanguíneas (razão parasita célula de 10:1) e tratados ou não por 24-72h com diferentes concentrações dos compostos, seguido de diluições seriadas. Após o tratamento, as culturas foram lavadas, fixadas, coradas e montadas em *permount* de modo a se quantificar o

percentual de células hospedeiras infectadas e avaliar o número de parasitas por células. Foi utilizada como parâmetro de análise a concentração necessária para inibir 50% da atividade (IC_{50}) para os compostos em estudos, ou seja, os valores mínimos de concentração capaz de inibir em 50% o crescimento do *T. cruzi*.

3.6.2 Toxicidade frente às linhagens tumorais A20, B16-F10, K562, MCR-5 e L919

Os ensaios de atividade antitumoral foram realizados, em colaboração, com a Profa. Elisângela de Paula Silveira Lacerda do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens tumorais estabelecidas A20 (Linfoma murino), B16-F10 (Melanoma murino), K562 (Leucemia mielóide humana) e como células normais (controle), utilizou-se a linhagem estabelecida MCR-5 (fibroblasto de pulmão humano) e L919 (Fibroblasto de pulmão murino).

Linhagens celulares e manutenção do cultivo celular

As linhagens celulares foram mantidas em cultura a 37 °C, 5% CO_2 em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute da GIBCO) ou DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos, segundo protocolo estabelecido pela *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA).

Ensaio de viabilidade celular por Ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)

As células foram semeadas em placas de 96 poços. No dia seguinte, concentrações crescentes (0,2 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de fármacos foram adicionadas, incubando-se a seguir por 48 horas em incubadora com 5% de CO_2 e a 37 °C. Ao final do período adiciona-se a solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), deixando-se em incubação por 5 horas para metabolização do reagente. A solubilização do reagente formazan foi feita com dodecil sulfato de sódio (SDS). A quantificação de densidade óptica (DO) foi medida por espectrofotômetro. O valor de IC_{50} foi determinado por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Citometria de fluxo: Avaliação das fases do ciclo celular.

Células tratadas e células controle mantidas em cultura líquida foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) com EDTA e fixadas em 1% de etanol gelado a 70%, sendo posteriormente tratadas com RNase por 30 minutos e em seguida coradas com 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de solução corante de iodeto de propídio. Após o período de incubação, a intensidade da fluorescência foi determinada através de citometria de fluxo quantitativa, utilizando o Citômetro de Fluxo FACS Callibur (Becton Dickinson®, San José, CA).

Eletroforese em gel de Agarose

Para a extração de DNA em gel de agarose as células de linhagens tumorais e normais foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos em estudo por 48 h, incubados na estufa com 5% de CO₂ e à 37 °C. As células foram retiradas do tratamento e centrifugadas e lavadas com PBS seguindo o protocolo de SAMBROOK *et al.* (1989). O DNA foi transferido para um gel de agarose, que foi submetido a eletroforese. O DNA foi visualizado através de transiluminação por ultravioleta, após a coloração por brometo de etídio utilizando um sistema de imageamento Omega® (UltraLum Inc. Claremont, CA, EUA).

Análise estatística

Para comparação entre os grupos tratados e controle foi utilizado Análise de Variância (Anova), segundo um único critério e pós-teste Dunnet's (software GraphPad Prism V4) com grau de significância de 95% ($p < 0,05$).

3.6.3 Bactérias e Fungos

Para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos complexos de Zn(II) e Mn(II) obtidos foram usadas fungos e bactérias da coleção do LABB (Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios), Departamento de Química – UFMG. Foram usados os fungos *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger* e *Microsporum gypseum* e as bactérias *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*.

Para os testes foram usadas microplacas constituídas por 96 poços (8 linhas e 12 colunas). As microplacas foram preparadas da seguinte forma:

- Pipetou-se 100 μL da solução trabalho nos poços e, a seguir 100 μL do inóculo do microrganismo ou da suspensão de esporos para avaliar a inibição dos microrganismos;
- Pipetou-se 100 μL da solução trabalho nos poços e, a seguir 100 μL de água destilada estéril para o controle dos extratos.
- Pipetou-se 100 μL do meio de cultura BHI nos poços e, a seguir 100 μL do inóculo do microrganismo ou da suspensão de esporos para o controle dos microrganismos.
- Pipetou-se 100 μL do meio de cultura BHI nos poços e, a seguir 100 μL de água destilada estéril para o controle da esterilidade do meio de cultura.

A disposição das amostras na microplaca para os ensaios antibacterianos e antifúngicos, onde foram avaliados os complexos de Zn(II) e Mn(II), ligantes e seus respectivos sais a uma concentração fixa de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, pode ser visualizada como exemplo na Figura 3.1.

As microplacas preparadas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Realizaram-se leituras em leitora de ELISA (Thermoplate, modelo: TP-READER), em comprimento de onda fixo de 492 nm com 24 horas para os testes antibacterianos e 48 horas para os fungos filamentosos.

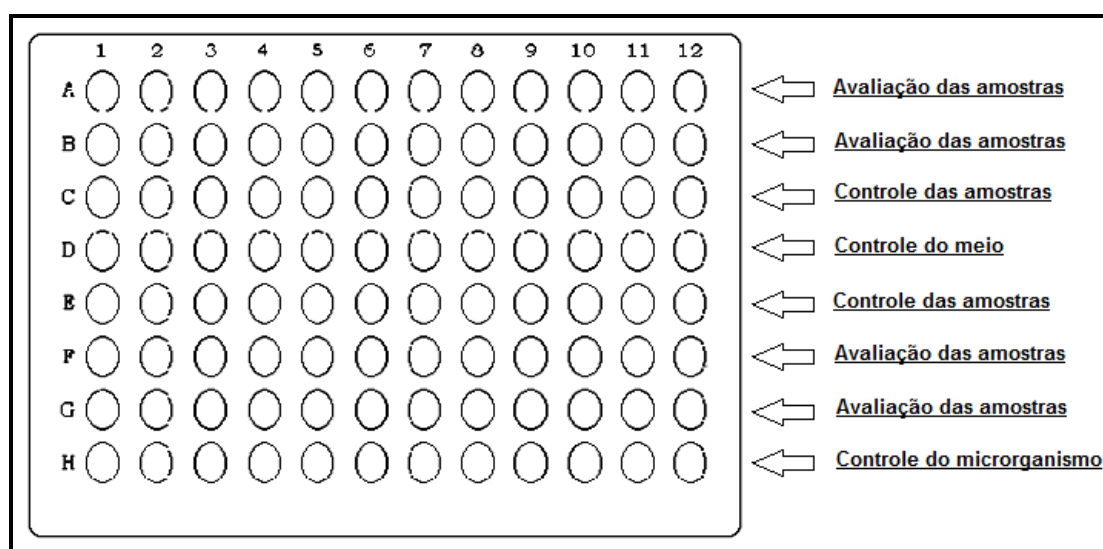


Figura 3.1 – Representação de microplaca do ensaio antibacteriano e antifúngico com as amostras a uma concentração fixa.

4. Complexos de Au(III) de algumas fluorquinolonas: síntese, caracterização, testes de atividade biológica e estudos de interação com alvos biológicos

A reação de ácido cloroáurico, HAuCl_4 , com as fluorquinolonas norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) e esparfloxacin (SPAR) levou à obtenção de três complexos de Au(III). Nesse trabalho, estes complexos foram obtidos para realizar os testes de atividade biológica e para os estudos de interação com alvos biológicos.

A atividade citotóxica dos complexos de Au(III) foi testada utilizando as linhagens tumorais A20 (Linfoma murino), B16-F10 (Melanoma murino), K562 (Leucemia mielóide humana) e como células normais (controle) utilizou-se a linhagem estabelecida MCR-5 (fibroblasto de pulmão humano) e L919 (Fibroblasto de pulmão murino). Além disso, estudou-se o efeito da NOR, LEVO, SPAR e de seus complexos de Au(III), assim como do ácido cloroáurico, sob as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas de sangue do *T. cruzi*.

A pesquisa sobre a interação entre macromoléculas biológicas e fármacos gera importante informação sobre os sítios de ligação, transporte e o metabolismo de moléculas no corpo humano (GUIZADO, 2008; GÓES FILHO, 2005). O estudo da interação das quinolonas e seus complexos com as albuminas séricas bovina (BSA) e humana (HSA) e o ácido desoxirribonucléico (DNA) é relatado, frequentemente, na literatura como modelos para o esclarecimento e conhecimento desta interação. Nesse trabalho, avaliou-se a interação dos complexos de Au(III) com a proteína BSA e o DNA com o intuito de compreender as propriedades estruturais e farmacológicas destes compostos.

4.1 Dados de microanálise e medidas de condutividade

A Tabela 4.1 (pág. 39) apresenta a faixa de temperatura de decomposição, os dados de análise elementar e condutividade para os complexos de Au(III).

Tabela 4.1 - Dados de microanálise (valores calculados entre parênteses), faixa de temperatura de decomposição (°C) e condutividade (Λ , $\mu\text{S cm}^{-1}$) para os compostos de Au(III).

Composto	Faixa de decomposição	%C	%H	%N	Λ^*
[AuCl ₂ (NOR)]Cl.2H ₂ O (1)	150 - 200	29,0 (29,2)	3,1 (3,4)	6,2 (6,4)	102
[AuCl ₂ (LEVO)]Cl.2H ₂ O (2)	190 - 210	31,0 (30,9)	3,0 (3,5)	6,0 (6,0)	89
[AuCl ₂ (SPAR)]Cl.2H ₂ O (3)	> 270	31,0 (31,2)	3,1 (3,6)	7,5 (7,7)	94

*Condutividade ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em *N,N*-dimetilformamida (DMF). Nos valores de condutividade tabelados já foi corrigido a condutividade do solvente.

Os dados de microanálise sugerem, que nos complexos (1), (2) e (3) a relação metal:ligante é de 1:1. As medidas de condutividade em DMF indicam que os complexos obtidos são eletrólitos 1:1 (GEARY, 1971). Portanto, podemos sugerir que os complexos são do tipo [AuCl₂(L)]Cl, onde L representa o ligante levofloxacina (LEVO), norfloxacina (NOR) e esparfloxacina (SPAR) coordenado de forma neutra e bidentada ao ouro.

4.2 Espectroscopia na região do infravermelho

Nos espectros de infravermelho (IV) das fluorquinolonas livres, as bandas atribuídas ao estiramento de C=O da carboxila ($\nu_{\text{C=O}}$ em COOH) e da outra carbonila são observadas na região entre 1716 - 1730 cm^{-1} e 1620 - 1641 cm^{-1} , respectivamente (DOROFEEV, 2004). Nos espectros de IV dos complexos de Au(III), há deslocamentos destes modos vibracionais para 1696-1708 cm^{-1} e 1620-1632 cm^{-1} , respectivamente. De acordo com a literatura, estes deslocamentos sugerem que os oxigênios da carboxila e da carbonila não participam da ligação com o metal (VIEIRA *et al.*, 2009; BATISTA *et al.*, 2011; DOROFEEV, 2004; MARTINS, 2012). A Figura 4.1 (pág. 40) mostra, como exemplo, os espectros de absorção na região do infravermelho para o ligante SPAR e seu complexo de Au(III). Os espectros de infravermelho dos demais complexos e seus ligantes encontram-se em anexo (pág. 108 e 109).

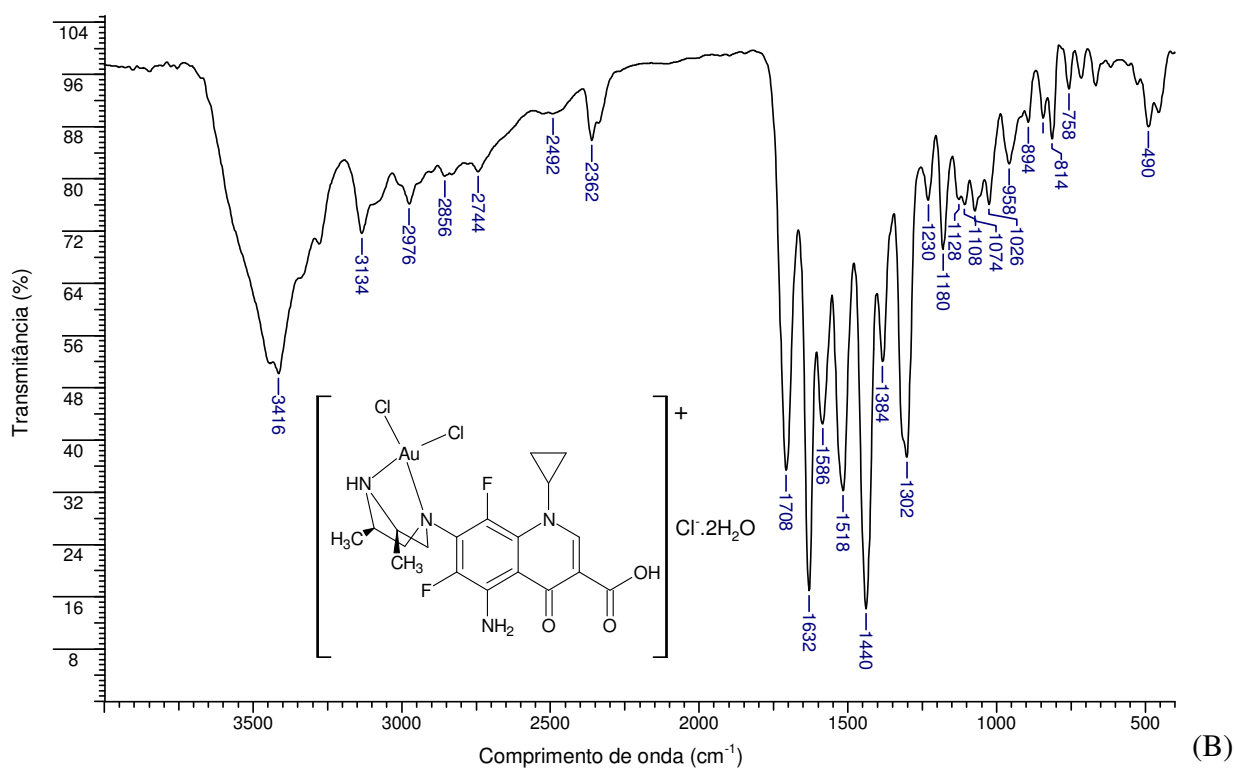
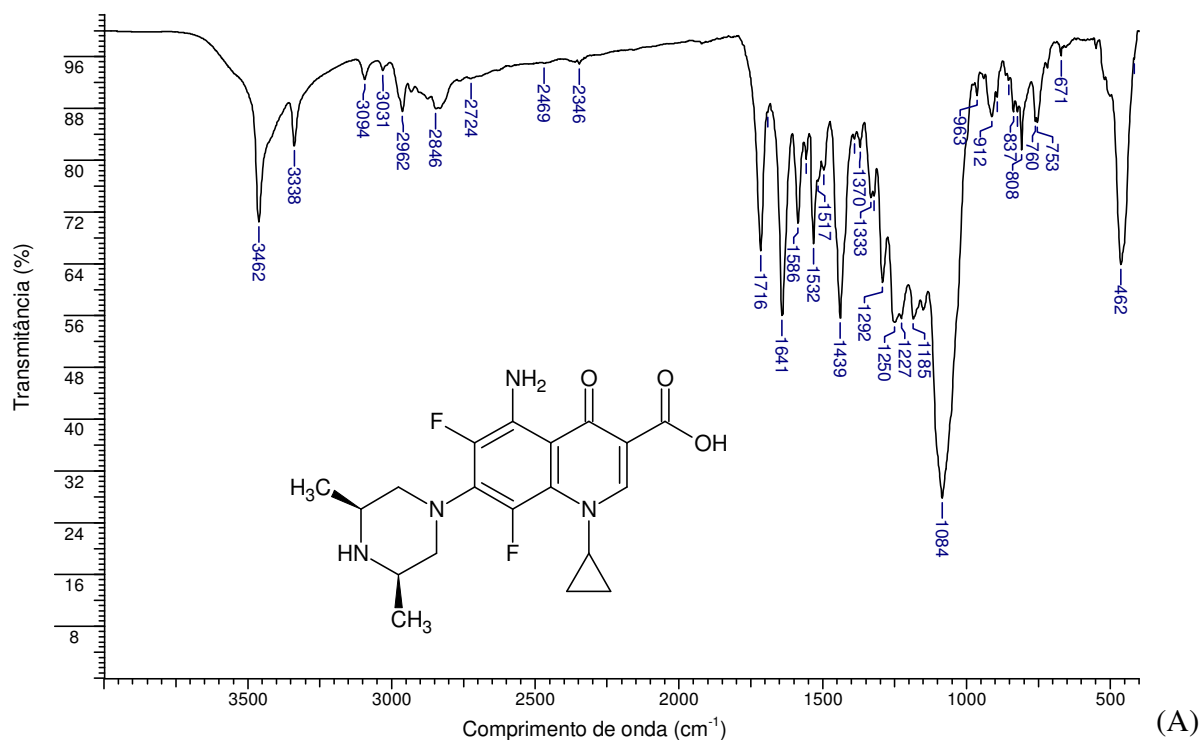


Figura 4.1 - Espectros de infravermelho da (A) SPAR e do complexo (B) $[AuCl_2(SPAR)]Cl \cdot 2H_2O$ (3) em pastilhas de KBr.

A Tabela 4.2 lista as atribuições das principais bandas dos espectros de infravermelho das fluorquinolonas e de seus complexos de Au(III).

Tabela 4.2 - Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das fluorquinolonas e dos complexos de Au(III).

Composto	$\nu(\text{C}=\text{O})$ do COOH	$\nu(\text{C}=\text{O})$ cetônica
Norfloxacin (NOR)	1730 F	1622 F
$[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	1706 F	1630 F
Levofloxacin (LEVO)	1725 F	1620 F
$[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2)	1696 F	1620 F
Esparfloxacin (SPAR)	1716 m	1641 m
$[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3)	1708 F	1632 F

*F = forte, m = média.

4.3 Análise termogravimétrica

As curvas TG/DTG foram feitas entre 30 e 800 °C, em atmosfera de ar, com taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} . Em todos os casos, foi possível confirmar a presença das moléculas de água de hidratação (Tabela 4.3). As curvas TG/DTG dos complexos de Au(III) encontram-se em anexo (pág. 115).

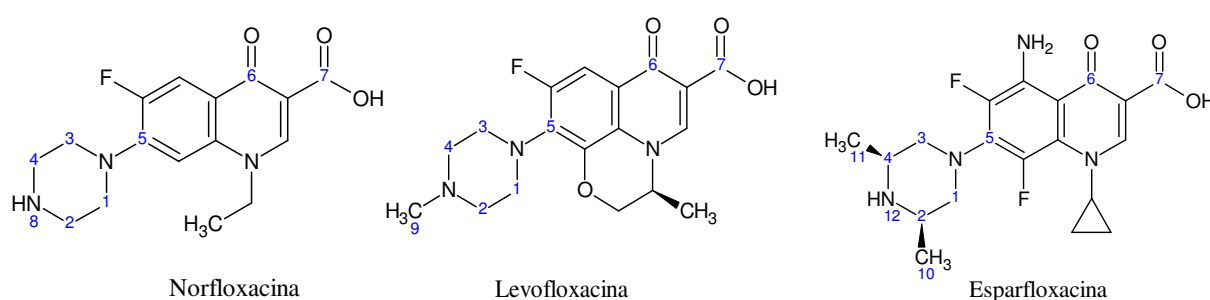
Tabela 4.3 – Porcentagens de perda de moléculas de água de hidratação calculadas e obtidas a partir da análise das curvas TG/DTG dos complexos de Au(III).

Composto	MM (g mol^{-1})	% H_2O (calculada)	% H_2O (experimental)
$[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	658,7	5,5	6,1
$[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2)	700,7	5,1	4,9
$[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3)	731,8	4,9	4,8

4.4 Ressonância magnética nuclear

As Tabelas 4.4 e 4.5 (pág. 43) listam as atribuições dos principais sinais de RMN de ^1H e ^{13}C das fluorquinolonas NOR, LEVO, SPAR e de seus complexos de Au(III). Os espectros obtidos encontram-se em anexo (pág. 119 a 124).

Tabela 4.4 - Principais deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN de ^1H para as fluorquinolonas e seus complexos de Au(III) em DMSO- d_6 , 200 MHz.



Composto	H(2),H(4)	H(1),H(3)	H(9)	H(10,11)	H(12)
Norfloxacin (NOR)	2,88 (m)	3,23 (m)	-	-	-
[AuCl ₂ (NOR)]Cl.2H ₂ O (1)	~3,3 (m)	~3,6 (m)	-	-	-
Levofloxacin (LEVO)	~2,4 (m)	~3,3 (m)	2,22 (s)	-	-
[AuCl ₂ (LEVO)]Cl.2H ₂ O (2)	~3,1 (m)	~3,5 (m)	2,88 (s)	-	-
Esparfloxacin (SPAR)	2,78 (t) 2,95 (t)	3,43 (d)	-	1,01 (d)	7,23 (s)
[AuCl ₂ (SPAR)]Cl.2H ₂ O (3)	3,16 (t)	~3,5 (m)	-	0,98 (d)	7,22 (s)

Legenda: d = duplete, s = simpleto, m= multiplete, ND = não detectado.

Nos complexos de Au(III) com as fluorquinolonas, os deslocamentos químicos de RMN ^1H dos complexos são similares aos dos ligantes, exceto para os hidrogênios ligados ao anel piperazina. Os sinais dos prótons próximos aos carbonos 1 a 4 sofreram deslocamentos de cerca de 0,3 ppm a 0,5 ppm, indicando que a coordenação do metal ocorreu aos nitrogênios do anel piperazina (Tabela 4.4).

Nos espectros de RMN de ^{13}C das fluorquinolonas livres NOR, LEVO e SPAR, os sinais da carbonila cetônica, C(6)=O, e da carboxila, C(7)=OOH, aparecem na faixa δ 176,15- δ 179,42 e

δ 166,20- δ 166,96, respectivamente. Após a complexação, estes sinais de carbono sofrem mudanças muito pequenas, sugerindo que estes grupos não estão envolvidos na coordenação ao íon metálico (VIEIRA *et al.*, 2009).

Os sinais em δ 45,34- δ 54,74 e δ 49,97- δ 57,36 foram atribuídos aos átomos C(2), C(4) e C(1), C(3) e os sinais em δ 132,12- δ 146,00 ao átomo C(5) nos espectros de ^{13}C da NOR, LEVO and SPAR. Nos espectros dos complexos de Au(III), estes sinais sofrem mudanças significativas, indicando que a coordenação do ligante ao metal ocorreu através dos átomos de nitrogênio do anel piperazina (Tabela 4.5). Este modo de coordenação é raro, quando comparados com os dados apresentados na literatura (VIEIRA *et al.*, 2009).

Tabela 4.5 - Principais deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN de ^{13}C para as fluorquinolonas e seus complexos de Au(III) em CDCl_3 ou $\text{DMSO-}d_6$, 200 MHz.

Composto	C(1),C(3)	C(2),C(4)	C(5)	C(6)=O	C(7)OOH
Norfloxacin (NOR)	50,68/ 50,72	45,34	146,00	176,15	166,20
[AuCl ₂ (NOR)]Cl (1)	46,42/ 46,52	42,55	144,28	176,14	166,01
Levofloxacin (LEVO)	49,97/ 50,04	54,74	132,12	176,20	165,96
[AuCl ₂ (LEVO)]Cl (2)	46,65	52,68	NO	175,89	165,48
Esparfloxacin (SPAR)	57,31/ 57,36	50,77	136,36	180,13	165,45
[AuCl ₂ (SPAR)]Cl (3) ^b	51,13	48,40	NO	179,52	165,33

NO: não observado

VIEIRA e colaboradores (2009) sintetizaram complexos de Pt(II) com ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina, esparfloxacina e gatifloxacina. A coordenação dos ligantes ao metal ocorreu através dos átomos de nitrogênio do anel piperazina de modo bidentado. Nestes casos, os deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^1H dos complexos são similares aos dos ligantes, com exceção dos deslocamentos dos hidrogênios do anel piperazina, que variaram cerca de 0,5 ppm. Nos espectros de RMN ^{13}C , os deslocamentos dos carbonos do anel piperazina variaram de 2 a 7 ppm. Em relação ao ligante, os sinais das carbonilas sofreram deslocamentos de 0,5 ppm, aproximadamente. REFAT (2007) sintetizou complexos de Ag(I), Cu(II) and Au(III) com a NOR. O ligante é coordenado aos íons Ag(I) e Au(III) através do átomo de nitrogênio do anel

piperazina de modo monodentado, mas o complexo de Cu(II) se liga através dos átomos de oxigênio. O espectro de RMN ^1H do $[\text{Au}(\text{NOR})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_3$ mostrou pequenos deslocamentos (cerca de 0,2 ppm), exceto pelos sinais dos prótons dos anéis da piperazina.

4.5 Estudos de interação dos complexos de Au(III) de algumas fluorquinolonas e seus ligantes com a albumina bovina

A albumina sérica bovina (BSA) é a proteína mais abundante no sangue bovino, com uma concentração típica de 50 mg mL^{-1} (Figura 4.2). Ela é extensamente utilizada em estudos de interação com fármacos, graças a sua semelhança estrutural com a albumina sérica humana (HSA) e seu baixo custo. A principal diferença entre as duas proteínas consiste no número de triptofanos. A BSA possui dois resíduos de triptofano, Trp134 e Trp212 e a HSA apenas um, Trp214 (GÓES FILHO, 2005; FERREIRA, 2009).

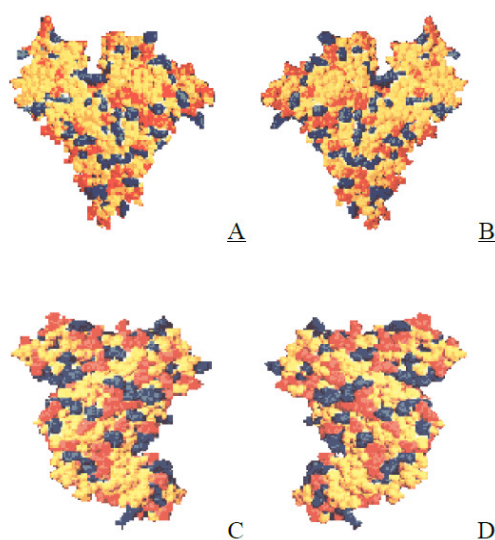


Figura 4.2 - Modelo de preenchimento espacial da molécula de BSA com resíduos básicos (em azul), resíduos ácidos (em vermelho) e resíduos neutros (em amarelo). (A) vista frontal, (B) vista traseira, (C) lado esquerdo e (D) lado direito (FERREIRA, 2009).

Em solução, a BSA exibe forte sinal fluorescente, devido principalmente aos resíduos de triptofano, com máximo em 340 nm, quando excitada em 280 nm. Portanto, a fluorescência é a técnica mais utilizada para os estudos de interação BSA-fármaco (FERREIRA, 2009; BUCK, 2009).

Neste trabalho, fizemos estudos de interação entre os complexos de Au(III) com a BSA para verificar a existência de interações e tentar compreender a natureza e a intensidade das mesmas. A interação da NOR, LEVO e SPAR livres também foi estudada para efeito de comparação.

As mudanças espectrais na titulação da BSA, em pH 7,4, com as fluorquinolonas NOR, LEVO, SPAR e seus complexos de Au(III) podem ser observadas na Figura 4.3 (pág. 46). Em todos os casos estudados, observa-se supressão do sinal fluorescente dos triptofanos em 340 nm após a adição de alíquotas sucessivas (0,1 mL) dos compostos, indicando que os complexos e ligantes interagem com a proteína. Em todos os casos, não houve deslocamentos significativos do comprimento de onda máximo de emissão da BSA com a adição dos compostos. Na medida em que se adicionava o composto em estudo, em alguns casos, observou-se o surgimento de outra banda em 430-460 nm. Esta banda corresponde à fluorescência emitida pelo composto em estudo, quando excitado em 285 nm. Como as concentrações do composto em estudo eram crescentes, observa-se um aumento da fluorescência nestes comprimentos de onda.

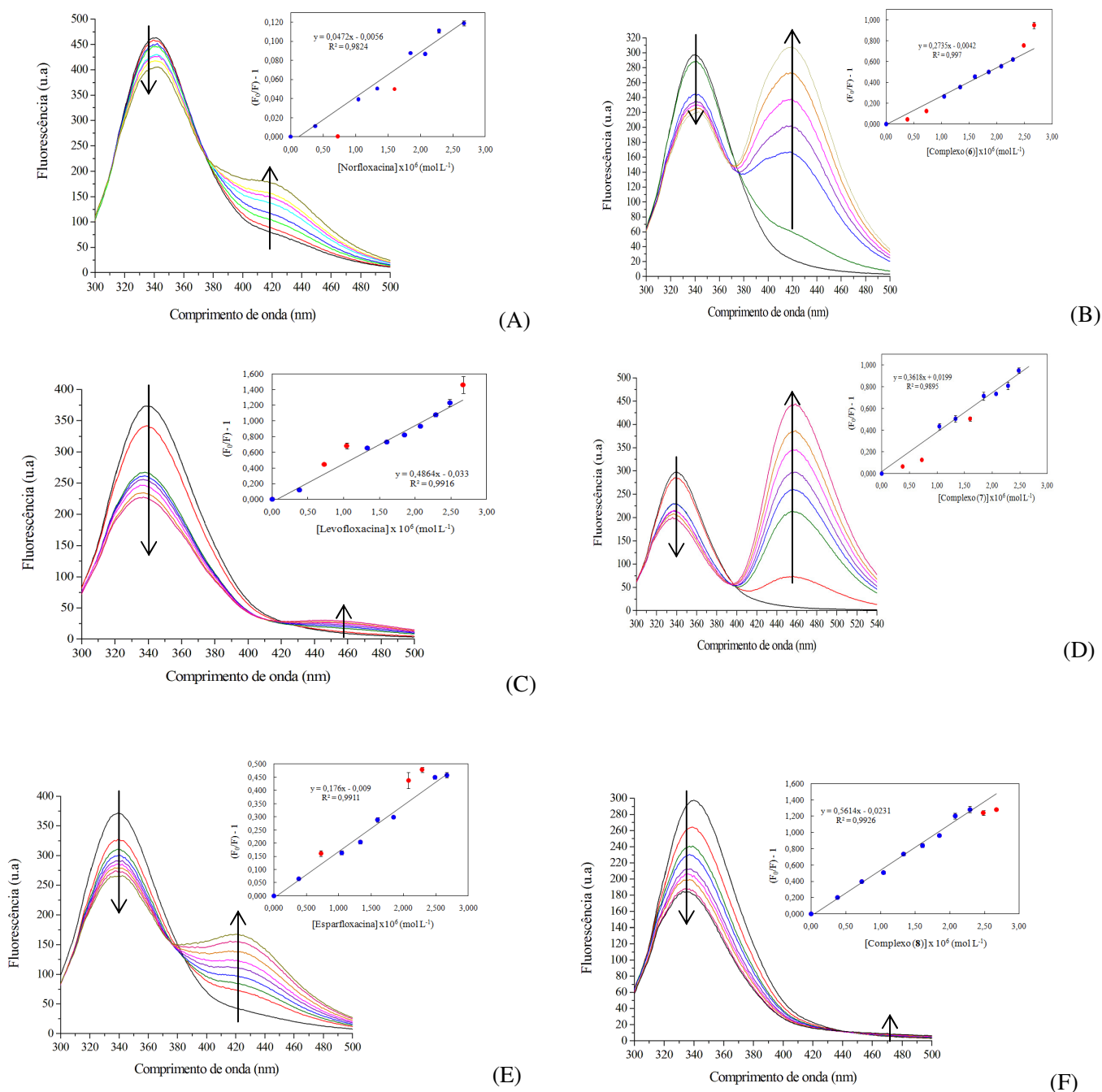


Figura 4.3 - Espectros de emissão da BSA na presença de concentrações crescentes de (A) NOR, (B) Complexo (1), (C) LEVO, (D) Complexo (2), (E) SPAR, (F) Complexo (3). $\lambda_{excitação} = 285$ nm. Retas inseridas: plotagem de $[(F_0-F)^{-1}]$ versus [composto]. $\{[BSA] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $[Composto] = 8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}\}$. Os pontos em vermelho não foram levados em consideração nos cálculos das constantes. As setas mostram as mudanças na emissão da BSA após a adição dos compostos.

A aplicação da equação de *Stern-Volmer* (Equação 16, pág. 16) permite a obtenção de uma reta, sendo que a constante (K_{SV}) é o coeficiente angular da reta e representa a constante de associação fármaco-BSA. Para os ligantes NOR, LEVO e SPAR, os valores de K_{SV} encontrados foram de $4,7 \times 10^4$, $4,9 \times 10^5$ e $1,8 \times 10^5$ L mol⁻¹, respectivamente. Destas fluorquinolonas, a LEVO é que possui maior interação com a proteína.

Estudos de interação da BSA com as fluorquinolonas NOR e SPAR já foram relatados. KAMAT (2005), SKYRIANOU e outros colaboradores (2009) estudaram a interação entre o BSA e estes ligantes e obtiveram constantes (K_{SV}) da ordem de 10^4 e 10^5 , respectivamente. Portanto, os valores das constantes de interação BSA-fármaco, obtidos no presente trabalho, são coerentes quando comparados a outros encontrados na literatura para essa mesma classe de compostos.

Embora não tenham sido descritos, na literatura, estudos de interação da BSA com a LEVO, foram encontrados resultados para seu isômero óptico, a ofloxacina (OFL). NI e colaboradores (2010) obtiveram uma constante de associação BSA-OFL de $4,3 \times 10^5$ L mol⁻¹, valor muito próximo do obtido no presente trabalho.

Para os complexos [AuCl₂(NOR)]Cl.2H₂O (**1**), [AuCl₂(LEVO)]Cl.2H₂O (**2**), [AuCl₂(SPAR)]Cl.2H₂O (**3**), os valores de K_{SV} encontrados foram de $2,7 \times 10^5$, $2,7 \times 10^5$ e $5,7 \times 10^5$ L mol⁻¹, respectivamente. Esses valores indicam que os complexos possuem uma boa interação com a BSA. A coordenação do Au(III) a NOR e a SPAR aumentou a constante de associação com a proteína em 6 e 3 vezes, respectivamente. As constantes (K_{SV}) obtidas encontram-se na Tabela 4.6 (pág. 48).

Tabela 4.6 - Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), constante de supressão dinâmica (k_q) e coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) para a interação das fluorquinolonas e seus complexos de Au(III) com a albumina bovina.

Sistema	K_{SV} (L mol ⁻¹)	k_q (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	R^2
BSA/ NOR	4,7 x 10 ⁴	~10 ¹²	0,9824
BSA/[AuCl ₂ (NOR)]Cl.2H ₂ O (1)	2,7 x 10 ⁵	~10 ¹³	0,9970
BSA/ LEVO	4,9 x 10 ⁵	~10 ¹³	0,9916
BSA/[AuCl ₂ (LEVO)]Cl.2H ₂ O (2)	2,7 x 10 ⁵	~10 ¹³	0,9895
BSA/ SPAR	1,8 x 10 ⁵	~10 ¹³	0,9911
BSA/[AuCl ₂ (SPAR)]Cl.2H ₂ O (3)	5,7 x 10 ⁵	~10 ¹³	0,9926

Sabe-se que a atividade biológica dos fármacos está diretamente relacionada a sua capacidade de se ligar a proteínas, que atuam em nível citoplasmático. Considerando os resultados obtidos dos complexos estudados, observa-se que a coordenação do íon metálico Au(III) pode facilitar o mecanismo de ação dos ligantes livres, exceto para a LEVO com o Au(III). Porém, mesmo neste caso o complexo possui afinidade a BSA da mesma ordem de grandeza (10⁵) que o ligante.

O mecanismo de ligação entre BSA e fármaco pode ser identificado caso haja a formação de uma curva ao se utilizar a equação de *Stern-Volmer*. Normalmente, a presença de um mecanismo estático, ou seja, a formação de um complexo no estado excitado produz uma curvatura para cima. No entanto, uma reta indica a ocorrência de um único sitio de ligação na proximidade dos triptofanos ou a existência de uma interação simples entre a albumina e o composto em estudo. Um mecanismo estático não requer difusão através do meio, a ligação é mais eficiente e a intensidade de fluorescência observada é mais baixa (SKYRIANOU *et al.*, 2009).

Considerando que o tempo de vida (τ_0) de um triptofano na albumina é de, aproximadamente, 10⁻⁸ s, a constante de supressão dinâmica (k_q , L mol⁻¹ s⁻¹) pode ser calculada utilizando a equação de *Stern-Volmer* (SKYRIANOU *et al.*, 2009). Na Tabela 4.6 foram incluídas as constantes de supressão dinâmica da NOR, LEVO, SPAR e seus complexos de Au(III) com a BSA, em pH 7,4.

k_q depende da probabilidade de colisão entre a proteína e os compostos em estudo e é medido a exposição do triptofano ao fármaco. O limite máximo de k_q esperado para um processo bimolecular controlado por difusão é $10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A magnitude no estudo dos complexos ($10^{12} - 10^{13} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) indica que o processo não ocorre inteiramente por difusão e que possui uma interação mais específica albumina-fármaco (SKYRIANOU *et al.*, 2009).

4.6 Estudos de interação dos complexos de Au(III) de algumas fluorquinolonas com o DNA

A estabilidade da conformação do ácido desoxirribonucléico (DNA) pode ser afetada por complexos de metais de transição, através de diversos mecanismos de ação. Pode haver a formação de ligações covalentes com as bases púricas ou pirimidínicas, quando um ligante lábil é substituído pelo nitrogênio de uma das bases do DNA (o nitrogênio N₇ de uma guanina, por exemplo - Figura 4.4). A intercalação entre dois pares de bases adjacentes e a ligação à superfície da dupla hélice (por interação eletrostática entre os grupos fosfato e cadeias poliamina) podem conduzir a uma alteração na conformação do DNA, tornando-o disfuncional. A citotoxicidade resultante pode ser altamente benéfica, quando estes complexos são transportados para o núcleo de células tumorais.

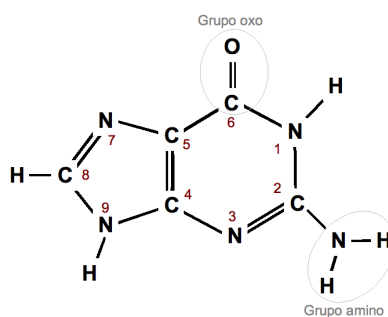


Figura 4.4 – Estrutura da guanina.

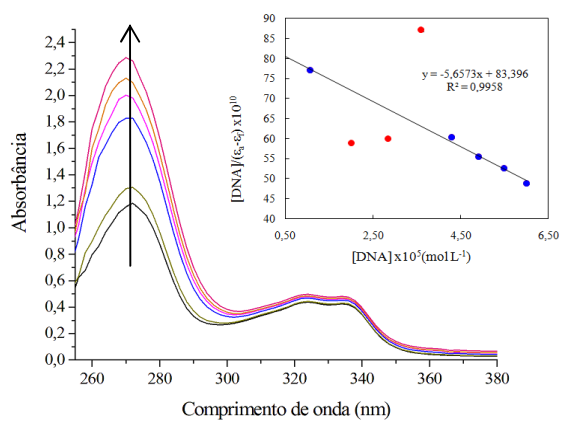
Neste trabalho, foram feitos estudos de interação entre os complexos de Au(III) de norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) e esparfloxacin (SPAR) e o DNA com o objetivo de verificar a existência de interações e tentar compreender a natureza e a intensidade das mesmas. A interação da NOR, LEVO e SPAR livres também foi estudada para efeito de comparação.

O estudo da interação das fluorquinolonas e de seus complexos de Au(III) com o DNA é importante visto que os possíveis alvos de ação dos fármacos anti-*T.cruzi* podem incluir o DNA mitocondrial ou DNA nuclear do parasito. Além disso, o DNA é o principal alvo no tratamento anticâncer.

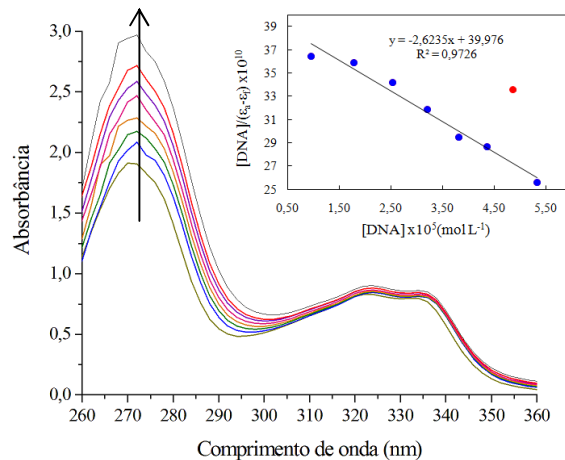
Para estudar a natureza da ligação do DNA aos complexos metálicos, foram feitas titulações de alíquotas de CT DNA (DNA de timo de vitelo) na presença de solução dos complexos, em pH 7,4, acompanhadas por espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-Vis). Mudanças observadas nos espectros de UV-vis, tais como, aumento ou diminuição da absorvidade molar, podem fornecer evidências de interações e da natureza das mesmas. Em geral, o hipercromismo e/ou hipsocromismo indica o rompimento da estrutura secundária do DNA. O hipocromismo e/ou batocromismo sugere que a ligação do complexo ao DNA pode ser eletrostática ou via intercalação, o que estabiliza a dupla hélice do DNA (PARAGINSKI, 2007; FIRDAUS *et al.*, 2008). As constantes de interação CT DNA/complexo (K_b) foram calculadas utilizando-se a Equação 27 (pág. 33).

Os espectros da NOR, LEVO e SPAR obtidos, durante a titulação com CT DNA, são mostradas na Figura 4.5 (pág. 51). O espectro inicial, em preto, refere-se ao fármaco livre, na ausência de CT DNA. Na região do UV-Vis, as bandas de absorção observadas podem ser atribuídas as transições internas das fluorquinolonas (SKYRIANOU *et al.*, 2010).

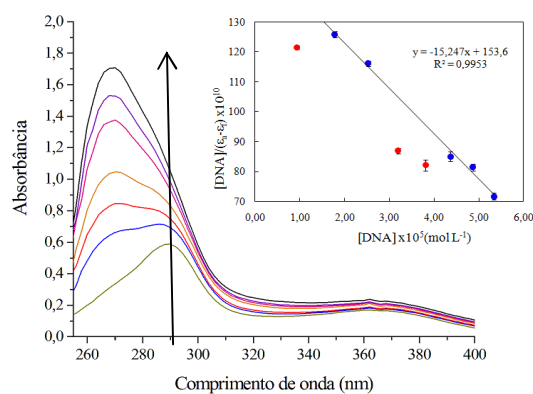
A intensidade das bandas dos complexos aumenta, resultando em hipercromismo, após a adição de alíquotas sucessivas de CT DNA (0,125 mL), sugerindo que a interação entre o DNA e estes compostos leva a quebra da estrutura secundária do DNA.



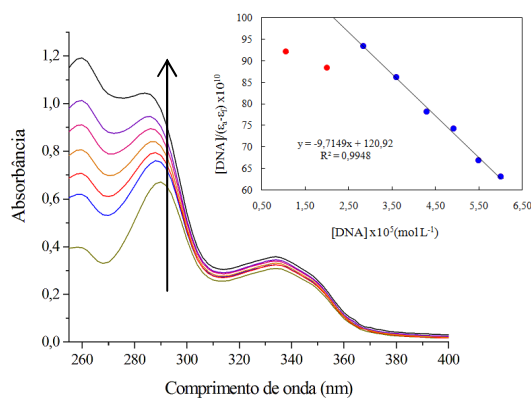
(A)



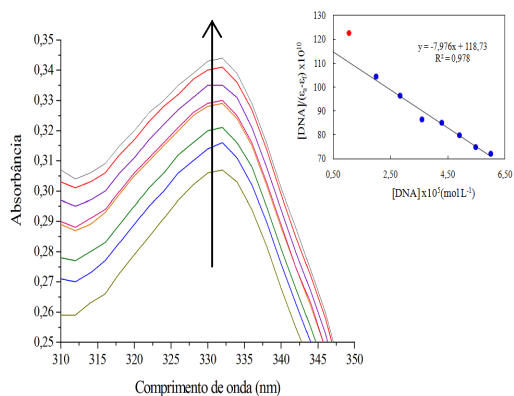
(B)



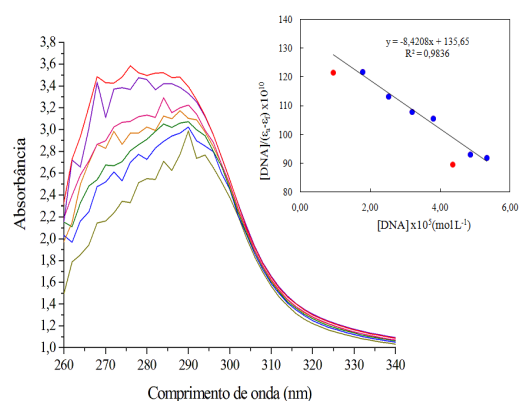
(C)



(D)



(E)



(F)

Figura 4.5 - Espectros de absorção de (A) NOR, (B) Complexo (1), (C) LEVO, (D) Complexo (2), (E) SPAR, (F) Complexo (3) na ausência e na presença de concentrações crescentes de DNA (período de incubação = 30 minutos). Retra inserida: plotagem de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA] L^{-1}$. $\{[DNA] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol}$ e $[Composto] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, à $25^\circ C$. Os pontos em vermelho não foram levados em consideração nos cálculos das constantes. As setas mostram as mudanças na absorção do composto após a adição de CT DNA.

A aplicação da equação de *Scatchard* (Equação 27, pág. 33) permite a obtenção de uma reta, sendo que a constante de ligação DNA-fármaco é obtida através da razão entre o coeficiente angular e o coeficiente linear dessa reta. A constante de ligação (K_b) foi obtida pelo monitoramento das mudanças ocorridas na absorbância em 334, 332 e 362 nm para a NOR, LEVO e SPAR, respectivamente.

Observa-se que todas as fluorquinolonas estudadas possuem constantes de associação com o DNA da ordem 10^3 L mol^{-1} . Dentre as fluorquinolonas, a SPAR é que possui a maior interação com o DNA. No espectro de UV da SPAR, observou-se um elevado hipercromismo (29%), sugerindo uma forte ligação com o CT DNA (SKYRIANOU *et al.*, 2010). Com a LEVO, além do hipercromismo, observou-se também um deslocamento hipsocrômico.

Para os complexos (1), (2) e (3), as constantes de ligação (K_b) foram obtidas pelo monitoramento das mudanças ocorridas na absorbância em 324, 332 e 350 nm, respectivamente. Na Tabela 4.7 são listados os valores das constantes de associação dos complexos de Au(III) com o DNA, em pH 7,4. Observa-se que todos os complexos de Au(III) possuem constantes de associação com o DNA extremamente semelhantes (da ordem 10^3 L mol^{-1}). Além disso, todos os complexos de Au(III) possuíram pequenas porcentagens de hipercromismo, o que indica moderada estabilização da estrutura do DNA (SKYRIANOU *et al.*, 2010).

Tabela 4.7 - Constantes de ligação (K_b), coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) e porcentagem de hipercromismo para a interação dos complexos de Au(III) e seus ligantes com o DNA.

Sistema	$K_b (\text{L mol}^{-1})$	R^2	Hipercromismo (%)
DNA/NOR	$6,7 \times 10^3$	0,9958	12
DNA/[AuCl ₂ (NOR)]Cl.2H ₂ O (1)	$6,3 \times 10^3$	0,9726	8
DNA/LEVO	$8,1 \times 10^3$	0,9953	15
DNA/[AuCl ₂ (LEVO)]Cl.2H ₂ O (2)	$6,9 \times 10^3$	0,9780	11
DNA/SPAR	$9,8 \times 10^3$	0,9948	29
DNA/[AuCl ₂ (SPAR)]Cl.2H ₂ O (3)	$6,5 \times 10^3$	0,9836	5

4.7 Toxicidade dos complexos de Au(III) frente as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*

Nesse trabalho, a atividade tripanocida das fluorquinolonas livres (NOR, LEVO, SPAR), dos complexos de Au(III), do HAuCl_4 e da droga de referência para doença de Chagas, o benzonidazol, foi testada sob as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*, *in vitro*. Para os compostos selecionados foram feitos também testes sob as formas amastigotas do parasito. Foi utilizada como parâmetro de análise a concentração inibitória mínima (IC_{50}) para os compostos em estudo, ou seja, os valores mínimos de concentração capaz de inibir em 50% o crescimento do *T. cruzi*. A Tabela 4.8 lista os valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) obtidos para os compostos sob as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares do *T. cruzi*. Os valores correspondem a média de três replicatas \pm desvio padrão.

Tabela 4.8 - Valores de IC_{50} dos complexos metálicos de Au(III), ligantes e ácido cloroáurico sob formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*.

Composto	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	Formas Tripomastigotas	Formas Intracelulares
Norfloxacina (NOR)	127 \pm 30	>250
Levofloxacina (LEVO)	211 \pm 39	>250
Esparfloxacina (SPAR)	114 \pm 20	>250
HAuCl_4	41 \pm 3	>250
$[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	73 \pm 6	>250
$[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2)	50 \pm 18	>250
$[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3)	135 \pm 29	>250
Benzonidazol	13 \pm 2	3 \pm 2

Os testes antiparasitários com as formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi* mostram que nenhum dos compostos em estudo possui atividade significativa, quando comparadas com a droga de referência o benzonidazol ($\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{mol L}^{-1}$).

As fluorquinolonas NOR, LEVO e SPAR não mostraram atividade significativa sob as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, exibindo valores de IC_{50} de 127, 211 e 114 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

A associação do Au(III) a NOR e a LEVO levou a um aumento da atividade antichagásica, exibindo valores de IC₅₀ de 73 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Porém, observa-se que este aumento deve-se ao sal de Au(III), que possui valor de IC₅₀ de 41 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A coordenação da SPAR ao Au(III) diminui a atividade da fluorquinolona e do ácido cloroáurico, correspondendo a valores de IC₅₀ de 135 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.8 Toxicidade dos complexos de Au(III) frente as linhagens tumorais A20, B16-F10, K562, MCR-5 e L919

Nesse trabalho, a atividade citotóxica das fluorquinolonas livres (NOR, LEVO, SPAR) e dos complexos de Au(III) foi testada com as linhagens tumorais estabelecidas A20 (Linfoma murino), B16-F10 (Melanoma murino), K562 (Leucemia mielóide humana) e como células normais (controle) utilizou-se a linhagem estabelecida MCR-5 (fibroblasto de pulmão humano) e L919 (Fibroblasto de pulmão murino).

A Tabela 4.9 lista os valores de IC₅₀ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) obtidos para os complexos de Au(III) frente as linhagens tumorais A20, B16-F10 e K562 e as linhagens sadias MCR-5 e L919.

Tabela 4.9 - Concentração necessária para inibir 50% da atividade citotóxica (IC₅₀) dos complexos de Au(III) frente a linhagens tumorais e sadia.

Composto	IC ₅₀ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				
	MRC-5	L919	B16-F10	A20	K562
[AuCl ₂ (NOR)]Cl.2H ₂ O (1)	65,1	79,2	26,6	24,9	55,0
[AuCl ₂ (LEVO)]Cl.2H ₂ O (2)	52,8	181,0	28,8	48,9	50,0
[AuCl ₂ (SPAR)]Cl.2H ₂ O (3)	104,0	65,1	45,0	48,3	61,2

Os resultados dos testes citotóxicos com as linhagens tumorais mostraram que nenhum dos ligantes livres apresentou atividade significativa (>200 $\mu\text{mol L}^{-1}$), sendo que se observa que a associação do Au(III) às fluorquinolonas aumentam significativamente a atividade.

Para as linhagens sadias L919 e MRC-5, o complexo (1) apresentou valores de IC₅₀ de 79,2 e 65,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Quando o complexo foi testado com as linhagens B16-F10 e A20, observou-se que foram necessárias concentrações inibitórias menores que a metade,

quando comparadas as linhagens sadias (IC_{50} de 26,6 e 24,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Para a linhagem K562, a IC_{50} foi da mesma ordem de grandeza das linhagens controle (55 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

O complexo (2) apresentou valores de IC_{50} de 79,2 e 65,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, para as linhagens sadias L919 e MRC-5. Para a linhagem B16-F10, a concentração inibitória (IC_{50}) foi de 28,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, ou seja, quase duas vezes menor que a da MRC-5. Para as linhagens K562 e A20, as concentrações inibitórias foram de 50 e 48,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores não são estatisticamente significativos, quando comparados com a linhagem sadia MRC-5. No entanto, para a linhagem L919, os valores de IC_{50} são três vezes menores que o da linhagem sadia.

Para as linhagens sadias L919 e MRC-5, o complexo (3) apresentou valores de IC_{50} de 65,1 e 104 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Já para as linhagens tumorais, o composto apresentou uma maior atividade inibitória frente às linhagens B16-F10 e A20, com concentrações inibitórias de 45 e 48,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Ciclo celular

Dos três complexos analisados no teste de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), o $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3) foi selecionado para realizar outros testes que caracterizam a ação do mecanismo de morte e ciclo celular do composto. No ensaio de ciclo celular da linhagem B16-F10, em 48 horas de tratamento, observou-se que, em geral, o composto impediu que a célula entrasse na fase de síntese e prosseguisse o ciclo celular em todas as concentrações testadas. Isto significa que houve a paralisação da célula na fase G1, onde se observou o maior percentual de células em G1 de 6%, 11% e 8% nas concentrações de 30, 45 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, em relação ao controle. Dessa forma, observa-se que o fármaco impede a proliferação das células no ciclo celular. Na concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, observou-se que menos de 10% das células foram encontradas em fase de síntese e, a medida, em que se aumenta a concentração do fármaco, menor a porcentagem de células em síntese. Pode-se notar que na concentração de 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ houve um aumento da fase G1 em comparação com o controle. Os dados do ciclo celular da linhagem B16-F10 podem ser observados na Figura 4.6 (pág. 56).

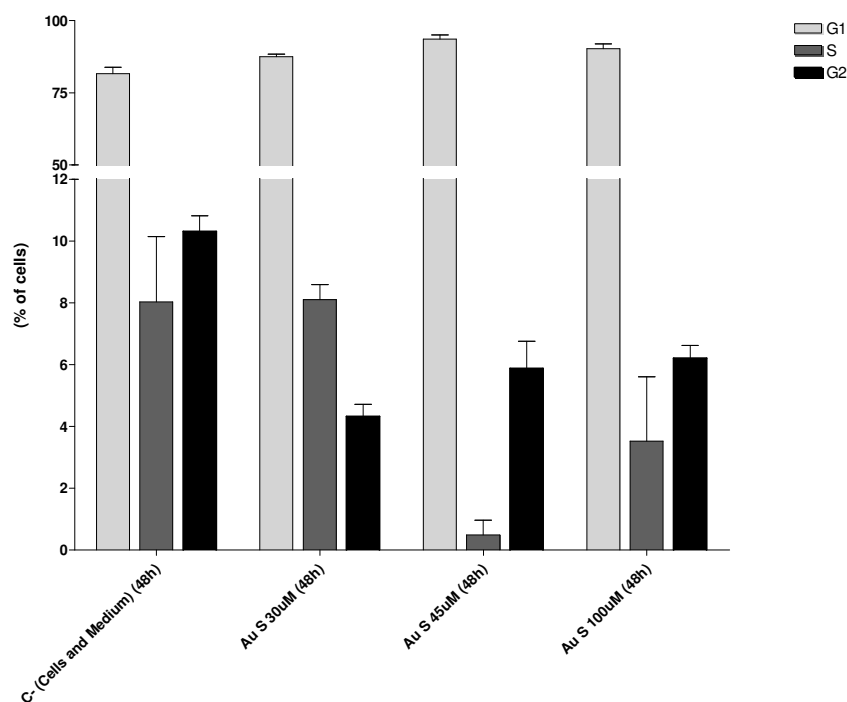


Figura 4.6 - Análise da cinética celular da célula B16-F10 frente ao tratamento com o complexo $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}.2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) nas concentrações de 30, 45 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Eletroforese em gel de agarose

Após o tratamento com o complexo (**3**) frente à linhagem B16-F10, pode-se notar que não houve degradação do DNA na eletroforese em gel de agarose, não demonstrando o padrão de degradação decorrente de apoptose (Figura 4.7). Observou-se a redução da banda de DNA nas concentrações de 30, 45 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ quando comparado com o controle negativo.

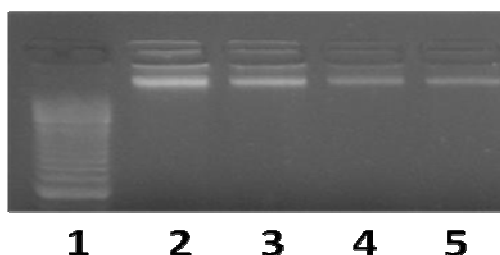


Figura 4.7 - Eletroforese em gel de agarose de DNA de células B16-F10 tratadas com o complexo $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}.2\text{H}_2\text{O}$ (**3**), em comparação ao controle negativo. 2×10^6 células foram cultivadas em diferentes concentrações: (1) Lader, (2) Controle negativo, (3) $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, (4) $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (5) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Vários antitumorais utilizados clinicamente são compostos com mecanismos de ação não específicos e relacionados ao DNA. Os agentes alquilantes, nitrossuréias, complexos tipo cisplatina e outros agem diretamente no DNA. Porém, outros mecanismos são possíveis como ligantes que interagem na fenda menor do DNA, compostos que alteram as propriedades de pareamento das bases, que inibem a DNA-girase e a síntese de nucleotídeos (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos mostram que os complexos de Au(III) estudados têm atividade citotóxica superior as fluorquinolonas livres frente as linhagens tumorais A20, B16-F10 e K562 e as linhagens sadias MCR-5 e L919. Portanto, o estudo dos mecanismos de ação dos complexos obtidos é essencial para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais.

5. Complexos de Zn(II) de algumas fluorquinolonas: síntese, caracterização, testes de atividade biológica, determinação das constantes de ionização e estudos de interação com alvos biológicos

A reação de cloreto de zinco(II) ($ZnCl_2$) com as fluorquinolonas norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFLO) e esparfloxacin (SPAR) levou à obtenção de três complexos inéditos. A reação do precursor $[ZnCl_2(phen)]$ ($phen = 1,10$ -fenantrolina) com a NOR levou a obtenção de mais um novo complexo.

As fluorquinolonas possuem um grupo ácido (carboxila) e um grupo básico (amino). Este fato influencia o comportamento farmacológico desses compostos, já que a presença de grupos carregados é necessária para a atividade biológica. Por exemplo, a diminuição da atividade em meio ácido, geralmente, é atribuída à baixa penetração da espécie catiônica na membrana celular (SOUSA, 2007 e LUIZ, 2009).

As propriedades físico-químicas das fluorquinolonas influenciam as propriedades ácido/base, a capacidade para complexar íons metálicos, o comportamento *in vivo/in vitro* e o caráter hidro/lipofílico destes compostos. Em especial, pode ser citado a constante de ionização (pK_a), fundamental para compreender a atividade biológica das drogas em estudo (LUIZ, 2009). Nesse capítulo, calculou-se as constantes de ionização (pK_a) para a NOR e seus complexos de Zn(II), utilizando espectroscopia de fluorescência, assim como foram descritas as mudanças espectrais ocorridas em função do pH.

Posteriormente, avaliou-se a interação dos complexos de Zn(II) com a albumina bovina (BSA) e o ácido desoxirribonucléico (DNA) com o intuito de compreender as propriedades estruturais e farmacológicas destes compostos. Além disso, estudou-se as atividades antibacteriana, antifúngica e antichagásica dos complexos de Zn(II) e seus ligantes, assim como do $ZnCl_2$.

5.1 Dados de microanálise e medidas de condutividade

A Tabela 5.1 apresenta as faixas de temperatura de decomposição, os dados de microanálise e de condutividade para os complexos de Zn(II), assim como para o precursor $[ZnCl_2(phen)]$.

Tabela 5.1 - Dados de microanálise (valores calculados entre parênteses), faixa de temperatura decomposição (°C) e condutividade (Λ , $\mu\text{S cm}^{-1}$) para os compostos de Zn(II).

Composto	Faixa de decomposição	%C	%H	%N	Λ^*
[ZnCl ₂ (NOR)].H ₂ O (4)	>270°C	40,0 (40,4)	4,4 (4,7)	8,4 (8,8)	10
[ZnCl ₂ (OFLO)] (5)	>270°C	42,7 (43,4)	3,9 (4,1)	8,3 (8,4)	12
[ZnCl ₂ (SPAR)] (6)	261-264	43,7 (43,0)	5,0 (4,6)	11,4 (10,6)	25
[ZnCl ₂ (phen)] (7)	>270°C	45,4 (45,5)	2,2 (2,6)	9,4 (8,9)	21
[ZnCl ₂ (NOR)(phen)].2H ₂ O (8)	262-265	49,5 (50,1)	3,7 (4,5)	10,3 (10,4)	23

*Condutividade ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em *N,N*-dimetilformamida (DMF). Nos valores de condutividade tabelados já foi corrigida a condutividade do solvente.

Os dados de microanálise sugerem que, nos complexos de Zn(II) com NOR, OFLO e SPAR, a relação metal:ligante é 1:1 e que há dois átomos de cloro coordenados ao átomo de Zn(II). No complexo com a NOR, há uma molécula de água de hidratação. Para o complexo de Zn(II)-NOR com 1,10-fenantrolina (phen), os dados de microanálise sugerem que a relação metal:NOR:phen também é de 1:1:1 e que há duas moléculas de água de hidratação. A presença de moléculas de água de hidratação foi confirmada pelos resultados das curvas TG/DTG dos complexos (pág. 63).

Para as medidas de condutividade, os complexos de Zn(II) foram dissolvidos em *N,N*-dimetilformamida (DMF). De acordo com GEARY (1971), os resultados das medidas indicam que os complexos são não-eletrólitos. O pesquisador fez vários estudos com o objetivo de analisar a capacidade coordenante dos solventes orgânicos e o deslocamento de ligantes da esfera interna de coordenação. GEARY (1971) propôs que, em DMF, um eletrólito 1:1 possui uma condutividade de 65-90 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Contudo, é importante destacar que para a solubilização completa dos complexos, foi necessário deixar as soluções, sob agitação, por 10 minutos, no banho de ultrassom. Este procedimento pode ter contribuído para a substituição dos átomos de cloro pelo DMF na esfera de coordenação do Zn(II), aumentando o valor de condutividade.

Considerando o exposto, pode-se sugerir que os complexos de Zn(II) são do tipo [ZnCl₂(L)], onde L representa os ligantes norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFLO) ou

esparfloxacina (SPAR), coordenados na forma neutra ou zwitteriônica ao metal. Para o complexo que contém phen, sugere-se que a melhor estrutura é $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

5.2 Espectroscopia na região do infravermelho

O modo vibracional, atribuído ao estiramento da carbonila cetônica $\nu(\text{C}=\text{O})$, é observado nas fluorquinolonas entre 1620 e 1641 cm^{-1} . Quando este grupo está coordenado ao metal, desloca-se significativamente para frequências menores. Nos espectros de IV dos complexos de Zn(II), essa banda deslocou-se para a região entre 1570 e 1591 cm^{-1} , sugerindo a coordenação da carbonila cetônica aos íons metálicos (DOROFEEV, 2004).

Nos espectros de infravermelho (IV) das fluorquinolonas livres, as bandas atribuídas ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ da carboxila são observadas na região entre 1706 e 1730 cm^{-1} . Essas bandas estão ausentes nos espectros dos complexos de Zn(II). Porém, há duas novas bandas que surgiram após a ionização do grupo carboxila. A banda próxima de 1630 cm^{-1} no espectro dos complexos foi atribuída ao estiramento assimétrico do grupo carboxilato coordenado ao metal, $\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-)$, e a banda em, aproximadamente, 1400 cm^{-1} , ao estiramento simétrico do grupo carboxilato, $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ (DOROFEEV, 2004; GAO *et al.*, 1995; SADEEK, 2005; BATISTA *et al.*, 2011).

A Figura 5.1 mostra, como exemplo, os espectros de absorção na região do infravermelho para o ligante OFLO e seu complexo de Zn(II).

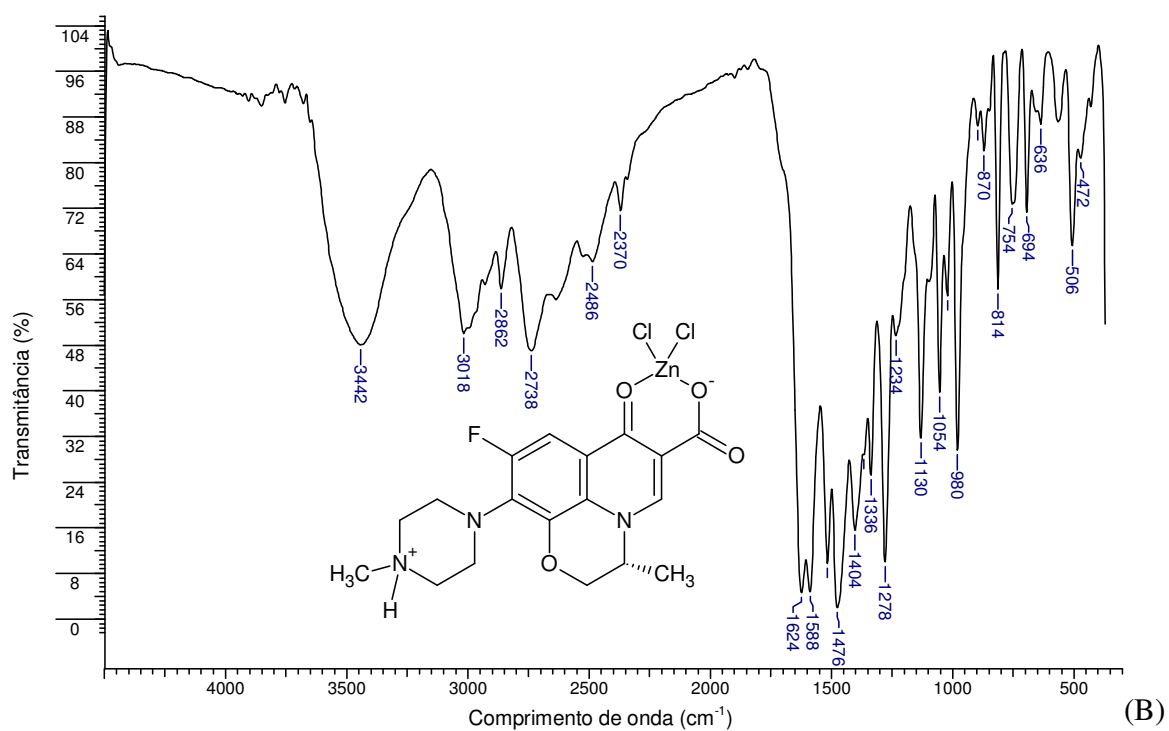
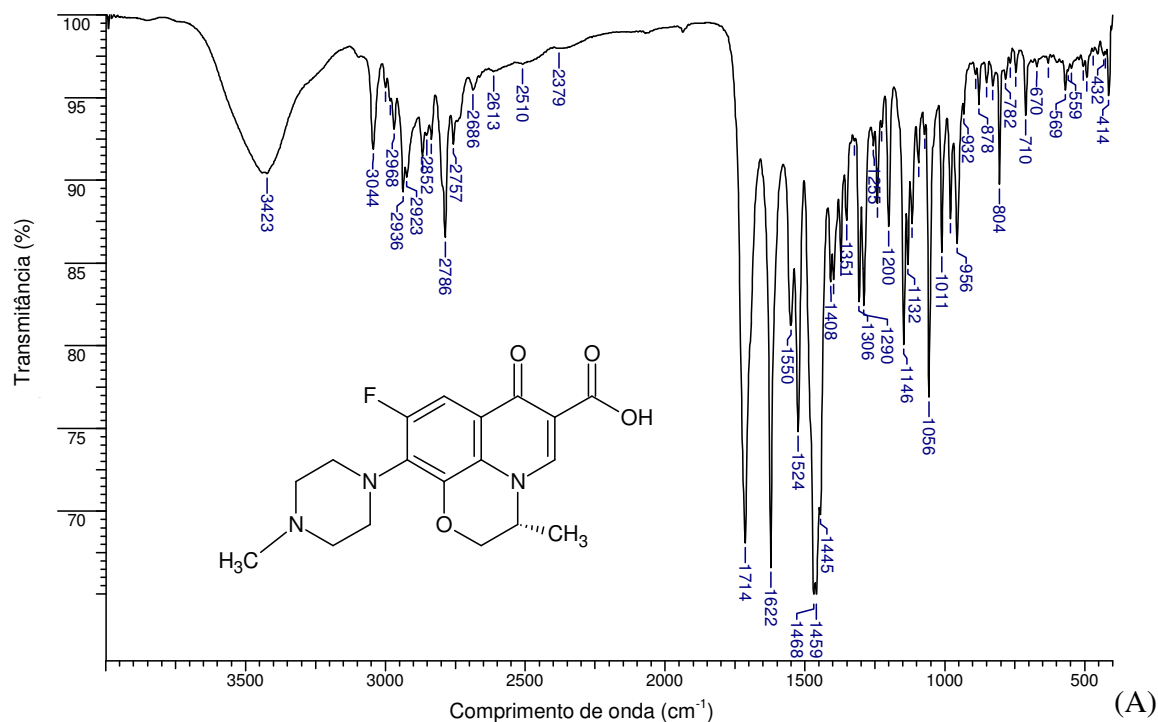


Figura 5.1 - Espectros de infravermelho da (A) OFLO e do complexo (B) [ZnCl₂(OFO)] (5) em pastilha de KBr.

A banda característica do co-ligante 1,10-fenantrolina também foi observada nos espectros dos complexos (7) e (8) em 725,6 e 728,1 cm^{-1} , respectivamente. Esta banda é atribuída às vibrações fora do plano dos átomos de hidrogênio dos anéis heterocíclicos da phen.

A Tabela 5.2 lista as atribuições das principais bandas dos espectros de infravermelho das fluorquinolonas e de seus complexos de Zn(II). Os espectros de infravermelho dos complexos e seus ligantes encontram-se em anexo (pág. 108, 110 e 111).

Tabela 5.2 - Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das fluorquinolonas e dos complexos de Zn(II).

Composto	$\nu(\text{COOH})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-)$	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$	$\Delta\nu^*$
Norfloxacin (NOR)	1730 F	1622 F	-	-	-
$[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})].\text{H}_2\text{O}$ (4)	-	1582 F	1632 F	1384 F	248
$[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})].2\text{H}_2\text{O}$ (8)	-	1580 F	1626 F	1384 F	242
Ofloxacin (OFLO)	1714 F	1622 F	-	-	-
$[\text{ZnCl}_2(\text{OFLO})]$ (5)	-	1588 F	1624 F	1404 F	220
Esparfloxacin (SPAR)	1716 m	1641 m	-	-	-
$[\text{ZnCl}_2(\text{SPAR})]$ (6)	-	1568 m	1632 m	1390 m	242

* $\Delta\nu = \nu_{\text{ass}} - \nu_{\text{s}}$; Legenda: F = forte, m = média.

O grupo carboxila pode coordenar-se aos íons metálicos de modo monodentado, bidentado ou em ponte. Para distinguir os diferentes modos de coordenação pode-se usar a frequência de separação entre os modos vibracionais simétrico e assimétrico desse grupo ($\Delta\nu = \nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$) (SADEEK, 2005). DEACON e PHILLIPS (1980) investigaram as frequências de estiramento simétrico e assimétrico de um grande número de complexos carboxilatos, com estruturas cristalográficas conhecidas, e concluíram que o modo de coordenação desse grupo pode ser distinguido da seguinte forma:

- (i) $\Delta\nu < 100 \text{ cm}^{-1}$, o grupo carboxilato está coordenado de modo bidentado;
- (ii) $\Delta\nu \sim 150 \text{ cm}^{-1}$, o grupo carboxilato está coordenado em ponte;
- (iii) $\Delta\nu > 200 \text{ cm}^{-1}$, o grupo carboxilato está coordenado de modo monodentado.

Nesse trabalho, os valores de $\Delta\nu$ observados para os complexos de Zn(II) estão entre 241 e 244 cm^{-1} , o que sugere a coordenação do grupo carboxilato na forma monodentada. Portanto, os dados dos espectros de infravermelho indicam que a NOR, OFLO e SPAR estão coordenadas aos íons Zn(II) na forma zwitteriônica (neutra) e de modo bidentado através do grupo carboxila e da carbonila cetônica (Esquema 3.4 a 3.6, pág. 25 e 26).

5.3 Análise termogravimétrica

As análises das curvas TG/DTG foram feitas entre 30 e 800 °C, em atmosfera de ar, com taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} . Nos complexos com a NOR, foi possível confirmar a presença das moléculas de água (Tabela 5.3). As curvas TG/DTG dos complexos de Zn(II) encontram-se em anexo (pág. 116).

Tabela 5.3 – Porcentagens de perda de moléculas de água de hidratação calculadas e obtidas a partir da análise das curvas TG/DTG dos complexos de Zn(II).

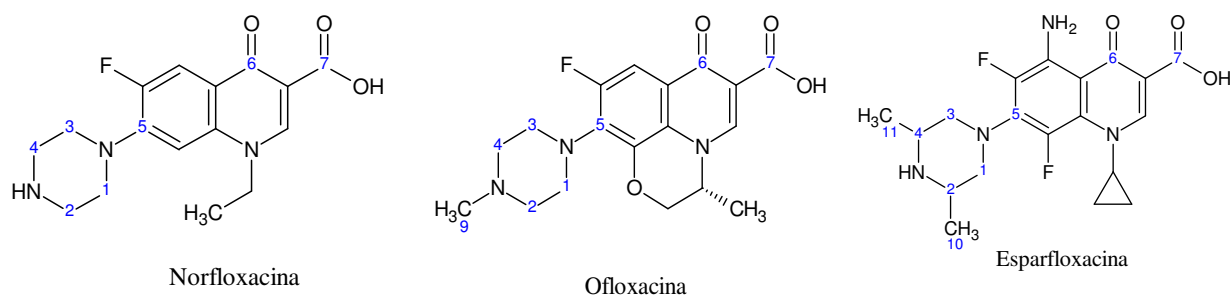
Composto	MM (g mol^{-1})	% H ₂ O (calculada)	% H ₂ O (experimental)
[ZnCl ₂ (NOR)].H ₂ O (4)	473,7	3,8	4,1
[ZnCl ₂ (NOR)(phen)].2H ₂ O (8)	671,9	5,4	6,0

5.4 Ressonância magnética nuclear

As fluorquinolonas, normalmente, coordenam-se aos íons metálicos através dos átomos de oxigênio da carbonila cetônica e do grupo carboxílico. Nesse modo de coordenação, não são observados grandes deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ¹H dos complexos em relação aos ligantes livres (VIEIRA *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 1995). Nesse trabalho, nos espectros de RMN ¹H dos complexos de Zn(II) com as fluorquinolonas, foram observados deslocamentos químicos menores que 0,2 ppm em todos os casos.

A Tabela 5.4 (pág. 64) listam as atribuições dos principais sinais de ¹³C dos espectros de RMN das fluorquinolonas NOR, OFLO, SPAR e de seus complexos de Zn(II). Os espectros obtidos encontram-se em anexo (pág. 119 a 121, 125 a 128).

Tabela 5.4 - Principais deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN de ^{13}C para as fluorquinolonas e seus complexos de Zn(II) em DMSO- d_6 , 200 MHz.



Composto	C(1),C(3)	C(2),C(4)	C(5)	C(6)	C(7)	C(9)	C(10,11)
Norfloxacina (NOR)	50,68/ 50,72	45,34	146,00	176,15	154,14	-	-
[ZnCl ₂ (NOR)].H ₂ O (4)	49,07	43,36	144,65	177,13	166,07	-	-
[ZnCl ₂ (NOR)(phen)].2H ₂ O (8)	48,84	44,22	145,32	177,11	166,09	-	-
Ofloxacina (OFLO)	49,97/ 50,04	54,74	132,12	176,20	165,96	-	-
[ZnCl ₂ (OFLO)] (5)	54,74/ 55,20	49,40	130,90	175,23	156,63	45,97	-
Esparfloxacina (SPAR)	57,31/ 57,36	50,77	136,36	180,18	166,71	-	19,42
[ZnCl ₂ (SPAR)] (6)	57,30	51,76	136,38	179,60	165,45	-	17,62

Os espectros de RMN de ^{13}C da NOR livre apresentou sinais em $\delta 176$ e $\delta 154$, que foram atribuídos aos carbonos cetônico e carboxílico, respectivamente. Os sinais dos carbonos aromáticos foram observados na região entre $\delta 100$ - $\delta 152$. Os sinais correspondentes aos carbonos do anel piperazina C2, C4 e C1, C3 foram observados em $\delta 45$ e $\delta 51$, respectivamente. Nos espectros de RMN ^{13}C dos complexos (**4**) e (**8**), os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos do anel piperazina e os carbonos aromáticos foram apenas ligeiramente alterados, sendo a mudança da ordem de 1-2 ppm. Em contraste, os sinais da carbonila e da carboxila foram observados em $\delta 177$ e $\delta 166$, com alterações da ordem de 10-12 ppm, o que sugere que o Zn(II) foi coordenado aos átomos de oxigênio dessas carbonilas. Comportamento similar foi observado para o complexo (**5**). No complexo (**6**), todos os deslocamentos químicos sofreram pequenas alterações, mas considerando as análises das outras técnicas e a semelhança com os demais

complexos, sugere-se que as carbonilas cetônica e carboxílica participam da coordenação ao Zn(II).

Normalmente, os complexos de zinco têm geometria tetraédrica ou octaédrica (DUDEV e LIM, 2000). Levando isso em consideração e soma dos outros dados obtidos, geometrias tetraédricas foram propostas para os complexos (4), (5) e (6) e geometria octaédrica para o complexo (8) (Esquema 3.4, 3.5, 3.6 e 3.8, pág. 25, 26 e 27).

5.5 Estudos de fluorescência da norfloxacinina e seus complexos de Zn(II)

Na literatura, a fluorescência do NOR tem sido relatada em função do pH (LUIZ *et al.*, 2011). Neste trabalho, foram obtidos os espectros de emissão de fluorescência da NOR e seus complexos de Zn(II) em soluções aquosas, ao longo da faixa de pH de 2 a 14 (Figura 5.2).

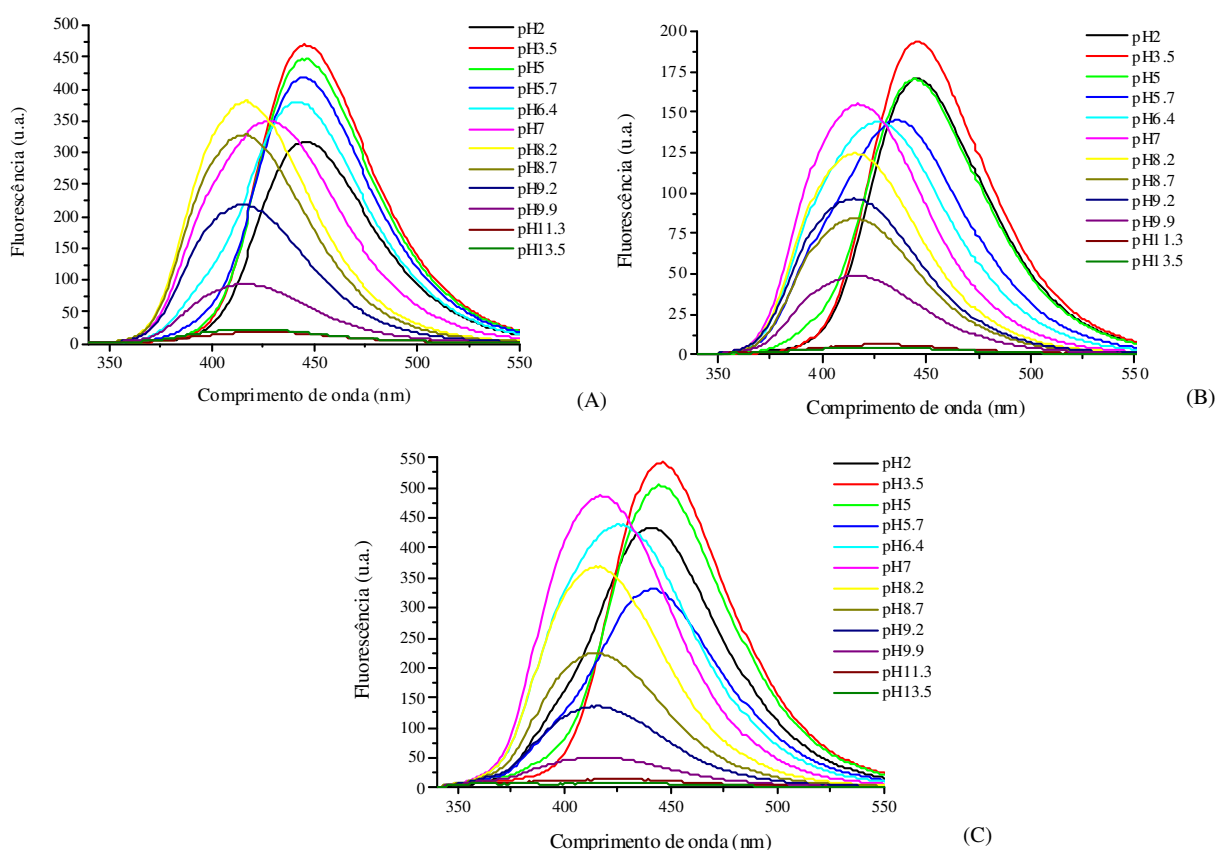


Figura 5.2 - Espectros de fluorescência da (A) NOR e dos complexos (B) $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})].\text{H}_2\text{O}$ (4), (C) $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})].2\text{H}_2\text{O}$ (8) em solução aquosa em diferentes valores de pH. $\{[\text{NOR}] = 8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}, \lambda_{\text{excitação}} = 320 \text{ nm}\}$.

Pode-se observar que em $\text{pH} = 13,5$, a NOR apresenta uma fluorescência quase nula, indicando que para valores altos de pH tem-se uma espécie molecular não fluorescente. À medida que o pH diminui, a fluorescência aumenta, tendo sua intensidade máxima em $\text{pH} = 3,5$ com o pico em 445 nm. Na faixa de pH entre 3,5 - 8,2, há duas transições entre espécies fluorescentes. Observa-se um deslocamento para o vermelho até 446 nm, com a diminuição do pH e um aumento de intensidade. A primeira transição entre duas espécies ocorre entre o pH 3,5 e 7,0 e a segunda transição ocorre entre os pH 6,4 e 8,2 (Figura 1.4, pág. 5).

Os espectros de emissão dos complexos de Zn(II) são semelhantes ao longo da faixa de pH investigado. Em $\text{pH} = 13,5$, os complexos apresentam uma fluorescência quase nula e à medida que o pH diminui, a fluorescência aumenta, tendo sua intensidade máxima em $\text{pH} = 3,5$.

Para os complexos (4) e (8), na faixa de pH entre 3,5 e 7,0, há duas transições entre espécies fluorescentes. Observa-se um deslocamento para o vermelho até 446 nm e um aumento de intensidade com a diminuição do pH . A primeira transição ocorre entre o pH 3,5 e 6,4 e a segunda transição ocorre entre 5,7 e 7,0.

Os gráficos das intensidades de fluorescência das NOR e seus complexos a 415 nm como uma função do pH são mostrados na Figura 5.3. Este comprimento de onda corresponde à intensidade máxima de fluorescência observada a pH 7.

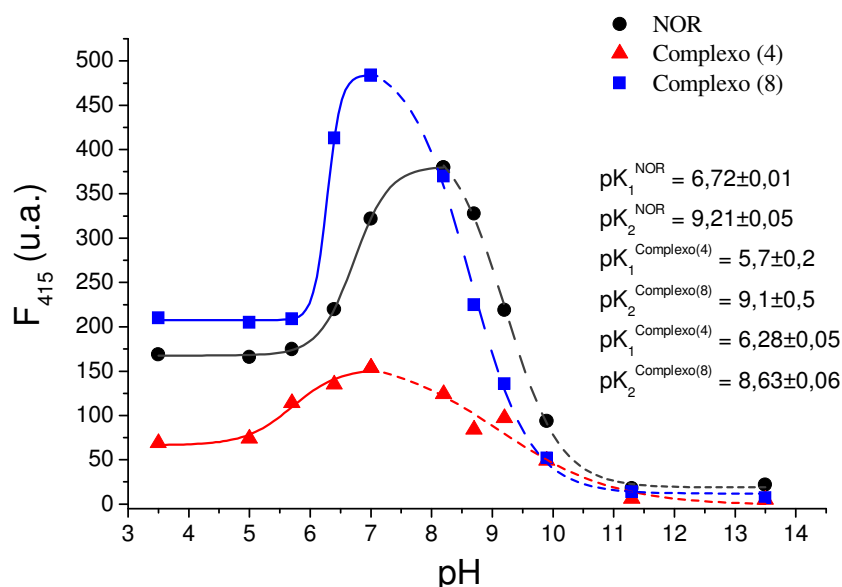


Figura 5.3 - Curvas de transição entre as espécies zwitteriônica - catiônica (pK_1) e zwitteriônica - aniônica (pK_2) da NOR e seus complexos de zinco, ao longo da faixa de pH de 3 a 14.

Para determinar o valor de pK_a (Figura 5.3), os dados foram ajustados com a Equação 24 (pág. 18). Os valores de pK_a obtidos estão resumidos na Tabela 5.5. Os valores obtidos do ácido carboxílico foram 6,72 para a NOR, 5,7 para o complexo $[ZnCl_2(NOR)].H_2O$ (**4**) e 6,28 para $[ZnCl_2(NOR)(phen)].2H_2O$ (**8**). Estes pK_a s se referem à transição na faixa alcalina, da espécie zwitteriônica (em meio neutro) para a espécie catiônica (em meio ácido). Já para o anel piperazina, o valores de pK_a foram 9,21 para a NOR, 9,1 para o complexo $[ZnCl_2(NOR)].H_2O$ (**4**) e 8,63 para $[ZnCl_2(NOR)(phen)].2H_2O$ (**8**). Estes se referem à transição na faixa alcalina, da espécie zwitteriônica (em meio neutro) para a espécie aniônica (em meio básico).

Tabela 5.5 - Constantes de ionização para a norfloxacin e seus complexos de Zn(II).

Composto	pK_1	pK_2
Norfloxacin (NOR)	$6,72 \pm 0,01$	$9,21 \pm 0,05$
$[ZnCl_2(NOR)].H_2O$ (4)	$5,7 \pm 0,2$	$9,1 \pm 0,5$
$[ZnCl_2(NOR)(phen)].2H_2O$ (8)	$6,28 \pm 0,05$	$8,63 \pm 0,06$

5.6 Estudos de interação dos complexos de Zn(II) de norfloxacin com a albumina bovina

Como já descrito, a BSA atua sobre o transporte de íons metálicos e fármacos no corpo humano. A BSA é a proteína mais extensivamente estudada no soro e possui dois resíduos de triptofano, Trp-134 e Trp-212, localizado nos IB sub-domínio e os sub-domínios IIA, respectivamente (KAMAT, 2005; DHAR *et al.*, 2005).

Nesse trabalho, descrevemos os estudos de interação entre os complexos de Zn(II) de norfloxacin (NOR) com a BSA para verificar a existência de interações e tentar compreender a natureza e a intensidade das mesmas.

A solução de BSA exibiu uma forte emissão de fluorescência em 338 nm, devido aos resíduos de triptofano (excitada a 285 nm). A Figura 5.4 mostra os espectros de fluorescência de BSA na presença de quantidades crescentes dos complexos de Zn(II).

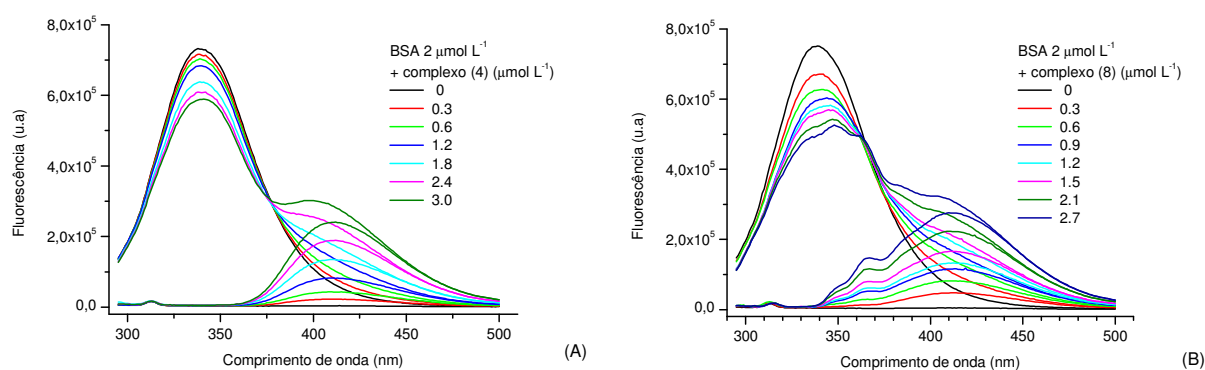


Figura 5.4 – Espectros de fluorescência de BSA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de quantidades crescentes de (A) $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})].\text{H}_2\text{O}$ (**4**) e (B) $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})].2\text{H}_2\text{O}$ (**8**) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. $[\text{Composto}] = 8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7.4.

A adição dos complexos resultou em uma supressão de fluorescência significativa em 338 nm e o aparecimento de um pico de emissão em comprimentos de onda maiores. Para avaliar se o desenvolvimento do pico de emissão dos complexos ocorre devido a excitação direta ou a transferência de energia ressonante (RET), os espectros de fluorescência dos complexos foram obtidos sob as mesmas condições experimentais, mas na ausência de BSA. Os espectros também são apresentados na Figura 5.4 (espectros atingiram um pico máximo de 412 nm).

Observou-se que a excitação direta explica o crescimento do pico de fluorescência do complexo. Isto torna-se evidente ao se subtrair os espectros dos complexos puros, a partir dos espectros correspondentes na presença de BSA. Nos casos estudados, obteve-se espectros que correspondem apenas a contribuição de fluorescência de triptofano, como observado na Figura 5.5 (pág. 69). O gráfico inserido na Figura 5.5 mostra a aplicação da equação de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência do Trp. Nesse gráfico, a fluorescência a 338 nm foi corrigido para o efeito de filtro interno, de acordo com a Equação 28 (LAKOWICZ e WEBER, 1973).

$$F = F_{obs} 10^{A_{exc}/2} \quad (28)$$

onde F_{obs} é a fluorescência observada em 338 nm e A_{exc} é a absorvância em 285 nm.

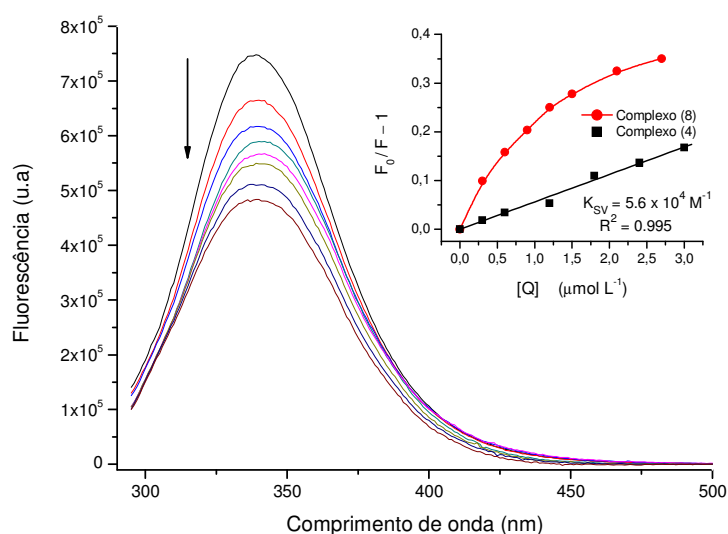


Figura 5.5 – Subtrações dos espectros de fluorescência da Figura 5.4 (B): (BSA + complexo (8) menos [ZnCl₂(NOR)(phen)].2H₂O). Inserção: Stern-Volmer obtidas, a partir da fluorescência em 338 nm, para os complexos (4) e (8).

Uma linearidade, como observada na Figura 5.5 para o complexo (4) é um indicativo da existência de um único tipo de fluoróforo ou revela a ocorrência de apenas um local de ligação para o fármaco na proximidade do fluoróforo. Por outro lado, uma linearidade na representação gráfica de Stern-Volmer pode resultar tanto de uma supressão dinâmica ou colisional como de uma supressão estática (formação de complexo).

Como a fluorescência estática não exige a difusão através do meio, o processo é mais eficiente e a constante de supressão observada é mais alta. Se a fluorescência dinâmica ocorre, a constante bimolecular de velocidade do processo de supressão (k_q , L mol⁻¹ s⁻¹) pode ser calculada a partir da Equação 16 (pág. 16). Nesse caso, leva-se em consideração o tempo de vida médio de fluorescência (τ_o) do triptofano da BSA, que é em torno de 10⁻⁸ s. No caso da fluorescência estática, a constante de ligação (K_b) é a própria constante de Stern-Volmer (SKYRIANOU *et al.*, 2009; COTRIM *et al.*, 2010).

O valor calculado de K_{SV} para a interação do complexo (4) com BSA é dada na Tabela 5.6 (pág. 70), indicando boa interação. No caso de supressão dinâmica, o k_q depende da probabilidade de uma colisão entre fluoróforo e o fármaco e são uma medida da exposição de

resíduos de triptofano a este composto. O limite superior de k_q esperado para um processo bimolecular controlado por difusão é $10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A magnitude de k_q de complexo (4) foram da ordem de $10^{13} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, que é muito superior ao valor citado. Por esta razão, o processo não pode ser controlada por difusão e interações mais específicas entre a BSA e o fármaco ocorreram. Neste caso, a constante de ligação (K_b) é a própria constante de Stern-Volmer (WANG *et al.*, 2007; COTRIM *et al.*, 2010).

Tabela 5.6 - Constantes de ligação (K_b) (igual a constante de Stern-Volmer, K_{SV}) obtidas para os complexos de Zn(II).

Composto	K_b (L mol ⁻¹)	R ^{2*}
[ZnCl ₂ (NOR)].H ₂ O (4)	$5,6 \times 10^4$	0,99
[ZnCl ₂ (NOR)(phen)].2H ₂ O (8)	$1,2 \times 10^6$	0,99

*Regressão Linear

É importante mencionar que as constantes de ligação (K_b) estão relacionadas com os sítios de ligação próximos aos resíduos de triptofano. Quando uma proteína contém vários resíduos de Trp que estão em ambientes diferentes, cada resíduo geralmente tem acessibilidades diferentes para o composto.

Em alguns sistemas, a curva de supressão desvia da linearidade, surgindo desvios negativos, como no caso do complexo (8), indicando que uma fração do fluoróforo não é acessível ao supressor. A Figura 5.5 mostra que o complexo (8) interage preferencialmente com apenas um resíduo Trp. (LAKOWICZ e WEBER, 1973).

A equação modificada de Stern-Volmer (29) pode ser utilizada para analisar as diferentes acessibilidades de resíduos dos triptofanos nas proteínas (WANG *et al.*, 2007). Ao examinar duas populações de fluoróforos, um dos quais é acessível e o outro inacessível tem-se:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a} + \frac{1}{f_a K_a [Q]} \quad (29)$$

onde f_a é a fração da fluorescência inicial, que é acessível ao fármaco e K_a é a constante de supressão de Stern-Volmer da fração acessível, F_0 é a fluorescência total na ausência do fármaco,

e $[Q]$ é a concentração do fármaco. A representação gráfica de $F_0/\Delta F$ versus $1/[Q]$ permite determinar f_a e K_a (f_a^{-1} é a interceção e $(f_a K_a)^{-1}$, a inclinação).

A Figura 5.6 apresenta a equação modificada para o complexo **(8)**. Com o ajuste linear, foi encontrado $f_a = 0,33$ e $K_a = 1,24 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$.

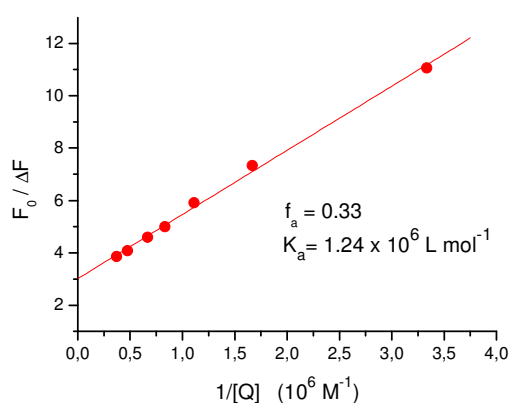


Figura 5.6 – Gráfico da equação de Stern-Volmer modificada para o complexo $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})].2\text{H}_2\text{O}$ **(8)**.

Uma vez que a BSA é uma proteína com dois resíduos de Trp é de se esperar que a supressão de fluorescência seja afetada por diferentes acessibilidades dos dois triptofanos. A fração acessível obtida sugere que o agente de supressão tem, apenas, acesso a um dos triptofanos, uma vez que $f_a + f_b = 1$ (sendo f_a , a fração acessível e f_b , a fração inacessível, em um ambiente mais hidrofóbico). Estando o Trp-134 localizado na superfície da proteína, a sua fluorescência é mais facilmente suprimida pelo complexo **(8)**. Enquanto o Trp-212 está localizado dentro de uma cavidade hidrofílica, de mais difícil acesso.

Tempos de meia-vida

Curvas de decaimento típicos de fluorescência para as amostras de BSA na ausência e na presença de concentrações diferentes de complexos **(4)** e **(8)** estão representados na Figura 5.7.

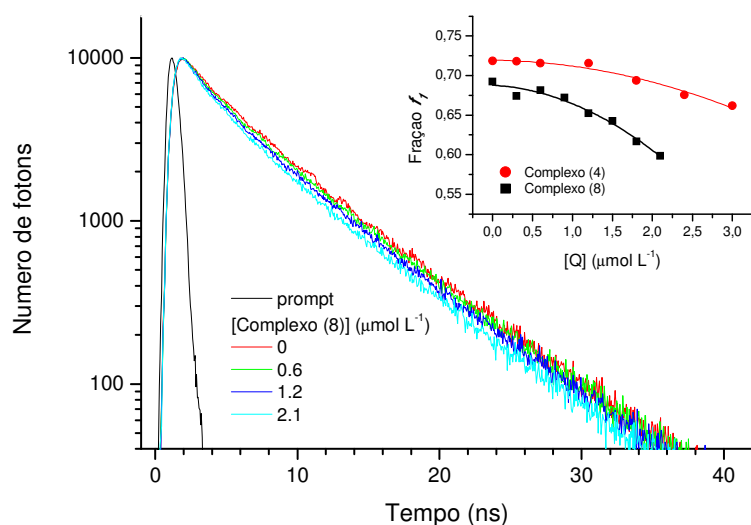


Figura 5.7 - Curvas de decaimento de fluorescência da BSA (excitação em 282 nm, emissão em 338 nm) na presença de diferentes concentrações do complexo (8). Inserção: contribuição fracionária do maior tempo de vida em função das concentrações dos complexos (4) e (8).

As curvas acima apresentaram uma pequena diminuição no tempo de vida médio de fluorescência com o aumento da concentração de supressores, como observado pela inclinação na curva logarítmica. As curvas foram analisadas individualmente, usando um modelo de três exponenciais, segundo a Equação 30.

$$I(t) = A + \sum_{i=1}^3 \alpha_i \exp(t / \tau_i) \quad (30)$$

Observou-se que os três tempos de vidas obtidos foram muito semelhantes para todas as curvas de decaimento e que a contribuição fracionária de cada tempo de decaimento variou. Isto está de acordo com o mecanismo de fluorescência estática, que não altera o tempo de vida.

Observou-se ainda que a contribuição do tempo de vida mais curto (<1 ns) foi menor (menos de 6%). Portanto, outra abordagem foi utilizada: os tempos de vida com a maior contribuição foram calculados $\langle \tau_1 \rangle = 7,03$ ns e $\langle \tau_2 \rangle = 3,62$ ns. Em seguida, uma análise global foi realizada, utilizando todas as curvas de decaimento para cada fármaco. A análise global gerou os tempo de vida e as contribuições das frações dos mesmos para cada decaimento. Nesta análise

global, dois principais tempos de vida foram fixados nos valores citados acima. O terceiro tempo de vida τ_3 e o fator pré-exponencial α_i foram os parâmetros de ajuste: $\tau_1 = 7,03$ ns (fixo) e $\tau_2 = 3,62$ ns (fixo), e $\tau_3 = 0,51$ ns para o complexo (4) ou $\tau_3 = 0,78$ ns para o complexo (8). A inserção na Figura 5.7 representa a contribuição fracionária (f_1) da τ_1 normalizados para as contribuições dos dois principais tempos de vida como uma função da concentração de agente de supressão, de acordo com a Equação 31 (A contribuição de τ_3 foi aleatória e menos significativa por causa da largura do pulso de luz).

$$f_1 = \frac{\alpha_1 \tau_1}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2} \quad (31)$$

A contribuição do maior tempo de vida diminui ligeiramente com o aumento das concentrações de complexos, o que pode ser explicado pela acessibilidade diferente dos dois resíduos de triptofano da BSA.

5.7 Estudos de interação dos complexos de Zn(II) de norfloxacin com o DNA

Nesse capítulo, estão descritos estudos de interação entre os complexos de Zn(II) com norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFLO) e esparfloxacin (SPAR) e a dupla hélice do DNA com o objetivo de verificar a existência de interações e tentar compreender a natureza e a intensidade das mesmas.

O estudo da interação dos complexos de Zn(II) com o DNA é importante visto que os possíveis alvos de ação dos fármacos anti*T. cruzi* podem incluir o DNA-mitocondrial ou DNA nuclear do parasito.

Os espectros de absorção da interação do CT DNA na presença de quantidades crescentes dos complexos de Zn(II) estão apresentados na Figura 5.8 (pág. 74). A intensidade das bandas de complexos (4) e (8) em 272 nm e 271 nm, respectivamente, na presença de CT de DNA exibiu um hipocromismo considerável.

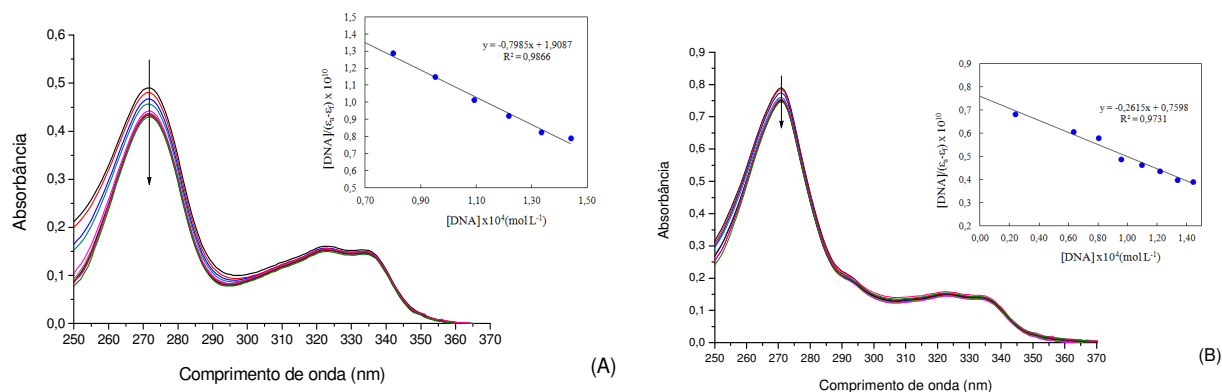


Figura 5.8 - Espectros de absorção de (A) $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (4) e (B) $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8) com quantidades crescentes de CT DNA. Reta inserida: plotagem de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}] \text{ L}^{-1}$. $\{[\text{DNA}] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol e } [\text{Composto}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}, \text{ a } 25 \text{ }^\circ\text{C em pH } 7,4\}$. As setas mostram as mudanças na absorção do composto após a adição de CT DNA.

A aplicação da equação de *Scatchard* (Equação 27, pág. 33) permite a obtenção de uma reta, sendo que a constante de ligação DNA-droga é obtida através da razão entre o coeficiente angular e o coeficiente linear dessa reta. A constante de ligação (K_b) foi obtida pelo monitoramento das mudanças ocorridas na absorbância em 272 e 271 nm para os complexos (4) e (8), respectivamente. Os valores K_b calculados estão apresentados na Tabela 5.7 e sugerem uma ligação moderada dos complexos de Zn(II) ao CT DNA. Os valores K_b dos dois complexos de Zn(II) foram semelhantes, sendo que a adição de phen não alterou significativamente estes valores. O efeito hipocrômico observado pode ter sido devido à interação entre o cromóforo aromático (norfloxacinato e/ou o ligante N-doador) dos complexos e os pares de bases de DNA coerentes com o modo de ligação de intercalação (COX *et al.*, 2009; SKYRIANOU *et al.*, 2009).

Tabela 5.7 - Constantes de ligação (K_b), coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) e porcentagem de hipocromismo para a interação dos complexos de Zn(II) com o DNA.

Composto	$K_b (\text{L mol}^{-1})$	R^{2*}	Hipocromismo (%)
$[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (4)	$(4,45 \pm 0,05) \times 10^3$	0,9866	12
$[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8)	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^3$	0,9731	6

*Regressão Linear

5.8 Toxicidade dos complexos de Zn(II) frente as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*

Nesse trabalho, a atividade tripanocida das fluorquinolonas livres (NOR, OFLO, SPAR), do co-ligante phen, dos complexos de Zn(II), do ZnCl₂, do precursor de Zn(II) {[ZnCl₂(phen)]} e da droga de referência para doença de Chagas, o benzonidazol, foi testada sob as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*, *in vitro*. Para os compostos selecionados foram feitos também testes sob as formas amastigotas do parasito. Foi utilizada como parâmetro de análise a concentração inibitória mínima (IC₅₀) para os compostos em estudos, ou seja, os valores mínimos de concentração capaz de inibir em 50% o crescimento do *T. cruzi*. A Tabela 5.8 lista os valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) obtidos para os compostos sob as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares do *T. cruzi*. Os valores correspondem a média de três replicatas ± desvio padrão.

Tabela 5.8 - Valores de IC₅₀ dos complexos metálicos de Zn(II), ligantes, co-ligante e sal do íon metálico sob formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*.

Composto	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	
	Formas Tripomastigotas	Formas Intracelulares
Norfloxacina (NOR)	127 ± 30	>250
Ofloxacina (OFLO)	242 ± 11	>250
Esparfloxacina (SPAR)	114 ± 20	>250
1,10 – fenantrolina (phen)	11 ± 3	>250
ZnCl ₂	> 250	ND*
[ZnCl ₂ (NOR)].H ₂ O (4)	197 ± 75	ND*
[ZnCl ₂ (OFLO)] (5)	90 ± 31	>250
[ZnCl ₂ (SPAR)] (6)	107 ± 62	ND*
[ZnCl ₂ (phen)] (7)	14 ± 2	>250
[ZnCl ₂ (NOR)(phen)].2H ₂ O (8)	12 ± 2	>250
Benzonidazol	13 ± 2	3 ± 2

* Não detectado.

Os testes antiparasitários com as formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi* mostram que nenhum dos compostos em estudo possui atividade significativa, quando comparadas com a droga de referência benzonidazol ($IC_{50} = 3 \mu\text{mol L}^{-1}$).

As fluorquinolonas NOR, OFLO e SPAR não mostraram também atividade significativa sob as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, exibindo valores de IC_{50} de 126, 242 e $114 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A associação do Zn(II) à NOR não levou a um aumento da atividade, resultando em valor de IC_{50} de $197 \mu\text{mol L}^{-1}$. Porém, a coordenação da OFLO ao Zn(II) aumentou consideravelmente a atividade antichagásica da fluorquinolona (63%), correspondendo a valores de IC_{50} de $90 \pm 31 \mu\text{mol L}^{-1}$. O estudo indica que a complexação com a SPAR aumentou discretamente a atividade do ligante livre (7%), correspondendo a valores de IC_{50} de $106 \pm 62 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A introdução da 1,10 - fenantrolina (phen) como co-ligante foi uma estratégia eficaz para a melhora da atividade. O complexo (**8**) mostrou-se 16 vezes mais ativo que o análogo, sem a phen. Além disso, ele possui atividade comparável a do benzonidazol, que é a droga de referência. Embora a fenantrolina livre e seu precursor, $[\text{ZnCl}_2(\text{phen})]$, mostrem atividade significativa, a adição de um grupo hidrofóbico diminui a polaridade do composto, o que muda a solubilidade e pode contribuir no transporte no organismo.

Estudos descritos na literatura demonstram que as fluorquinolonas são ativas contra várias parasitoses. CORTÁZAR e colaboradores (2007) citam a enoxacina e a ciprofloxacina como fluoroquinolonas com alta atividade antiparasitária frente às formas amastigotas intracelulares de *Leishmania panamensis*. Membros do nosso grupo de pesquisa estudaram a atividade anti*T. cruzi* de complexos de Cu(II) com a NOR, LEVO, SPAR e phen e observaram que, em alguns casos, os complexos mostraram atividade maior que os ligantes livres e a droga de referência sob as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares (MARTINS *et al.*, 2012). Estes resultados justificam novos estudos, *in vitro* e *in vivo*, e sugerem que a associação fluorquinolona - íon metálico - phen, em um mesmo composto, pode representar uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos agentes anti*T. cruzi*.

5.9 Atividade antibacteriana e antifúngica

As bactérias e fungos surgiram há bilhões de anos e desenvolveram mecanismos de resistência aos antibióticos. Um fator que contribui para tornar um antibiótico menos eficiente é a sua utilização excessiva e incorreta. Na tentativa de solucionar o problema da resistência bacteriana e fúngica, tem-se utilizado como técnica a coordenação de metais a antibióticos.

A atividade antibacteriana e antifúngica das fluorquinolonas livres (NOR, OFLO, SPAR) e de seus complexos de Zn(II) foi avaliada frente aos fungos *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger*, *Microsporium gypseum* e as bactérias *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*. Para efeito de comparação foram testadas também as atividades do sal de zinco, do precursor [ZnCl₂(phen)] e da 1,10-fenantrolina.

Após verificar a atividade biológica dos compostos em estudo, avaliou-se a capacidade de inibição *in vitro* do crescimento dos microrganismos, utilizando 250 µg mL⁻¹ de cada amostra. Para calcular a porcentagem de inibição do crescimento do patógeno usou-se a Equação 28:

$$\% \text{ de Inibição} = [(Absorbância \text{ do controle} - \text{absorbância da amostra}) / \text{absorbância do controle}] \times 100 \quad (28)$$

As Tabelas 5.9 e 5.10 (pág. 78) listam as porcentagens de inibição do crescimento das bactérias e dos fungos, respectivamente, citados acima. Os valores correspondem a média de cinco replicatas \pm desvio padrão.

Tabela 5.9 – Porcentagens de inibição (% inib) dos complexos metálicos de Zn(II), ligantes, co-ligante e sal do íon metálico frente as bactérias *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhi*.

Composto	<i>B. cereus</i>	<i>C. freundii</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>
Norfloxacina (NOR)	84,9 ± 3,8	94,2 ± 0,7	79,1 ± 4,4	95,3 ± 0,5	70,6 ± 12,5	40,6 ± 9,0
Ofloxacina (OFLO)	84,7 ± 2,0	93,9 ± 0,6	76,2 ± 1,8	93,7 ± 2,2	84,6 ± 2,1	65,1 ± 7,2
Esparfloxacina (SPAR)	68,1 ± 14,6	88,0 ± 2,3	63,9 ± 8,7	91,4 ± 1,2	80,3 ± 0,9	63,0 ± 1,5
1,10-fenantrolina (phen)	89,6 ± 1,6	92,7 ± 0,6	65,3 ± 3,7	92,9 ± 2,0	80,8 ± 1,7	56,8 ± 6,6
ZnCl ₂	20,6 ± 3,4	76,3 ± 3,3	0,0 ± 0,0	54,9 ± 6,6	0,0 ± 0,0	8,3 ± 5,0
[ZnCl ₂ (NOR)].H ₂ O (4)	86,4 ± 1,8	89,7 ± 1,7	73,8 ± 7,4	94,6 ± 0,5	83,0 ± 1,6	64,9 ± 2,7
[ZnCl ₂ (OFLO)] (5)	87,4 ± 0,8	94,6 ± 0,4	79,1 ± 5,3	93,3 ± 4,2	81,0 ± 7,7	71,3 ± 1,7
[ZnCl ₂ (SPAR)] (6)	81,1 ± 7,5	87,6 ± 2,6	71,6 ± 6,8	94,3 ± 0,7	79,6 ± 1,5	66,1 ± 2,1
[ZnCl ₂ (phen)] (7)	39,3 ± 4,8	94,3 ± 0,4	66,4 ± 2,2	92,6 ± 0,6	83,3 ± 3,0	66,5 ± 8,2
[ZnCl ₂ (NOR)(phen)].2H ₂ O (8)	88,5 ± 1,5	89,2 ± 1,5	77,0 ± 3,3	94,9 ± 1,0	84,6 ± 1,6	75,1 ± 3,8

Tabela 5.10 – Porcentagens de inibição (% inib) dos complexos metálicos de Zn(II), ligantes, co-ligante e sal do íon metálico frente os fungos *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger* e *Microsporium gypseum*.

Composto	<i>C. albicans</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>C. cladosporioides</i>	<i>A. niger</i>	<i>M. gypseum</i>
Norfloxacina (NOR)	82,9 ± 10,0	55,3 ± 35,8	100,0 ± 8,4	0,0 ± 0,0	100,0 ± 34,7
Ofloxacina (OFLO)	93,1 ± 3,5	100,0 ± 33,2	100,0 ± 18,2	0,0 ± 0,0	100,0 ± 22,2
Esparfloxacina (SPAR)	92,5 ± 1,3	81,4 ± 15,6	74,0 ± 61,1	0,0 ± 0,0	51,6 ± 33,3
1,10-fenantrolina (phen)	92,4 ± 1,4	92,6 ± 15,6	100,0 ± 14,0	0,0 ± 0,0	96,3 ± 22,8
ZnCl ₂	71,1 ± 2,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
[ZnCl ₂ (NOR)].H ₂ O (4)	91,3 ± 3,5	100,0 ± 28,0	100,0 ± 25,4	0,0 ± 0,0	100,0 ± 13,1
[ZnCl ₂ (OFLO)] (5)	95,0 ± 0,7	100,0 ± 43,6	100,0 ± 12,4	0,0 ± 0,0	100,0 ± 15,5
[ZnCl ₂ (SPAR)] (6)	94,0 ± 3,1	92,6 ± 33,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	100,0 ± 22,6
[ZnCl ₂ (phen)] (7)	95,2 ± 1,0	100,0 ± 12,0	100,0 ± 26,1	100,0 ± 71,4	100,0 ± 10,9
[ZnCl ₂ (NOR)(phen)].2H ₂ O (8)	94,3 ± 2,0	66,5 ± 20,4	85,1 ± 76,0	100,0 ± 15,0	92,6 ± 33,8

A partir da análise dos resultados obtidos (Tabelas 5.9 e 5.10, pág. 78), observa-se que a associação do Zn(II) a NOR levou a um aumento significativo da atividade apenas com a bactéria *S. typhi*. Porém, a coordenação da OFLO e da SPAR ao Zn(II) não contribuiu para um aumento da atividade antibacteriana e antifúngica, em nenhum dos casos.

Nos testes com as bactérias, a introdução da phen contribui para um efeito inibitório maior (~10%) apenas com a bactéria *S. typhi*. Em todos os outros casos, houve um efeito inibitório semelhante. No estudo com os fungos, observa-se que o co-ligante é responsável pela inibição do *A. niger*, já que os demais complexos não inibem este fungo significativamente.

6. Complexos de Mn(II) de algumas fluorquinolonas: síntese, caracterização, testes de atividade biológica e estudos de interação com alvos biológicos

A reação de cloreto de manganês(II) tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) com as fluorquinolonas norfloxacin (NOR) e esparfloxacin (SPAR) levou à obtenção de dois complexos, obtidos pela primeira vez por outros membros do nosso grupo de pesquisa (BATISTA *et al.*, 2011). A reação destes complexos com o co-ligante, 1,10-fenantrolina (phen), levou a obtenção de dois complexos inéditos. Os complexos obtidos foram caracterizados por análise elementar e termogravimétrica, medidas de condutividade, espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

Para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos complexos de Mn(II) foram usados os fungos *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger*, *Microsporium gypseum* e as bactérias *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*. Para efeito de comparação foram testadas também as atividades do sal de manganês e dos ligantes.

Para investigar um possível mecanismo de ação dessas drogas, realizou-se estudos de interação dos complexos metálicos com a albumina humana (HSA).

6.1 Dados de microanálise e medidas de condutividade

A Tabela 6.1 apresenta as faixas de temperatura de decomposição, os dados de microanálise e de condutividade para os complexos de Mn(II).

Tabela 6.1 - Dados de microanálise (valores calculados entre parênteses), faixas de temperatura de decomposição ($^{\circ}\text{C}$) e medidas de condutividade (Λ , $\mu\text{S cm}^{-1}$) para os compostos de Mn(II).

Composto	Faixa de decomposição	%C	%H	%N	Λ^*
$[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (9)	244-252	39,8 (39,9)	4,7 (4,6)	8,7 (8,7)	28
$[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (10)	256 - 264	37,4 (37,5)	5,0 (5,3)	9,2 (9,2)	38
$[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11)	232 - 243	50,8 (50,9)	4,7 (4,6)	10,9 (10,6)	12
$[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{phen})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (12)	230-236	49,5 (49,5)	5,3 (4,8)	11,4 (11,2)	30

*Condutividade ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em *N,N*-dimetilformamida (DMF). Nos valores de condutividade tabelados já foi descontada a condutividade do solvente.

A Tabela 6.1 (pág. 80) apresenta os dados de análise elementar e condutividade para os complexos de Mn(II). Os dados sugerem que a relação metal:ligante é 1:1 com dois átomos de cloro coordenados ao átomo de Mn(II). Os dados de análise elementar sugerem ainda que alguns complexos possuam moléculas de água de hidratação. A presença das moléculas de água de hidratação pode ser confirmada pelas curvas TG-DTG dos complexos em anexo (pág. 116 e 117).

Para as medidas de condutividade, os complexos de Mn(II) foram dissolvidos em *N,N*-dimetilformamida (DMF). Os resultados das medidas indicam que os complexos são não-eletrólitos de acordo com GEARY (1971). É importante destacar que para a solubilização completa dos complexos, foi necessário deixar as soluções, sob sonicação, por 10 minutos, no banho de ultrassom. Este procedimento pode ter contribuído para a substituição dos átomos de cloro pelo DMF na esfera de coordenação do Mn(II), aumentando o valor de condutividade.

Considerando o exposto, pode-se sugerir que os complexos de Mn(II) são do tipo $[MnCl_2(L)(H_2O)_2]$ e $[MnCl_2(phen)(L)]$, onde L representa os ligantes norfloxacin (NOR) ou esparfloxacin (SPAR), coordenados na forma neutra ou zwitteriônica ao metal. Os complexos metálicos de Mn(II) com a NOR e com a SPAR possuem 2 ou 3 moléculas de hidratação.

6.2 Espectroscopia na região do infravermelho

As bandas dos espectros do infravermelho mais úteis na determinação do modo de coordenação das fluorquinolonas ao íon Mn(II) são mostradas na Tabela 6.2. Os espectros de infravermelho dos complexos e seus ligantes encontram-se em anexo (pág. 108, 112 e 113).

Tabela 6.2 - Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das fluorquinolonas e dos complexos de Mn(II).

Compostos	$\nu(COOH)$	$\nu(C=O)$	$\nu_{ass}(COO^-)$	$\nu_s(COO^-)$	$\Delta\nu^*$
Norfloxacin (NOR)	1730 F	1622 F	-	-	-
$[MnCl_2(NOR)(H_2O)_2]$ (9)	-	1577 F	1621 F	1384 F	237
$[MnCl_2(NOR)(phen)].2H_2O$ (11)	-	1577 F	1621 F	1385 F	238
Esparfloxacin (SPAR)	1716 m	1641 m	-	-	-
$[MnCl_2(SPAR)(H_2O)_2].3H_2O$ (10)	-	1568 F	1636 F	1386 F	250
$[MnCl_2(SPAR)(phen)].3H_2O$ (12)	-	1568 F	1634 F	1378 F	256

* $\Delta\nu = \nu_{ass} - \nu_s$; Legenda: F = forte, m = média.

Similarmente aos complexos de Zn(II) (capítulo 5), os espectros da NOR e SPAR livres mostram absorções entre 1716 - 1730 cm^{-1} atribuídas à vibração de estiramento do grupo carboxila, $\nu(\text{COOH})$, ausentes nos espectros dos complexos de Mn(II), o que indica o envolvimento do grupo carboxílico na interação com os íons metálicos (DOROFEEV, 2004; GAO *et al.*, 1995; SADEEK, 2005; BATISTA *et al.*, 2011).

A banda atribuída ao estiramento $\nu(\text{C=O})$ de cetona aparece entre 1622 - 1641 cm^{-1} nos espectros das fluorquinolonas livres. Nos espectros dos complexos, essa banda desloca-se para regiões de mais baixa frequência, indicando a coordenação da carbonila cetônica aos íons metálicos (DOROFEEV, 2004).

Nos espectros dos complexos de Mn(II) observa-se o surgimento de duas novas bandas atribuídas ao estiramento assimétrico do grupo carboxilato, $\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-)$, entre 1624-1638 cm^{-1} e ao estiramento simétrico do grupo carboxilato, $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$, entre 1378-1386 cm^{-1} indicando, novamente, o envolvimento desse grupo na coordenação (DOROFEEV, 2004; GAO *et al.*, 1995; SADEEK, 2005; BATISTA *et al.*, 2011).

Similarmente aos complexos de Zn(II), os valores de $\Delta\nu$ [$\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$] observados para os complexos de Mn(II) obtidos nesse trabalho estão entre 237 e 256 (Tabela 6.2, pág. 81), o que sugere a coordenação do grupo carboxilato de modo monodentado (SADEEK, 2005; REFAT, 2007; DEACON e PHILLIPS, 1980). Portanto, os dados de infravermelho indicam que nos quatro complexos obtidos, a NOR e a SPAR estão coordenadas ao Mn(II) de modo bidentado através da carbonila da cetona e do grupo carboxilato na forma zwitteriônica.

Para os complexos que contém phen observou-se uma banda em torno de 750 cm^{-1} atribuída às vibrações fora do plano dos átomos de hidrogênio dos anéis heterocíclicos da 1,10-fenantrolina. Os espectros dos complexos apresentaram bandas na região de $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ atribuídas a vibração do grupo OH das moléculas de água (PEREZ-GUAITA *et al.*, 2011).

6.3 Análise termogravimétrica

As curvas TG/DTG foram feitas entre 30 e 800 $^{\circ}\text{C}$, em atmosfera de ar, com taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Nos dois casos estudados, foi possível confirmar a presença das

moléculas de água (Tabela 6.3). As curvas TG/DTG dos complexos de Mn(II) encontram-se em anexo (pág. 116 e 117).

Tabela 6.3 – Porcentagens de perda de moléculas de água de hidratação calculadas e obtidas a partir da análise das curvas TG/DTG dos complexos de Mn(II).

Compostos	MM(g mol ⁻¹)	% H ₂ O (calculada)	% H ₂ O (experimental)
[MnCl ₂ (SPAR)(H ₂ O) ₂].3H ₂ O (10)	608,3	8,9	9,0
[MnCl ₂ (NOR)(phen)].2H ₂ O (11)	661,4	8,2	8,7
[MnCl ₂ (SPAR)(phen)].3H ₂ O (12)	752,5	7,2	7,8

6.4 Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Os espectros de RPE de íons de Mn²⁺ em um campo cristalino cúbico com pequena distorção axial ou rômica são descritos pelo Hamiltoniano de spin (ABRAGAM e BLEANEY, 1970):

$$H = g\mu_B \vec{B} \cdot \vec{S} + A\vec{S} \cdot \vec{I} + H_{ZFS} + g_N \mu_N \vec{B} \cdot \vec{I} \quad (31)$$

Os dois primeiros termos representam a interação Zeeman e a interação hiperfina do spin eletrônico $S = 5/2$ com o spin nuclear $I = 5/2$ do ⁵⁵Mn (100% abundante). O termo H_{ZFS} (desdobramento em campo nulo) descreve a interação do spin eletrônico com o campo cristalino local e o último termo corresponde à interação Zeeman nuclear. O termo H_{ZFS} (diferente de zero para $S > 1/2$) é dado por:

$$H_{ZFS} / h = D_x S_x^2 + D_y S_y^2 + D_z S_z^2 = D(S_z^2 - S(S+1)/3) + E(S_x^2 - S_y^2) = D(S_z^2 - S(S+1)/3) + E(S_+^2 + S_-^2)/2 \quad (32)$$

Os espectros de RPE de Mn²⁺ (MnCl₂.4H₂O) e dos complexos (**9**)-(12) foram registrados à temperatura ambiente e estão apresentados na Figura 6.1(pág. 84). Há seis linhas hiperfinas que são características de íons Mn(II), configuração 3d⁵.

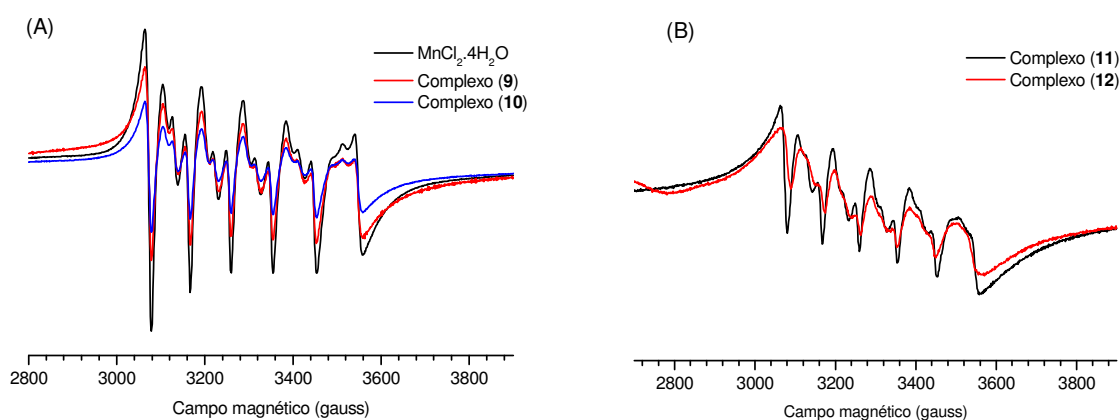


Figura 6.1 - Espectros de RPE para os complexos (9), (10), (11) e (12) e o $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (pó, temperatura ambiente – 25°C).

Observa-se que os espectros apresentam o mesmo padrão, variando apenas a intensidade dos sinais, o que indica que os compostos possuem mesmos parâmetros de RPE. Parece haver também diferentes contribuições de um espectro alargado, devido a interações dipolares magnéticas. O parâmetro g e a constante de interação hiperfina obtidos dos espectros foram $g = 2,008$ e $A = 94,6$ gauss (266 MHz). O valor de $g = 2,008$, muito perto do valor de g do elétron livre ($g = 2,0023$), é característico de Mn(II) baixo spin. Os parâmetros Hamiltonianos obtidos dos espectros demonstram a formação de complexos monoméricos de Mn(II) , de geometrias octaédricas com distorção axial (COFFINO e PEISACH, 1996; ROMANOWSKI *et al.*, 2010).

Não foi possível obter as constantes D e E , já que não conseguimos simular esses espectros com o programa EasySpin (COFFINO e PEISACH, 1996), especialmente as intensidades dos dubletes entre as 6 linhas hiperfinas principais. Chegamos a pensar que havia mais de uma espécie (além da alargada) em um campo cristalino diferente. No entanto, observa-se que tanto as linhas hiperfinas como as intermediárias dos espectros são muito semelhantes as do espectro de Mn^{2+} . Isso sugere que os nossos espectros, ao menos a contribuição com linhas bem resolvidas, também se referem a uma única geometria bem definida, ou seja, um único tipo de vizinhança.

6.5 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica que permite avaliar as propriedades eletroquímicas de ligantes e complexos metálicos de Mn(II) em seus diversos estados de oxidação e verificar a reversibilidade (ou irreversibilidade) dos processos redox (DE SOUZA, 2011).

A técnica consiste basicamente na aplicação de uma variação de potencial linear a um eletrodo de trabalho, ocasionando reações de oxidação e redução na presença de espécies eletroativas na solução ou presentes na superfície do eletrodo (TICIANELLI e GONZALEZ, 2005).

Inicialmente, aplicou-se um potencial nas soluções dos complexos de Mn(II) e nas soluções das fluorquinolonas livres na faixa entre -2,0 e 2,0 V com uma velocidade de 100 mV s^{-1} . Nos voltamogramas dos ligantes, verificou-se a ausência de processos redox na faixa entre -1,5 e 0,5 V. Já nesta faixa, observaram-se processos redox nos voltamogramas das soluções dos complexos de Mn(II). Assim, determinou-se a faixa de potencial adequada para estudar os processos redox centrados no íon metálico.

A Figura 6.2 (pág. 86) mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para os complexos de Mn(II) na concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, na faixa entre -1,5 e 0,5 V, na velocidade de 100 mV s^{-1} .

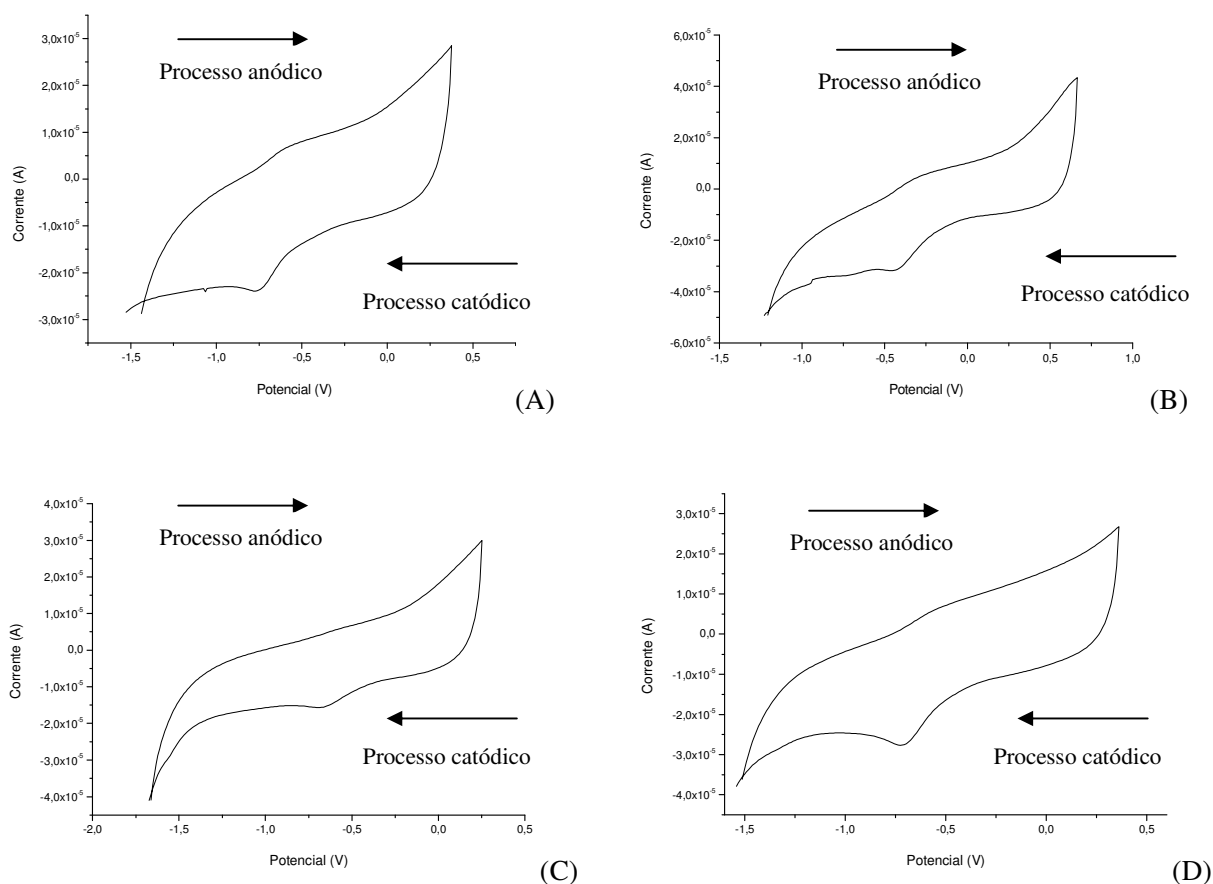


Figura 6.2 - Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de carbono vítreo de: (A) $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**9**), (B) $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})].2\text{H}_2\text{O}$ (**11**) e (C) $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{H}_2\text{O})_2].3\text{H}_2\text{O}$ (**10**), (D) $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{phen})].3\text{H}_2\text{O}$ (**12**). DMSO, $[\text{Composto}] = 5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{TBABF}_4] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,100 \text{ V s}^{-1}$.

Nos voltamogramas dos complexos metálicos, observa-se processos de oxidação $\text{Mn}^{\text{II}}/\text{Mn}^{\text{III}}$ em -0,57, -0,30, -0,62 para os complexos (**9**), (**11**) e (**12**), respectivamente, e processos de redução em -0,77, -0,39, -0,65 e -0,69 V para os complexos (**9**), (**11**), (**10**) e (**12**), respectivamente, que pode ser atribuída à redução $\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{II}}$ (SILVA, 2009; HABIB *et al.*, 2006).

6.6 Estudos de interação dos complexos de Mn(II) de esparfloxacina com a albumina humana

Albuminas são proteínas que contêm um número pequeno de resíduos de triptofano e metionina, além de um alto número de cistina e aminoácidos carregados, ácidos aspártico e glutâmico, lisina e arginina. Como já dito anteriormente, a albumina bovina (BSA) possui 2 resíduos de triptofano, Trp134 e Trp212 e a humana (HSA) apenas um, Trp214 (GÓES FILHO, 2005).

A solução de HSA exibe uma forte emissão de fluorescência em 321 nm, devido ao resíduo de triptofano (excitada a 280 nm). Os espectros de fluorescência da HSA na presença de diferentes quantidades dos complexos $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**10**) e $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{phen})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**12**) foram obtidos em uma faixa de 305 nm a 400 nm sobre uma excitação em 280 nm. Como pode ser observado na Figura 6.3, a intensidade de fluorescência diminui a partir da adição de complexo de Mn(II), indicando a ligação do complexo com a HSA. Nestes casos, não houve mudanças no comprimento de onda máximo de emissão com a adição do complexo e, nas mesmas condições, não foram observadas fluorescência para o complexo em análise.

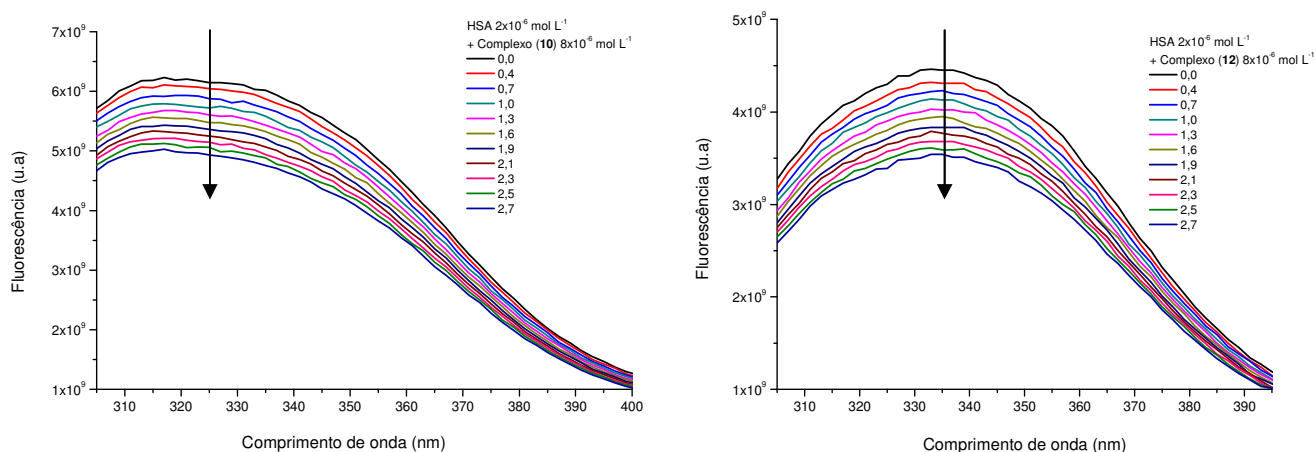


Figura 6.3 - Espectros de emissão de fluorescência da HSA na presença de concentrações crescentes de (A) complexo (**10**) e (B) Complexo (**12**), $\lambda_{\text{excitação}} = 280 \text{ nm}$. $\{[\text{BSA}] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ e } [\text{Composto}] = 8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}, \text{ à } 20^\circ\text{C, pH } 7,4\}$.

As supressões de fluorescência observadas podem ser resultados de interações moleculares entre os fármacos e a HSA, das quais se destacam reações de estado excitado,

rearranjos moleculares, transferência de energia e colisão. Elas podem ser classificadas como dinâmica ou estática. A supressão dinâmica é resultado da colisão entre o fluoróforo com o supressor, enquanto que a supressão estática é devido à formação do complexo com estado de menor energia entre fluoróforo e o supressor.

Em geral, supressores dinâmicos e estáticos podem ser distinguidos por suas diferentes dependências da temperatura e da viscosidade. A supressão dinâmica depende da difusão. Neste sentido, altas temperaturas resultam em um coeficiente de difusão alto, conseqüentemente as constantes de supressão da biomolécula devem aumentar com o aumento da temperatura. Em contrapartida, um aumento de temperatura pode resultar em valores mais baixos das constantes de supressão estática (OLIVEIRA, 2000; SANTOS, 2007; MOHD *et al.*, 2010).

Uma análise quantitativa do processo de supressão de fluorescência da albumina pode ser realizada empregando-se a equação de Stern-Volmer (Equação 16, pág. 16), a qual é frequentemente utilizada para descrever a supressão de fluorescência e analisar os mecanismos de supressão.

A Figura 6.4 apresenta gráficos utilizando a equação de Stern-Volmer que exhibe a relação de supressão da HSA com o complexo de Mn(II) em diferentes temperaturas. Neste caso, observam-se comportamentos lineares, com as inclinações diminuindo com o aumento da temperatura, dentro das concentrações investigadas, e esses resultados estão de acordo com a equação de Stern-Volmer (Equação 16, pág. 16).

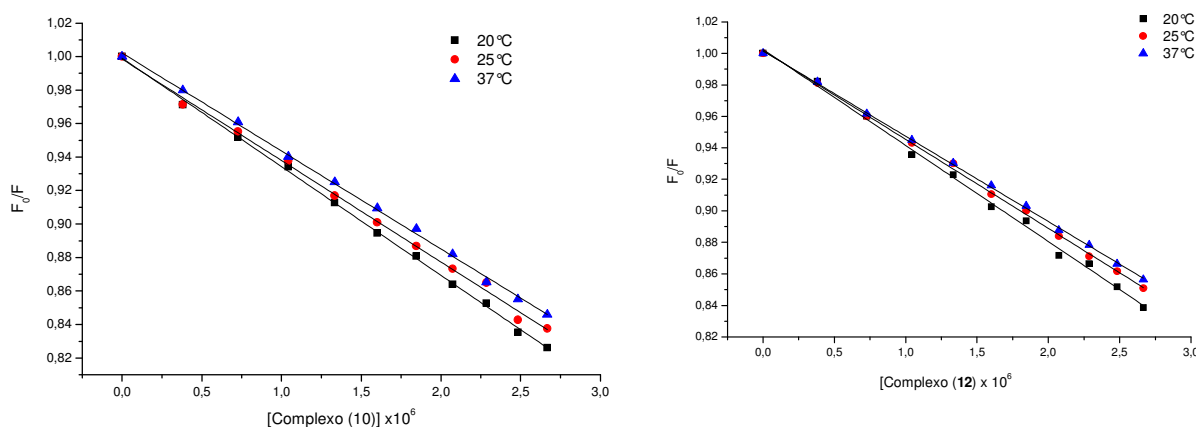


Figura 6.4 – Gráficos de Stern-Volmer para HSA na presença de concentrações crescentes de (A) complexo (10) e (B) Complexo (12) para três diferentes temperaturas, $\lambda_{\text{excitação}} = 280$ nm. $\{[\text{BSA}] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{Composto}] = 8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,4}.

A Tabela 6.4 contem as constantes obtidas (K_{SV} e k_q) para as temperaturas estudadas. Esses valores indicam que os complexos possuem uma boa interação com a HSA. Os valores de K_{SV} encontrados para os complexos de Mn(II) com a SPAR possuem a mesma ordem de grandeza.

Tabela 6.4 - Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), constante de supressão dinâmica (k_q) e coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) para a interação dos complexos de Mn(II) com a albumina humana.

Compostos	T (°C)	K_{SV} (L mol ⁻¹)	k_q (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	R^2
[MnCl ₂ (SPAR)(H ₂ O) ₂].3H ₂ O (10)	20	6,49x10 ⁴	6,49x10 ¹²	0,9989
	25	6,06x10 ⁴	6,06x10 ¹²	0,9969
	37	5,85x10 ⁴	5,85x10 ¹²	0,9987
[MnCl ₂ (SPAR)(phen)].3H ₂ O (12)	20	6,10x10 ⁴	6,11x10 ¹²	0,9968
	25	5,64x10 ⁴	5,64x10 ¹²	0,9987
	37	5,41x10 ⁴	5,41x10 ¹²	0,9994

Os resultados mostram que os valores de supressão Stern-Volmer para as constantes K_{SV} e k_q diminuem com o aumento de temperatura e os valores de k_q foram muito superiores que o valor máximo de dispersão por colisão da constante de supressão da biomolécula ($k_q = 2.0 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$). Isso significa que a supressão da fluorescência da HSA pelos complexos de Mn(II) ocorre pelo mecanismo estático, no qual há a formação de um complexo via interação axial do resíduo de triptofano ao centro metálico.

Quando pequenas moléculas se ligam independentemente em um conjunto de sítios em uma macromolécula, a constante de ligação (K_b) e os números de sítios (n) podem ser determinados pela Equação 17 (pág. 16).

A Figura 6.5 (pág. 90) mostra um gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log[Q]$ para os sistemas complexos de Mn(II)-HSA para as três temperaturas. As constantes obtidas estão apresentados na Tabela 6.6 (pág. 90).

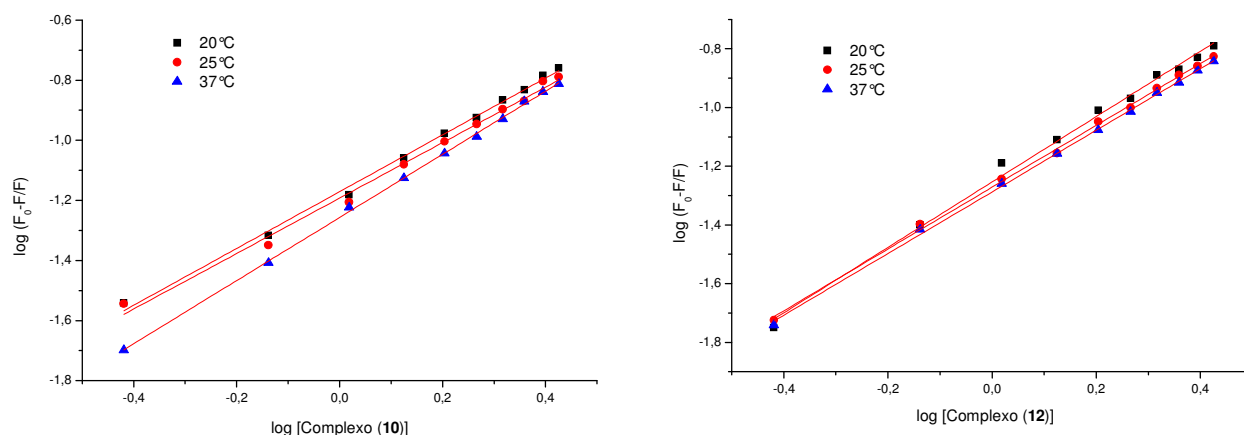


Figura 6.5 – Gráficos da Equação modificada de Stern-Volmer para a constante de ligação da interação da HSA na presença de concentrações crescentes de (A) complexo (10) e (B) complexo (12) para três diferentes temperaturas, $\lambda_{\text{excitação}} = 280 \text{ nm}$. $\{[\text{BSA}] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ e } [\text{Composto}] = 8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ em pH } 7,4\}$.

Pela Tabela 6.5 observa-se valores altos da constante de ligação K_b para as três temperaturas indicando a existência de interação forte entre a biomolécula e os complexos de Mn(II). Os valores de n são, aproximadamente, igual a 1, o que indica que existe uma classe de sítios de ligação para o complexo de Mn(II) na HSA.

Tabela 6.5 – Parâmetros da constante de ligação (K_b), sítios de ligação (n) e coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) para a interação dos complexos de Mn(II) com a albumina humana.

Composto	T (°C)	K_b (mol L ⁻¹)	n	R^2
[MnCl ₂ (SPAR)(H ₂ O) ₂].3H ₂ O (10)	20	6,76x10 ⁴	0,94	0,9960
	25	6,46x10 ⁴	0,92	0,9923
	37	5,50x10 ⁴	1,05	0,9993
[MnCl ₂ (SPAR)(phen)].3H ₂ O (12)	20	5,57x10 ⁴	1,11	0,9944
	25	5,35x10 ⁴	1,05	0,9983
	37	5,16x10 ⁴	1,05	0,9990

As forças que atuam entre os complexos metálicos e a HSA podem ser do tipo ligação de hidrogênio, forças de dispersão de London, eletrostáticas, hidrofóbicas, etc. Como existe uma

dependência da constante de ligação e a temperatura, os processos termodinâmicos devem ser considerados na formação do complexo. Os parâmetros termodinâmicos (ΔH e ΔS) foram determinados utilizando-se a equação de van't Hoff (Equação 18, pág. 16). O gráfico linear obtido está apresentado na Figura 6.6. A variação da energia livre de Gibbs, ΔG° , é calculado pela Equação 19 (pág. 16) e os valores obtidos de ΔH , ΔS e ΔG° são apresentados na Tabela 6.6.

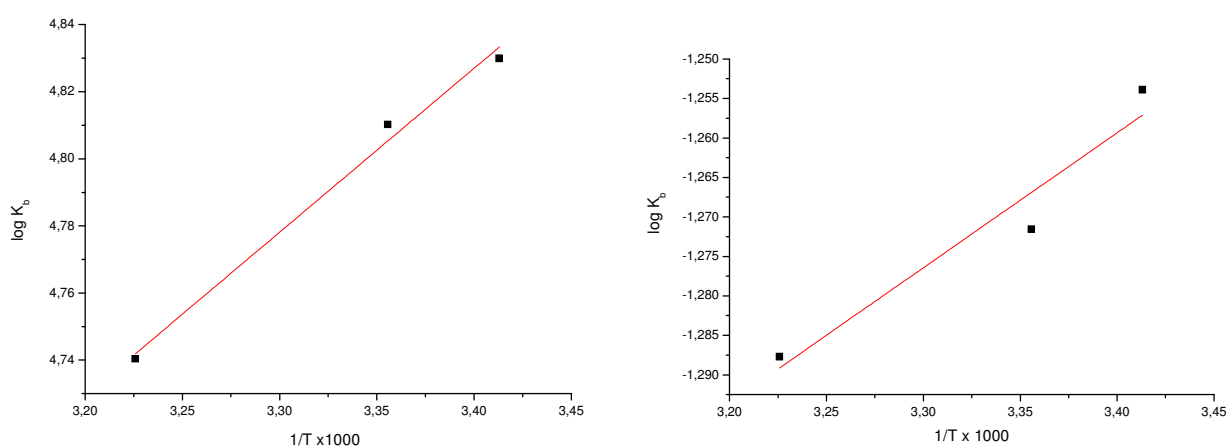


Figura 6.6 – Gráficos de van't Hoff para a interação da HSA na presença de (A) complexo (10) e (B) Complexo (12), $\lambda_{\text{excitação}} = 280 \text{ nm}$. $\{[\text{BSA}] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ e } [\text{Composto}] = 8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ em pH } 7,4\}$.

Tabela 6.6 – Parâmetros de formação e termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) e determinação da regressão linear (R^2) para a interação dos complexos de Mn(II) com a albumina humana.

Composto	T (°C)	ΔH (KJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (KJ mol ⁻¹)	R^2
[MnCl ₂ (SPAR)(H ₂ O) ₂].3H ₂ O (10)	20			-27,10	
	25	9,36	60,60	-27,45	0,9830
	37			-28,14	
[MnCl ₂ (SPAR)(phen)].3H ₂ O (12)	20			-26,62	
	25	3,27	35,24	-26,98	0,8815
	30			-27,97	

ROSS e SUBRAMANIAN (1981) têm caracterizado o sinal e a magnitude dos parâmetros termodinâmicos associados de vários tipos de interações com proteínas. De acordo com os autores, as variações de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) positivas ocorrem porque as moléculas de água que estão dispostas de forma ordenada em torno do complexo e da proteína adquirem uma configuração mais aleatória, como resultado de interações hidrofóbicas. O sinal negativo para os valores encontrados de ΔG significa que o processo de ligação é espontâneo.

6.7 Atividade antibacteriana e antifúngica

Para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica das fluorquinolonas livres (NOR e SPAR), do co-ligante phen, dos complexos de Mn(II) e do $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ foram usados os fungos *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger*, *Microsporium gypseum* e as bactérias *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*.

Após verificar a atividade biológica dos compostos em estudo, avaliou-se a capacidade de inibição *in vitro* do crescimento dos microrganismos, utilizando $250 \mu g mL^{-1}$ de cada amostra. Para calcular a porcentagem de inibição do crescimento do patógeno usou-se a equação abaixo:

$$\% \text{ de Inibição} = [(Absorbância \text{ do controle} - \text{absorbância da amostra}) / \text{absorbância do controle}] \times 100$$

As Tabelas 6.7 e 6.8 (pág. 93) listam as porcentagens de inibição do crescimento das bactérias e dos fungos, respectivamente, citados anteriormente. Os valores correspondem a média de cinco replicatas \pm desvio padrão.

Tabela 6.7 – Porcentagens de inibição (% inib) dos complexos metálicos de Mn(II), ligantes, co-ligante e sal do íon metálico frente as bactérias *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhi*.

Composto	<i>B. cereus</i>	<i>C. freundii</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>
Norfloxacina (NOR)	84,9 ± 3,8	94,2 ± 0,7	79,1 ± 4,4	95,3 ± 0,5	70,6 ± 12,5	40,6 ± 9,0
Esparfloxacina (SPAR)	68,1 ± 14,6	88,0 ± 2,3	63,9 ± 8,7	91,4 ± 1,2	80,3 ± 0,9	63,0 ± 1,5
1,10-fenantrolina (phen)	89,6 ± 1,6	92,7 ± 0,6	65,3 ± 3,7	92,9 ± 2,0	80,8 ± 1,7	56,8 ± 6,6
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0 ± 0,0	91,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0	66,2 ± 4,1	60,2 ± 2,6	15,3 ± 4,2
[MnCl ₂ (NOR)(H ₂ O) ₂] (9)	82,4 ± 1,4	93,6 ± 3,7	83,8 ± 1,7	93,7 ± 1,8	84,6 ± 7,3	74,3 ± 17,1
[MnCl ₂ (SPAR)(H ₂ O) ₂].3H ₂ O (10)	76,9 ± 5,0	86,8 ± 1,5	72,7 ± 5,9	93,1 ± 0,2	74,6 ± 7,4	59,8 ± 0,7
[MnCl ₂ (NOR)(phen)].2H ₂ O (11)	76,9 ± 3,7	94,9 ± 1,6	71,6 ± 6,8	94,2 ± 2,8	100,1 ± 1,0	78,2 ± 0,7
[MnCl ₂ (SPAR)(phen)].3H ₂ O (12)	83,3 ± 3,9	88,0 ± 2,0	68,1 ± 6,7	93,4 ± 0,7	71,8 ± 4,8	64,1 ± 1,5

Tabela 6.8 – Porcentagens de inibição (% inib) dos complexos metálicos de Mn(II), ligantes, co-ligante e sal do íon metálico frente os fungos *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger* e *Microsporium gypseum*.

Composto	<i>C. albicans</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>C. cladosporioides</i>	<i>A. níger</i>	<i>M. gypseum</i>
Norfloxacina (NOR)	82,9 ± 10,0	55,3 ± 35,8	100,0 ± 8,4	0,0 ± 0,0	100,0 ± 34,7
Esparfloxacina (SPAR)	92,5 ± 1,3	81,4 ± 15,6	74,0 ± 61,1	0,0 ± 0,0	51,6 ± 33,3
1,10-fenantrolina (phen)	92,4 ± 1,4	92,6 ± 15,6	100,0 ± 14,0	0,0 ± 0,0	96,3 ± 22,8
MnCl ₂ .4H ₂ O	77,2 ± 9,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	74,0 ± 57,9
[MnCl ₂ (NOR)(H ₂ O) ₂] (9)	94,0 ± 2,9	100,0 ± 9,0	100,0 ± 7,1	0,0 ± 0,0	100,0 ± 18,6
[MnCl ₂ (SPAR)(H ₂ O) ₂].3H ₂ O (10)	91,7 ± 2,2	100,0 ± 66,0	100,0 ± 35,6	0,0 ± 0,0	100,0 ± 17,3
[MnCl ₂ (NOR)(phen)].2H ₂ O (11)	92,1 ± 9,4	81,4 ± 15,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	81,4 ± 15,6
[MnCl ₂ (SPAR)(phen)].3H ₂ O (12)	90,1 ± 2,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

A partir da análise dos resultados obtidos (Tabelas 6.7 e 6.8), observa-se que a associação do Mn(II) a NOR levou a um aumento significativo da atividade antibacteriana apenas com a bactéria *S. typhi* e com o fungo *P. citrinum*. Por outro lado, a coordenação da SPAR ao Mn(II)

não contribuiu para um aumento significativo da atividade antibacteriana. Entretanto, aumentou em 45% a atividade antifúngica frente ao fungo *M. gypseum*.

A introdução da phen nos testes com as bactérias aumentou, em aproximadamente, 20% a inibição da *S. aureus* no complexo de Mn(II) com a NOR. Em todos os outros casos, houve um efeito inibitório semelhante. No estudo com os fungos, observa-se que o co-ligante não contribui para um aumento da atividade, sendo que com os fungos *P. citrinum*, *C. cladosporioides* e *M. gypseum*, a atividade antifúngica diminui consideravelmente.

7. CONCLUSÕES

Nesse trabalho, as fluorquinolonas norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFLO), levofloxacin (LEVO) e esparfloxacin (SPAR) foram complexadas aos íons metálicos Zn(II), Mn(II) e Au(III) para, posteriormente, testar as atividades anti-parasitária, antibacteriana e antifúngica, testar a citotoxicidade e fazer estudos espectroscópicos e de interação com alvos biológicos. Em alguns casos, usou-se também um co-ligante, 1,10-fenantrolina, com o objetivo de verificar a atividade.

A caracterização dos complexos de Au(III) indicam que, em todos os complexos, a relação metal:ligante é de 1:1. As medidas de condutividade em DMF indicam que os complexos são eletrólitos 1:1 e há dois íons cloreto coordenados ao metal. Em todos os casos, os ligantes coordenam-se ao Au(III) na forma neutra e de modo bidentado, através dos nitrogênios do anel piperazina. Portanto, podemos sugerir que os complexos são do tipo $[AuCl_2(L)]Cl$, onde L representa NOR, LEVO ou SPAR. As análises termogravimétricas dos complexos indicaram a presença de duas moléculas de água de hidratação em todos eles.

Foram relatadas também as sínteses de cinco complexos de Zn(II) com as fluorquinolonas norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFLO) e esparfloxacin (SPAR), contendo ou não o co-ligante 1,10-fenantrolina (phen). Em todos os casos, os ligantes coordenam-se ao Zn(II) na forma zwitteriônica e de modo bidentado através da carbonila cetônica e do grupo carboxila. As análises termogravimétricas dos complexos indicaram a presença de uma ou duas moléculas de água de hidratação nos complexos com a NOR. Portanto, os complexos obtidos são: $[ZnCl_2(NOR)] \cdot H_2O$ (4), $[ZnCl_2(OFLO)]$ (5), $[ZnCl_2(SPAR)]$ (6), $[ZnCl_2(phen)]$ (7) e $[ZnCl_2(NOR)(phen)] \cdot 2H_2O$ (8).

Com o íon Mn(II), foram obtidos quatro complexos com as fluorquinolonas NOR e SPAR, contendo ou não a phen. Similarmente aos complexos de Zn(II), os dados sugerem que nos complexos com a NOR e a SPAR, a relação metal:ligante é 1:1 e que há dois átomos de cloro coordenados ao metal. Em todos os casos, os ligantes coordenam-se ao Mn(II) na forma zwitteriônica e de modo bidentado através das carbonilas. As análises termogravimétricas dos complexos indicaram a presença de duas ou três moléculas de água de hidratação nos complexos com a SPAR. Portanto, os complexos obtidos são: $[MnCl_2(NOR)(H_2O)_2]$ (9),

[MnCl₂(SPAR)(H₂O)₂].3H₂O (**10**), [MnCl₂(NOR)(phen)].2H₂O (**11**) e [MnCl₂(SPAR)(phen)].3H₂O (**12**).

A atividade tripanocida das fluorquinolonas livres (NOR, OFLO, LEVO, SPAR), dos complexos de Zn(II) e Au(III), do ZnCl₂, do H₂AuCl₄, do precursor [ZnCl₂(phen)] e da droga de referência para doença de Chagas, o benzonidazol, foi testada sob as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. Nenhum dos complexos estudados apresentou atividade sob as formas amastigotas intracelulares. As fluorquinolonas NOR, OFLO, LEVO e SPAR não mostraram atividade significativa sob as formas tripomastigotas do *T. cruzi*. A associação do Zn(II) à OFLO levou a um aumento da atividade. O co-ligante phen e o precursor, [ZnCl₂(phen)], possuem atividade comparável a droga de referência. A adição da NOR ao precursor não altera a atividade tripanocida. A coordenação do Au(III) à NOR, à LEVO e à SPAR não alterou significativamente a atividade biológica do H₂AuCl₄. A adição da phen, mostrou ser uma estratégia eficaz para melhorar a atividade anti-*T. cruzi* dos complexos estudados.

A atividade citotóxica das fluorquinolonas livres (NOR, LEVO, SPAR) e dos complexos de Au(III) foi testada com as linhagens tumorais estabelecidas A20 (Linfoma murino), B16-F10 (Melanoma murino), K562 (Leucemia mielóide humana) e como células normais (controle) utilizou-se a linhagem estabelecida MCR-5 (fibroblasto de pulmão humano) e L919 (Fibroblasto de pulmão murino). Os resultados obtidos mostram que os complexos de Au(III) estudados têm atividade citotóxica superior as fluorquinolonas livres frente as linhagens tumorais e as linhagens sadias utilizadas.

Para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica das fluorquinolonas livres (NOR, OFL, SPAR), do co-ligante phen, dos complexos de Zn(II), dos complexos de Mn(II), do precursor de Zn(II) {[ZnCl₂(phen)]} e dos sais dos íon metálicos foram usados os fungos *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger*, *Microsporum gypseum* e as bactérias *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*. Os resultados mostraram que apenas a coordenação da NOR e da phen ao Zn(II) levou a um aumento significativo da atividade com a bactéria *S. typhi*. Em nenhum dos outros casos, a coordenação da OFLO e da SPAR ao Zn(II) contribuiu para um aumento da atividade antibacteriana. No estudo com os fungos,

observou-se um aumento significativo da inibição do fungo *M. gypseum*, após a complexação com a SPAR, e do fungo *A. niger*, após a adição do co-ligante phen.

Em seguida, foram feitos estudos de investigação dos possíveis mecanismos de ação dessas drogas, com estudos de interação dos complexos com o ácido desoxirribonucléico (DNA), a albumina bovina (BSA) e/ou a albumina humana (HSA).

Inicialmente, foram feitos estudos de interação entre os complexos de Zn(II) com a NOR e a dupla hélice do DNA com o objetivo de verificar a existência de interações e tentar compreender a natureza e a intensidade das mesmas (K_b). A interação da NOR livre e do precursor $[ZnCl_2(phen)]$ (phen = 1,10-fenantrolina) também foi estudada para efeito de comparação. Investigou-se, ainda, a interação do DNA com a LEVO, a SPAR e os complexos de Au(III). O estudo da interação das fluorquinolonas e seus complexos de Zn(II) e Au(III) com o DNA é importante visto que os possíveis alvos de ação das drogas anti-*T.cruzi* podem incluir o DNA-mitocondrial ou DNA nuclear do parasito. Além disso, na terapia anticâncer, os agentes quimioterápicos interagem diretamente com o DNA. Constatamos que os compostos estudados interagem com o DNA com constantes que variam entre 10^3 e 10^4 L mol⁻¹, via intercalação.

Fármacos com o pK_a fora do intervalo 6-8 podem ser ionizados e pouco absorvidos através da membrana das células. Portanto, a atividade biológica dos complexos de Zn(II) com a NOR depende diretamente de suas constantes de ionização (pK_a). Utilizando espectroscopia de fluorescência, foram calculados os valores de pK_a do grupo ácido (grupo carboxila) e do grupo básico (amino) destes compostos. A coordenação do Zn(II) diminui o valor de pK_1 da NOR, consideravelmente. Porém, pouco afetou o pK_2 . Provavelmente, isto ocorreu devido à coordenação da NOR ao metal ter ocorrido pelo grupo carboxílico. Quando o Zn(II) está coordenado à NOR e phen, observa-se uma diminuição dos dois valores de pK_a , em relação à fluorquinolona livre com valores no intervalo de 6,3 - 8,6.

Neste trabalho, estudou-se a interação entre os complexos de Zn(II) e Au(III) de norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) e esparfloxacin (SPAR) com a albumina bovina (BSA) para verificar a existência de interações e tentar compreender a natureza e a intensidade das mesmas. A BSA é carregada negativamente no pH 7 e sofre mudanças conformacionais no intervalo de pH 4 e 8. Portanto, a associação de centros carregados positivamente à fármacos pode contribuir com uma maior interação droga-BSA. A interação da NOR, LEVO e SPAR livres e do precursor $[ZnCl_2(phen)]$, também foi estudada para efeito de comparação. As

fluorquinolonas e complexos estudados interagem com a proteína com constantes que variam entre 10^4 e 10^5 L mol⁻¹. Considerando os complexos estudados e resultados obtidos, a coordenação dos íons metálicos Zn(II) e Au(III) pode facilitar o mecanismo de ação dos ligantes livres, exceto para o complexo de Au(III) com a LEVO. A magnitude das constantes de supressão dinâmica calculadas para a NOR, LEVO, SPAR e seus complexos de Zn(II) e Au(III) com a BSA indica que o mecanismo não ocorre inteiramente por difusão e há uma interação mais específica albumina-droga. Quando o mecanismo de interação não requer difusão, através do meio, o processo é mais eficiente.

Por último, estudou-se a interação entre os complexos de Mn(II) a HSA. Esta proteína é a mais abundante nos sistemas circulatórios, possuem diversas funções fisiológicas e desempenham um papel extremamente importante no transporte de fármacos. Os resultados indicam que os complexos de Mn(II) interagem com a HSA através do mecanismo estático, o qual é o resultado da formação de um complexo entre os dois na região hidrofóbica da biomolécula. Além disso, as forças de dispersão de London e as ligações de hidrogênio desempenham um papel importante no processo de ligação destes complexos com a HSA.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAGAM, A. e BLEANEY, B. **Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions**. Clarendon Press, Oxford, 1970.
- ALMEIDA, V.L. de *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, n.1, p. 118-129, 2005.
- APPELBAUM, P.C. e HUNTER, P.A. The fluoroquinolones: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p. 5-15, 2000.
- BARBOSA, J. *et al.* Electrophoretic behaviour of quinolones in capillary q electrophoresis. Effect of pH and evaluation of ionization constants. **Journal of Chromatography A**, v.839, p. 183-192, 1999.
- BATISTA, D.G.J. *et al.* Co(II), Mn(II) and Cu(II) complexes of fluoroquinolones: synthesis, spectroscopical studies and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. **Polyhedron**, v. 16, p. 1718-1725, 2011.
- BERNERS-PRICE, S.J. The mitochondrial cell death pathway as a target for gold and other metal-based antitumour compounds. In: **ICBIC XIII**, 2007, Vienna, Austria.
- BUCK, S.T.G. **Relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em terapia fotodinâmica**. 2009. 93 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2009.
- CAMOZZATO, A.C. e CAMPOS, V. Quinolonas: gênese e propriedades terapêuticas da terceira geração. **Revista Brasileira de Medicina**, v.56, n.5, p. 386-400, 1999.
- CARDOSO, C.R. **Complexos de metais de transição para o desenvolvimento de novas drogas neuroativas**. 2010. 107 p. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil, 2010.
- COFFINO, A.R. e PEISACH, J. Simulation of Mn(II) EPR Spectra Using a Full Spin-Hamiltonian Approach. **Journal of Magnetic Resonance- Series B**, v. 111, p. 127-134, 1996.
- CORTÁZAR, T.M. *et al.* Leishmania panamensis: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 4, p. 475-482, 2007.

- COSSU, F. *et al.* Cytotoxic activity of some gold(III) complexes. **Journal Farmaco (Societa Chimica Italiana: 1989)**, v.49, p. 301-302, 1994.
- COTRIM, C.A. *et al.* Síntese, caracterização e estudos de interação de um análogo da antitoxina CcdA empregando fluorescência no estado estacionário. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 841-845, 2010.
- COX, P.J. *et al.* Characterization and DNA-interaction studies of 1,1-dicyano-2,2-ethylene dithiolate Ni(II) mixed-ligand complexes with 2-amino-5-methyl thiazole, 2-amino-2-thiazoline and imidazole. Crystal structure of [Ni(i-MNT)(2a-5mt)(2)], **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.17, p. 6054–6062, 2009.
- DHAR, S. *et al.* Effect of charge transfer bands on the photo-induced DNA cleavage activity of [1-(2-thiazolylazo)-2-naphtholato]copper(II) complexes, **Journal Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 805-812, 2005.
- DE SOUZA, P. H. M. **Estudos eletroquímicos de complexos de Cu(II) de antibióticos da classe das fluorquinolonas**. 2011. 99 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil, 2011.
- DEACON, G.B. e PHILLIPS, R.J. Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 33, p. 227-250, 1980.
- DIAS, L.C. e DESSOY, M. A. Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v.32, n.9, p. 2444-2457, 2009.
- DOROFEEV, V.L. Infrared spectra and the structure of drugs of the fluoroquinolone group. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.38, p. 693-697, 2004.
- DUDEV, T e LIM, C. Tetrahedral vs Octahedral Zinc Complexes with Ligands of Biological Interest: A DFT/CDM Study. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 122, p. 11146-11153, 2000.
- EMAMI, S. *et al.* Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.3, p. 123-136, 2005.
- FERREIRA, E.S. **Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**. 2009. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2009.
- FIRDAUS, F. *et al.* Template synthesis and physicochemical studies of 14-membered hexaazamacrocyclic complexes with Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II): a comparative spectroscopic approach on DNA binding with Cu(II) and Ni(II) complexes. **Transition Metal Chemistry**, v.33, p. 467-473, 2008.

- FRAGA, C.A.M. Razões da atividade biológica: Interações micro- e biomacro-moléculas. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, p. 3-42, 2001.
- GABBIANI, C. *et al.* Gold(III) compounds as anticancer drugs. **Journal Gold Bulletin**, v. 40, n. 1, p. 73-81, 2007.
- GAO, F. *et al.* Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Novel Fe(III), Co(II), and Zn(II) Complexes with Norfloxacin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 60, p. 61-67, 1995.
- GEARY, W.L. The use of conductivity measurement in organic solvent for the characterization of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v.7, p. 81-122, 1971.
- GIOVAGNINI, L. *et al.* Gold(III) dithiocarbamate complexes induce cell death triggered by thioredoxin redox system inhibition, mitochondrial permeability increase, and activation of ERK pathway. In: **ICBIC XIII**, 2007, Vienna, Austria.
- GÓES FILHO, L. da S. **Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio: espectroscopia de absorção e fluorescência**. 2005. 84 p. Dissertação (Mestrado em Física) – Pontífca Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.
- GUIZADO, T.R.C.G. **Estudos computacionais da interação de porfirinas e seus complexos de ferro com albumina sérica humana**. 2008. 111 p. Dissertação (Mestrado em Física) – Pontífca Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.
- HAMZAH, J. *et al.* In vitro antimalarial activity of trovafloxacin, a fourth-generation fluoroquinolone. **Acta Tropica**, v.74, n.1, p. 39-42, 2000.
- HAWTIN, R.E. *et al.* Voreloxin Is an Anticancer Quinolone Derivative that Intercalates DNA and Poisons Topoisomerase II. **Journal Plos One**, v. 5, n. 5, p. 1-10, 2010.
- HABIB, A. *et al.* Cyclic voltammetric studies of copper and manganese in the presence of L-leucine using glassy carbon electrode. **Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 96-102, 2006.
- HUHEEY, J.E. *et al.* **Inorganic Chemistry**. Nova York: Harper Collins College Publishers, 1993. 964p.
- JAYABHARATHI *et al.* Fluorescence investigation of the interaction of 2-(4-fluorophenyl)-1-phenyl-1H-phenanthro[9,10-d] imidazole with bovine serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 117, p. 222–227, 2012.
- KAMAT, B.P. Study of the interaction between fluoroquinolones and bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 1046–1050, 2005.

- KOSTOVA, I. Gold coordination complexes as anticancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 19-32, 2006.
- LAKOWICZ, J.R. e WEBER, G. Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules, **Biochemistry**, v.12, p. 4161–4170, 1973.
- LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Nova York: Springer, 2004.
- LESCHER, G.Y. *et al.* 1,8 - Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. **Journal of Medicinal Pharmaceutical Chemistry**, v.5, p. 1063-1065, 1962.
- LIANG-CAI, YU *et al.* Syntheses and crystal structures of Zn(II) and Co(II) complexes with ofloxacin and enoxacin. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 62, n. 8, p. 1313-1319, 2009.
- LIU, R. *et al.* The Role of Electrostatic Interactions in Human Serum Albumin Binding and Stabilization by Halothane. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 39, p. 36373–36379, 2002.
- LUCASSEN, G.W. *et al.* Band Analysis of Hydrated Human Skin Stratum Corneum Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectra *In Vivo*. **Journal of Biomedical Optics**, v.3, p. 267-280, 1998.
- LUIZ, F.C.L. **Estudos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo de anestésicos locais e de antibióticos da classe das fluoroquinolonas**. 2009. 154 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Física) – Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2009.
- LUIZ, F.C.L. *et al.* Fluorescence Studies of gold(III)-Norfloxacin Complexes in Aqueous Solutions, **Journal of Fluorescence**, v.21, p. 1933-1940, 2011.
- MARTINS, D.A. *et al.* Copper(II)–fluoroquinolone complexes with anti-Trypanosoma cruzi activity and DNA binding ability, **Biometals**, v.25, n.5, p. 951-960.
- MEIRELLES, M.N.L. *et al.* Interaction of Tripanosoma-Cruzi with heart-muscle cells- ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. **European Journal of Cell Biology**, v. 41, p. 198-206, 1986.
- MODIA, C.K. e JANIB, D.H. Mn(III) mixed-ligand complexes with bis-pyrazolones and ciprofloxacin drug: synthesis, characterization and antibacterial activities, **Applied Organometallic Chemistry**, v. 25, p.429–436, 2011.
- MOHD, A. *et al.* Interaction and fluorescence quenching study of levofloxacin with divalent toxic metal ions, **Eurasian Journal Analytical Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 177-186, 2010.

- MONTERO, M.T. *et al.* Expression of the partition coefficients of a homologous series of 6-fluoroquinolones. **International Journal of Pharmaceutics**, v.149, p.161-170, 1997.
- NI, Y.N. *et al.* Spectrometric studies on the interaction of fluoroquinolones and bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta - Part A**, v. 75, p. 547-552, 2010.
- NOBILI, S. *et al.* Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, n. 3, p. 550--580, 2010.
- OLIVEIRA, C. J. dos S. **Caracterização de ácidos fúlvicos extraídos de resíduos reciclados para atividades agrícolas**. 2000. 283 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Lisboa, Portugal, 2000.
- PARAGINSKI, G.L. **Triazenos: Clivagem do DNA, atividade antibacteriana e toxicidade frente à *Artemia salina* LEACH**. 2007. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, 2007.
- PEREZ-GUAITA, D. *et al.* Copper(II) influence on flumequine retention in soils: macroscopic and molecular investigations. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 357, p. 453-459, 2011.
- PERRIN, D.D. e DEMPSEY, B. **Buffers for pH and Metal Ion Control**. Chapman and Hall, New York, capítulo 3, p. 48-49, 1974.
- REFAT, M.S. Synthesis and characterization of norfloxacin-transition metal complexes (group 11, IB): Spectroscopic, thermal, kinetic measurements and biological activity. **Spectrochimica Acta**, Part A, v.68, p.1393–1405, 2007.
- REIS, M. Farmacogenética aplicada ao câncer. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.39, n. 4, p. 577-586, 2006.
- ROCHA, D. P. *et al.* Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v.34, n.1, p. 111-118, 2011.
- ROMANOWSKI, S. M. de M. *et al.* Synthesis, Characterization, EPR Spectroelectrochemistry Studies and Theoretical Calculations of Manganese(II) Complexes with the Ligands H₃bpeten and H₃bnbpeten. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 21, n. 5, p. 842-850, 2010.
- ROSS, P.D. e SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, p. 3096 - 3102, 1981.
- SADEEK, S.A. Synthesis, thermogravimetric analysis, infrared, electronic and mass spectra of Mn(II), Co(II) and Fe(III) norfloxacin complexes. **Journal of Molecular Structure**, v.753, p. 1-12, 2005.

- SAHA, D.K. *et al.* Hydrothermal synthesis, crystal structure, spectroscopy, electrochemistry and antimycobacterial evaluation of the copper (II) ciprofloxacin complex: $[\text{Cu}(\text{cf})_2(\text{BF}_4)_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. **Inorganic Chemistry Communications**, v.5, p. 1022-1027, 2002.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. Ed. New York: Cold Spring Laboratory, 9.16-9.23, 1989.
- SANTOS, W.G. **Estudo de transferência de energia eletrônica entre poli(p-fenilenovinileno) e corantes iônicos em solução**. 2007. 79 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Físico-química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2007.
- SÁRKÖZY, G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. **Veterinari Medicina**, v. 46, n. 9/10, p. 257-274, 2001.
- SHRIVER, D. F. *et al.* **Química Inorgânica**. São Paulo: Artmed Editora S.A., 2008. 847p.
- SILVA, R.S. **Complexos de Mn(II) e Co(II) de tiossemicarbazonas e fluorquinolonas: sínteses, estudos das propriedades espectroscópicas e eletroquímicas e testes de atividade biológica**. 2009. 85p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil, 2009.
- SILVA, J.M.B. da e HOLLENBACH, C.B. Fluoroquinolonas x resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n. 2, p.363-369, 2010.
- SKYRIANOU, K.C. *et al.* Nickel–quinolones interaction. Part 1 - Nickel(II) complexes with the antibacterial drug sparfloxacin: Structure and biological properties. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p.1617-1625, 2009.
- SKYRIANOU, K.C. *et al.* Nickel–quinolones interaction. Part 3 - Nickel(II) complexes of the antibacterial drug flumequine. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, p.740-479, 2010.
- STARCEVIC, K. *et al.* Synthesis, photochemical synthesis, DNA binding and antitumor evaluation of novel cyano- and amidino-substituted derivatives of naphtho-furans, naphtho-thiophenes, thieno-benzofurans, benzo-dithiophenes and their acyclic precursors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 925-939, 2006.
- SOUSA, I.C. **Interação da Enrofloxacin com modelos biomembranares: influência das suas propriedades físicoquímicas**. 2007. 130 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Lisboa, Portugal, 2007.
- THADEPALLI, H. *et al.* Antitumor activity of trovafloxacin in an animal model. **In vivo**, v. 19, p. 269-276, 2005.

- TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. **Eletroquímica**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2005. 220 p.
- TUREL, I. *et al.* Antibacterial tests of Bismuth(III)-Quinolone (Ciprofloxacin, cf) compounds against *Helicobacter pylori* and some other bacteria. Crystal structure of $(\text{cfH}_2)_2[\text{Bi}_2\text{Cl}_{10}]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 71, p. 53-60, 1998.
- VIEIRA, L.M.M. *et al.* Platinum (II) complexes with fluoroquinolones: Synthesis and characterization of unusual metal-piperazine chelates. **Inorganic Chimica Acta**, v.369, p. 2060-2064, 2009.
- WANG, Y. *et al.* Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study, **Journal of Luminescence**, v.126, p. 211–218, 2007.
- WATSON, J.D. e CRICK, F.H.C. Molecular structure of nucleic acids. **Nature**, v. 171, n. 4355, p. 737-738, 1953.

Anexos

Espectros de Infravermelho

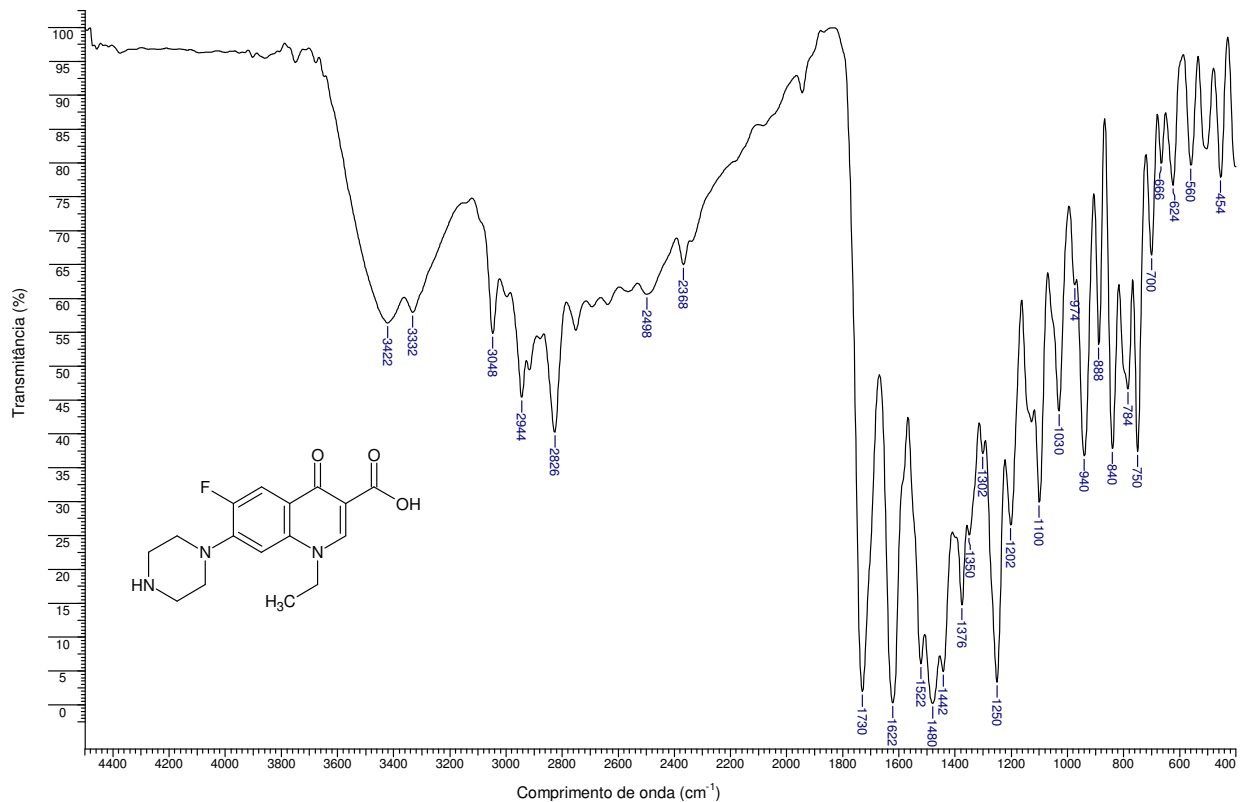


Figura A.1 - Espectro de infravermelho da norfloxacin.

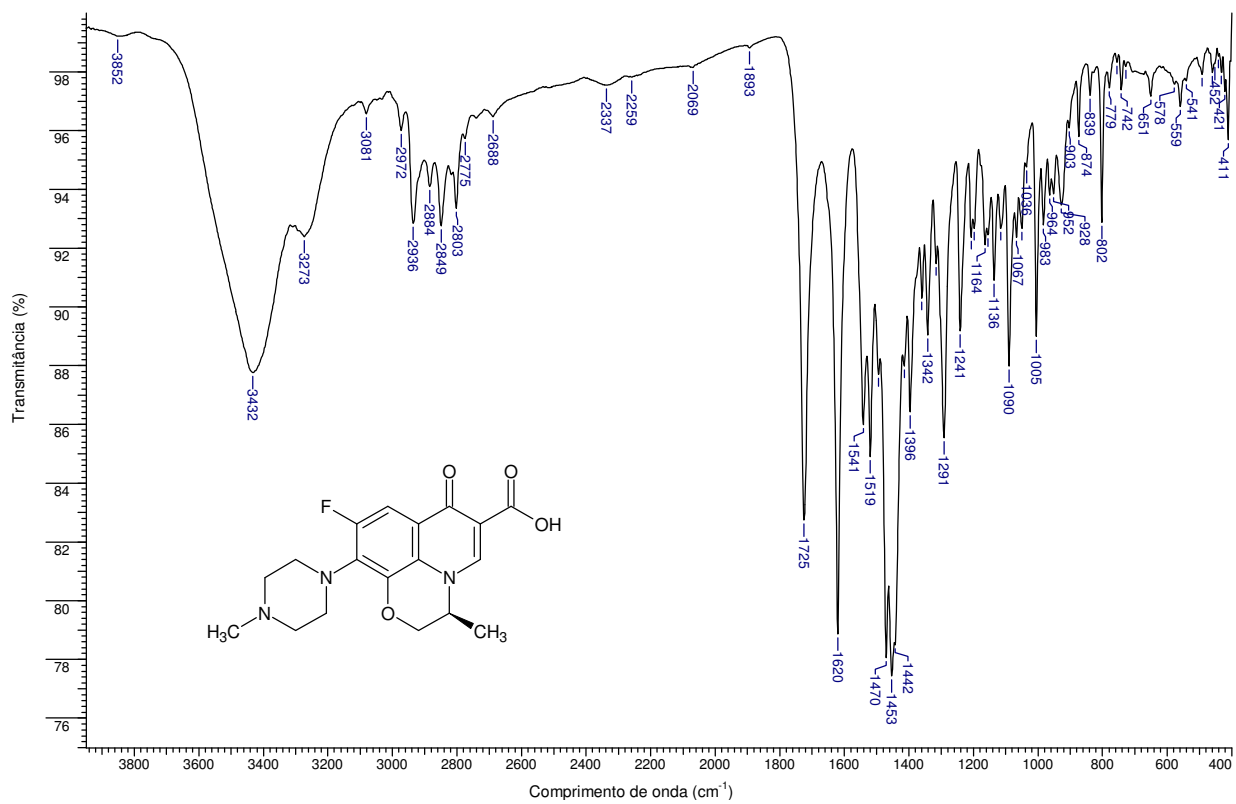


Figura A.2 - Espectro de infravermelho da levofloxacin.

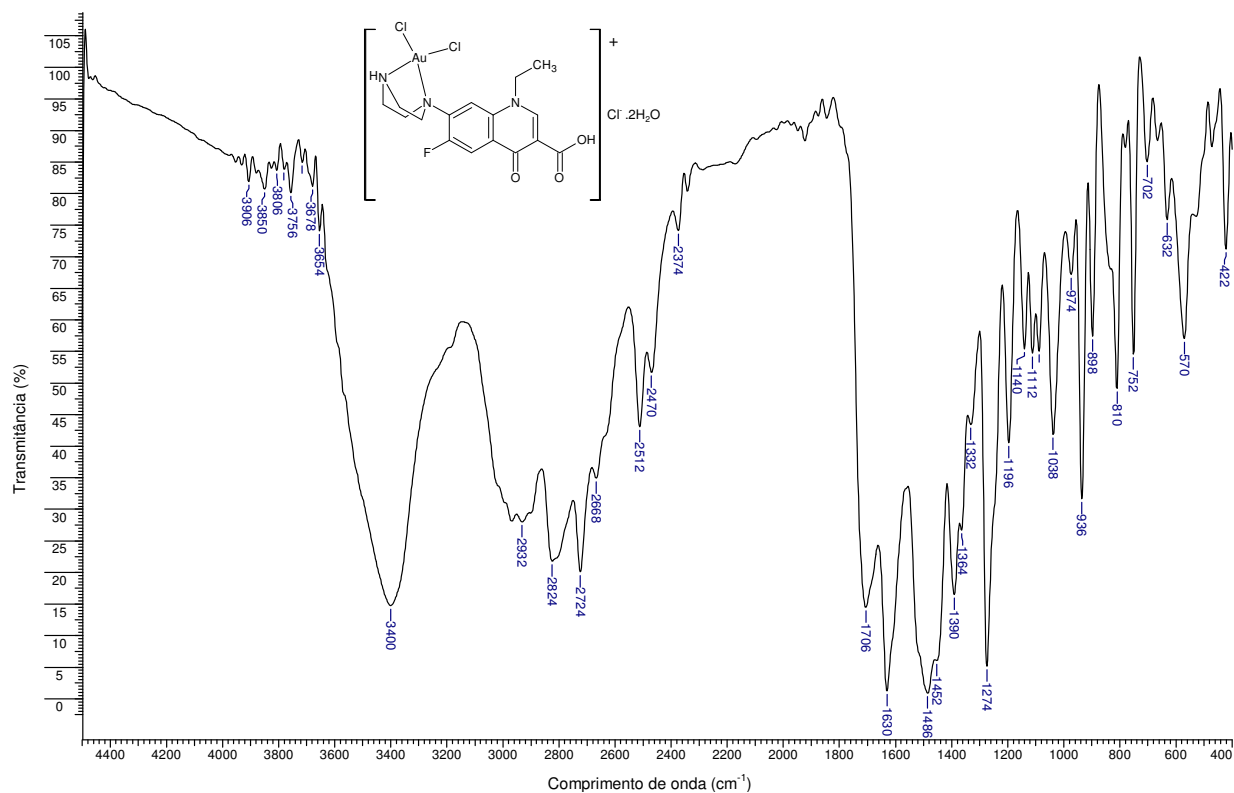


Figura A.3 - Espectro de infravermelho do complexo $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

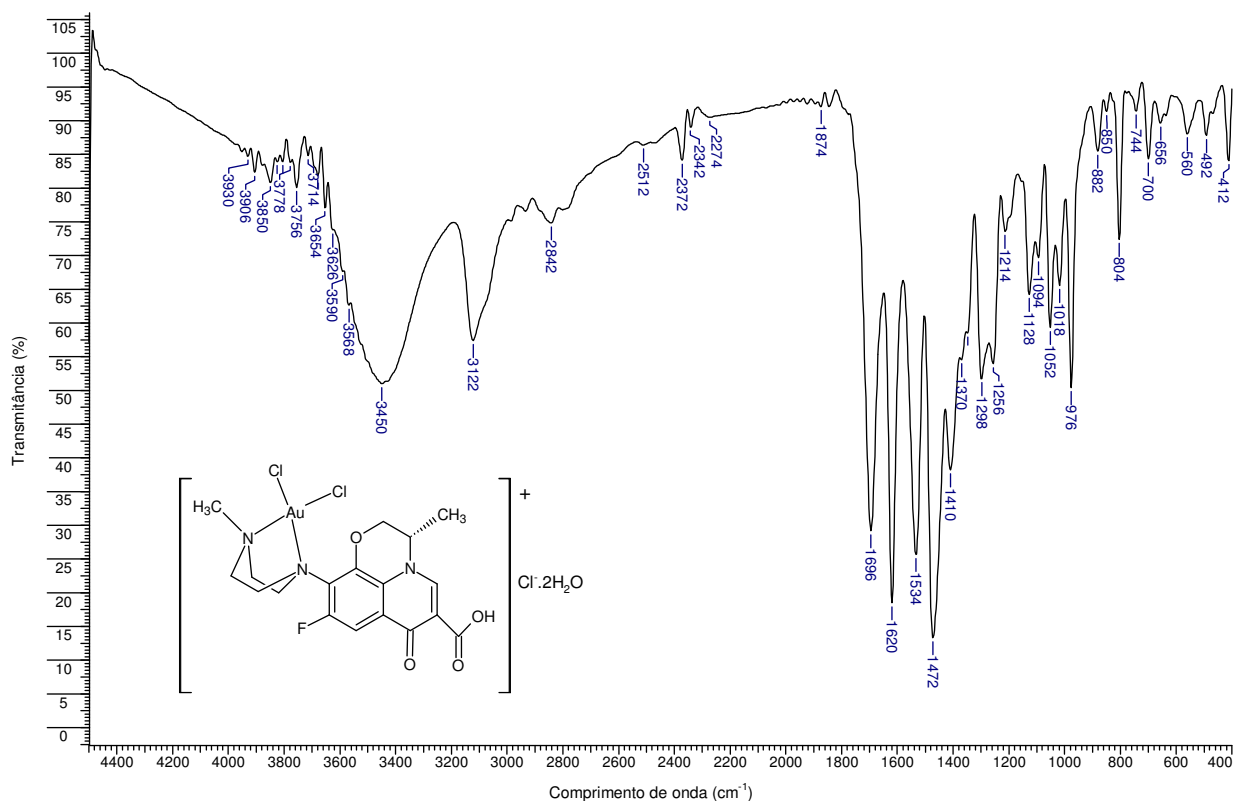


Figura A.4 - Espectro de infravermelho do complexo $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

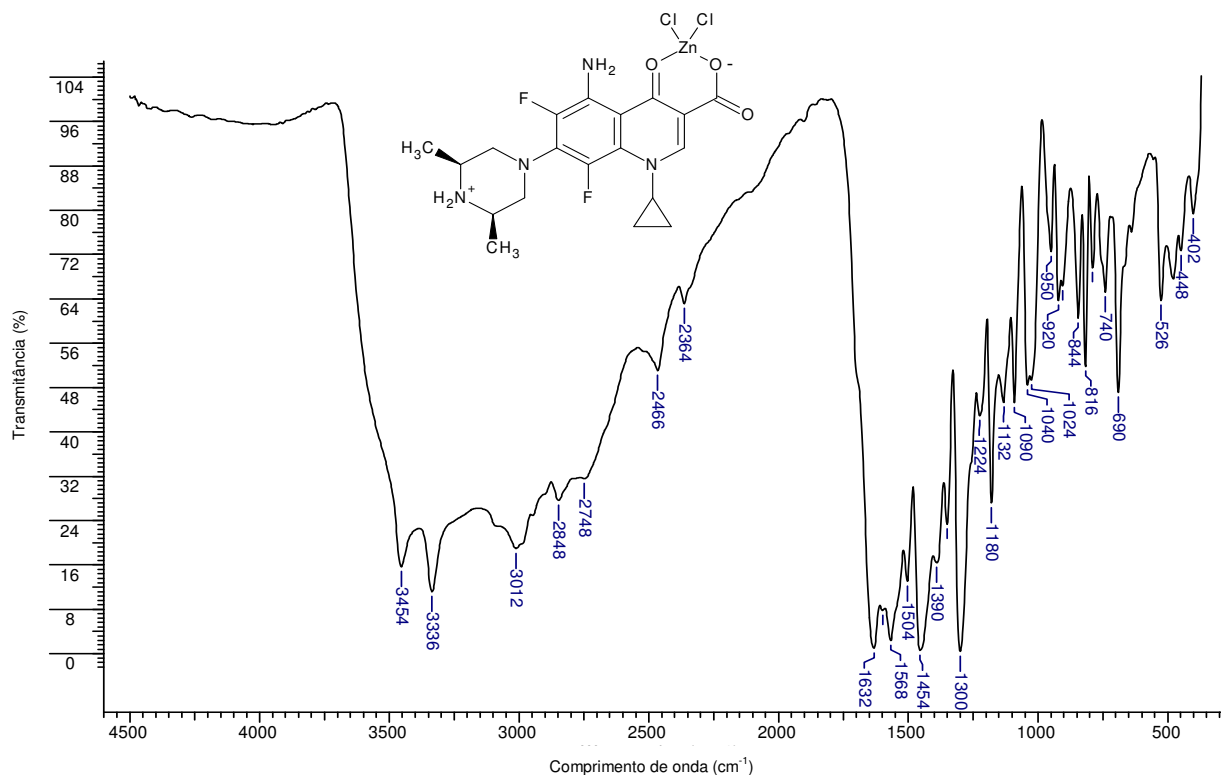


Figura A.5 - Espectro de infravermelho do complexo $[ZnCl_2(SPAR)]$.

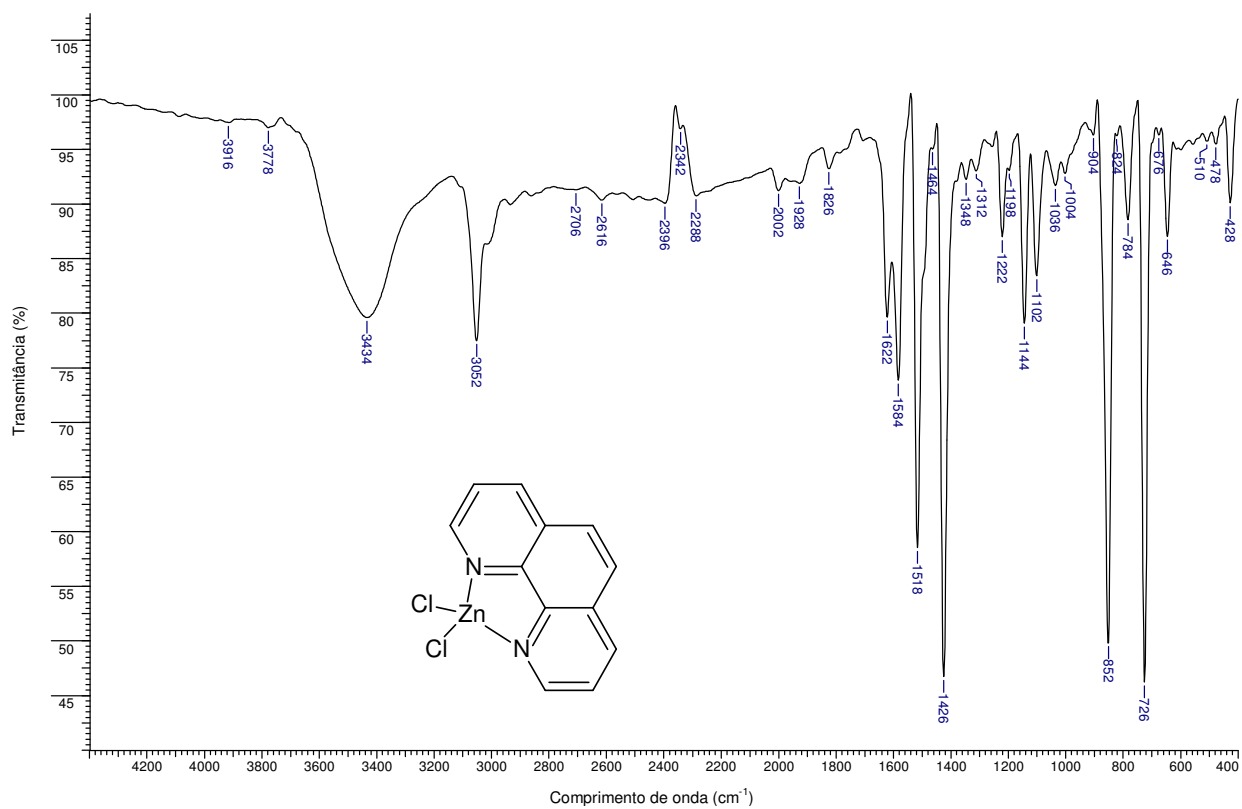


Figura A.6 - Espectro de infravermelho do precursor $[ZnCl_2(phen)]$.

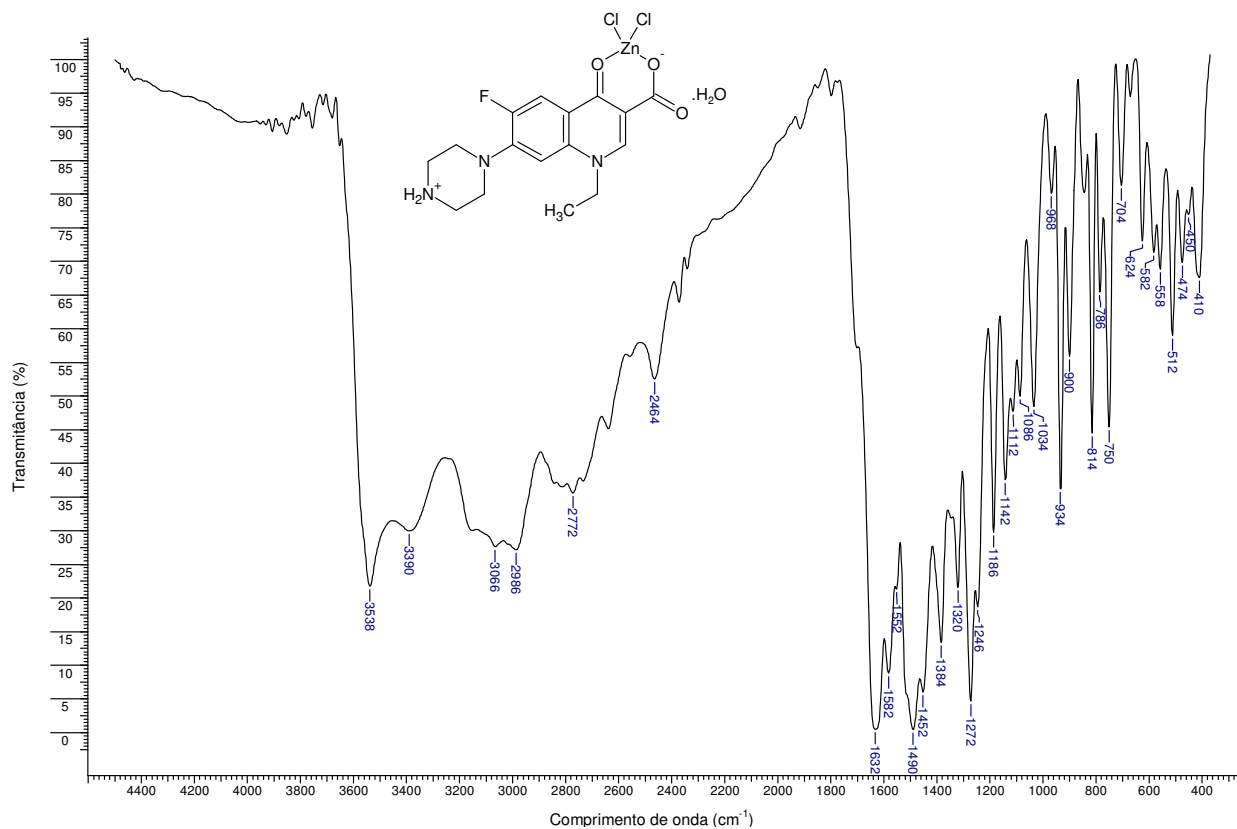


Figura A.7 - Espectro de infravermelho do complexo $[ZnCl_2(NOR)].H_2O$.

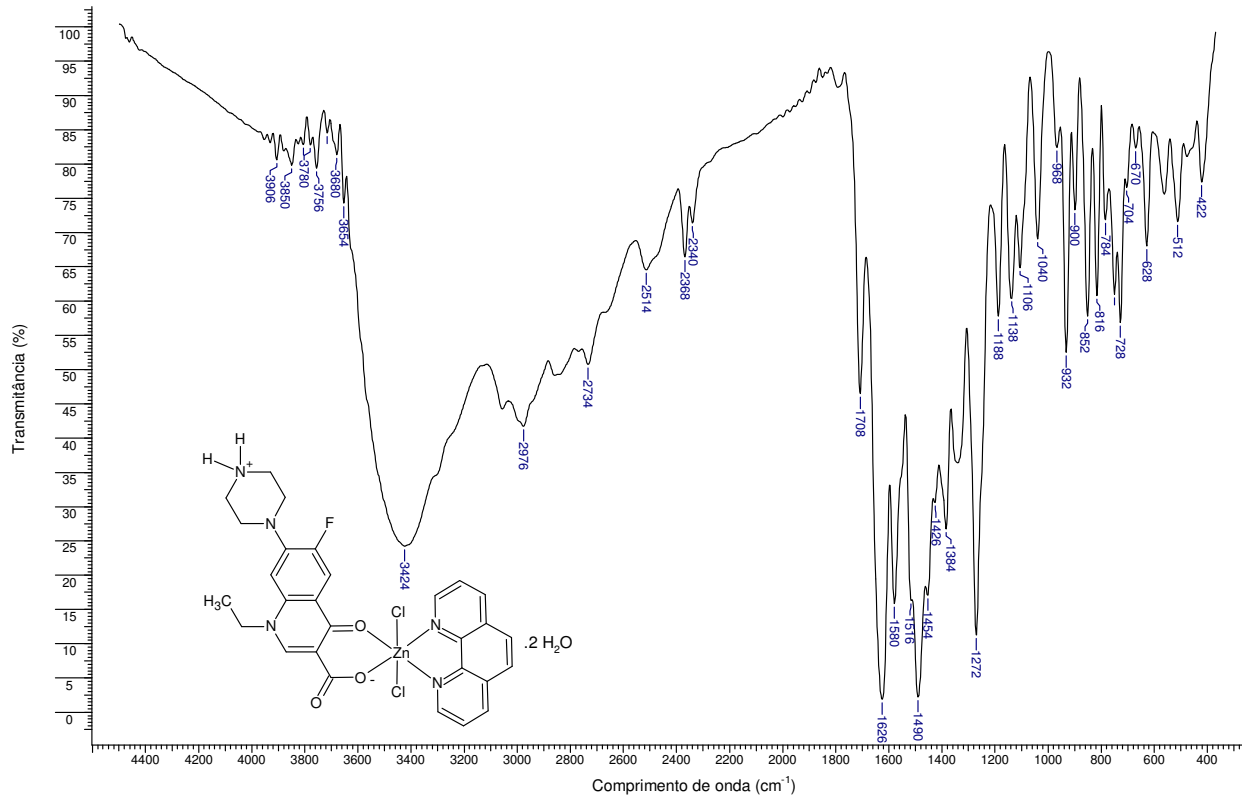


Figura A.8 - Espectro de infravermelho do complexo $[ZnCl_2(NOR)(phen)].2H_2O$.

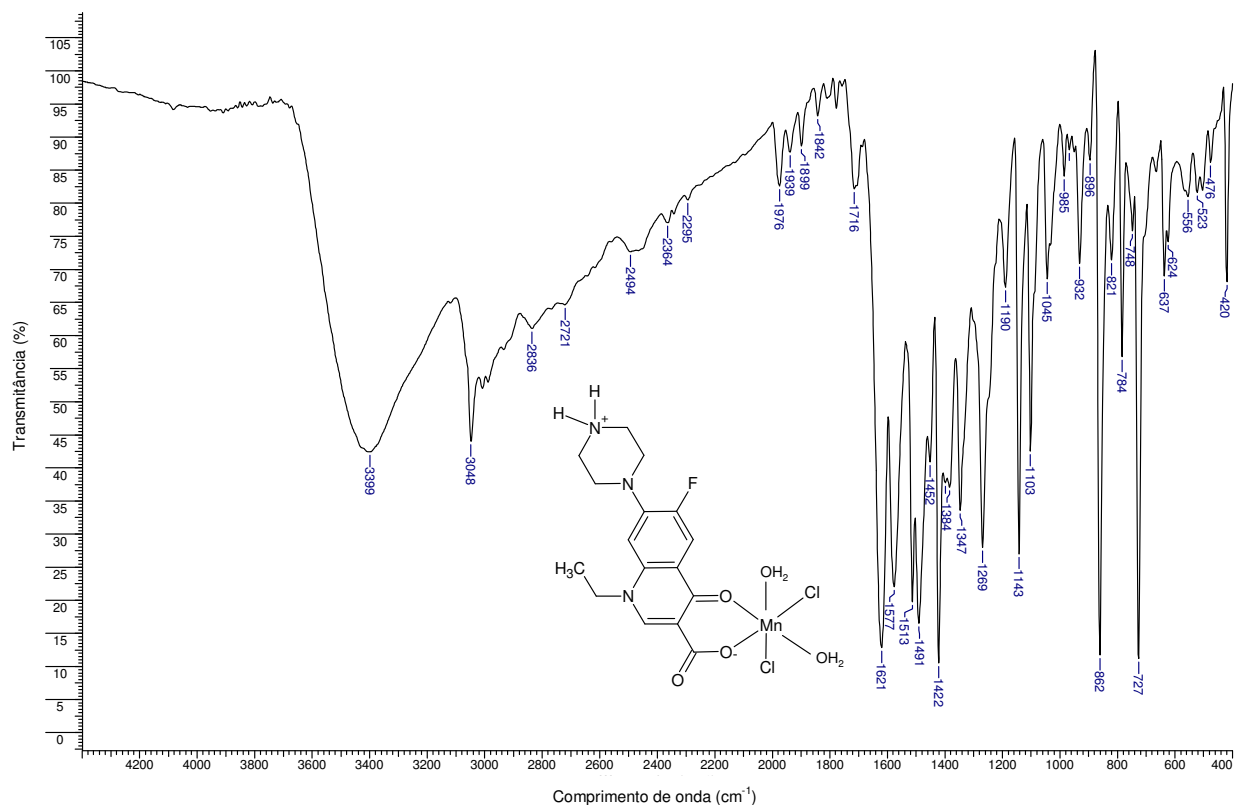


Figura A.9 - Espectro de infravermelho do complexo $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{H}_2\text{O})_2]$.

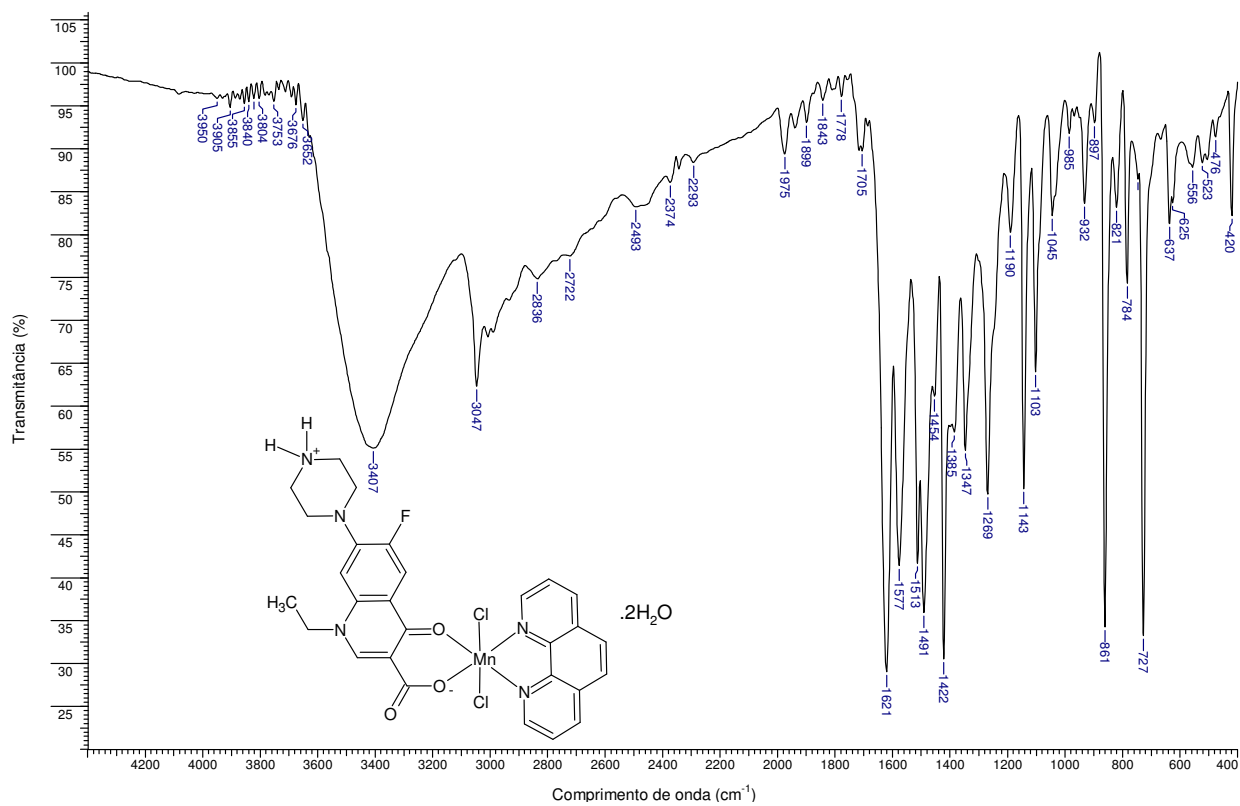


Figura A.10 - Espectro de infravermelho do complexo $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

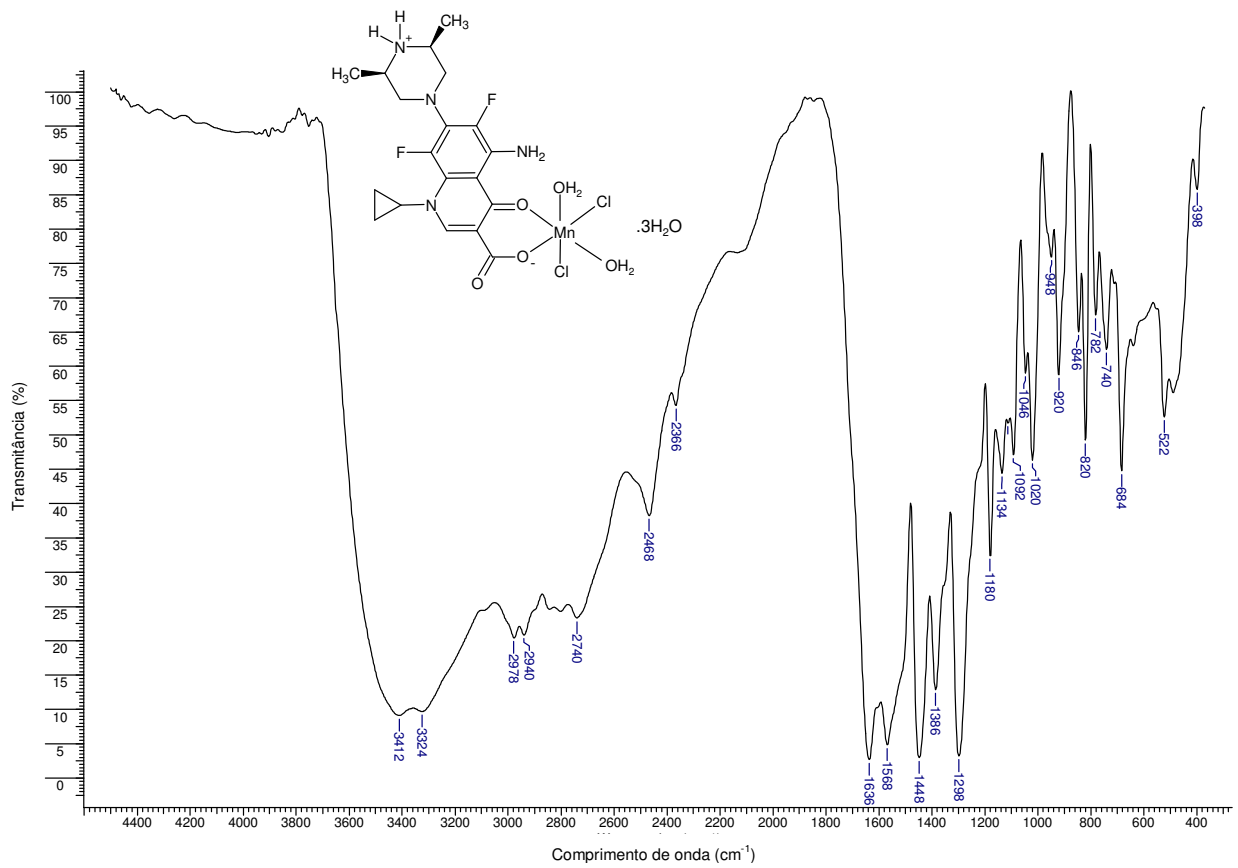


Figura A.11 - Espectro de infravermelho do complexo $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

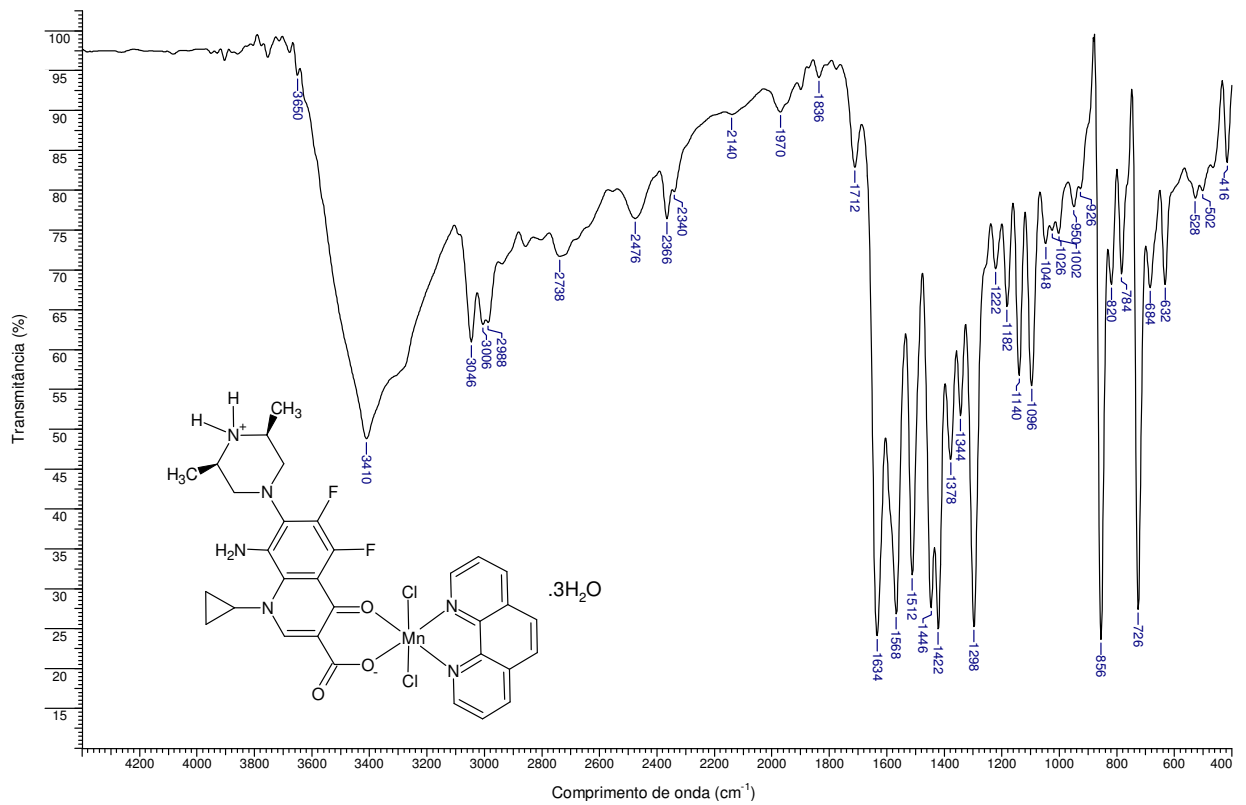


Figura A.12 - Espectro de infravermelho do complexo $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{phen})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

Curvas de TG/DTG

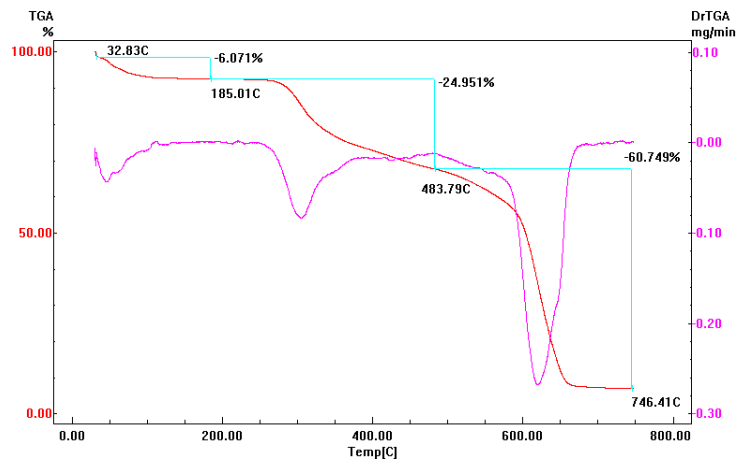


Figura A.13 - Curvas TG/DTG para o complexo $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

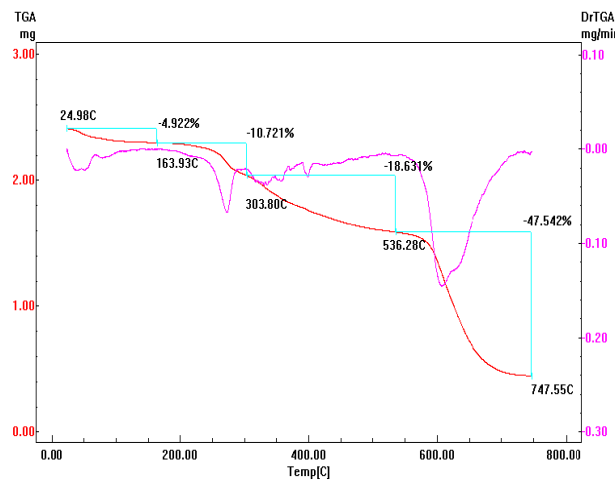


Figura A.14 - Curvas TG/DTG para o complexo $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

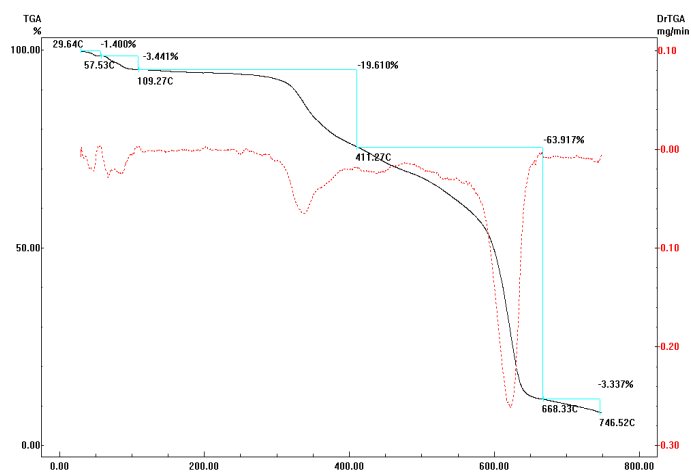


Figura A.15 - Curvas TG/DTG do complexo $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

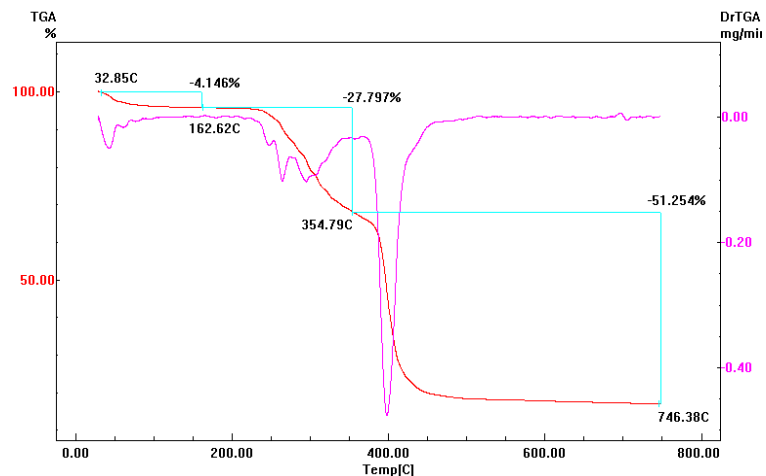


Figura A.16 - Curvas TG/DTG para o complexo $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$.

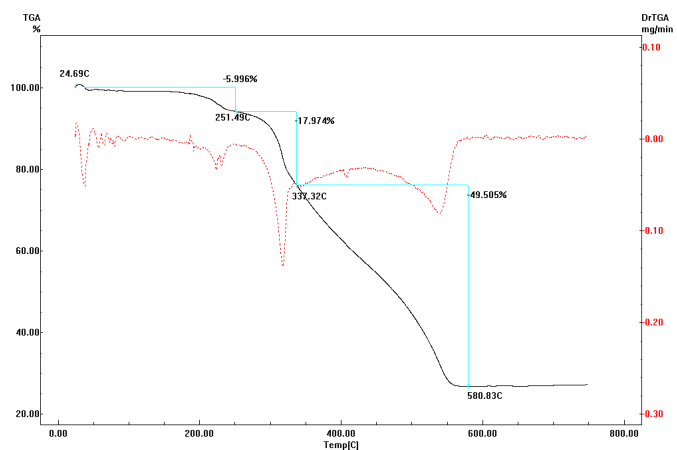


Figura A.17 - Curvas TG/DTG para o complexo $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

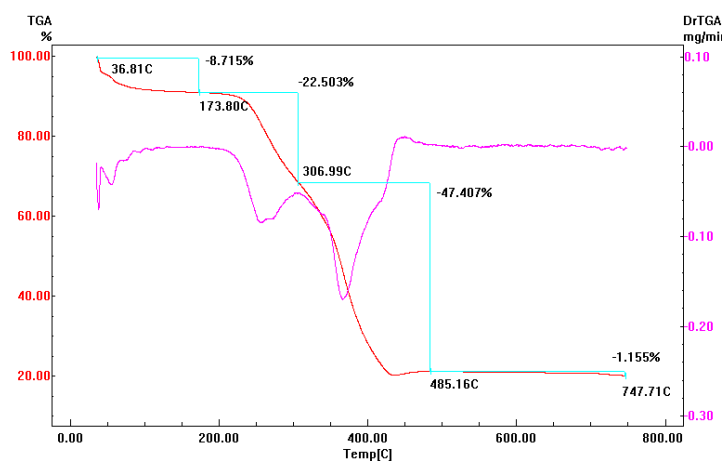


Figura A.18 - Curvas TG/DTG para o complexo $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

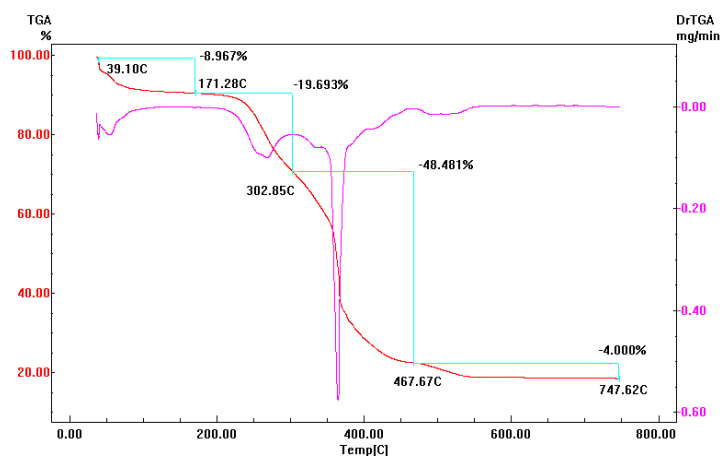


Figura A.19 - Curvas TG/DTG para o complexo $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

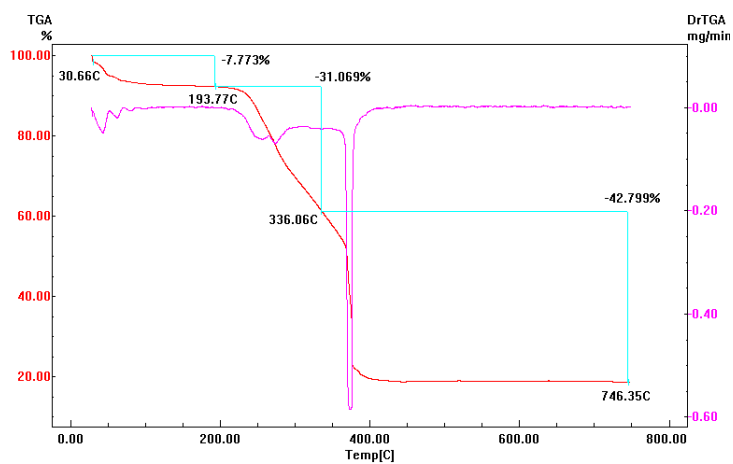


Figura A.20 - Curvas TG/DTG para o complexo $[\text{MnCl}_2(\text{SPAR})(\text{phen})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

Espectros de RMN

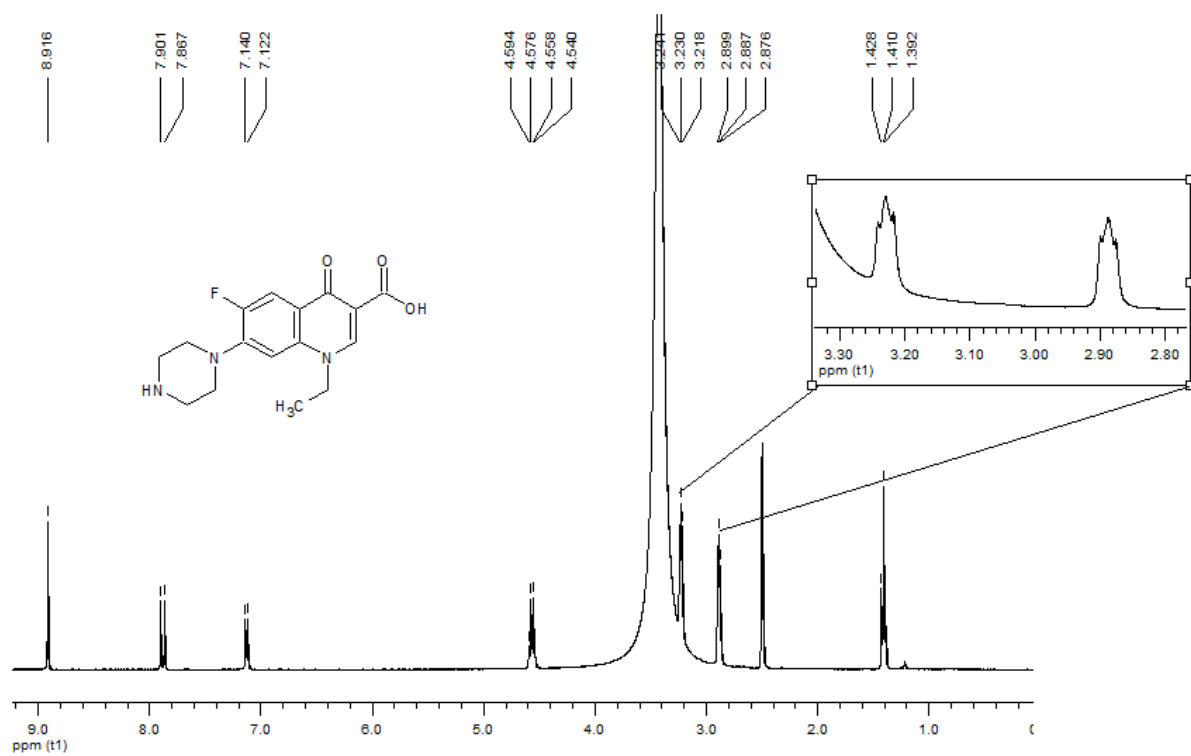


Figura A.21 - Espectro de RMN de ¹H da norfloxacin em DMSO-*d*₆, 200 MHz.

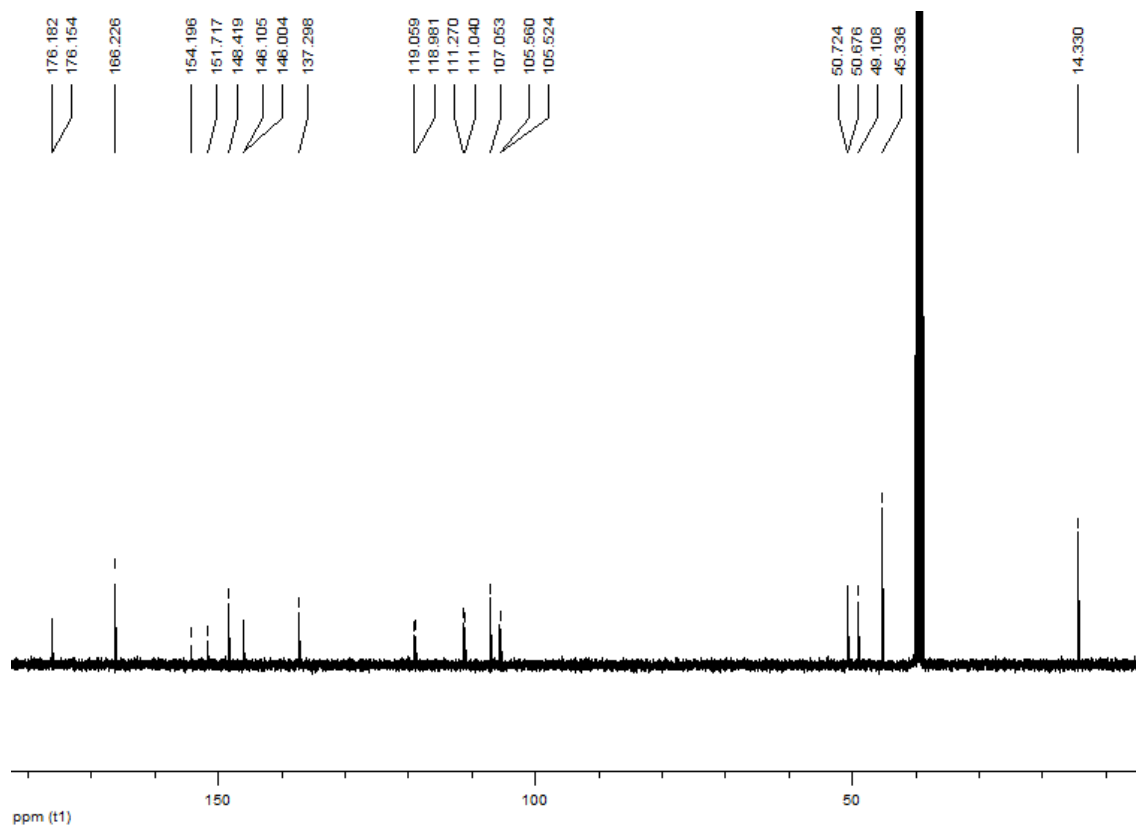


Figura A.22 - Espectro de RMN de ¹³C da norfloxacin em DMSO-*d*₆, 200 MHz.

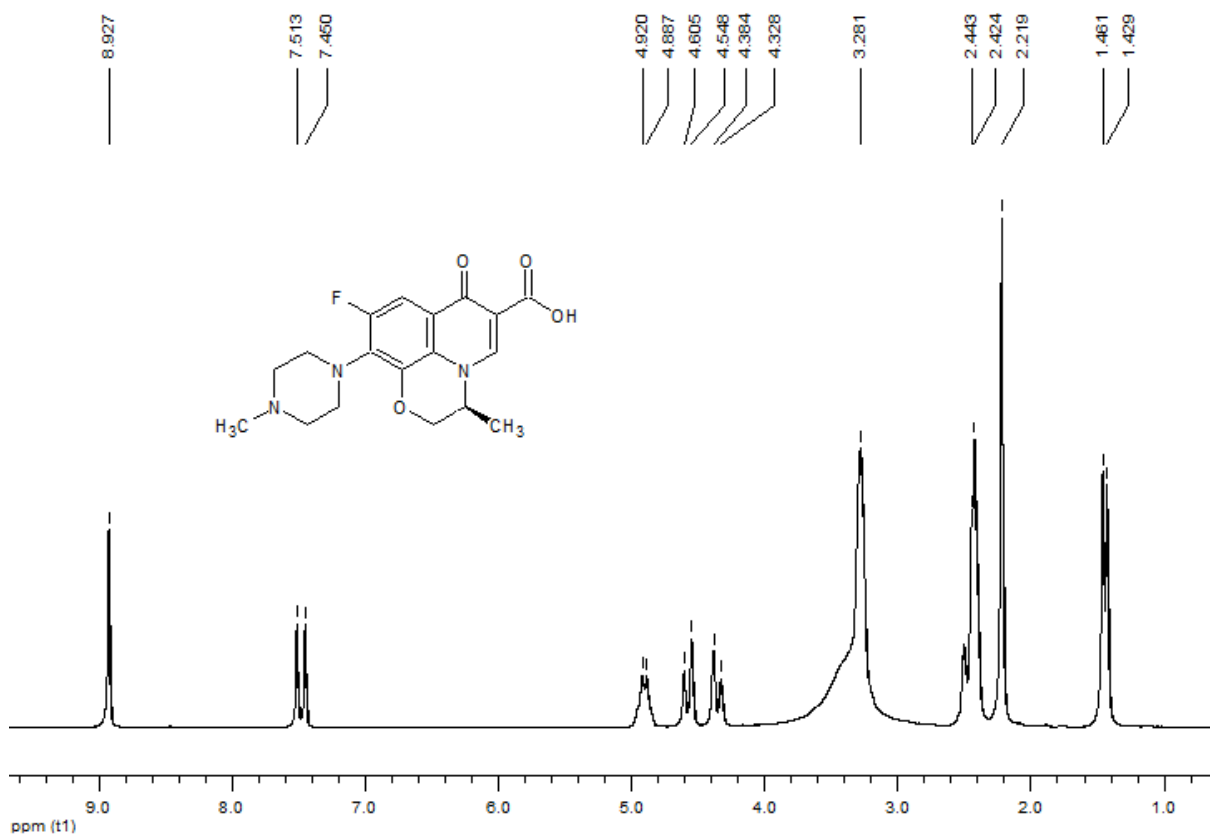


Figura A.23 - Espectro de RMN de ^1H da levofloxacin em $\text{DMSO-}d_6$, 200 MHz.

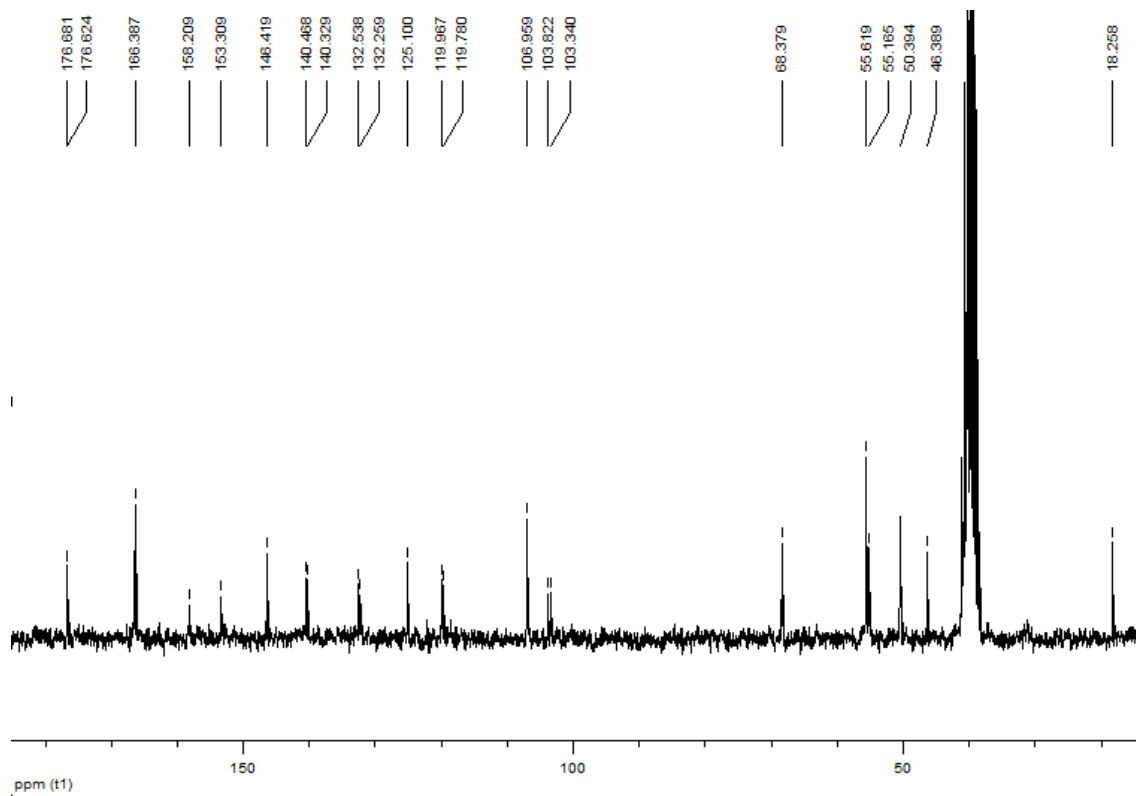


Figura A.24 - Espectro de RMN de ^{13}C da levofloxacin em $\text{DMSO-}d_6$, 200 MHz.

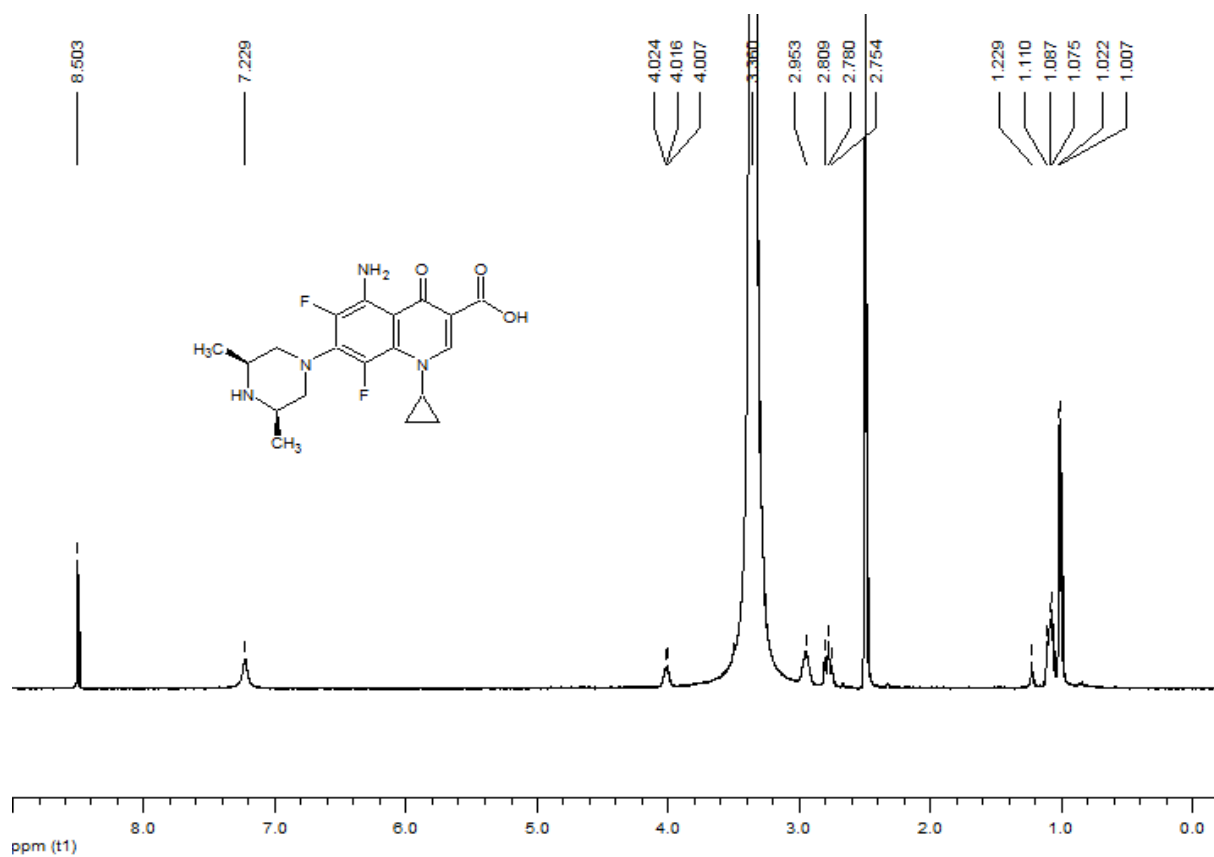


Figura A.25 - Espectro de RMN de ^1H da esparfloxacina em $\text{DMSO-}d_6$, 200 MHz.

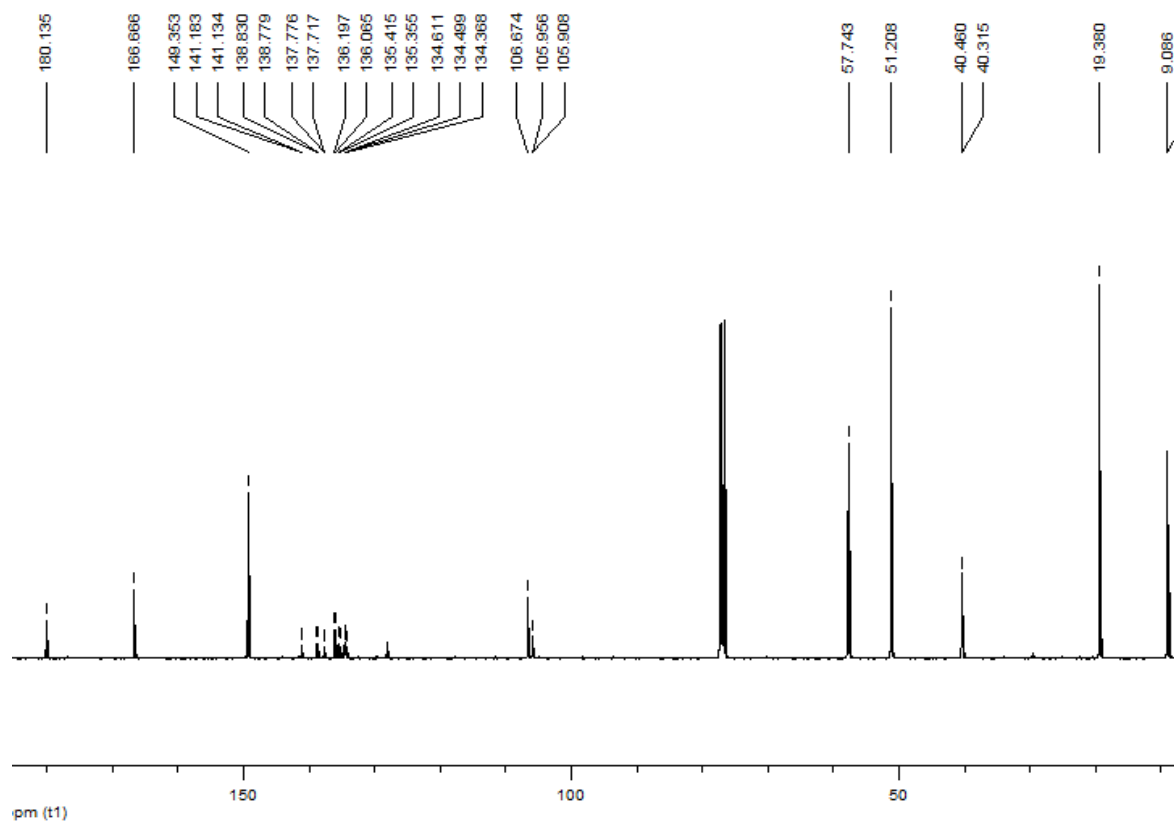


Figura A.26 - Espectro de RMN de ^{13}C da esparfloxacina em $\text{DMSO-}d_6$, 200 MHz.

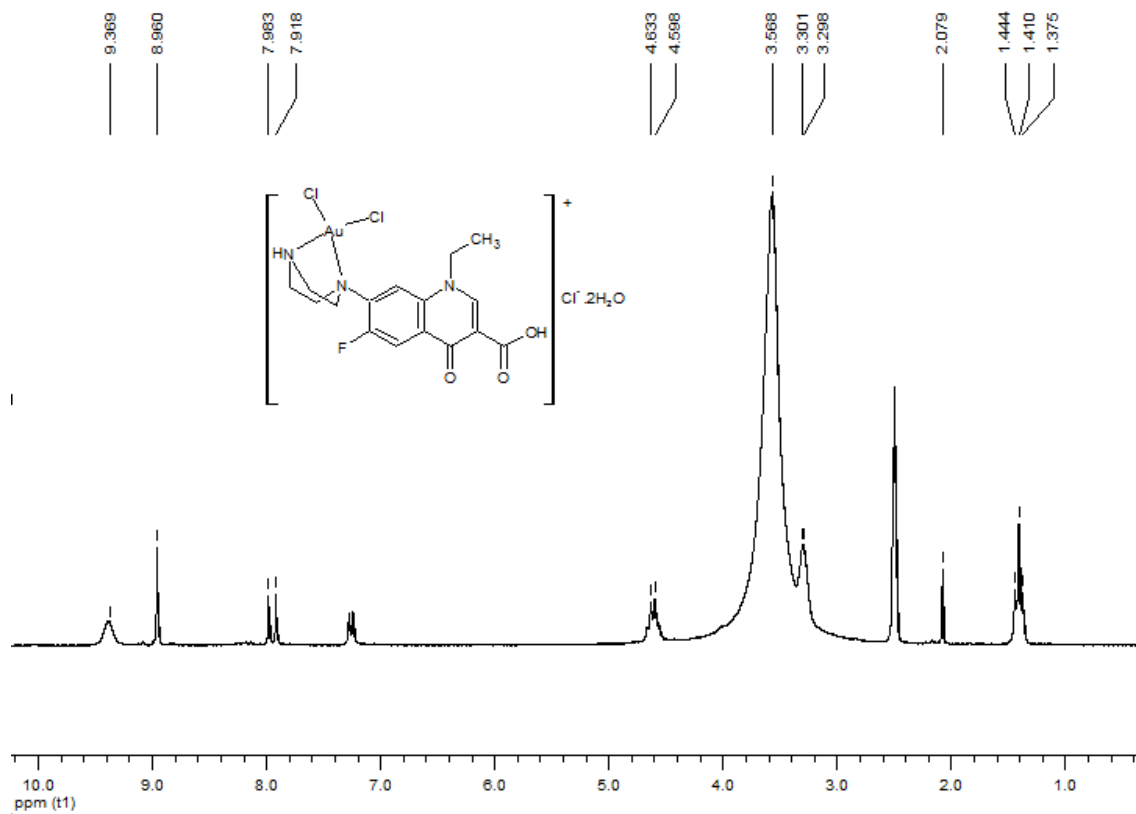


Figura A.27 - Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em $\text{DMSO-}d_6$, 200 MHz.

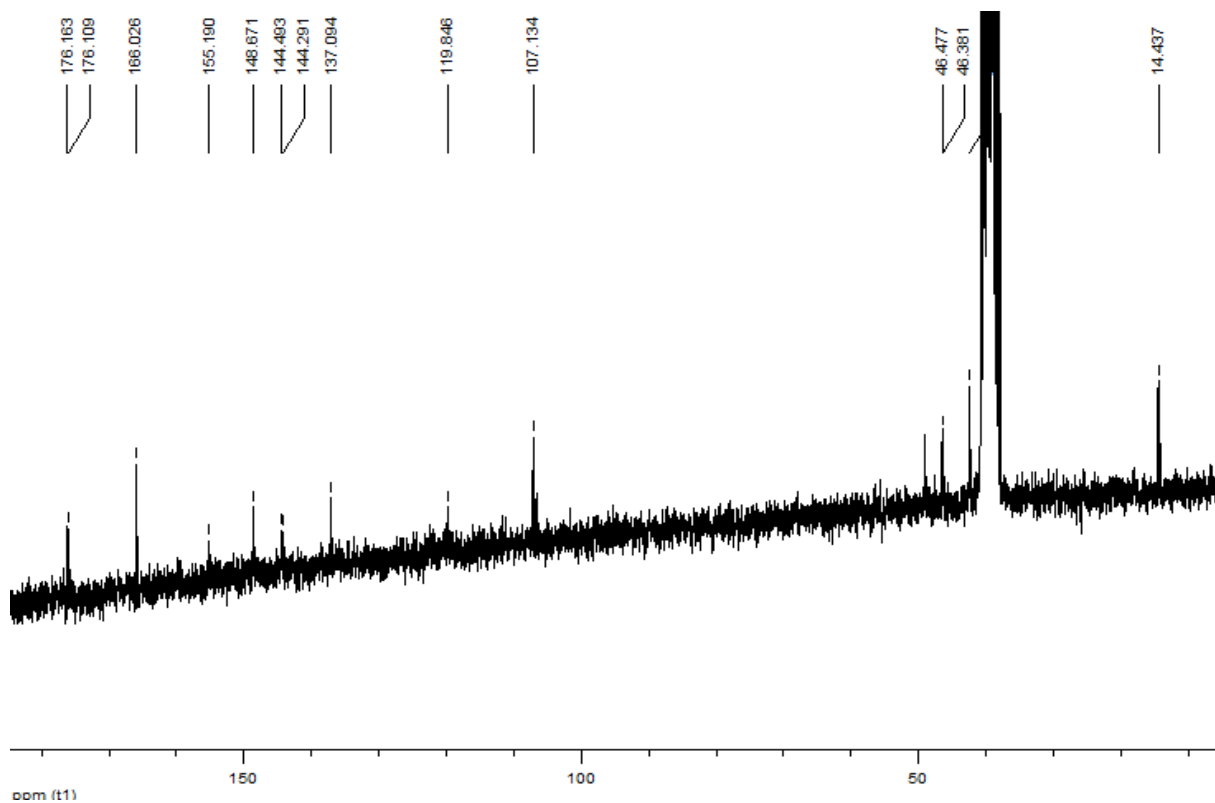


Figura A.28 - Espectro de RMN de ^{13}C do complexo $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em $\text{DMSO-}d_6$, 200 MHz.

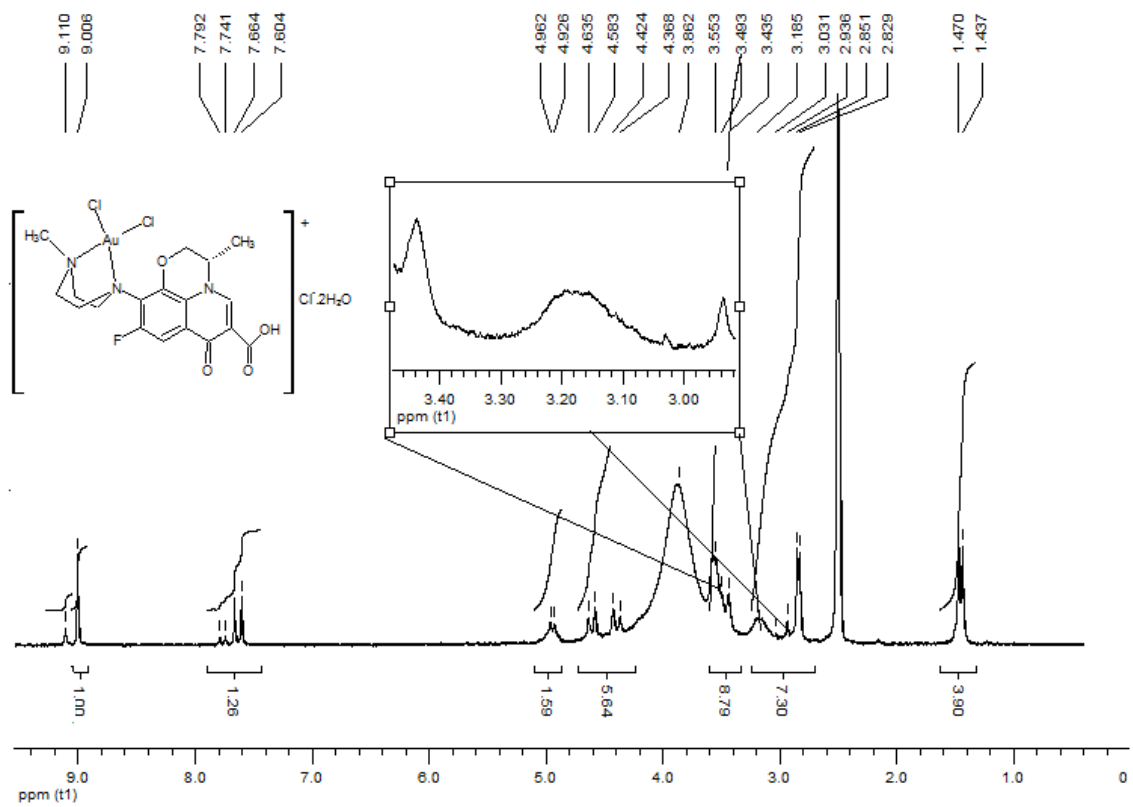


Figura A.29 - Espectro de RMN de ¹H do complexo [AuCl₂(LEVO)]Cl·2H₂O em DMSO-*d*₆, 200 MHz.

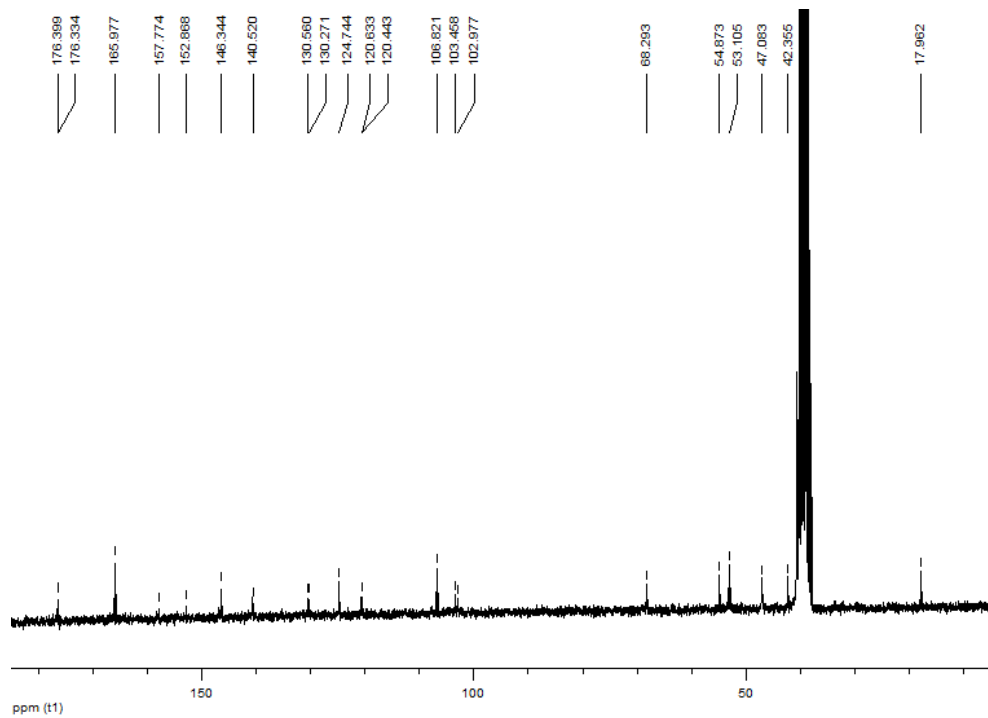


Figura A.30 - Espectro de RMN de ¹³C do complexo [AuCl₂(LEVO)]Cl·2H₂O em DMSO-*d*₆, 200 MHz.

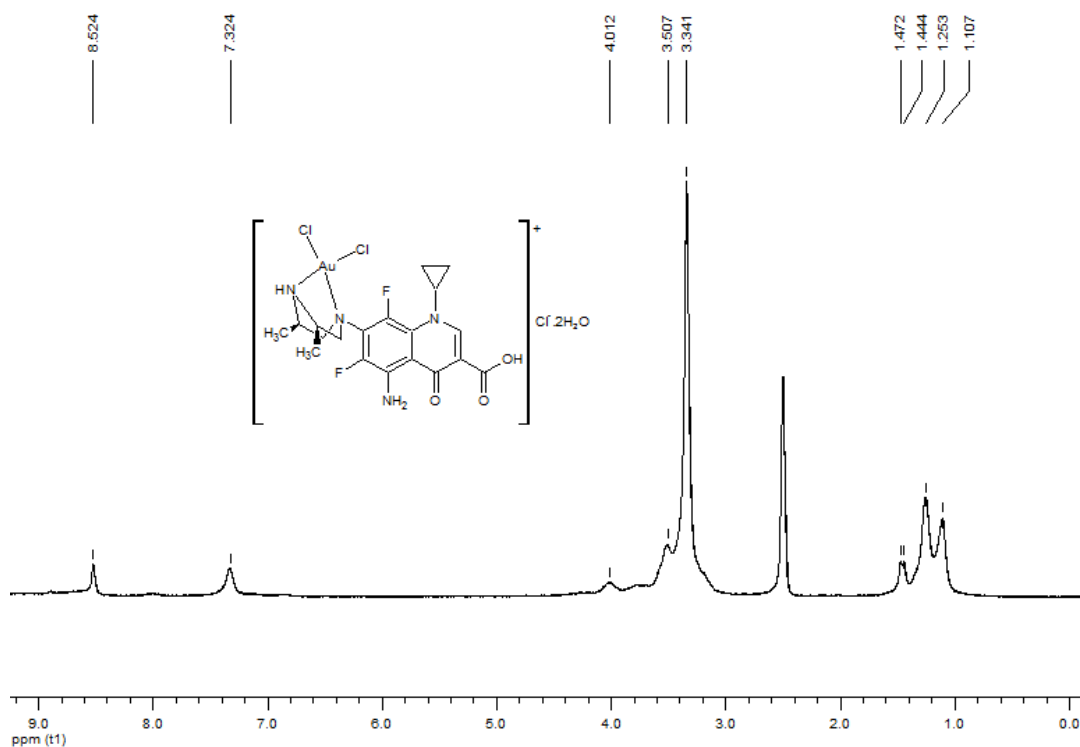


Figura A.31 - Espectro de RMN de 1H do complexo $[AuCl_2(SPAR)]Cl \cdot 2H_2O$ em $DMSO-d_6$, 200 MHz.

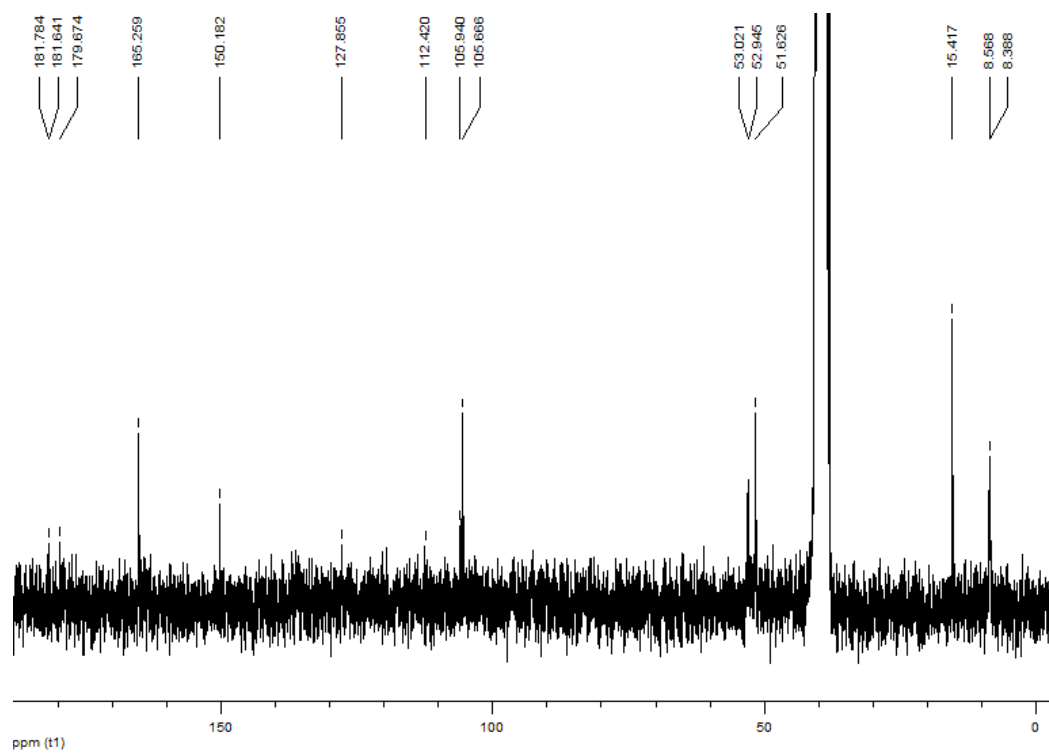


Figura A.32 - Espectro de RMN de ^{13}C do complexo $[AuCl_2(SPAR)]Cl \cdot 2H_2O$ em $DMSO-d_6$, 200 MHz.

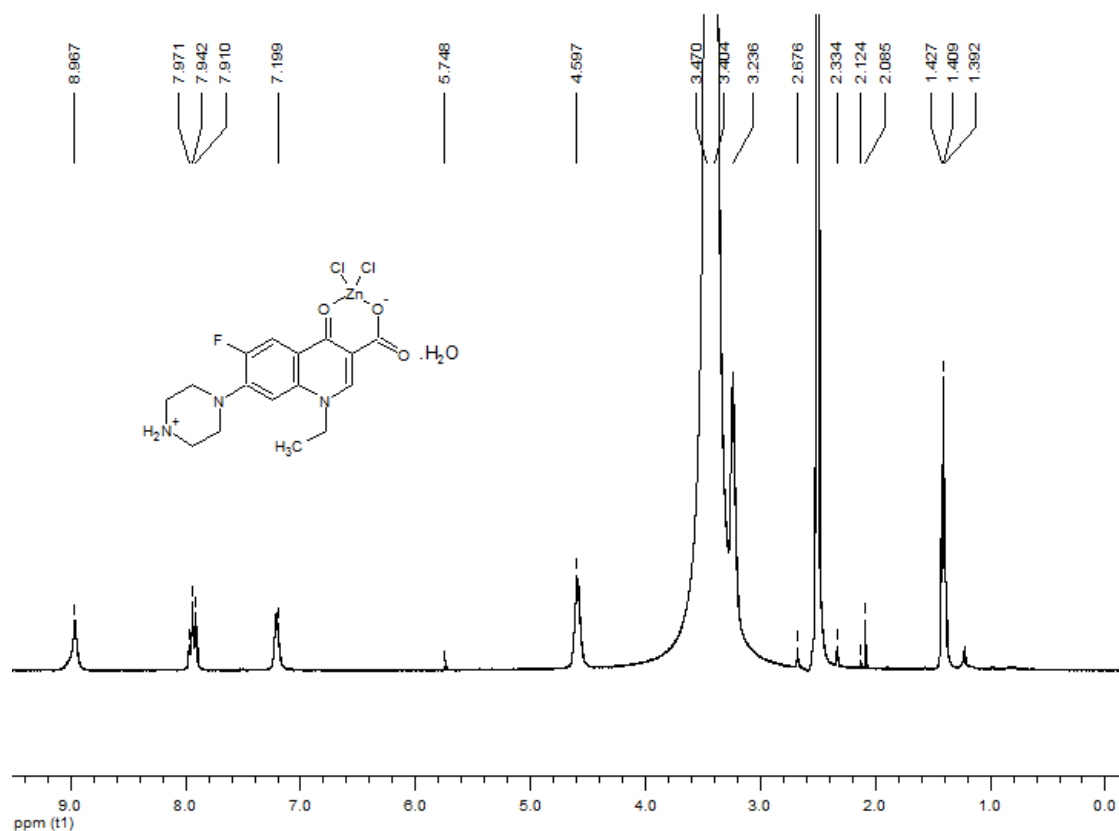


Figura A.33 - Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ em $\text{DMSO-}d_6$, 200 MHz.

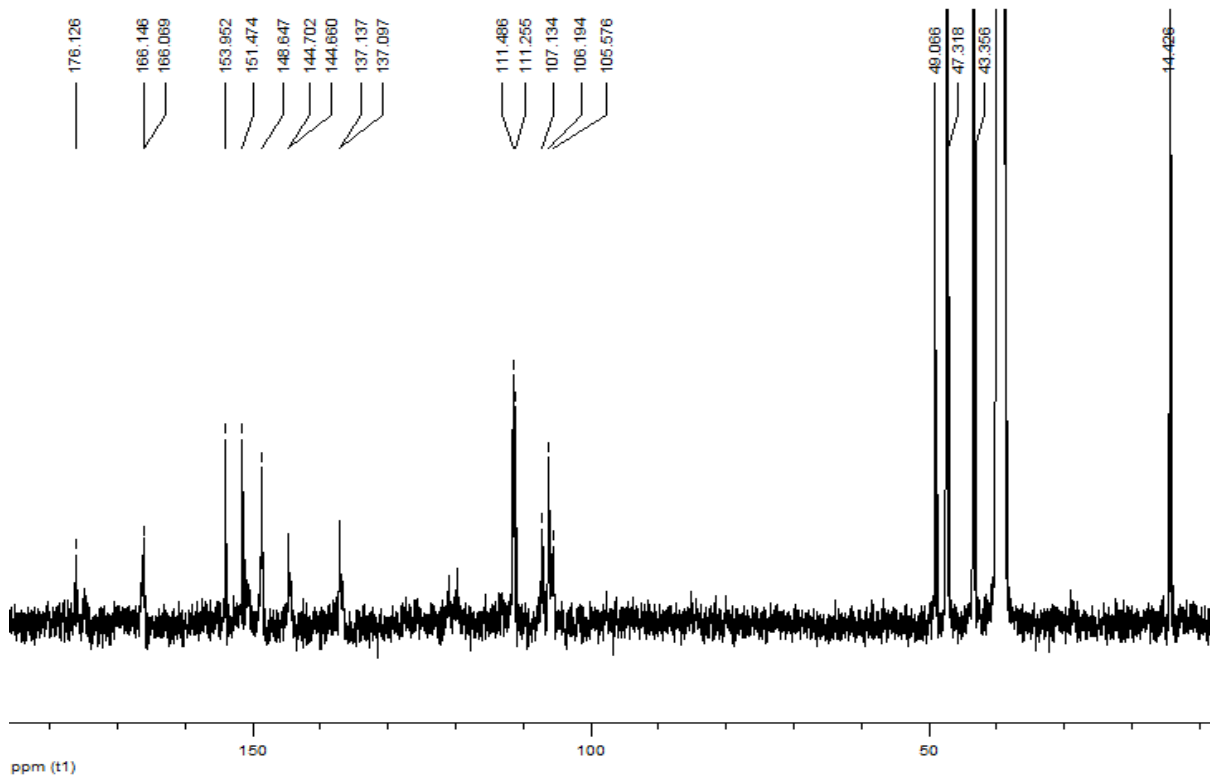


Figura A.34 - Espectro de RMN de ^{13}C do complexo $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ em $\text{DMSO-}d_6$, 200 MHz.

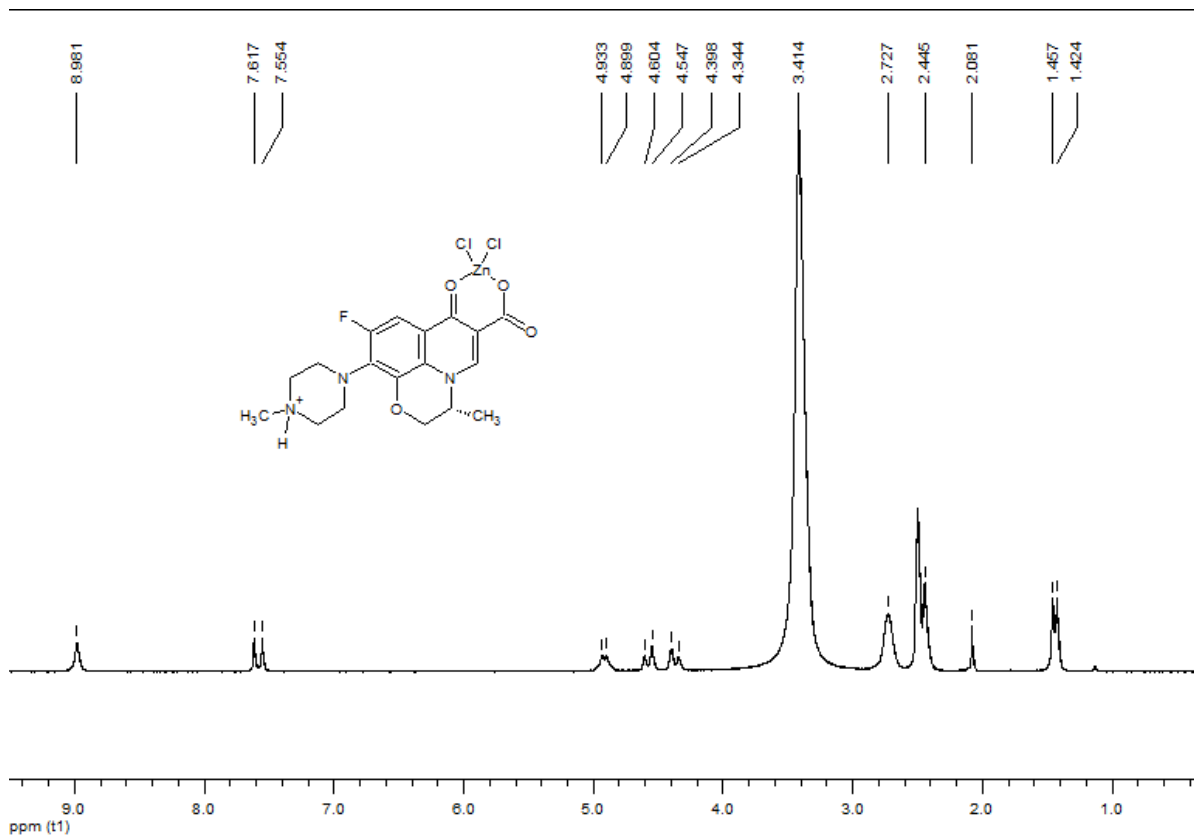


Figura A.35 - Espectro de RMN de 1H do complexo $[ZnCl_2(OFLO)]$ em $DMSO-d_6$, 200 MHz.

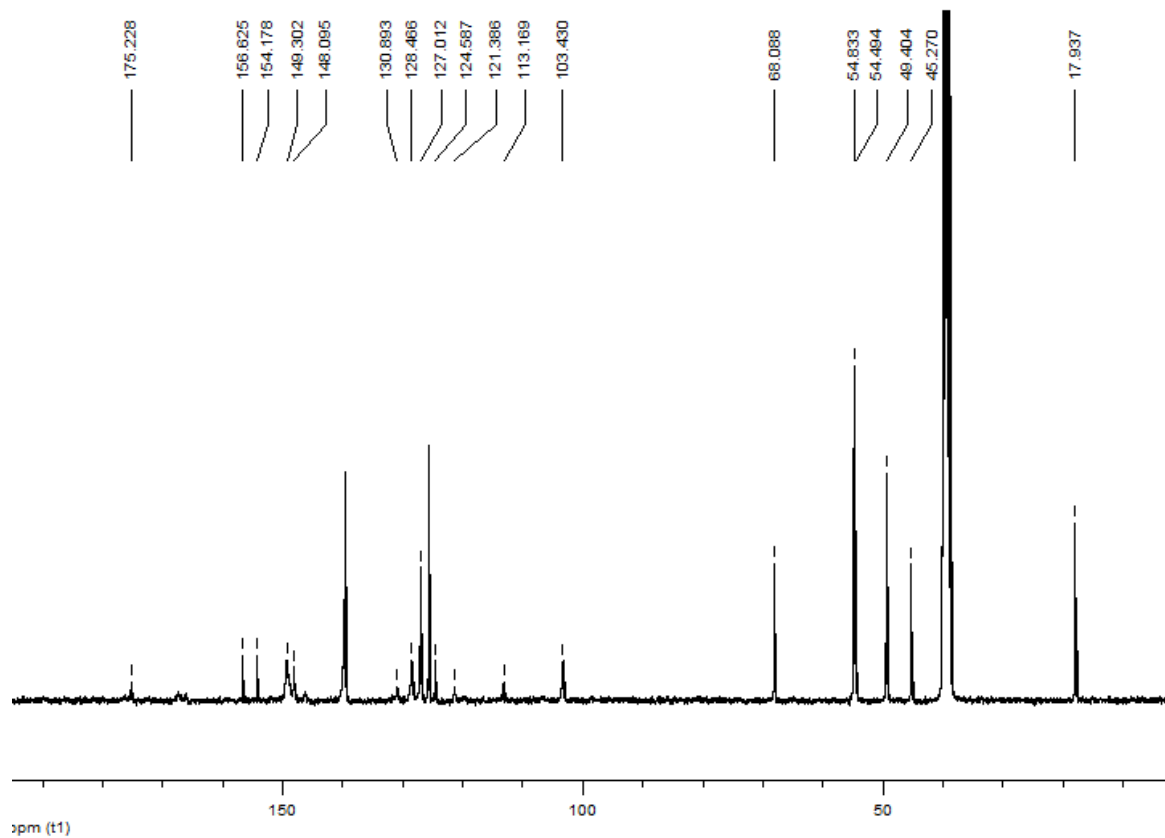


Figura A.36 - Espectro de RMN de ^{13}C do complexo $[ZnCl_2(OFLO)]$ em $DMSO-d_6$, 200 MHz.

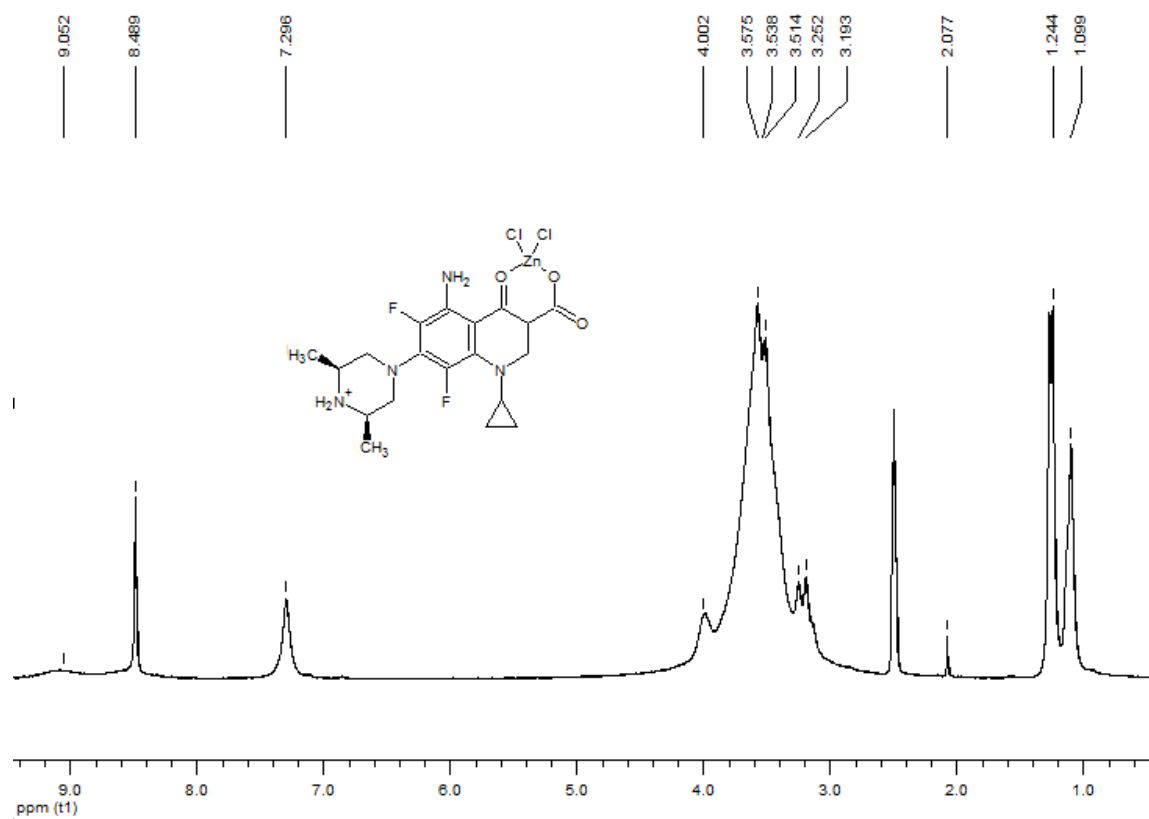


Figura A.37 - Espectro de RMN de 1H do complexo $[ZnCl_2(SPAR)]$ em $DMSO-d_6$, 200 MHz.

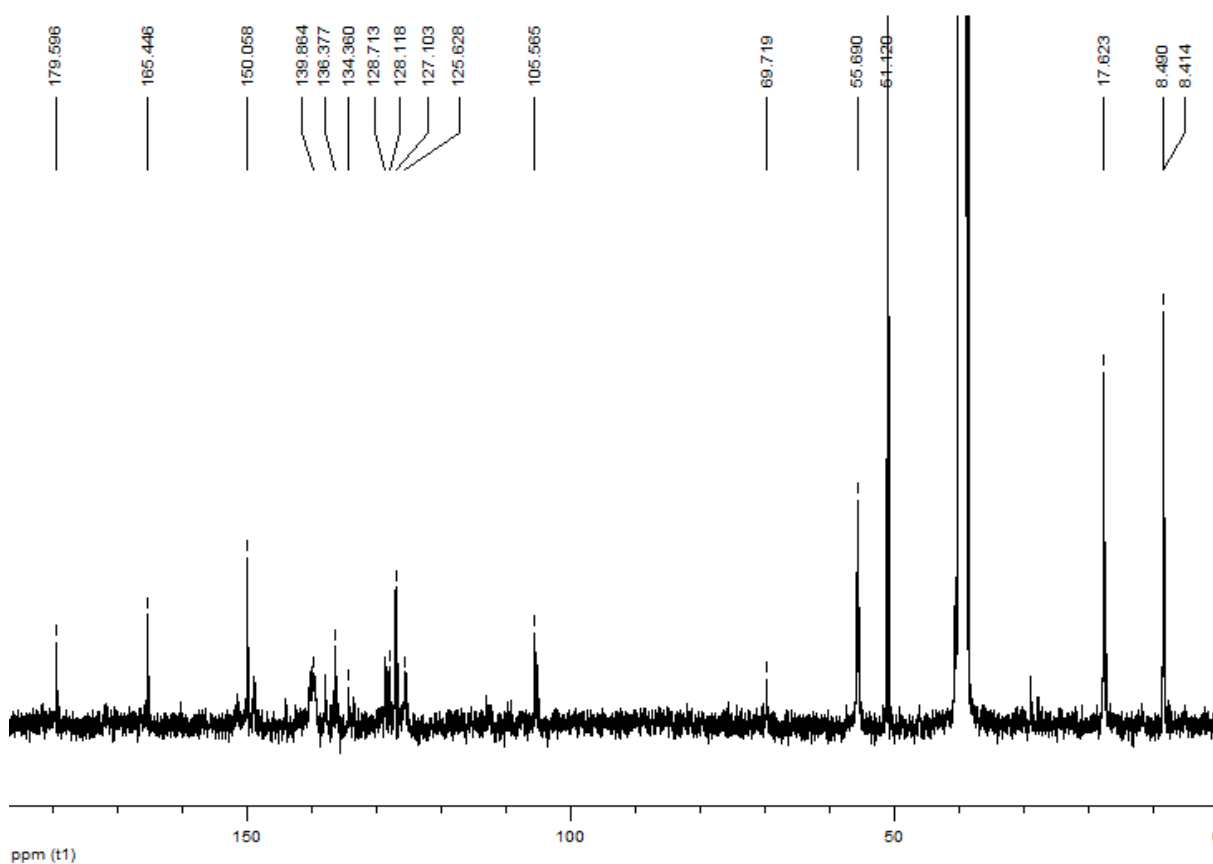


Figura A.38 - Espectro de RMN de ^{13}C do complexo $[ZnCl_2(SPAR)]$ em $DMSO-d_6$, 200 MHz.

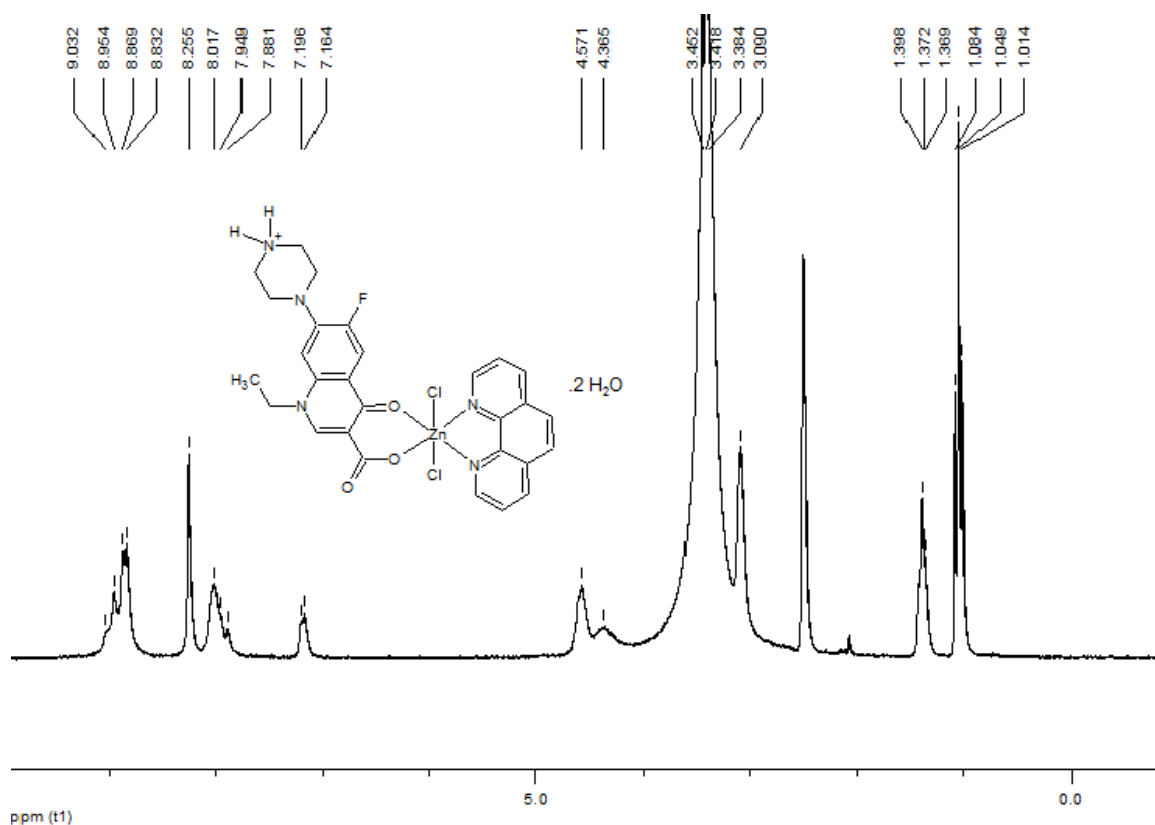


Figura A.39- Espectro de RMN de ¹H do complexo [ZnCl₂(NOR)(phen)].2H₂O em DMSO-*d*₆, 200 MHz.

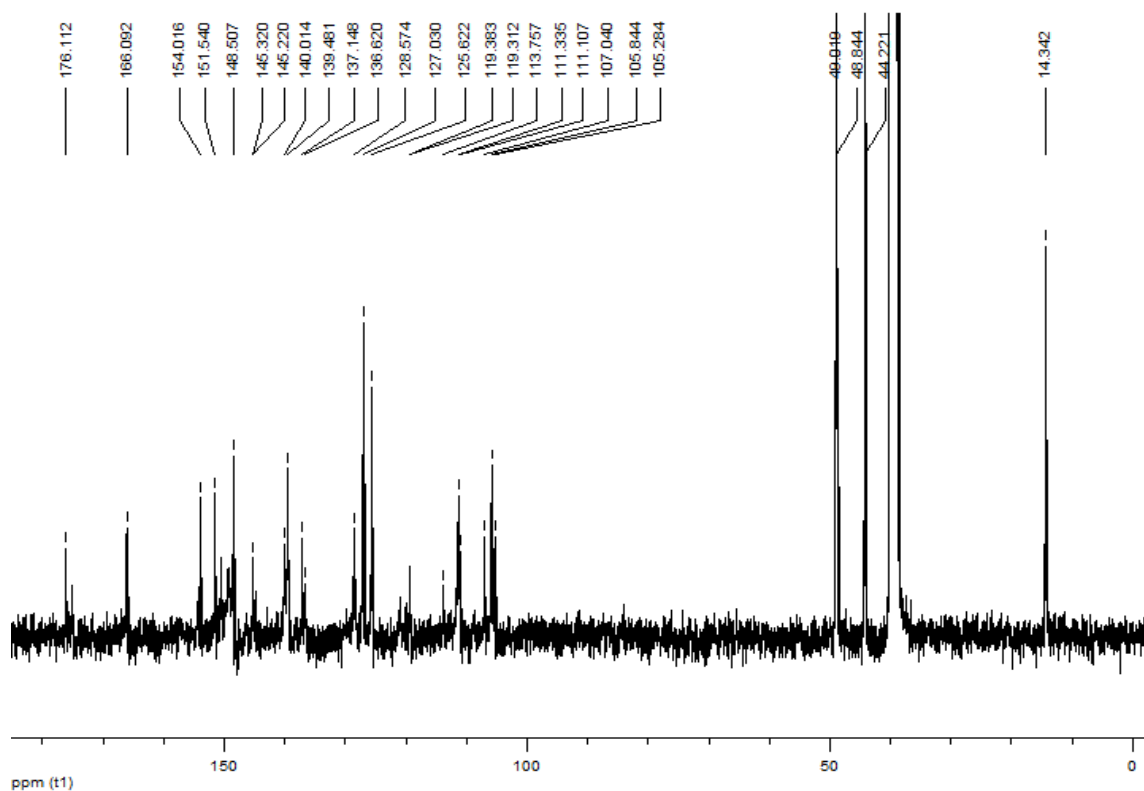


Figura A.40 - Espectro de RMN de ¹³C do complexo [ZnCl₂(NOR)(phen)].2H₂O em DMSO-*d*₆, 200 MHz.

Artigos publicados



Original article

Atypical fluoroquinolone gold(III) chelates as potential anticancer agents: Relevance of DNA and protein interactions for their mechanism of action

Ligiane R. Gouvea^a, Luciene S. Garcia^b, Daniela R. Lachter^b, Paula Roberta Nunes^c, Flávia de Castro Pereira^c, Elisângela P. Silveira-Lacerda^c, Sônia R.W. Louro^d, Paulo Jorge S. Barbeira^a, Letícia R. Teixeira^{a,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte (MG), Brazil

^b Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 22653-900 Rio de Janeiro (RJ), Brazil

^c Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás, 74001-970 Goiânia (GO), Brazil

^d Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 22653-900 Rio de Janeiro (RJ), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 February 2012

Received in revised form

28 June 2012

Accepted 2 July 2012

Available online 14 July 2012

Keywords:

Fluoroquinolones

Gold(III) complexes

Cytotoxic activity

Interaction with calf-thymus DNA

Interaction with bovine serum albumin

ABSTRACT

Quinolones are known for their antimicrobial and antitumor activities. Gold(III) compounds constitute an emerging class of biologically active substances, of special interest as potential anticancer agents. In this work three gold(III) complexes of the fluoroquinolones antimicrobial agents norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) and sparfloxacin (SPAR) were prepared and characterized with physicochemical and spectroscopic techniques. In these complexes, NOR, LEVO and SPAR act as bidentate neutral ligands bound to gold(III) through the nitrogen atoms of the piperazine ring, which is an unusual mode of coordination for this class of compounds. Two chloride ions occupy the remaining coordination sites.

The cytotoxic activity of the fluoroquinolones and their gold(III) complexes was tested against the A20 (murine lymphoma), B16-F10 (murine melanoma) and K562 (human myeloid leukemia) tumor cell lines as well as the L919 (murine lung fibroblasts) and MCR-5 (human lung fibroblasts) normal cells lines. All complexes were more active than their corresponding free ligands. Complex $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ was selected for DNA fragmentation and cell cycle analysis.

Spectroscopic titration with calf-thymus DNA (CT DNA) showed that the complexes can bind weakly to CT DNA, probably by an external contact (electrostatic or groove binding). The complexes exhibit good binding propensity to bovine serum albumin (BSA) having relatively high binding constant values.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Quinolones are known for their antimicrobial and antitumor activities through DNA intercalation and alteration of the normal functions of bacterial gyrase, and were found to be a topoisomerase II inhibitor in humans [1].

Thadepalli and collaborators (2005) evaluated the *in vivo* activity of trovafloxacin and ciprofloxacin against murine leukemic cells in neutropenic mice with lung infection due to *Klebsiella pneumoniae*. The results showed that both quinolones were effective in clearing lung infection. However, just trovafloxacin was effective in preventing metastasis of leukemia cells to the lungs and other tissue and in prolonging the survival of mice [2].

Voreloxin is a quinolone derivative that has not antibacterial activity, but shows potent cytotoxicity towards eukaryotic cancer

cell lines. This compound intercalates DNA and inhibits topoisomerase II and it is currently being evaluated in a Phase 2 clinical trial for resistant ovarian cancer [3].

Numerous studies regarding the interaction between quinolones and metal ions were reported in the literature [4–7]. However, few studies regarding metal complexes of quinolones as antitumor agents can be found.

Generally, the coordination of the fluoroquinolones with metallic ions occurs through the carboxylate and the carbonyl oxygen atoms. It's much less common for the coordination to happen by way of the piperazine nitrogen atoms. The literature contains only one work, with few examples, such as platinum(II) complexes with ciprofloxacin, levofloxacin, ofloxacin, sparfloxacin and gatifloxacin. The resulting complexes present the fluoroquinolone coordinated through the nitrogen atoms of the piperazine ring [4].

Gold(III) compounds constitute an emerging class of biologically active substances, of special interest as potential anticancer agents. During the past decade a number of structurally diverse gold(III)

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 5764; fax: +55 31 3409 5700.

E-mail address: lregina@qui.ufmg.br (L.R. Teixeira).

complexes were reported to be acceptably stable under physiological-like conditions and to manifest very promising cytotoxic effects against selected human tumor cell lines, making them good candidates as anti-tumor agents [8]. As we know, the literature reports only one example of a gold(III) complex with the fluoroquinolone norfloxacin (NOR) [5], of the type $[\text{Au}(\text{NO-R})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_3$ (NOR = norfloxacin) in which NOR is coordinated to gold(III) as a neutral monodentate ligand through the nitrogen atom of piperidyl ring.

The synthesis and characterization of new metal complexes with fluoroquinolone antibacterial agents are of great importance for understanding the drug-metal ion interaction and for their potential pharmacological use. In this context, the present work describes the synthesis of gold(III) complexes with norfloxacin, levofloxacin and sparfloxacin (Fig. 1) in an attempt to examine the binding mode and the biological properties of the complexes. The resultant mononuclear complexes were characterized with elemental analysis, IR, UV–vis and NMR spectroscopy.

The cytotoxic activity of the fluoroquinolones and their gold(III) complexes was tested against the A20 (murine lymphoma), B16-F10 (murine melanoma) and K562 (human myeloid leukemia) tumor cell lines as well as the L919 (murine lung fibroblasts) and MCR-5 (human lung fibroblasts) normal cells lines. For $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$, DNA fragmentation and cell cycle analysis were also performed.

Finally, the binding properties of the fluoroquinolones and their gold(III) complexes with CT DNA were investigated as well as their affinity for the bovine serum albumin (BSA), a protein responsible for the transport of drugs in the body.

2. Experimental

2.1. Materials

Norfloxacin, Levofloxacin, Sparfloxacin, calf-thymus DNA (CT DNA), bovine serum albumin (BSA) and $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ were purchased from Sigma–Aldrich. All solvents were purchased from Merck.

The DNA stock solution was prepared by dilution of CT DNA to universal buffer at pH 7.4 [9] followed by exhaustive stirring at 4 °C for three days, and was kept at 4 °C for no longer than a week. The stock solution of CT DNA gave a ratio of UV absorbance at 260 and 280 nm (A_{260}/A_{280}) of 1.90, indicating that DNA was sufficiently free of protein contamination. The DNA concentration was determined by the UV absorbance at 260 nm after 1:20 dilution using $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [10].

The solutions of fluoroquinolones, Au(III) complexes and BSA were prepared in 0.1 mol L^{-1} universal buffer at pH 7.4 [9].

2.2. Apparatus

Elemental analyses were performed on a CE Instruments, model EA 1110. Molar conductivity measurements were performed at RT in DMF, $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ concentration using a Tecnonon, model mCA-150, conductivity meter. The IR spectra were acquired on a Perkin Elmer, model 2000 Ft-IR spectrophotometer using KBr pellets. NMR spectra were obtained with a Bruker DRX-400 Avance (400 MHz) spectrometer using d^6 -DMSO as the solvent and TMS as internal reference.

Fluorescence measurements were performed on a Shimadzu spectrophotometer Model RF 5301PC using a 1.00 cm quartz cell. A Hewlett Packard 8451-A UV–vis spectrophotometer was used for scanning UV–vis spectra with a 1.00 cm quartz cell.

2.3. Synthesis of the complexes

$[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (**1**) was prepared previously by some of us [11]. $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ (**2**) and $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ (**3**) were obtained by the reaction of appropriate quantities of the ligands (0.25 mmol), dissolved in methanol (40 mL), which were then added to the solutions of HAuCl_4 (0.25 mmol) in methanol (5 mL). Immediately after the addition of the ligand, a precipitate formed. The reaction mixture remained stirring at room temperature for 24 h. The solids obtained were filtered under vacuum, washed with diethyl ether, and dried.

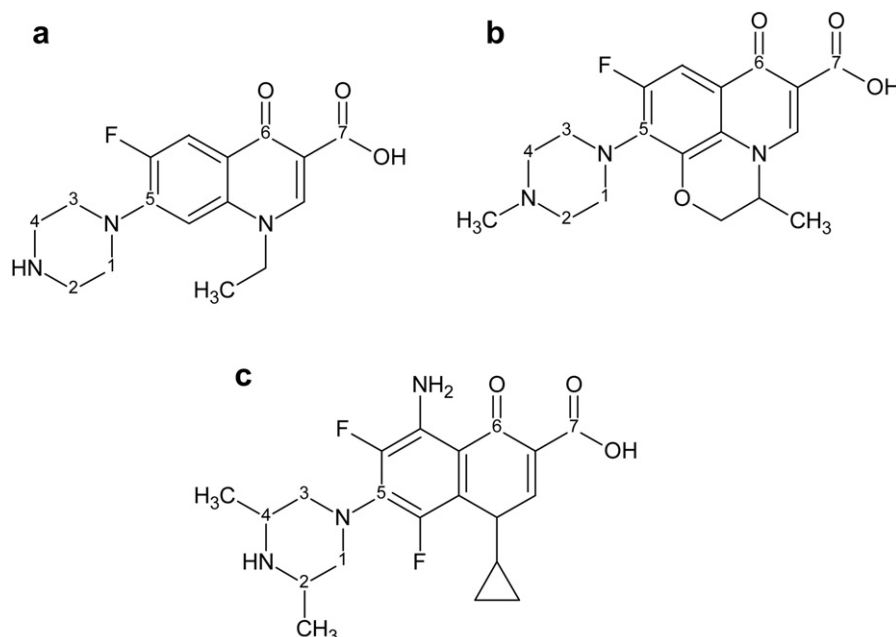


Fig. 1. Structures of (a) norfloxacin, (b) levofloxacin and (c) sparfloxacin.

2.3.1. [AuCl₂(NOR)]Cl·2H₂O (**1**)

Anal. Calc.: C, 29.2; H, 3.2; N, 6.4. Found: C, 29.0; H, 3.1; N, 6.2. Conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ in DMF): 102 μ S cm⁻¹. Yield: 79%. IR (cm⁻¹): 3390 s ν (OH); 1628 s ν (C=O); 1706 s ν (COOH). NMR: δ C1, C3 (46.42, 46.52); δ C2, C4 (42.55); δ C5 (144.28); δ C6 (176.14); δ C7 (166.01).

2.3.2. [AuCl₂(LEVO)]Cl·2H₂O (**2**)

Anal. Calc.: C, 30.9; H, 3.4; N, 6.0. Found: C, 31.0; H, 3.0; N, 6.0%. Conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ in DMF): 89 μ S cm⁻¹. Yield: 80%. IR (cm⁻¹): 3390 s ν (OH); 1619 s ν (C=O); 1700 s ν (COOH). NMR: δ C1, C3 (46.65); δ C2, C4 (52.68); δ C5 (not detected); δ C6 (175.89); δ C7 (165.48).

2.3.3. [AuCl₂(SPAR)]Cl·2H₂O (**3**)

Anal. Calc.: C, 31.2; H, 3.6; N, 7.7%. Found: C, 31.0; H, 3.1; N, 7.5%. Conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ in DMF): 94 μ S cm⁻¹. Yield: 92%. IR (cm⁻¹): 3390 s ν (OH); 1636 s ν (C=O); 1708 s ν (COOH). NMR: δ C1, C3 (51.13); δ C2, C4 (48.40); δ C5 (not detected); δ C6 (165.33); δ C7 (179.52).

2.4. Cytotoxic activity

The A20 (murine lymphoma), B16-F10 (murine melanoma) and K562 (human myeloid leukemia) tumor cell lines as well as the L919 (murine lung fibroblasts) and MCR-5 (human lung fibroblasts) normal cell lines were purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank/RJ, Brazil. They were cultured RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., MO), supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g mL⁻¹ streptomycin in a humidified atmosphere at 37 °C in 5% CO₂ (humidified atmosphere).

The effects of the gold(III) complexes in the cytotoxicity of A20, B16-F10, K562, L919 and MCR-5 cells lines were studied by MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, assay as described by Mosmann (1983) [12]. Briefly, 1×10^4 of A20, B16-F10, K562, L919 and MCR-5 cells were plated in 96-well tissue culture plates and treated with different concentrations of gold complexes (0.2, 2, 20, 50, 100 and 200 μ M) for 48 h. After treatment, 10 μ L MTT (5 mg mL⁻¹) was added to each well and the plates were incubated at 37 °C for another 3 h. The purple formazan crystals were dissolved in 50 μ L SDS (10%), and absorbance was determined at 565 nm using a Stat Fax 2100 microplate reader (Awareness Technology, Palm City, FL, USA). The cell viability was calculated as follows: Cytotoxicity (%) = (Absorbance of the treated wells)/(Absorbance of the control wells) \times 100. Each concentration was tested in three different experiments run in triplicate. The IC₅₀ (compound concentration (μ M) that produces a 50% reduction in cellular viability) was obtained from the dose–response curves using GraphPad Prism 4.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2.5. DNA fragmentation analysis

For the DNA fragmentation assay, 2×10^6 cells (K562) were treated with different concentrations of [AuCl₂(LEVO)]Cl (**2**) (25–75 μ M) for 48 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were harvested and centrifuged at $300 \times g/15$ min/10 °C and washed with PBS. The cells were then re-suspended at a concentration of 1×10^6 cells mL⁻¹ in an extraction buffer (10 mmol L⁻¹ Tris–HCl, 0.1 mol L⁻¹ EDTA, 5 g mL⁻¹ SDS) and treated with 20 mg L⁻¹ RNase A at 37 °C for 60 min, followed by incubation with proteinase K (100 mg L⁻¹) at 37 °C for 60 min. An equal volume of saline solution (NaCl 6 M) was added to the cells and centrifuged at $13,000 \times g$ for 10 min. The supernatant was collected and 2 volume of ethanol (–20 °C) were added. The samples were centrifuged at $13,000 \times g$ for 30 min at

4 °C. The supernatant was then discarded and the pellets dissolved in TE buffer (1 \times). The concentration of DNA was detected using a UV spectrophotometer (Beckman DU-640, USA). The DNA (5 μ g/tube) was transferred to a 1.5% agarose horizontal gel, and electrophoresis was performed at 100 V cm⁻¹ for 90 min. The DNA in the gels was visualized by ultraviolet transillumination after staining with ethidium bromide (5 μ g mL⁻¹) using an Omega[®] molecular imaging system (UltraLum Inc., Claremont, CA, USA).

2.6. Cell cycle analysis

The K562 cells were treated with different concentrations [AuCl₂(LEVO)]Cl (**2**) (30, 45, and 100 μ M) for 48 h. Briefly, 5×10^5 cells were harvested by centrifugation, washed with PBS, fixed with 70% (v/v) cold aqueous ethanol and stored overnight at –20 °C. The fixed cells were washed with PBS, followed by incubation with proteinase K (100 mg L⁻¹) at 37 °C for 60 min. Cells were centrifuged and incubated with propidium iodide (Sigma). Samples were stored at 4 °C in the dark and analyzed by flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences). The percentage of cells in G1, S, G2 and sub-G1 was analyzed using Cell Quest Pro software (BD Biosciences).

2.7. Statistical analysis

The statistical analysis of the results was performed by using one-way ANOVA followed by Dunnett's or Tukey post hoc test for multiple comparisons with a control. All statistical analyses were performed using the statistical software GraphPad Prism, version 4. A probability of 0.05 or less was deemed statistically significant. The following notation was used throughout; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, relative to control.

2.8. DNA binding studies

The interaction of NOR, LEVO, SPAR and complexes **1–3** with CT DNA was studied in order to investigate the possible binding modes to CT DNA and to calculate the binding constants to CT DNA (K_b). Binding constants, K_b , of the compounds with CT DNA were determined using the UV spectra of the complexes recorded for a constant concentration in the absence or presence of CT DNA for diverse r values. K_b was obtained by monitoring the changes in the absorbance at the corresponding λ_{max} (334, 332, 362, 334, 332 and 362 nm to NOR, LEVO, SPAR, complexes **1**, **2** and **3**, respectively), with increasing concentrations of CT DNA. K_b is given by the ratio of slope to the y intercept in plots [DNA]/($\epsilon_a - \epsilon_f$) versus [DNA], according to the Eq. (1) [13]:

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)_q} + \frac{1}{[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]} \quad (1)$$

where [DNA] is the concentration of DNA in base pairs, ϵ_a , ϵ_f and ϵ_b correspond to the apparent absorption coefficient $A_{obsd}/[compound]$, the extinction coefficient for the free compound and the extinction coefficient for the compound in the fully bound form, respectively.

2.9. Bovine serum albumin (BSA) binding studies

The protein-binding study was performed by tryptophan fluorescence quenching experiments using bovine (BSA, 2 μ M) in universal buffer at pH 7.4. The quenching of the emission intensity of tryptophan residues of BSA at 341 nm was monitored using either NOR, LEVO, SPAR or complexes **1–3** as quenchers with

increasing concentration. Fluorescence spectra were recorded from 300 to 500 nm at an excitation wavelength of 285 nm. The fluorescence spectra of quenchers in buffer solutions were recorded under the same experimental conditions and exhibited a maximum emission at 341 nm. Therefore, the quantitative studies of the serum albumin fluorescence spectra were performed after their correction by subtracting the spectra of the compounds.

Stern–Volmer analysis is useful in the estimation of the accessibility of tryptophan residues in proteins to the drug (quencher) molecules and may be used to study the interaction of a quencher with serum albumins. According to Stern–Volmer quenching Eq. (2) [14]:

$$\frac{F_0}{F} = k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2)$$

where F_0 and F are the steady-state fluorescence intensities in absence and presence of quencher (fluoroquinolones and complexes), respectively. k_q = the bimolecular quenching rate constant of BSA, K_{SV} = Stern–Volmer quenching constant, τ_0 = the average lifetime of BSA without the quencher, $[Q]$ = the concentration of quencher. According to Eq. (2), the relation between K_{SV} and k_q is [14]:

$$K_{SV} = k_q \tau_0 \quad (3)$$

3. Results and discussion

3.1. Microanalysis and molar conductivity studies

Microanalysis suggests the formation of $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (**1**), $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ (**2**) and $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ (**3**), in which the fluoroquinolones NOR, LEVO and SPAR coordinate as neutral bidentate ligands. The molar conductivity data reveal that the complexes are 1:1 electrolytes, in accordance with the proposed formulations.

3.2. Infrared spectral studies

In the IR spectra of levofloxacin and sparfloxacin, the vibration of the carboxylic stretch $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{carb}}$ was found in the 1732 and 1716 cm^{-1} range and the pyridone stretch $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{p}}$ at 1638 and 1640 cm^{-1} range [4,16,17]. The characterization of fluoroquinolones metal complexes can be achieved by studying the most typical vibrations that are characteristic of the coordination type of quinolones. In the majority of the metal complexes with fluoroquinolones related in the literature, the ligands coordinate in a bidentate manner via the carboxylic oxygen and the carbonyl oxygen, where the metal ion forms a stable six membered ring chelate. However, for complexes **1**, **2** and **3**, reported in this work, no changes were observed for the carboxylic stretch $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{carb}}$ and the pyridone stretch $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{p}}$ suggesting that these groups are not involved in coordination.

Table 1
 ^{13}C NMR signals (δ) for the norfloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and their gold(III) complexes (d^6 -DMSO).

Compounds	C(1), C(3)	C(2), C(4)	C(5)	C(6)=O	C(7)OOH
Norfloxacin (NOR)	45.34	50.68, 50.72	146.00	176.15	166.20
$[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (1)	42.55	46.42, 46.52	144.28	176.14	166.01
Levofloxacin (LEVO)	49.97, 50.04	54.74	132.12	176.20	165.96
$[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ (2)	46.65	52.68	^a	175.89	165.48
Sparfloxacin (SPAR)	50.77	57.31, 57.36	136.36	179.42	165.45
$[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ (3) ^b	48.40	51.13	^a	179.52	165.33

^a Not observed.

^b Compound with low solubility.

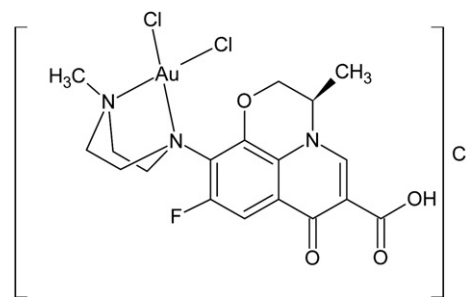


Fig. 2. Proposed structure for $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$.

3.3. NMR measurements

The ^1H NMR spectra of Au(III) complexes and free fluoroquinolones are very similar, and it was possible to observe only small shifts (~ 0.2 ppm) with the exception of the piperazine ring hydrogens (1, 2, 3 and 4, see Fig. 1). These hydrogens showed considerable shifts on the order of 0.3–0.5 ppm, indicating that the nitrogen atoms of the piperazine ring are the probable coordination sites for Au(III) [4,6,15].

Table 1 lists ^{13}C NMR assignments for the fluoroquinolones and their gold(III) complexes in d^6 -DMSO. The carbon type (C, CH) was determined by using DEPT135 experiments (see atom numbering used for NMR attributions in Fig. 1).

In the ^{13}C NMR spectra of the free fluoroquinolones NOR, LEVO and SPAR the carbonyl, C(6)=O, and carboxylate, C(7)OOH, signals appear in the $\delta 176.15$ – $\delta 179.42$ and $\delta 166.45$ – $\delta 166.20$ range, respectively. Upon complexation these carbon signals undergo insignificant shifts, indicating that these groups are not involved in coordination as normally occur for metal quinolones chelates.

The signs at $\delta 45.34$ – 54.74 and $\delta 49.97$ – $\delta 57.36$ range were attributed to the C(1), C(3) and C(2), C(4) atoms, and the singlet at $\delta 146.0$ – $\delta 132.12$ range to the C(5) atom, in the ^{13}C NMR spectra of the NOR, LEVO and SPAR. In the spectra of Au(III) complexes these carbon signals undergo significant shifts, indicating that the coordination of the ligand to the metal occurs via the nitrogen atoms of the piperazine ring. This mode of coordination is rare when compared to data presented in the literature. When this type of coordination occurs, the piperazine ring has to assume a boat conformation, which is stabilized by chelation to the Au(III) [4] (Fig. 2).

3.4. Cytotoxic activity

Table 2 lists the compound concentration ($\mu\text{mol L}^{-1}$), which produces a 50% reduction in cellular viability (IC_{50}) for gold(III) complexes against the A20 (murine lymphoma), B16-F10 (murine melanoma) and K562 (human myeloid leukemia) tumor cell lines, along with the corresponding values of IC_{50} for the normal cells lines L919 (murine lung fibroblasts) and MCR-5 (human lung fibroblasts) for comparison.

The free fluoroquinolones did not show themselves significantly active ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{mol L}^{-1}$) in the three tumor cell lines, and

Table 2
Compound concentration ($\mu\text{mol L}^{-1}$) that produces of 50% reduction in cellular viability (IC_{50}) for gold(III) complexes.

Compounds	IC_{50} (μM)				
	Normal cells		Tumor cells		
	MRC-5	L919	A20	B16-F10	K562
$[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (1)	65 \pm 13	45 \pm 4	25 \pm 8	27 \pm 15	55 \pm 10
$[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ (2)	53 \pm 13	106 \pm 21	49 \pm 8	29 \pm 9	50 \pm 10
$[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ (3)	126 \pm 18	65 \pm 4	48.3 \pm 0.3	45 \pm 7	61 \pm 4

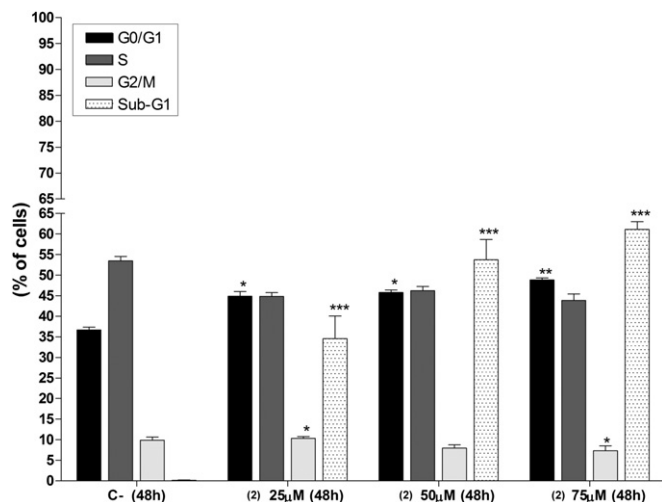


Fig. 3. Cell cycle profile of K562 cells cultured with different concentrations of $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ (**2**) ($25\text{--}75\ \mu\text{mol L}^{-1}$) for 48 h. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

neither in the normal cells lines (data not shown). Upon complexation to Au(III) the IC_{50} values decreased, indicating that the complexes were more active than the free ligands. Furthermore, these complexes have similar cytotoxic activity.

The complex $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ was selected for DNA fragmentation and cell cycle analysis, because it was more toxic for the

tumor cells than for normal cells, thus revealing itself as a promising antitumor candidate.

3.5. DNA fragmentation analysis

The DNA fragmentation pattern is an important biochemical sign of apoptosis, representing DNA cleavage into oligonucleosomal fragments through activation of the cysteine protease caspase-3, which is involved in the proteolytic cleavage of key downstream proteins such as poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) [18]. This process ultimately results in DNA fragmentation and apoptotic death [19]. To investigate if the $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ (**2**) complex is involved in apoptotic cell death, we examined DNA fragmentation using agarose gel electrophoresis. As shown, K562 cells cultured in the presence of $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ (**2**) did not present a DNA fragmentation pattern in all of the concentrations tested. However, a reduction of the K562 DNA concentration was observed in the presence of higher concentrations of $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ (**2**).

3.6. Cell cycle

Cell cycle is a fundamental process to comprehend the mechanisms of tumor growth. The results derived from cell cycle tests revealed the compound $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ (**2**) interfered with cell kinetics, leading to an increase of the number of cell on phase G0/G1 and decreasing the number of cells on G2/M phase when compared with the negative control. Moreover, an increased

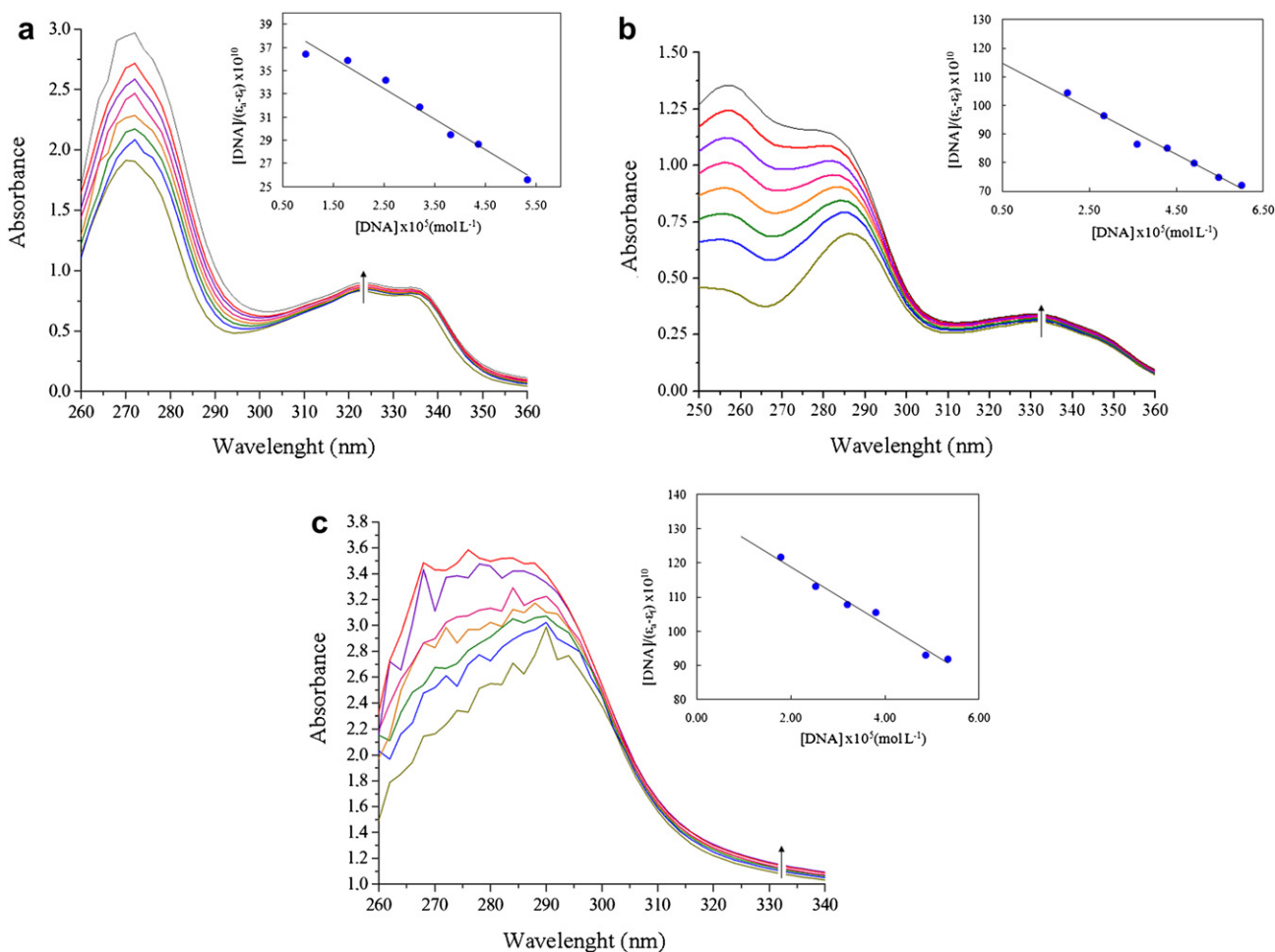


Fig. 4. Plots of (a) $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$, (b) $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$, (c) $[\text{AuCl}_2(\text{SPA})]\text{Cl}$ in the presence of CT DNA at increasing amounts. The arrows show the changes upon increasing amounts of CT DNA. $[\text{Compound}] = 2.5 \times 10^{-5}\ \text{mol L}^{-1}$ at pH 7.4. Insets: plots of $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \times 10^{10}$ versus $[\text{DNA}]$ at (a) 334 nm, (b) 332 nm, (c) 362 nm.

Table 3

The binding constants (K_b) obtained for the fluoroquinolones and their Au(III) complexes.

Compounds	K_b ($L \cdot mol^{-1}$)	R^{2a}	Hyperchromism (%)
Norfloxacin	6.7×10^3	1.00	12
Levofloxacin	8.1×10^3	0.99	15
Sparfloxacin	9.8×10^3	0.99	29
[AuCl ₂ (NOR)]Cl (1)	6.3×10^3	0.97	8
[AuCl ₂ (LEVO)]Cl (2)	6.9×10^3	0.98	11
[AuCl ₂ (SPAR)]Cl (3)	6.5×10^3	0.98	5

^a Linear regression.

number of cells on sub-G1 was also observed and is an indicative of apoptosis (Fig. 3). The [AuCl₂(LEVO)]Cl (2) interference on tumor cell cycle phases indicates that this compound is acting as a cell cycle-specific drug.

Apoptosis, or programmed cell death, is an essential process for the maintenance of living beings, because it has the function of eliminating defective cells. An important characteristic of tumor cells is the resistance to apoptosis natural mechanisms [20]. Studies suggest that the induction of apoptosis is a desirable mechanism of action of antitumor drugs and different research groups aim to develop drugs with activity in chemotherapy [21]. As noted, the compound [AuCl₂(LEVO)]Cl (2) presents significant apoptotic activity on K562 cells and its action is concentration-dependent leading to an increment in apoptosis as far as [AuCl₂(LEVO)]Cl (2) concentration grow. The treatment with IC₅₀ concentration (50 μ M) caused an apoptosis increase of 53% approximately.

3.7. Interaction with DNA

Transition metal complexes can bind to DNA via covalent and/or noncovalent interactions (including intercalative, electrostatic and groove binding outside of DNA helix, along major or minor groove). To examine the binding modes of DNA with metal complexes is

normally used electronic absorption spectroscopy [22]. The absorption spectra of the interaction of CT DNA with Au(III) complexes (Fig. 4) were recorded to calculate the binding constants to CT DNA (K_b). The intensity of the observed bands in the presence of CT DNA results in hyperchromism.

The binding constants, K_b , of Au(III) complexes to DNA were calculated from Eq. (1). For comparison, the K_b values of free fluoroquinolones were also calculated. The calculated K_b values are given in Table 3 and suggest a moderate binding of the Au(III) complexes to CT DNA. The K_b values of fluoroquinolones and their complexes are similar. The hyperchromic effect observed might be ascribed to external contact (electrostatic binding) or that the complex could uncoil the helix structure of DNA and made more bases embedding in DNA exposed [22,23,26].

3.8. Interaction with BSA

Serum albumins are proteins involved in the transport of metal ions and metal complexes with drugs in the circulatory system [24]. The interaction of NOR, LEVO, SPAR and their Au(III) complexes with BSA was studied from tryptophan emission–quenching experiments. Fluorescence spectra of BSA in the presence of increasing amounts of the fluoroquinolones and their Au(III) complexes are shown in Fig. 5. The inner filter effect of the compounds at the excitation and emission wavelengths was negligible. The fluorescence peaks at $\lambda > 400$ nm are due to direct excitation of the ligands or complexes.

The quenching mechanism can also be predicted from the curvature in the Stern–Volmer plots. Normally, a presence of static quenching and the formation of dark complexes lead to upward curvature in the Stern–Volmer plots. On the other hand, linear Stern–Volmer plots may either reveal the occurrence of just one binding site for the quencher in the proximity of the fluorophore, or indicate the existence of a single type of quenching. As static quenching

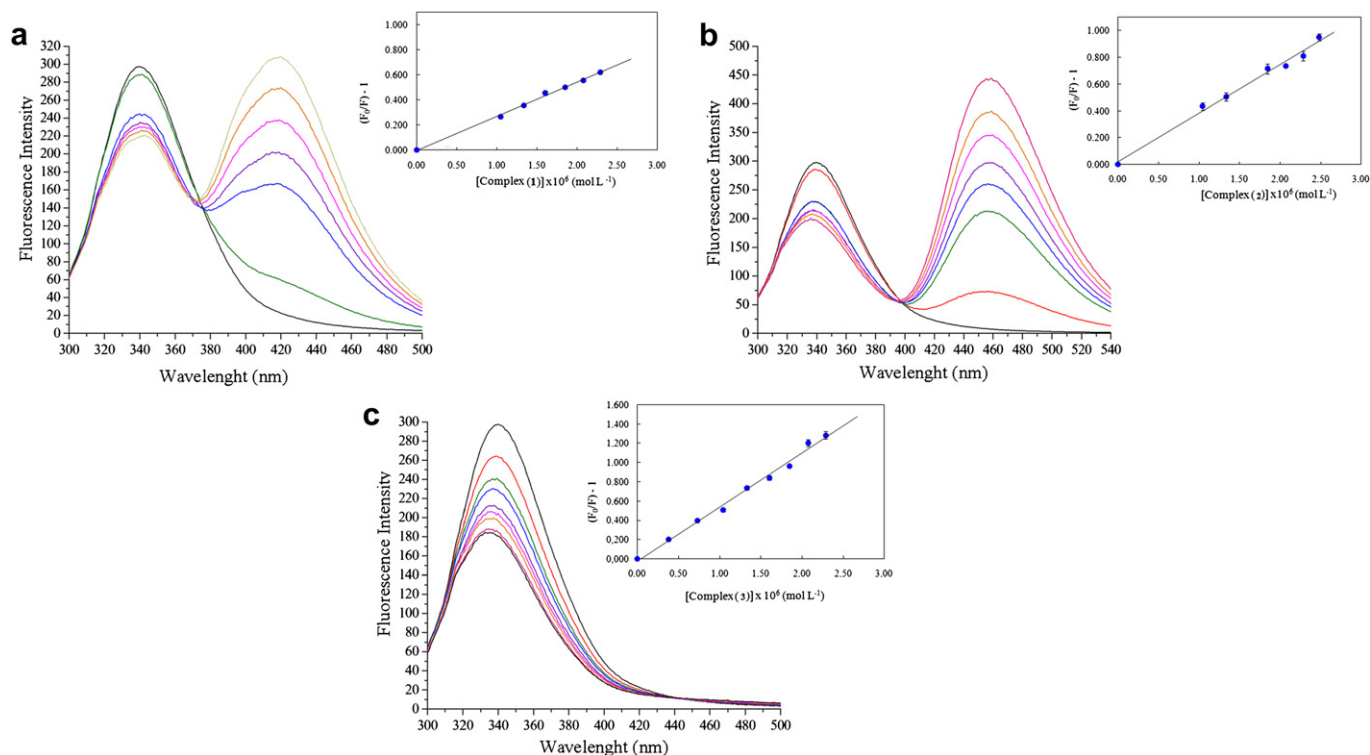


Fig. 5. Fluorescence spectra of BSA (2 μ M) in the presence of increasing concentrations of (a) [AuCl₂(NOR)]Cl, (b) [AuCl₂(LEVO)]Cl, (c) [AuCl₂(SPAR)]Cl. [Compound] = 8×10^{-6} mol L⁻¹ at pH 7.4. Insets: Stern–Volmer plots for the fluorescence at 340 nm.

Table 4

The binding constants (K_{SV}) obtained for the fluoroquinolones and their Au(III) complexes.

Compounds	K_{SV} (L mol ⁻¹)	R^{2a}
Norfloxacin	4.7×10^4	0.982
Levofloxacin	4.9×10^5	0.991
Sparfloxacin	1.8×10^5	0.991
[AuCl ₂ (NOR)]Cl (1)	2.7×10^5	0.997
[AuCl ₂ (LEVO)]Cl (2)	2.7×10^5	0.994
[AuCl ₂ (SPAR)]Cl (3)	5.7×10^5	0.990

^a Linear regression.

does not require diffusion through the medium, the quenching is more efficient and the observed fluorescence intensity is lower.

The Stern–Volmer quenching constant (K_{SV} , L mol⁻¹) can be obtained by the slope of the diagram F_0/F versus $[Q]$, and if dynamic quenching occurs the approximate bimolecular quenching constant (k_q , M⁻¹ s⁻¹) may be calculated from Eq. (2) taking the fluorescence lifetime (τ_0) of tryptophan in albumin around 10⁻⁸ s. In case of static quenching, the binding constant is the Stern–Volmer constant itself. Binding constants of fluoroquinolones with human serum albumins were determined in some works. The values of K_{SV} (at 298 K) for the interaction of NOR and SPAR with BSA were 3.2×10^4 L mol⁻¹ [24] and 1.3×10^5 L mol⁻¹ [26], respectively. The binding constant of the ofloxacin, an analogous of the levofloxacin, was 4.3×10^5 L mol⁻¹ [25].

The calculated values of K_{SV} for the interaction of fluoroquinolones and their complexes with BSA as given in Table 4 indicate good binding. [AuCl₂(LEVO)]Cl exhibits the strongest protein-binding ability. In case of dynamic quenching, the quenching constants k_q depend on the probability of a collision between fluorophore and quencher and is a measure of the exposure of tryptophan residues to the drug. The upper limit of k_q expected for a diffusion-controlled bimolecular process is 10¹⁰ L mol⁻¹ s⁻¹ [26]. The magnitude of k_q in the present study (10¹²–10¹³ L mol⁻¹ s⁻¹) is much greater than this limit, and shows that the process is not diffusion controlled, and specific drug–protein interactions are involved.

4. Conclusions

The fluoroquinolones react with Au(III) ion furnishing compounds [AuCl₂(L)]Cl, where L = NOR, LEVO or SPAR. Spectroscopic data, including IR, ¹H, ¹³C, elemental analyses and conductivity measurements of the complexes are consistent with mononuclear structures, where the ligands coordinates to the metal in a bidentate way by piperazine nitrogen atoms. This type of coordination is considerate rare.

The complexes showed moderate binding affinity to BSA protein giving relatively high binding constants. UV spectroscopy studies have revealed the ability of the fluoroquinolones and Au(III) complexes to bind to DNA. The binding strength of the complexes with CT DNA has shown that the complexes exhibit higher K_b values than the free fluoroquinolones. This results corroborate with the cytotoxic activity data, in which Au(III) complexes present a significant and similar cytotoxic activity and were more active than the free ligands.

Acknowledgments

The present study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- [1] Y.S. Kim, K.M. Kim, R. Song, M.J. Jun, Y.S. Sohna, Synthesis, characterization and antitumor activity of quinoloneplatinum(II) conjugates, *J. Inorg. Biochem.* 87 (2001) 157–163.
- [2] H. Thadepalli, F. Salem, S.K. Chuah, S. Gollapudi, Antitumor activity of trovafloxacin in an animal model, *In Vivo* 19 (2005) 269–276.
- [3] R.E. Hawtin, D.E. Stockett, J.A.W. Byl, R.S. McDowell, N. Tan, M.R. Arkin, A. Conroy, W. Yang, N. Osheroff, J.A. Fox, Voreloxin is an anticancer quinolone derivative that intercalates DNA and poisons topoisomerase II, *J. PLoS One* 5 (2010) 1–10.
- [4] L.M.M. Vieira, M.V. de Almeida, H.A. de Abreu, H.A. Duarte, R.M. Grazul, A.P.S. Fontes, Platinum(II) complexes with fluoroquinolones: synthesis and characterization of unusual metal–piperazine chelates, *Inorg. Chim. Acta* 362 (2009) 2060–2064.
- [5] M.S. Refat, Synthesis and characterization of norfloxacin-transition metal complexes (group 11, IB): spectroscopic, thermal, kinetic measurements and biological activity, *Spectrochim. Acta Part A* 68 (2007) 1393–1405.
- [6] F. Gao, P. Yang, J. Xie, H. Wang, Synthesis, characterization and antibacterial activity of novel Fe(III), Co(II), and Zn(II) complexes with norfloxacin, *J. Inorg. Biochem.* 60 (1995) 61–67.
- [7] S.A. Sadeek, Synthesis, thermogravimetric analysis, infrared, electronic and mass spectra of Mn(II), Co(II) and Fe(III) norfloxacin complexes, *J. Mol. Struct.* 753 (2005) 1–12.
- [8] A. Casini, C. Hartinger, C. Gabbiani, E. Mini, P.J. Dyson, B.K. Keppler, L. Messori, Gold(III) compounds as anticancer agents: relevance of gold–protein interactions for their mechanism of action, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 564–575.
- [9] D.D. Perrin, B. Dempsey, Buffers for pH and Metal Ion Control, Chapman and Hall, New York, 1974.
- [10] J. Marmur, A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 208–218.
- [11] F.C.L. Luiz, L.S. Garcia, L.S. Goes Filho, L.R. Teixeira, S.R.W. Louro, Fluorescence studies of gold(III)–norfloxacin complexes in aqueous solutions, *J. Fluoresc.* 21 (2011) 1933–1940.
- [12] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [13] A.M. Pyle, J.P. Rehmann, R. Meshoyrer, C.V. Kumar, N.J. Turro, J.K. Barton, Mixed-ligand complexes of ruthenium(II): factors governing binding to DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 3051–3058.
- [14] J.R. Lakowicz, G. Weber, Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules, *Biochemistry* 12 (1973) 4161–4170.
- [15] B.S. Macias, M.C. Martinez, A.N. Sanchez, A.H. Dominguez-Gil, A physico-chemical study of the interaction of ciprofloxacin and ofloxacin with polyvalent cations, *Int. J. Pharm.* 106 (1994) 229.
- [16] V.L. Dorofeev, Infrared spectra and the structure of drugs of the fluoroquinolone group, *Pharm. Chem. J.* 38 (2004) 693–697.
- [17] D.G.J. Batista, P.B. Silva, L.S. Garcia, D.R. Lachter, R.S. Silva, J. Felcman, S.R.W. Louro, L.R. Teixeira, M.N.C. Soeiro, Co(II), Mn(II) and Cu(II) complexes of fluoroquinolones: synthesis, spectroscopical studies and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*, *Polyhedron* 30 (2011) 1718–1725.
- [18] C.D. Bortner, N.B. Oldenburg, J.A. Cidlowski, The role of DNA fragmentation in apoptosis, *Trends in Cell Biol.* 5 (1995) 21–26.
- [19] L.I. Huschtscha, J.R. Noble, A.A. Neumann, E.L. Moy, P. Barry, J.R. Melki, S.J. Clark, R.R. Reddel, Loss of p16^{INK4} expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells, *Cancer Res.* 58 (1998) 3508–3512.
- [20] I. Grivicich, A. Regner, A.B. da Rocha, Morte celular por apoptose, *Revista Brasileira de Cancerologia* 53 (2007) 335–343.
- [21] S.W. Lowe, A.W. Lin, Apoptosis in cancer, *Carcinogenesis* 21 (2000) 485–495.
- [22] P.J. Cox, G. Psomas, C.A. Bolos, Characterization and DNA-interaction studies of 1,1-dicyano-2,2-ethylene dithiolate Ni(II) mixed-ligand complexes with 2-amino-5-methyl thiazole, 2-amino-2-thiazoline and imidazole. Crystal structure of [Ni(i-MNT)(2a-5mt)(2)], *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 6054–6062.
- [23] A. Tarushi, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, A. Terzis, G. Psomas, D.P. Kessissoglou, Zinc(II) complexes of the second-generation quinolone antibacterial drug enrofloxacin: structure and DNA or albumin interaction, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 2678–2685.
- [24] B.P. Kamat, Study of the interaction between fluoroquinolones and bovine serum albumin, *J. Pharm. Biom. Anal.* 39 (2005) 1046.
- [25] Y. Ni, X. Zhang, S. Koko, Spectrometric studies on the interaction of fluoroquinolones and bovine serum albumin, *Spectrochim. Acta Part A* 75 (2010) 547–552.
- [26] K.C. Skyrianou, E.K. Efthimiadou, V. Psycharis, A. Terzis, D.P. Kessissoglou, G. Psomas, Nickel–quinolones interaction. Part 1–nickel(II) complexes with the antibacterial drug sparfloxacin: structure and biological properties, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 1617–1625.

Copper(II)–fluoroquinolone complexes with anti-Trypanosoma cruzi activity and DNA binding ability

Darliane A. Martins, Ligiane R. Gouvea, Denise da Gama Jean Batista, Patrícia Bernardino da Silva, Sonia R. W. Louro, et al.

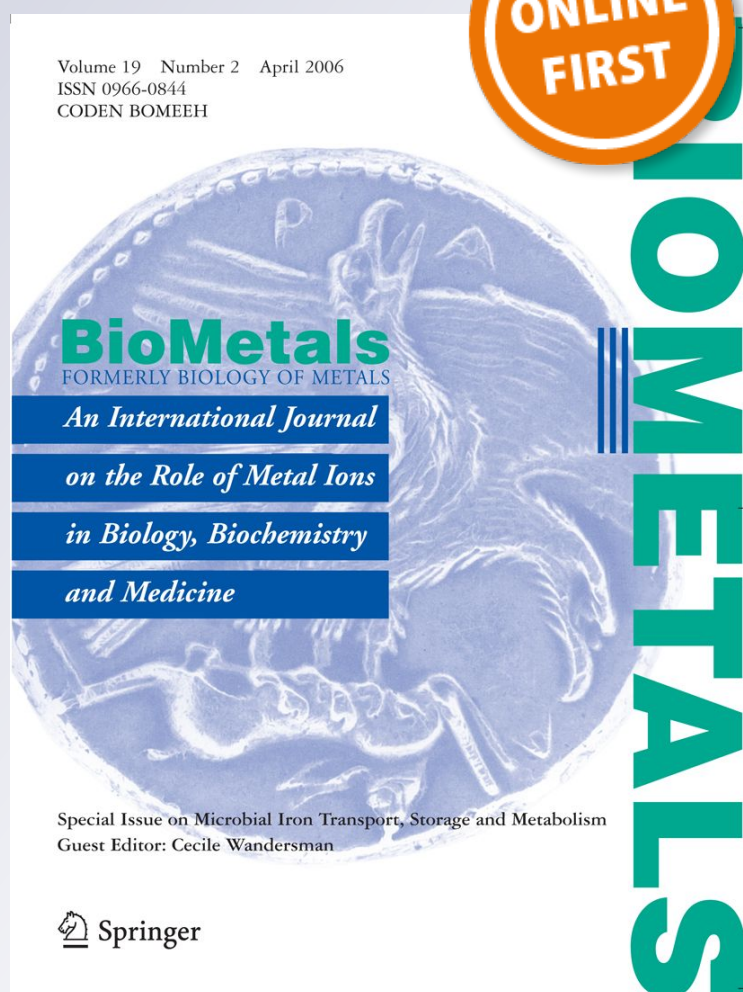
BioMetals

An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry and Medicine

ISSN 0966-0844

Biometals

DOI 10.1007/s10534-012-9565-3



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC.. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Copper(II)–fluoroquinolone complexes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and DNA binding ability

Darlíane A. Martins · Ligiane R. Gouvea · Denise da Gama Jean Batista ·
Patrícia Bernardino da Silva · Sonia R. W. Louro ·
Maria de Nazaré C. Soeiro · Letícia R. Teixeira

Received: 24 February 2012 / Accepted: 20 May 2012
© Springer Science+Business Media, LLC. 2012

Abstract Copper(II) complexes of fluoroquinolone antibacterial agents levofloxacin (LEV) and sparfloxacin (SPAR), containing or not a nitrogen donor heterocyclic ligand, 2,2'-bipyridine (bipy) or 1,10-phenanthroline (phen), were prepared and characterized. The complexes are of the type $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{L})]$, $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{L})]\text{Cl}$ and $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{L})]$, where L = LEV or SPAR. The data suggest that LEV and SPAR act as zwitterionic bidentate ligands coordinated to Cu(II) through the carboxylate and ketone oxygen atoms. The electron paramagnetic resonance spectra of the $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{L})]\text{Cl}$ and $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{L})]$ complexes (L = LEV and SPAR) in aqueous and DMSO solutions indicate mixture of mononuclear and binuclear forms. The Cu(II) complexes, together with the corresponding ligands, were evaluated for their trypanocidal activity in vitro against *Trypanosoma*

cruzi, the causative agent of Chagas disease. The assays performed against bloodstream trypomastigotes showed that all complexes were more active than their corresponding ligands. Complexes $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{LEV})]$ and $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{SPAR})]$ were revealed, among all studied compounds, to be the most active with $\text{IC}_{50} = 1.6$ and $4.7 \mu\text{M}$, respectively, both presenting a superior effect than benznidazole. The interactions of fluoroquinolones and their Cu(II) complexes with calf-thymus DNA were investigated. These compounds showed binding properties towards DNA, with moderated binding constants values, suggesting that this structure may represent a parasite target.

Keywords Fluoroquinolones · Copper(II) complexes · Anti-*T. cruzi* activity · UV–Vis spectroscopy · Interaction with calf-thymus DNA

D. A. Martins · L. R. Gouvea · L. R. Teixeira (✉)
Departamento de Química, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil
e-mail: lregina@qui.ufmg.br

D. da Gama Jean Batista · P. B. da Silva ·
M. de Nazaré C. Soeiro
Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz,
FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil

S. R. W. Louro
Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica
do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 22653-900, Brazil

Introduction

Fluoroquinolones (FQs) are a group of synthetic antibacterial agents active against various microorganisms (Sharma et al. 2009). Some works regarding the antiparasitary activity of FQs can also be found in the literature, including chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum* (Anquetin et al. 1993) *Trypanosoma cruzi* (Castora et al. 1983), *Trypanosoma brucei* (Chollet et al. 2009; Nenortas et al. 2003), *Leishmania* spp. (Romero

et al. 2005; Cortázar et al. 2007) and *Toxoplasma gondii* (Anquetin et al. 1993; Gozalbes et al. 2000).

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease, affecting approximately eight million individuals in Latin America (Coura and Dias 2009). Also, Chagas disease is emerging in non-endemic areas due to the globalization of immigration and non-vectorial transmission routes (Soeiro and Castro 2011). However, although this neglected tropical disease still poses an important public health problem, resulting in high morbidity and considerable mortality rates, few investments have been allocated towards developing novel anti-*T. cruzi* agents. In fact, the available therapy for this illness, based on only two nitro derivatives, nifurtimox ([3-methyl-4-(5'-nitro-furfurylideneamine) tetrahydro-4*H*-1,4-tiazine-1,1-dioxide], Nf) and benznidazole (*N*-benzyl-2-nitroimidazole acetamide, Bz), presents limited efficacy, especially during the later chronic phase, besides displaying undesirable secondary side effects (Coura and Castro 2002). Additionally, both require long periods of treatment (30–60 days), and natural resistance of different parasite strains to both nitro-derivatives has also been reported (Coura and Castro 2002). Thus, all these drawbacks justify the urgent need to identify better drugs to treat chagasic patients.

With that in mind, not long ago some members of our team developed a series of Co(II) and Cu(II) complexes with norfloxacin (NOR) and sparfloxacin (SPAR). At the time, we managed to demonstrate that, while the free ligands were poorly effective against *T. cruzi*, [CoCl₂(NOR)(H₂O)₂] and [CoCl₂(SPAR)(H₂O)₂] were active against intracellular forms of the parasite and that [CuCl₂(phen)(NOR)] and [CuCl₂(phen)(SPAR)] present trypanocidal effect against both bloodstream trypomastigotes and intracellular forms of *T. cruzi* (Batista et al. 2011).

In the present work we prepare a new series of Cu(II) complexes with levofloxacin (LEV) and SPAR (Fig. 1), containing or not 2,2'-bipyridine (bipy) or 1,10-phenanthroline (phen), in order to verify the importance of the presence of a nitrogen-donor for the anti-*T. cruzi* activity. [CuCl₂(phen)(SPAR)] which had been studied by some members of our team (Batista et al. 2011) was included in this study for comparison. The binding properties of the free fluoroquinolones and their Cu(II) complexes to DNA investigated using UV–Vis spectroscopy.

Experimental

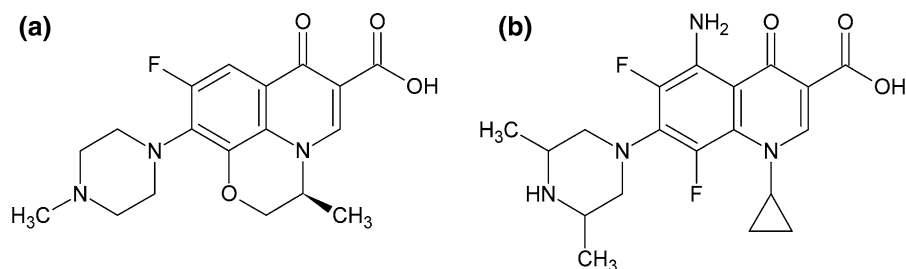
Materials

LEV, SPAR, calf-thymus DNA (CT DNA), 2,2'-bipyridine, CuCl₂·2H₂O and CuCl₂(phen) were purchased from Sigma-Aldrich. All solvents were purchased from Merck.

DNA stock solution was prepared by dilution of CT DNA into universal buffer at pH 7.4 (Perrin and Dempsey 1974), followed by exhaustive stirring at 4 °C for 3 days, and storage at 4 °C for no longer than a week. The stock solution of CT DNA gave a ratio of UV absorbance at 260 and 280 nm (A_{260}/A_{280}) of 1.90, indicating that DNA was sufficiently free of protein contamination (Marmur 1961). The DNA concentration was determined by the UV, absorbance at 260 nm after 1:20 dilution using $\epsilon = 6,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Reichmann et al. 1954).

The solutions of fluoroquinolones and Cu(II) complexes were prepared in universal buffer at pH 7.4. Universal Buffer consists of citric acid (Sigma), potassium phosphate monobasic (Synth), sodium tetraborate (Ecibra), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Sigma) and potassium chloride (Synth). For pH

Fig. 1 Structures of
a levofloxacin and
b sparfloxacin



regulation the required amount of a 0.4 mol L⁻¹ sodium hydroxide solution (Nuclear) was added (Perrin and Dempsey 1974).

Apparatus

Elemental analyses were performed on a CE Instruments, model EA 1110. Molar conductivity measurements were performed in H₂O or DMF solutions, 1 × 10⁻³ mol L⁻¹ concentration, using a Quimis, model Q405M, conductivity meter. The IR spectra were acquired on a Mattson Instruments Galaxy 3000 spectrophotometer using KBr pellets. X-band electron paramagnetic resonance (EPR) spectra were obtained with a Bruker ESP300E spectrometer with modulation frequency of 100 kHz and modulation amplitude of 1 mT. Frozen aqueous and DMSO solutions of the complexes (~1 mM) were measured at liquid N₂ temperature (77 K) in Teflon® tubes of 3 mm internal diameter. A Hewlett Packard 8451-A UV-Vis spectrophotometer was used to obtain UV-Vis spectra with a 1.00 cm quartz cell.

Syntheses of [CuCl₂(bipy)] precursor

Equimolar amounts of CuCl₂·2H₂O and 2,2'-bipyridine (1.0 × 10⁻³ mol) were dissolved in acetone (20 mL). The reaction mixture was kept under stirring for 24 h. The solid which precipitated was filtered and washed with diethyl ether and dried.

Synthesis of the complexes

The complexes were obtained by dissolving LEV or SPAR (0.31 mmol) in acetone (20 mL) with gentle heating and stirring. After cooling the solution to room temperature CuCl₂·2H₂O, [CuCl₂(bipy)] or [CuCl₂(phen)] (0.31 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature for 24 h. The solids which precipitated were filtered and washed with diethyl ether and dried in vacuo.

[CuCl₂(H₂O)(LEV)] (1): Green solid. Yield: 71 %. Anal.: found, C 42.3, H 4.6, N 8.1. Calc. for C₁₈H₂₂N₃O₅Cl₂FCu, C 42.1 %, H 4.3 %, N 8.2 %. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 40.8 μS cm⁻¹. IR (cm⁻¹): 3469 s ν(OH); 1592 m ν(C=O)_p; 1630 s ν_{as}(COO⁻); 1344 m ν_s(COO⁻).

[CuCl(bipy)(LEV)]Cl·3H₂O (2): Green solid. Yield: 61 %. Anal.: found, C 47.4, H 4.6, N 9.8. Calc.

for C₂₈H₃₄N₅O₇Cl₂FCu, C 47.6 %, H 4.8 %, N 9.9 %. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, H₂O): 142 μS cm⁻¹. IR (cm⁻¹): 3422 s ν(OH); 1518 s ν(C=O)_p; 1617 s ν_{as}(COO⁻); 1343 m ν_s(COO⁻).

[CuCl₂(phen)(LEV)]·4H₂O (3): Green solid. Yield: 65 %. Anal.: found, C 47.4, H 5.0, N 9.0. Calc. for C₃₀H₃₆N₅O₈Cl₂FCu, C 48.2 %, H 4.8 %, N 9.4 %. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 38 μS cm⁻¹. IR (cm⁻¹): 3442 s ν(OH); 1584 s ν(C=O)_p; 1643 s ν_{as}(COO⁻); 1395 m ν_s(COO⁻).

[CuCl₂(H₂O)(SPAR)]·H₂O (4): Green solid. Yield: 78 %. Anal.: found, C 40.4, H 4.9, N 9.7. Calc. for C₁₉H₂₈N₄O₆Cl₂F₂Cu, C 40.6 %, H 4.7 %, N 10.0 %. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 29 μS cm⁻¹. IR (cm⁻¹): 3431 s ν(OH); 1573 s ν(C=O)_p; 1636 s ν_{as}(COO⁻); 1385 m ν_s(COO⁻).

[CuCl(bipy)(SPAR)]Cl·2H₂O (5): Green solid. Yield: 92 %. Anal.: found, C 47.6, H 4.4, N 11.5. Calc. for C₂₉H₃₀N₆O₃Cl₂F₂Cu, C 48.4 %, H 4.8 %, N 11.7 %. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, H₂O): 148 μS cm⁻¹. IR (cm⁻¹): 3445 s ν(OH); 1568 s ν(C=O)_p; 1611 s ν_{as}(COO⁻); 1384 m ν_s(COO⁻).

[CuCl₂(phen)(SPAR)]·3H₂O (6): Green solid. Yield: 76 %. Anal.: found, C 49.1, H 4.8, N 10.9. Calc. for C₃₁H₃₆N₆O₆Cl₂F₂Cu, C 48.9 %, H 5.8 %, N 11.0 %. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 37 μS cm⁻¹. IR (cm⁻¹): 3422 s ν(OH); 1574 s ν(C=O)_p; 1632 m ν_{as}(COO⁻); 1383 m ν_s(COO⁻).

Parasites

Y strain of *T. cruzi* was used throughout the experiments. Bloodstream forms were harvested by heart puncture from *T. cruzi*-infected Swiss mice at the peak of parasitemia (Meirelles et al. 1982).

Trypanocidal analysis

For the in vitro analysis on trypomastigotes, the parasites were incubated at 37 °C in the presence of increasing doses (0–200 μM) of each compound diluted in Dulbecco's modified medium supplemented with 5 % fetal bovine serum and 1 mM L-glutamine (DMES) (Batista et al. 2010). After 24 h, death rates were determined by light microscopy through the direct quantification of live parasites using a Neubauer chamber, and IC₅₀ values (drug concentration that reduces 50 % of the number of lived parasites) were then calculated as reported (Daliry et al. 2009).

Mammalian cell cultures and toxicity assays

Primary cultures of embryonic cardiomyocytes (CM) were obtained following the previously described method (Meirelles et al. 1986). After purification, the CM were seeded at a density of 0.1×10^6 cells/well into 24-well culture plates, or 0.05×10^6 cell/well into 96-well microplates, containing gelatin-coated cover slips and sustained in Dulbecco's modified medium supplemented with 10 % horse serum, 5 % fetal bovine serum, 2.5 mM CaCl_2 , 1 mM L-glutamine and 2 % chicken embryo extract (DMEM). All procedures were carried out in accordance with the guidelines established by the FIOCRUZ Committee of Ethics for the Use of Animals (License 0099/01). All the cultures were maintained at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO_2 , and the assays were run at least three times in duplicate. In order to rule out toxic effects of the compounds on mammalian host cells, uninfected CMs were incubated for 24 h at 37 °C in presence or absence of the compounds (up to 200 μM) diluted in DMEM, then their morphology evaluated by light microscopy and the cell viability measured by the MTT colorimetric assay (Mosmann 1983). The absorbance was measured at 490 nm wavelength with a spectrophotometer (VERSAmx tunable, Molecular Devices, USA) allowing the determination of LC_{50} values (drug concentration that reduces 50 % of cellular viability) and the respective selective indexes ($\text{SI} = \text{LC}_{50}/\text{IC}_{50}$).

DNA binding studies

The interaction of complexes **1–6** with CT DNA has been studied with UV spectroscopy in order to investigate the possible binding modes to CT DNA and to calculate the binding constants (K_b). In UV titration experiments, the spectra of each compound in the presence of CT DNA have been recorded for a constant compound concentration in diverse [compound]/[CT DNA] mixing ratio (r). K_b values were obtained by monitoring absorbance changes in the compounds spectra at the corresponding λ_{max} (287, 288, 272, 288, 291, and 272 nm for complexes **1**, **2**, **3**, **4**, **5** and **6**, respectively), with increasing concentrations of CT DNA. K_b is given by the ratio of slope to the y intercept in plots $[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$, according to the Eq. 1 (Pyle et al. 1989):

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)_q} + \frac{1}{[K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)]} \quad (1)$$

where $[\text{DNA}]$ is the concentration of DNA in base pairs, ε_a , ε_f and ε_b correspond to the apparent absorption coefficient $A_{\text{obsd}}/[\text{compound}]$, the extinction coefficient for the free compound and the extinction coefficient for the compound in the fully bound form, respectively.

Results and discussion

Microanalyses and molar conductivity studies

Microanalyses suggest the formation of $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEV})]$ (**1**), $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEV})]\text{Cl}$ (**2**), $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{LEV})]$ (**3**), $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})]$ (**4**), $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}$ (**5**) and $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{SPAR})]$ (**6**) in which the fluoroquinolones LEV and SPAR coordinate as bidentate ligands. The molar conductivity data reveal that the complexes (**1**), (**3**), (**4**) and (**6**) are non-electrolytes and that complexes (**2**) and (**5**) are 1:1 electrolytes, in accordance with the proposed formulations.

Infrared spectral studies

In the IR spectra of LEV and SPAR the valence vibration of the carboxylic stretch $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{carb}}$ was found at 1,725 and 1,716 cm^{-1} , respectively, and the pyridone stretch $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{p}}$ at 1,620 and 1,641 cm^{-1} , respectively (Efthimiadou et al. 2006). The characterization of metal–quinolone complexes can be achieved by studying the most typical vibrations that are characteristic of the coordination type of quinolones. In the IR spectra of the complexes **1–6** the absorption of the $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{carb}}$ vibration has disappeared. Two very strong characteristic bands are present in the 1,611–1,636 and 1,344–1,395 cm^{-1} range assigned to $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{O})$ asymmetric and symmetric stretching vibrations, respectively, whereas $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{p}}$ is shifted from 1,620 and 1,641 to 1,522–1,592 cm^{-1} range upon coordination.

The difference $\Delta = \nu(\text{O}-\text{C}-\text{O})_{\text{asym}} - \nu(\text{O}-\text{C}-\text{O})_{\text{sym}}$ is a useful characteristic for determining the coordination mode of the quinolone ligands. The Δ values for complexes **1–6** fall in the 227–286 cm^{-1} range, indicating a monodentate coordination mode of

the carboxylate group of the LEV and SPAR ligands (Deacon and Phillips 1980). The overall changes of the IR spectra suggest that the LEV and SPAR ligands are coordinated to Cu(II) via the pyridone and one carboxylate oxygen in the neutral zwitterionic form.

EPR spectral properties of the Cu(II) complexes

Room temperature EPR powder spectra

Room temperature X-band EPR spectra of the powdered samples were obtained (Fig. 2; parameters in Table 1). The EPR spectra of **1** and **4** are characteristic of axial symmetry, with g_{\parallel} and g_{\perp} presented in Table 1, and lack the hyperfine splitting as frequently observed in concentrated solid samples of Cu(II) complexes where exchange interactions are present (Hathaway and Billing 1970).

Complex **2** presents a well resolved doublet at the perpendicular region of the spectrum, associated with the triplet state ($S = 1$, $\Delta m_s = \pm 1$) of binuclear complexes (Weil et al. 1993; Singh et al. 2010). At the parallel region a seven-line hyperfine structure also appears. The much weaker half-field resonance from the forbidden transitions $\Delta m_s = \pm 2$ also exhibits the seven line hyperfine structure ($2I + 1$, from the two copper nuclei $I = 3/2 + 3/2$), with an average hyperfine splitting of $A = 90$ G (inset in Fig. 2b), which confirms the presence of a binuclear complex. In this case, there was no contribution from mononuclear

complex. On the other hand, the room temperature EPR spectrum of complex **5** is a superposition of binuclear and mononuclear Cu(II) complexes.

The distance between the two Cu(II) ions can be estimated from the zero field splitting parameter D . The average distance r between the two coupled unpaired electrons can be calculated by using the equation $D = 3/2 g\beta/r^3 = 1.39 \times 10^4 (g/r^3)$, where D is in Gauss and r is in Angstrom (Eaton et al. 1983). The estimated distances r for the binuclear complexes are 4.1 Å (**2**) and 4.5 Å (**5**).

The room temperature EPR spectra of complexes **3** and **6** also suggest the presence of two components. The mononuclear component of **3** lacks the hyperfine splitting at the parallel region but **6** has a hyperfine splitting constant $A_{\parallel} \sim 130$ G. Besides these, wide components that can be due to binuclear complexes are present.

EPR spectra of aqueous and DMSO solutions frozen at 77 K

The EPR spectra of aqueous and DMSO solutions of the complexes were obtained at 77 K. Aqueous solutions produced very wide spectra (Fig. 3), because ice crystals segregate the paramagnetic species and cause cluster formation with strong dipole–dipole interactions. In one experiment, glycerol was added as glass-forming agent and the EPR spectrum became similar to that in DMSO, but since glycerol can act as a

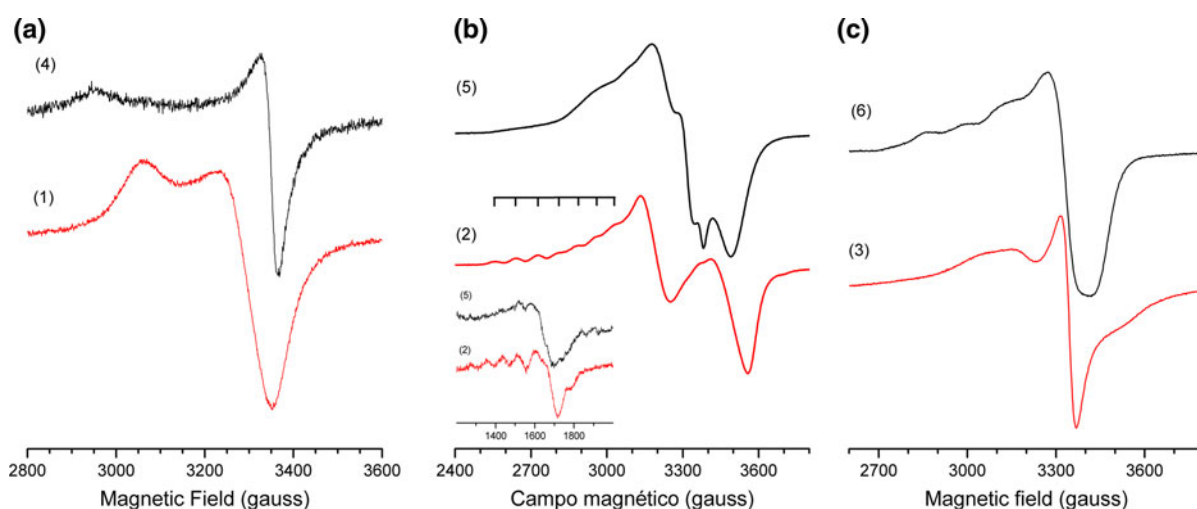


Fig. 2 Solid state powder EPR spectra (X-band), at room temperature, of **a** $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEV})]$ (**1**) and $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})]$ (**4**), **b** $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEV})]\text{Cl}$ (**2**) and $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}$ (**5**), and **c** $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{LEV})]$ (**3**) and $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{SPAR})]$ (**6**)

Table 1 EPR parameters of the Cu(II) complexes (powder at room temperature)

	g_{\perp}	g_{\parallel}	A_{\parallel} (G)	g_{binucl}	D	A_{binucl} (G)
[CuCl ₂ (phen)]	2.074	2.292	155	–		
[CuCl ₂ (H ₂ O)(LEV)] (1)	2.133	2.274	0			
[CuCl ₂ (H ₂ O)(SPAR)] (4)	2.082	2.360	0			
[CuCl(bipy)(LEV)]Cl (2)	–	–	–	2.08	425	75
[CuCl(bipy)(SPAR)]Cl (5)	2.087	2.36	0	2.08	320	–
[CuCl ₂ (phen)(LEV)] (3)	2.08	2.28	0	Very wide		
[CuCl ₂ (phen)(SPAR)] (6)	2.08	2.28	130			

ligand, it can modify the aqueous environment of the complex. In aqueous solutions, complexes showed little evidence of binuclear complexes, excepting **3**, which exhibited the doublet with a zero-field splitting constant D equal to 475 G (see the arrows in Fig. 3c).

In DMSO solutions the EPR spectral components are much more defined, because there is no aggregation upon freezing (Fig. 4). All the spectra represent mixtures of mononuclear and binuclear complexes. The half-field lines due to the forbidden transitions $\Delta m_s = \pm 2$ were detected in these complexes (see insets in Fig. 4). The first derivative central line of the spectrum at $g \sim 2.08$ is assigned to the g_{\perp} component of mononuclear Cu(II). The g_{\parallel} component is around $g \approx 2.2$, and part of the expected fourfold hyperfine splitting is clearly seen in Fig. 4 for complexes **2** and **5**, but is less clear for **3** and **6**.

The estimated distances r for the binuclear complexes in DMSO are 3.9 Å for **2** and **3**, and 4.0 Å, for **5**

and **6**. These distances are similar to those obtained for others Cu(II) dinuclear complexes (Batista et al. 2011; Saha et al. 2004; Psomas et al. 2006).

Anti-*T. cruzi* activity

Table 2 shows the effect of all the evaluated compounds and of Bz, the reference drug, against bloodstream trypomastigote forms of *T. cruzi* (Y strain) expressed as IC₅₀, as well as their corresponding selectivity index (SI, ratio between LC₅₀ and IC₅₀ values).

LEV and SPAR exerted a low trypanocidal effect against bloodstream trypomastigotes, exhibiting IC₅₀ values of 211 and 114 μM, respectively. The association of the Cu(II) ion with LEV and SPAR led to an increase of the trypanocidal activity. Complexes [CuCl₂(H₂O)(LEV)] (**1**) and [CuCl₂(H₂O)(SPAR)] (**4**) are more active than the correspondent free ligands

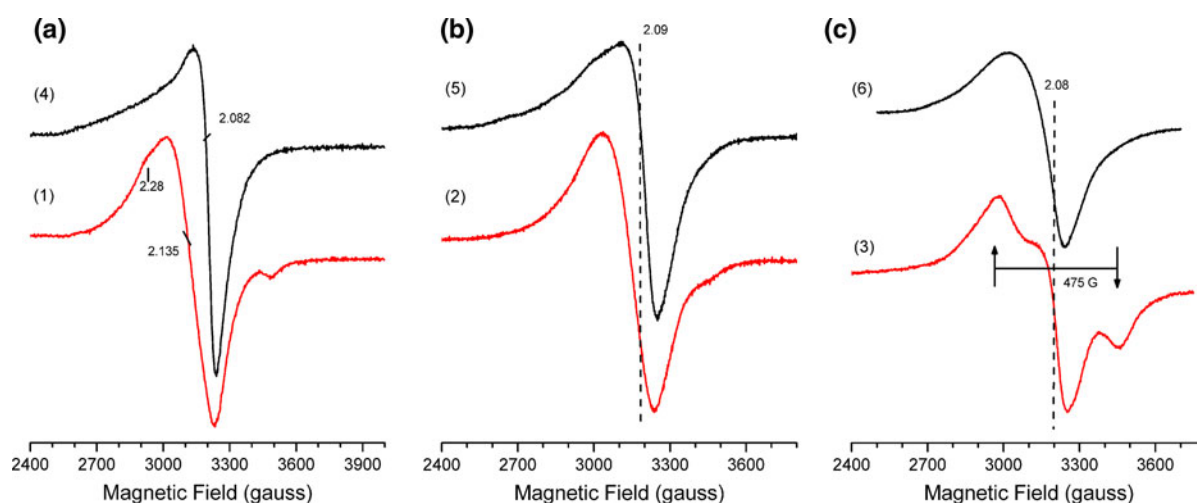


Fig. 3 EPR spectra (X-band) in aqueous solutions at 77 K of **a** [CuCl₂(H₂O)(LEV)] (1) and [CuCl₂(H₂O)(SPAR)] (4), **b** [CuCl(bipy)(LEV)]Cl (2) and [CuCl(bipy)(SPAR)]Cl (5), and **c** [CuCl₂(phen)(LEV)] (3) and [CuCl₂(phen)(SPAR)] (6)

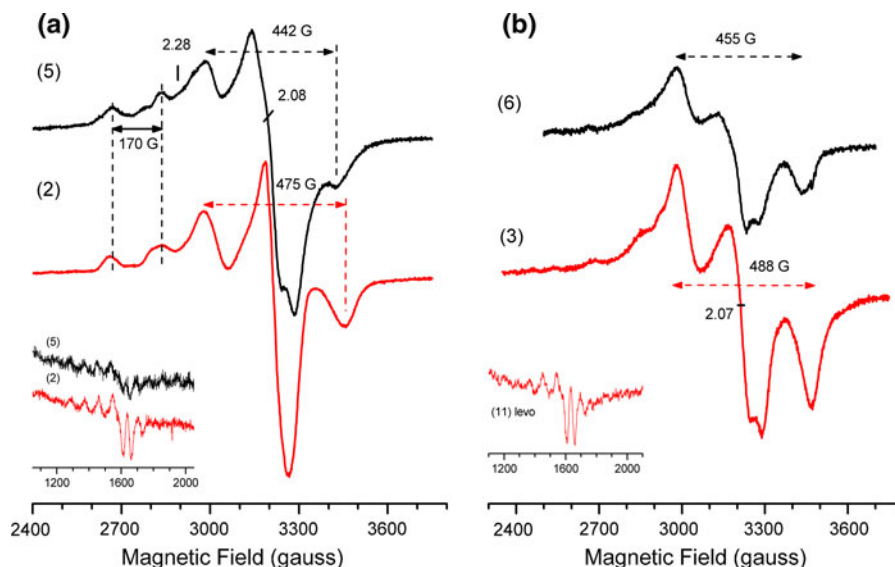


Fig. 4 EPR spectra (X-band) in DMSO solutions at 77 K of **a** [CuCl(bipy)(LEV)]Cl (**2**) and [CuCl(bipy)(SPAR)]Cl (**5**) and **b** [CuCl₂(phen)(LEV)] (**3**) and [CuCl₂(phen)(SPAR)] (**6**)

Table 2 Activity (mean ± SD) and selectivity index (SI) of the compounds and of benznidazole (Bz) upon bloodstream trypomastigotes (BT) forms of *T. cruzi* (Y strain), in vitro (24 h of incubation at 37 °C)

Compound	IC ₅₀ (μM)	Selectivity index (SI)
Levofloxacin (LEV)	211 ± 38	nd
[CuCl ₂ (H ₂ O)(LEV)] (1)	60 ± 9	nd
[CuCl(bipy)(LEV)]Cl (2)	15 ± 3	4.18
[CuCl ₂ (phen)(LEV)] (3)	1.6 ± 1.4	19
Sparfloxacin (SPAR)	114 ± 20	>1.75
[CuCl ₂ (H ₂ O)(SPAR)] (4)	45 ± 30	nd
[CuCl(bipy)(SPAR)]Cl (5)	18 ± 4	3.4
[CuCl ₂ (phen)(SPAR)] (6)	4.7 ± 0.1	2.86
CuCl ₂	83 ± 3	6
[CuCl ₂ (bipy)]	134 ± 7	4.5
[CuCl ₂ (fen)]	7 ± 5	<4
Benznidazole	13 ± 2	77

SD standard deviation of multiple experimental measurements, SI selective index: ratio between LC₅₀/IC₅₀ values, LC₅₀ drug concentration that reduces 50 % the viability of mammalian cell, IC₅₀ drug concentration that reduces 50 % of the number of the parasites, nd not done

and the CuCl₂·2H₂O salt, exhibiting IC₅₀ values of 59.7 and 45 μM, respectively.

The association of 2,2'-bipyridine (bipy) with Cu(II) and LEV and SPAR improves the anti-*T. cruzi*

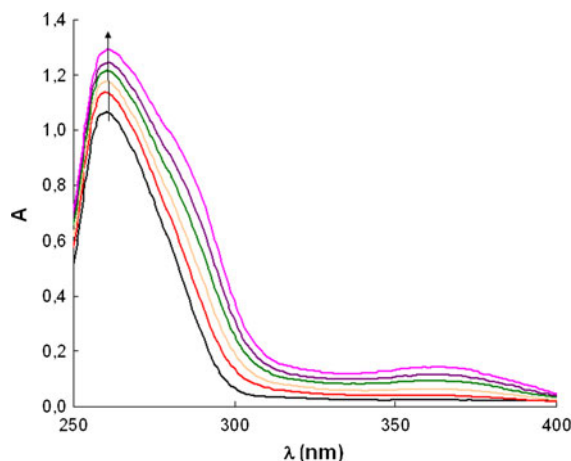


Fig. 5 UV spectra of CT DNA in buffer solution, pH 7.4, in the absence and in the presence of [CuCl₂(H₂O)(SPAR)] (**4**). The arrow shows the changes upon increasing amounts of complex

activity. Complexes [CuCl₂(bipy)(LEV)] (**2**) and [CuCl₂(bipy)(SPAR)] (**5**) exhibit IC₅₀ values of 14.9 and 18.2 μM, respectively. However, the precursor [CuCl₂(bipy)] exhibits a IC₅₀ value of the same order, IC₅₀ = 13.8 μM.

Complexes [CuCl₂(phen)(LEV)] (**3**) and [CuCl₂(phen)(SPAR)] (**6**) were revealed to be the most active among all studied compounds, exhibiting IC₅₀ values of 1.6 and 4.7 μM, respectively, while the precursor [CuCl₂(phen)] exhibits a IC₅₀ value of 7.2 μM.

[CuCl₂(phen)(LEV)] (**3**) is 36 times more active than complex (**1**), 9 times more active than complex (**2**) and 8 times more active than Bz, being the most promising anti-*T. cruzi* agent. Moreover, its SI is the highest one (SI = 19). So, the association of the LEV and SPAR with Cu(II) and 1,10-phenanthroline (phen) in one same complex proved to be a good strategy of activity improvement.

Interaction with DNA

Metal-quinolone complexes can bind to DNA via noncovalent interactions: intercalative, electrostatic

and groove binding (Zeglis et al. 2007; Chao et al. 2002). Changes in the UV spectra of the complexes give evidences of the existing interaction and its mode (Hathaway and Billing 1970). In general hyperchromism means the breakage of the secondary structure of DNA and hypochromism shows that binding of complex to DNA can be due to electrostatic effect or intercalation which may stabilize the DNA duplex (Chao et al. 2002).

UV spectra of CT DNA in the presence of complexes **1–6** are in Fig. 5. The intensity of the band at $\lambda_{\max} = 258$ nm increases for all compounds, indicating that the interaction with CT DNA results in the

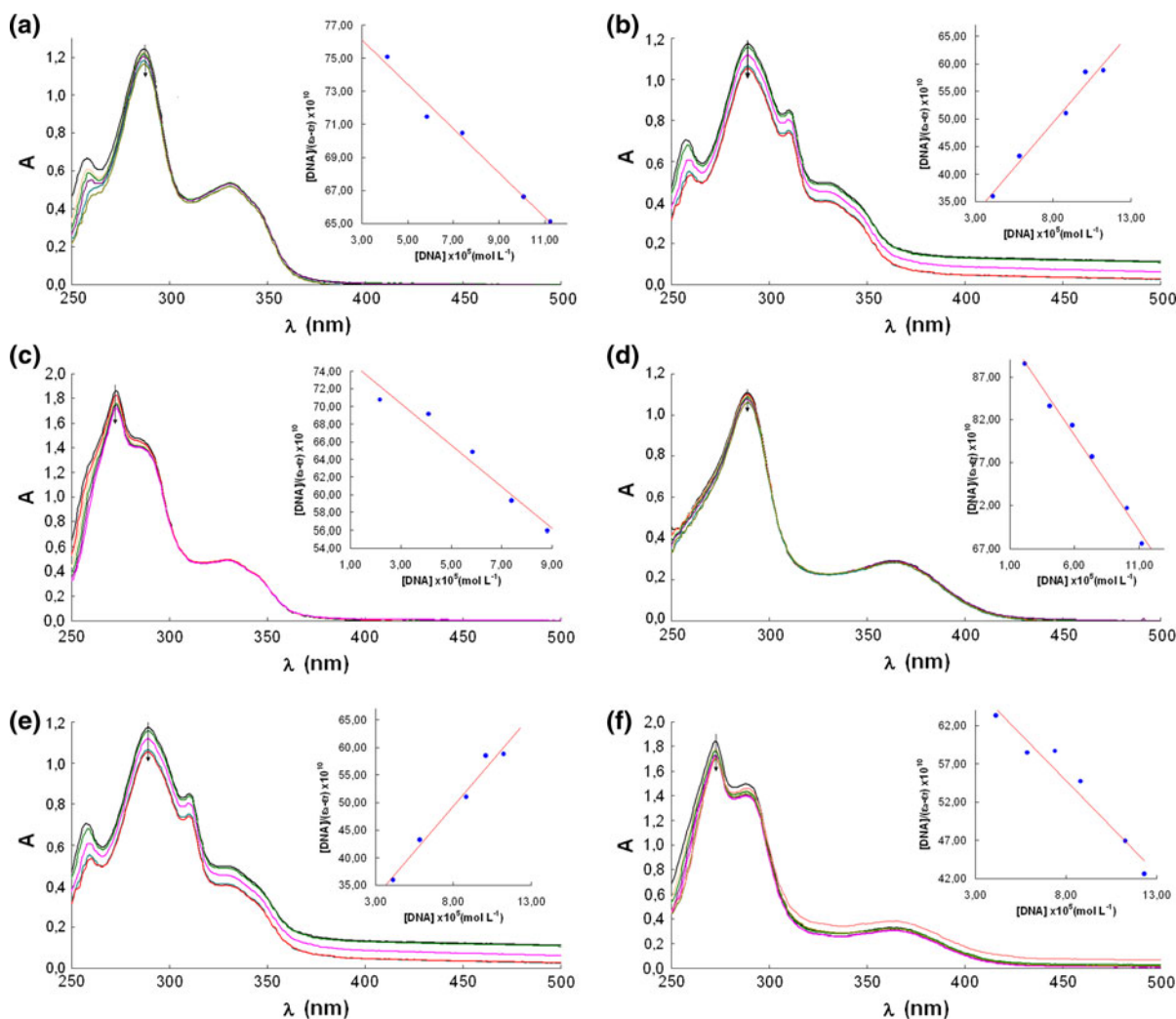


Fig. 6 UV spectra of **a** [CuCl₂(H₂O)(LEV)] (**1**), **b** [CuCl(bipy)(LEV)]Cl (**2**), **c** [CuCl₂(phen)(LEV)] (**3**), **d** [CuCl₂(H₂O)(SPAR)] (**4**), **e** [CuCl(bipy)(SPAR)]Cl (**5**) and **f** [CuCl₂(phen)(SPAR)] (**6**) in buffer solution, pH 7.4, in the absence and in the presence of

CT DNA at increasing amounts. Inset: plot of [DNA]/($\epsilon_a - \epsilon_f$) versus [DNA]. The arrows show the changes upon increasing amounts of CT DNA

direct formation of a new complex with double-helical CT DNA (Efthimiadou et al. 2010; Katsarou et al. 2008; Son et al. 1998).

The changes observed in the UV spectra of complexes **1–6** after addition of increasing amounts of DNA are shown in Fig. 6. The initial spectrum refers to free complex in the absence of CT DNA. In the UV region the intense absorption bands observed in the spectra of the Cu(II) complexes can be attributed to the intra-ligand transitions of LEV and SPAR. Any interaction between each complex and CT DNA could perturb the intra-ligand bands of the complex (Long and Barton 1990).

In the UV-spectra of complexes **1–6** no appreciable changes in the position of the intra-ligand band centred in the 272–291 nm range were observed upon addition of CT DNA. However, the intensity of these bands decrease, resulting in hypochromism (see Fig. 6), and suggesting binding to CT DNA, maybe through intercalation.

The K_b values of Cu(II) complexes are similar ($\sim 10^3 \text{ M}^{-1}$) and suggest a moderated binding to CT DNA.

Conclusions

The developed Cu(II) complexes (**1–6**) present a significant trypanocidal activity in vitro against *T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease. The strategy of joining in one same complex LEV or SPAR with Cu(II) and 1,10-phenanthroline (phen) proved to be a good strategy of activity improvement. It must be pointed out that previous data from our group had already demonstrated the activity of novel complexes of MnCl_2 , CoCl_2 and $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$ coordinated with NOR and SPAR against *T. cruzi* (Batista et al. 2011) indicating the promising trypanocidal effect of this class of compounds.

Acknowledgments The present study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The EPR spectrometer from Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) was used in this research. We thank Dr. Eliane Wajnberg for skilful assistance and discussions.

References

- Anquetin G, Greiner J, Mahmoudi N, Santillana-Hayat M, Gozalbes R, Farhati K, Tripathi KD, Sharma AK, Valecha N, Biswas S (1993) In vitro activity of fluoroquinolones against chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. Indian J Malariol 30:67–73
- Batista DGJ, Pacheco MGO, Kumar A, Branowska D, Ismail MA, Hu L, Boykin DW, Soeiro MNC (2010) Biological, ultrastructural effect and subcellular localization of aromatic diamidines in *Trypanosoma cruzi*. Parasitology 137: 251–259
- Batista DGJ, Silva PB, Stivanin L, Lachter DR, Silva RS, Felcman J, Louro SRW, Teixeira LR, Soeiro MNC (2011) Co(II), Mn(II) and Cu(II) complexes of fluoroquinolones: synthesis, spectroscopical studies and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. Polyhedron 30:1718–1725
- Castora FJ, Vissering FF, Simpson MV (1983) The effect of bacterial DNA gyrase inhibitors on DNA synthesis in mammalian mitochondria. Biochim Biophys Acta 740: 417–427
- Chao H, Mei W, Huang Q, Ji L (2002) DNA binding studies of ruthenium(II) complexes containing asymmetric tridentate ligands. J Inorg Biochem 92:165–170
- Chollet C, Baliani A, Wong PE, Barrett MP, Gilbert IH (2009) Targeted delivery of compounds to *Trypanosoma brucei* using the melamine motif. Bioorg Med Chem 17:2512–2523
- Cortázar TM, Coombs GH, Walker J (2007) *Leishmania panamensis*: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. Exp Parasitol 116: 475–482
- Coura JR, Castro SL (2002) A critical review on chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz 97:3–24
- Coura JR, Dias JC (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz 104:31–40
- Daliry A, Da Silva PB, Da Silva CF, Batista MM, Castro SL, Tidwell RR, Soeiro MNC (2009) In vitro analyses of the effect of aromatic diamidines upon *Trypanosoma cruzi*. J Antimicrob Chemother 64:747–750
- Deacon GB, Phillips RJ (1980) Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylate complexes and the type of carboxylate coordination. Coord Chem Rev 33:227–250
- Eaton SS, More KM, Sawant BM, Eaton GR (1983) Use of the ESR half-field transition to determine the interspin distance and the orientation of the interspin vector in systems with two unpaired electrons. J Am Chem Soc 105:6560–6567
- Efthimiadou EK, Sanakis Y, Raptopoulou CP, Karaliota A, Katsarou N, Psomas G (2006) Crystal structure, spectroscopic, and biological study of the copper(II) complex with third-generation quinolone antibiotic sparfloxacin. Bioorg Med Chem Lett 16:3864–3867
- Efthimiadou EK, Karaliota A, Psomas G (2010) Metal complexes of third-generation quinolone antimicrobial drug sparfloxacin: structure and biological evaluation. J Inorg Biochem 104:455–466

- Gozalbes R, Brun-Pascaud M, Garcia-Domenech R, Galvez J, Girard PM, Doucet JP, Derouin F (2000) Anti-toxoplasma activities of 24 quinolones and fluoroquinolones in vitro: prediction of activity by molecular topology and virtual computational techniques. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2771–2776
- Hathaway BJ, Billing DE (1970) The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper(II) ion. *Coord Chem Rev* 5:143–207
- Katsarou ME, Efthimiadou EK, Psomas G, Karaliota A, Vourloumis D (2008) Novel copper(II) complex of N-propyl-norfloxacin and 1,10 phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities. *J Med Chem* 51(3):470–478
- Long EC, Barton JK (1990) On demonstrating DNA intercalation. *Acc Chem Res* 23:271–273
- Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Mol Biol* 3:208–218
- Meirelles MN, Araujo-Jorge TC, Souza W (1982) Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. *Z Parasitenkd* 68:7–14
- Meirelles MN, Araujo-Jorge TC, Miranda CF, Souza W, Barbosa HS (1986) Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *Eur J Cell Biol* 41:198–206
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–56
- Nenortas E, Kulikowicz T, Burri C, Shapiro TA (2003) Antitrypanosomal activities of fluoroquinolones with pyrrolidinyli substituents. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3015–3027
- Perrin DD, Dempsey B (1974) Buffers for pH and metal ion control. Chapman and Hall, New York
- Psomas G, Tarushi A, Efthimiadou EK, Sanakis Y, Raptopoulou CP, Katsaros N (2006) Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with oxolinic acid. *J Inorg Biochem* 100:1764–1773
- Pyle AM, Rehmann JP, Meshoyrer R, Kumar CV, Turro NJ, Barton JK (1989) Mixed-ligand complexes of ruthenium(II): factors governing binding to DNA. *J Am Chem Soc* 111:3053–3063
- Reichmann ME, Rice SA, Thomas CA, Doty P (1954) A further examination of the molecular weight and size of desoxy-pentose nucleic acid. *J Am Chem Soc* 76:3047–3053
- Romero IC, Saravia NG, Walker J (2005) Selective action of fluoroquinolones against intracellular amastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis* in vitro. *J Parasitol* 91:1474–1479
- Saha DK, Sandbhor U, Shirisha K, Padhye S, Deobagkar D, Anson CE, Powell AK (2004) A novel mixed-ligand antimycobacterial dimeric copper complex of ciprofloxacin and phenanthroline. *Bioorg Med Chem Lett* 14:3027–3032
- Sharma PC, Jain A, Jain S (2009) Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol Pharm* 66:587–604
- Singh LJ, Devi NS, Devi SP, Devi WB, Singh RKH, Rajeswari B, Kadam RM (2010) Spectroscopic studies on bis(1-amidino-O-alkylurea) copper(II) sulfate complexes where alkyl = methyl, ethyl, n-propyl or n-butyl: EPR evidence for binuclear complexes. *Inorg Chem Commun* 13:365–368
- Soeiro MNC, Castro SL (2011) Screening of potential anti-*Trypanosoma cruzi* candidates: in vitro and in vivo. *Open Med Chem J* 5:21–30
- Son GS, Yeo JA, Kim MS, Kim SK, Holmem A, Akerman B, Nordin B (1998) Binding mode of norfloxacin to calf-thymus DNA. *J Am Chem Soc* 120:6451–6457
- Weil JA, Bolton JR, Wertz JE (1993) Electron paramagnetic resonance, elementary theory and practical applications. Wiley, New York
- Zeglis BM, Pierre VC, Barton JK (2007) Metallo-intercalators and metallo-insertors. *Chem Commun* 4565–4579

Norfloxacin Zn(II)-based complexes: acid base ionization constant determination, DNA and albumin binding properties and the biological effect against *Trypanosoma cruzi*

Ligiane R. Gouvea · Darliane A. Martins · Denise da Gama Jean Batista ·
Maria de Nazaré C. Soeiro · Sonia R. W. Louro · Paulo J. S. Barbeira ·
Letícia R. Teixeira

Received: 28 March 2013 / Accepted: 11 July 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Zn(II) complexes with norfloxacin (NOR) in the absence or in the presence of 1,10-phenanthroline (phen) were obtained and characterized. In both complexes, the ligand NOR was coordinated through a keto and a carboxyl oxygen. Tetrahedral and octahedral geometries were proposed for $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**) and $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**), respectively. Since the biological activity of the chemicals depends on the pH value, pH titrations of the Zn(II) complexes were performed. UV spectroscopic studies of the interaction of the complexes with calf-thymus DNA (CT DNA) have suggested that they can bind to CT DNA with moderate affinity in an intercalative mode. The interactions between the Zn(II) complexes and bovine serum albumin (BSA) were investigated by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy at pH 7.4. The experimental data showed static quenching of BSA fluorescence, indicating that both complexes bind to BSA. A modified Stern–Volmer

plot for the quenching by complex **2** demonstrated preferential binding near one of the two tryptophan residues of BSA. The binding constants obtained (K_b) showed that BSA had a two orders of magnitude higher affinity for complex **2** than for **1**. The results also showed that the affinity of both complexes for BSA was much higher than for DNA. This preferential interaction with protein sites could be important to their biological mechanisms of action. The analysis in vitro of the Zn(II) complexes and corresponding ligand were assayed against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease and the data showed that complex **2** was the most active against bloodstream trypomastigotes.

Keywords Norfloxacin · Zn(II) complexes · Anti-*T. cruzi* activity · Acid ionization constant · Interaction with DNA · Interaction with bovine serum albumin

L. R. Gouvea · D. A. Martins · P. J. S. Barbeira ·
L. R. Teixeira (✉)
Departamento de Química, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil
e-mail: lregina@qui.ufmg.br

D. da Gama Jean Batista · M. de Nazaré C. Soeiro
Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz,
FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil

S. R. W. Louro
Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica
do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 22653-900, Brazil

Introduction

Norfloxacin [1-ethyl(-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-quinoline-3-carboxylic acid) (NOR), which was patented in 1978, is a synthetic and potent fluoroquinolone antibacterial agent for oral administration. In general, the antibacterial spectrum of NOR includes a wide variety of aerobic gram-negative and gram-positive bacteria (Appelbaum and Hunter 2000;

Emami et al. 2005; Shaikh et al. 2007; Hooper 1999). The chemical structure of NOR is shown in Fig. 1.

In the literature, there are only few references to the anti-parasitic activity of fluoroquinolones and their complexes (Martins et al. 2012; Batista et al. 2011). *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, affects more than ten million individuals in Latin America. In relation to the treatment of the disease the only current options are benznidazole and nifurtimox. Both present limited efficacy, especially, during the later chronic phase and cause undesirable secondary side effects. Thus, the identification of novel therapeutic agents more selective and presenting higher activity spectrum is an urgent need (Martins et al. 2012; Batista et al. 2011; Coura and Dias 2009; Dias 2007).

The biological activity of NOR is directly related to its ability to cross cell membranes, to bind to cytoplasmic proteins and/or inhibit the replication of DNA of the microorganism. In this sense, the coordination of metal ions to fluoroquinolones can facilitate and improve their mechanism of action (Shaikh et al. 2007).

Previous data showed that the mixed-ligand copper and manganese complexes of 1,10-phenanthroline (phen) result in higher potency against *E. coli* as compared to the free quinolone or the cupric-phen complex. The phen is a ligand with a nitrogen donor heterocycle that can increase the interaction with DNA (Yesilel et al. 2006; Arounaguiri et al. 2000).

In this context, our aim was investigate the synthesis and the structural characterization of new Zn(II) complexes with the first-generation quinolone antibacterial drug NOR in the absence or in the presence of 1,10-phen followed by the biological analysis of their potential effect in vitro against *T. cruzi*.

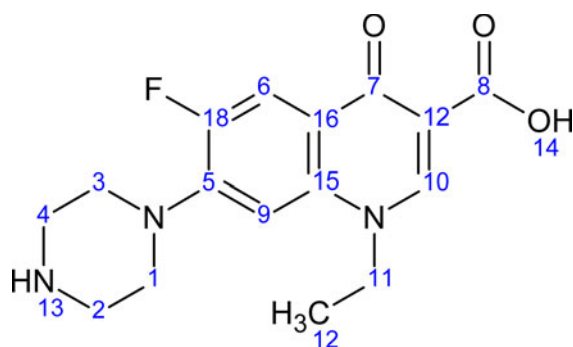


Fig. 1 Structure of norfloxacin

The coordination of a metal ion to a ligand influences the ligand's physicochemical properties. In this work, we studied the effect of the coordination in the acid base ionization constant (pK_a) (Shaikh et al. 2007; Luiz et al. 2011).

Norfloxacin has two ionizable functional groups: an acid (carboxylic group) and a basic group (amine group). In an aqueous solution, it shows three different species, which are cationic, zwitterionic and anionic. The cationic and the anionic forms predominate in acid and basic solutions, respectively. At physiological pH value (pH 7.4), the fluoroquinolone is totally or partially ionized and the predominant specie is the zwitterionic form (Shaikh et al. 2007; Luiz et al. 2011). The three relevant forms of the NOR in aqueous solution ($4 < \text{pH} < 11$) are shown in Fig. 2.

The activity of the fluoroquinolones is directly related to the pH values, since the presence of charged groups is required for biological activity. For example, the reduction in activity in lower pH values is generally attributed to the low penetration of the cationic species in the cell membrane (Shaikh et al. 2007). Consequently, we calculated the NOR-Zn(II) complexes pK_a values.

Furthermore, in order to understand the transportation, uptake and receptor binding of the Zn(II) complexes at molecular level, we also studied the interaction of the complexes with DNA and bovine serum albumin (BSA). DNA is one of the possible targets of anti-*T. cruzi* chemicals, which may include the parasites mitochondrial or nuclear DNA, while BSA is the bovine variant of the most abundant plasma protein in mammals and is responsible for the transportation of chemicals in the plasma (Martins et al. 2012; Skyrianou et al. 2010).

In order to investigate the binding properties of the complexes with calf-thymus DNA (CT DNA) UV spectroscopy was used. The affinity between Zn(II) complexes and BSA was investigated using steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy.

Experimental

Materials

Norfloxacin, CT DNA and BSA were purchased from Sigma-Aldrich. ZnCl_2 was purchased from Vetec. All solvents were purchased from Merck.

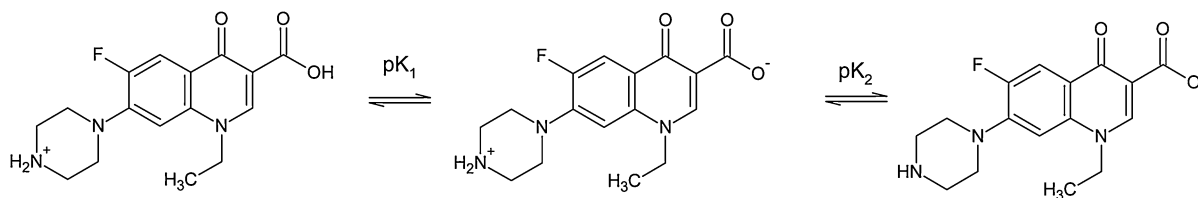


Fig. 2 Acid–base equilibria of the norfloxacin in acidic, neutral and alkaline means

The DNA stock solution was prepared by dissolving CT DNA in a universal buffer at pH 7.4 (Perrin and Dempsey 1974) followed by continuous stirring under refrigeration for 3 days, and maintained at 4 °C for no longer than a week. The stock solution of CT DNA gave a UV absorbance at 260 and 280 nm (A_{260}/A_{280}) of 1.90, indicating that the DNA was sufficiently free of protein contamination. The DNA concentration was determined by the UV absorbance at 260 nm after 1:20 dilution using $\epsilon = 6,600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Marmur 1961; Skyrianou et al. 2009).

The solutions of BSA ($2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) and Zn(II) complexes were prepared in 0.1 mol L^{-1} universal buffer at pH 7.4 (Perrin and Dempsey 1974). The concentration of both Zn(II) complex solutions were $8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ for both the pK_a and BSA studies and $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for the DNA interaction studies.

Instrumentation—physical measurements

Elemental analyses were performed on a Perkin Elmer 2400 CHN Elemental Analyzer. The thermogravimetric curves were obtained in a Thermobalance Shimadzu TGA-5H air atmosphere (flow rate of 50 mL min^{-1}). The heating rate was 10 °C and the final temperature reached was 750 °C.

Molar conductivity measurements were taken from the Zn(II) complexes using a dimethylformamide (DMF) solution with $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ concentration. The measurements were taken using a Quimis, model Q405M, conductivity meter after calibration with a KCl aqueous solution ($k = 74.00 \mu\text{S cm}^{-1}$) as a standard solution.

Infrared (IR) spectra ($370\text{--}4,000 \text{ cm}^{-1}$) were obtained on a Mattson Instruments Galaxy, model 3000 spectrophotometer using potassium bromide (KBr) pellets. NMR spectra were obtained with a Bruker DRX-400 Avance (400 MHz) spectrometer

using d^6 -DMSO (deuterated dimethyl sulfoxide) as the solvent and tetramethylsilane as internal reference.

The pK_a measurements and DNA studies were performed on a Cary Eclipse Varian-Agilent spectrophotometer. In the BSA studies, UV–Visible absorption spectra were obtained with a diode array spectrophotometer HP 8452A (Agilent) using 1.00 cm quartz cells. Fluorescence spectra were recorded on a PTI QM1 spectrofluorometer (Photon Technology International, Birmingham, NJ). Fluorescence lifetimes were measured using an IBH-Horiba-Jobin-Yvon TCSPC system. The light source used for excitation was a 330 nm nanoLED N-16, 1.0 ns nominal pulse duration, 1 MHz repetition rate. Computer programs supplied by Horiba Jobin Ivon IBH which perform reconvolution fits were employed for processing the time decay curves. Fluorescence decay analysis of each titration set was performed with multiexponential expressions ($0.9 < \chi^2 < 1.2$).

Synthesis of the complexes

$[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (I)

Appropriate quantities of NOR (0.25 mmol) were dissolved in acetone (40 mL), which were then added to a 5 mL acetone solution of ZnCl_2 (0.25 mmol). Immediately after the addition of the ligand, a precipitate was formed. The reaction mixture was continuously stirred at room temperature for 24 h. The solid obtained was vacuum filtered, washed with diethyl ether and dried.

$[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$: yield: 86 %. Anal. calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{FN}_3\text{O}_4\text{Zn}$: C, 40.4; H, 4.7; N, 8.8. Found: C, 40.0; H, 4.4; N, 8.4 %. Conductivity ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ in DMF): $10 \mu\text{S cm}^{-1}$. IR (cm^{-1}): 1586 s (strong) $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1628 s $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$; 1384 s $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$; 3386 m $\nu(\text{NH})$; 2,464 and 2,772 m $\nu(\text{NH}_2^+)$. TG: mass loss (313–373 K): 4.8 % (found),

3.8 % (calc). ^1H NMR (DMSO- d_6): 1.40 (t, H-12); 2.67 (m, H2, H4); 3.23 (m, H1, H3); 4.58 (q, H11); 7.20 (d, H9); 7.95 (d, H6), 8.95 (s, H10). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 177.13 (C7); 166.07 (C8); 151.48, 153.95 (C18); 148.65 (C10); 144.65 (C5); 137.10, 137.14 (C15); 119.75, 119.81 (C16); 111.26, 111.49 (C6); 107.13 (C12); 105.58, 106.19 (C9); 49.07 (C1, C3); 43.36 (C2, C4); 47.32 (C11); 14.42 (C12).

[ZnCl₂(NOR)(phen)]·2H₂O (2)

The precursor [ZnCl₂(phen)] was obtained using appropriate quantities of phen (0.50 mmol) dissolved in methanol (35 mL). This solution was added to a methanolic solution (5 mL) of ZnCl₂ (0.50 mmol). Immediately after the addition of phen, a precipitate was formed. The reaction mixture was stirred continuously at room temperature for 24 h. The solid obtained was vacuum filtered, washed with diethyl ether and dried.

Appropriate quantities of the precursor, [ZnCl₂(phen)], (0.25 mmol) were dissolved in acetone (20 mL), which were then added to a acetone solution (40 mL) of NOR (0.25 mmol). Immediately after the addition of the ligand, a precipitate was formed. Once again, the reaction mixture was stirred continuously at room temperature for 24 h and the solid obtained was vacuum filtered and washed with diethyl ether and dried.

[ZnCl₂(phen)]: yield: 89 %. Anal. calc. for C₁₂H₈Cl₂N₂Zn: C, 45.5; H, 2.6; N, 9.6. Found: C, 45.4; H, 2.2; N, 9.4 %. Conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ in DMF): 21 $\mu\text{S cm}^{-1}$. IR (cm⁻¹): 1426 s $\nu(\text{CC, CN})$; 1519 s $\nu(\text{CC, CN})$; 853 s $\gamma(\text{CH})$; 726 s $\gamma(\text{CH})$.

[ZnCl₂(NOR)(phen)]·2H₂O (2): yield: 80 %. Anal. calc. for C₂₈H₃₁Cl₂FN₅O₅Zn: C, 49.8; H, 4.9; N, 10.4. Found: C, 49.5; H, 3.7; N, 10.3 %. Conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ in DMF): 23 $\mu\text{S cm}^{-1}$. IR (cm⁻¹): 1579 s $\nu(\text{C=O})$; 1626 s $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$; 1385 s $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$, 848 m $\gamma(\text{CH})$; 728 m $\gamma(\text{CH})$; 3422 s $\nu(\text{NH})$; 2,468 and 2,732 m $\nu(\text{NH}_2^+)$. TG: mass loss (373–423 K): 4.9 % (found), 4.8 % (calc). ^1H NMR (DMSO- d_6): 1.40 (t, H-12); 3.10 (m, H2, H4); 3.43 (m, H1, H3); 4.60 (q, H11); 7.18 (d, H9); 7.90 (d, H6), 8.95 (s, H10). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 177.11 (C7); 166.09 (C8); 151.54, 153.95 (C18); 148.51 (C10); 145.22, 145.32 (C5); 136.62, 137.15 (C15); 119.31, 119.38 (C16); 111.10, 111.34 (C6); 107.04 (C12); 105.28,

105.84 (C9); 48.84 (C1, C3); 44.22 (C2, C4); 47.32 (C11); 14.34 (C12).

Anti-*Trypanosoma cruzi* activity

Parasites

Y strain of *T. cruzi* was used throughout the experiments. Bloodstream forms were harvested by heart puncture from *T. cruzi*-infected Swiss mice at the peak of parasitemia (Meirelles et al. 1982).

Trypanocidal analysis

For the in vitro analysis on trypomastigotes, the parasites were incubated at 37 °C in the presence of increasing doses (0–200 μM) of each compound diluted in Dulbecco's modified medium supplemented with 5 % fetal bovine serum and 1 mM L-glutamine (DMES) (Batista et al. 2009). After 24 h, death rates were determined by light microscopy through the direct quantification of live parasites using a Neubauer chamber, and IC₅₀ values (drug concentration that reduces 50 % of the number of lived parasites) were then calculated as reported (Daliry et al. 2009).

pK_a determination of the norfloxacin and the Zn(II) complexes

The Henderson–Hasselbalch equation describes the derivation of pH as a measure of acidity, using pK_a , the negative log of the acid dissociation constant, in biological and chemical systems (Luiz et al. 2011).

In order to determine the pK_a values it was necessary to know the concentration of protonated and neutral species in solution, depending on the pH. These concentrations were obtained by emission spectroscopy. The spectroscopic parameter used was the fluorescence intensity at a given wavelength, I_λ . The equation below (Luiz et al. 2011) gives I_λ as a function of the pH, for one titration site:

$$I_\lambda = \frac{I_{\lambda 1}10^{pK} + I_{\lambda 2}10^{pH}}{10^{pH} + 10^{pK}} \quad (1)$$

where $I_{\lambda 1}$ and $I_{\lambda 2}$ are the fluorescence intensity of the protonated and deprotonated drug, respectively, at a given wavelength. In the case of two titratable groups the equation is:

$$I_{\lambda} = \frac{I_{\lambda 1} 10^{pK_1}}{10^{pH} + 10^{pK_1}} + \frac{I_{\lambda 2} 10^{pH}}{10^{pH} + 10^{pK_1}} \cdot \frac{10^{pK_2}}{10^{pH} + 10^{pK_2}} + \frac{I_{\lambda 3} 10^{pH}}{10^{pH} + 10^{pK_2}} \quad (2)$$

where $I_{\lambda 1}$, $I_{\lambda 2}$ and $I_{\lambda 3}$ are the fluorescence intensities of the lowest, intermediate and highest pH form of the drug, respectively, at a given wavelength.

DNA binding studies

The interaction of Zn(II) complexes with CT DNA were studied with UV spectroscopy in order to investigate the possible binding modes to CT DNA and to calculate the binding constants (K_b). Binding constants, K_b , were determined using a constant concentration of the complexes recorded in the absence or presence of increasing CT DNA amounts. K_b values were obtained by monitoring the changes in the absorbance of the complexes at 272 and 271 wavelengths for complexes **1** and **2**, respectively. K_b was given by the ratio of the slope to the y-intercept in plots of $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA]$, according to the Eq. (3) (Pyle et al. 1989):

$$\frac{[DNA]}{\epsilon_a - \epsilon_f} = \frac{[DNA]}{\epsilon_b - \epsilon_f} + \frac{1}{[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]} \quad (3)$$

where $[DNA]$ is the concentration of DNA in base pairs, ϵ_a , ϵ_f and ϵ_b corresponds to the apparent extinction coefficient $A_{\text{obsd}}/[\text{compound}]$, the extinction coefficient for the free compound, and the extinction coefficient for the compound in the fully bound form, respectively.

Bovine serum albumin (BSA) binding studies

The protein-binding studies were performed by tryptophan fluorescence quenching experiments using BSA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) dissolved in a phosphate buffer at pH 7.4. The quenching of the emission intensity at 338 nm of BSA tryptophan residues (Trp-134, Trp-213) was monitored using increasing amounts of complexes **1** and **2** as quenchers. Fluorescence spectra were recorded from 300 to 500 nm at an excitation wavelength of 285 nm. The fluorescence spectra of the quenchers (complexes **1** and **2**) in the buffer solution were recorded under the same experimental conditions and exhibited a

maximum emission of 412 nm. Therefore, the quantitative studies of the serum albumin fluorescence spectra were performed after correction by subtracting the spectra of the complexes.

Stern–Volmer analysis is useful in the estimation of the accessibility of tryptophan residues in proteins to the drug molecules (quenchers) and was used to study the interaction between the quenchers and bovine serum albumin. According to the Stern–Volmer equation for dynamic quenching, Eq. (4) (Lakowicz and Weber 1973):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] + K_{SV} [Q] \quad (4)$$

where F_0 and F are the steady-state fluorescence intensities in the absence and presence of the quencher, respectively. k_q is the bimolecular quenching rate constant of BSA, τ_0 is the average lifetime of BSA without the quencher, $[Q]$ is the concentration of the quencher. K_{SV} is the Stern–Volmer quenching constant. According to Eq. (4), the relation between K_{SV} and k_q in case of dynamic quenching is (Lakowicz and Weber 1973)

$$K_{SV} = k_q \tau_0 \quad (5)$$

but in the case of static quenching, due to the formation of a ground-state non-fluorescent complex, K_{SV} is the actual association constant of the quencher with the protein.

Results and discussion

Microanalysis and molar conductivity studies

Microanalysis suggested the formation of $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**) and $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{-phen})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**) in which NOR is the NOR ligand and phen is the 1,10-phen co-ligand. The thermogravimetric data confirmed the presence of hydration water molecules in the complexes' structures. The neutrality of the compounds was revealed by the conductivity data in a 1:1 DMF solution. The values obtained, between 10 and $23 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$, were well below the conductivity level generally associated with a 1:1 electrolyte in DMF (between 65 and $90 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$), according to the literature, suggesting a non-electrolyte covalent feature (Geary 1971).

Infrared spectral studies

The IR spectrum of free NOR exhibited one band at $1,617\text{ cm}^{-1}$, which was assigned to the stretching vibration of $\nu(\text{CO})_{\text{ketonic}}$. In the spectra of the complexes, the $\nu(\text{CO})$ was affected by the interaction with the metal ion and appeared as a shoulder around $1,579$ and $1,586\text{ cm}^{-1}$. Such behavior has been observed in several quinolone metal ion complexes (Dorofeev 2004).

The band around $1,630\text{ cm}^{-1}$ in the spectra of the complexes was assigned to the asymmetric stretching vibration (ν_{as}) of the coordinated carboxylate group. The two complexes also showed other strong intensity bands at $1,384$ and $1,385\text{ cm}^{-1}$ which were absent in the NOR spectrum and were assigned to the symmetric vibration (ν_{s}) of the coordinated COO^- group. These bands appeared after the ionization of the carboxyl group and were characterized by the formation of a resonance structure. This occurrence suggested the involvement of this group in the interaction with the metal ion (Dorofeev 2004; Gao et al. 1995; Sadeek 2005; Batista et al. 2011).

The carboxylate group can act as unidentate, bidentate or as a bridging ligand, and the frequency separation [$\Delta\nu = \nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$] between the asymmetric and symmetric stretching of this group was used to distinguish between these binding states (Sadeek 2005; Batista et al. 2011). Deacon and Phillips (1980) investigated the asymmetric and symmetric stretching vibrations of a large number of carboxylate complexes with a known crystal structure. They found that unidentate carboxylate complexes exhibit $\Delta\nu > 200\text{ cm}^{-1}$. The observed $\Delta\nu$ values were 244 and 241 cm^{-1} for complexes **1** and **2**, respectively, which suggested a unidentate interaction of the carboxylate group.

The IR spectral data of the Zn(II) complexes show a very strong broad band of about $3,400\text{ cm}^{-1}$ and medium weak to weak bands of about $2,800$ and $2,500\text{ cm}^{-1}$. These bands were assigned to the vibrations of the quaternized nitrogen in the piperazinyl group, which indicated that the zwitterionic form of NOR is involved in the coordination with the Zn(II) (Refat et al. 2010; Refat 2007).

UV–Vis absorption studies

The formation of the Zn(II) complexes was also investigated using UV–Vis spectra. Electronic spectra

of the NOR and their Zn(II) complexes were recorded in the $260\text{--}800\text{ nm}$ region in the universal buffer, pH 7.4. The absorption spectrum of the free NOR showed three bands at 272 , 324 and 334 nm , attributed to $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ transitions. In the spectra of the complexes, these bands showed less absorption (hypochromism), indicating that the carboxylic group and the ketone group were involved in the complexation (Refat et al. 2010; Refat 2007).

^1H NMR measurements

The ^1H NMR spectra of the free NOR present a triplet at $\delta 1.41$ attributed to CH_3 and two multiplets at $\delta 2.89$ and $\delta 3.23$ corresponding to the piperazine ring's hydrogens. The quartet corresponding to the non-aromatic CH_2 was observed at $\delta 4.56$. The signals of the aromatic hydrogens were observed at $\delta 7.13$, $\delta 7.88$ and $\delta 8.92$. In the ^1H NMR spectra of the complexes, the chemical shift values were only slightly changed, being of the order of 0.2 ppm . This subtle change was expected as there was no hydrogen near the coordination sites.

In the ^1H NMR spectra of complex **1**, a small signal at $\delta 5.73$ attributed to NH_2^+ was observed. This was due to the NOR zwitterionic form and can be observed only when the metallic ion is coordinated to the ketonic and the carboxylic carbons (Refat 2007). Owing to low solubility of complex **2**, this signal could not be observed.

^{13}C NMR measurements

The ^{13}C NMR spectra of free NOR presented signals at $\delta 176$ and $\delta 154$ attributable to the ketonic and the carboxylic carbons, respectively. The signals of the aromatic carbons were observed in the $\delta 100\text{--}\delta 152$ region. The signals corresponding to the piperazine ring carbons C2, C4 and C1, C3 were observed in about $\delta 45$ and $\delta 51$, respectively.

In the ^{13}C NMR spectra of the complexes, the chemical shift values of the piperazine ring and the aromatic carbons were only slightly changed, being in the order of $1\text{--}2\text{ ppm}$. In contrast, the signals of the ketonic and the carboxylic carbons were observed at $\delta 177$ and $\delta 166$, and showed major changes in the order of $10\text{--}12\text{ ppm}$, suggesting that Zn(II) was coordinated to the oxygens.

Normally, zinc complexes have tetrahedral or octahedral geometry (Dudev and Lim 2000). Taking

this into consideration and all data obtained, tetrahedral and octahedral geometries were proposed for $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, respectively.

Fluorescence studies of NOR and their Zn(II) complexes

In the literature, the fluorescence of NOR has been reported as a function of the pH (Luiz et al. 2011). In this work, the NOR and their Zn(II) complexes spectra in aqueous solutions were obtained and compared in a pH range from 4 to 11.

At $\text{pH} > 10$, NOR showed almost no fluorescence, indicating that for high pH values it had become a non-fluorescent molecular species. When the pH decreased, the fluorescence increased, and its maximum intensity with peak at 408 nm was registered at pH 7.6. This transition between pH 10 and 7.6 is due to protonation of the distal amine of the piperazine group. In the pH range from 7.6 to 4.0, there was a transition between two fluorescent species. The fluorescence peak at 408 nm decreased and that at 446 nm increased with decreasing pH in this range. This transition refers to the protonation of the carboxylate group (Fig. 3).

The emission spectra of Zn(II) complexes were similar over the whole pH range. Figure 4 shows the graphs of fluorescence intensities of NOR and their complexes at the two wavelengths of maximum variations, (a) 400 nm and (b) 450 nm, as a function of pH.

To determine the pK values (Fig. 4), the data were fitted by means of Eq. (2). These values appear in the legends of Fig. 4 and were observed to be the same for NOR and the two complexes. The pK_1 value obtained for the carboxylic group was 6.18 ± 0.03 . This pK_1 value referred to the transition from the zwitterionic (at neutral pH) to the cationic species (in acid pH). For the basic group, the pK_2 value obtained was 8.66 ± 0.06 . These pK_2 values referred to the transition in the alkaline range, from zwitterionic (at neutral pH) to anionic species (in basic pH). It is important to note that pK values of 6.1 and 8.6 have been previously found for both transitions of NOR (Luiz et al. 2011).

There are negligible differences in the pK values among NOR and complexes 1 and 2. Park et al. (2002) presented the formation constant (K_f) of the NOR

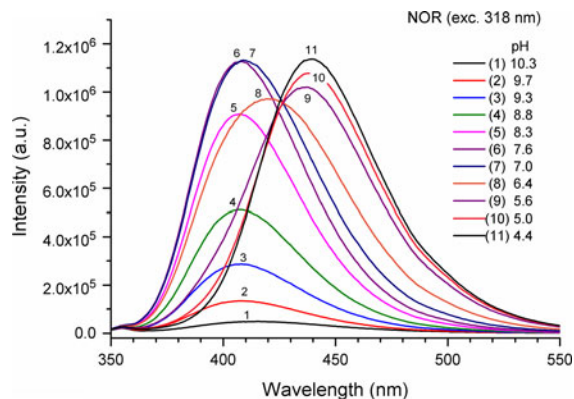


Fig. 3 Fluorescence spectra of NOR, in an aqueous solution, at different pH values. $[\text{NOR}] = 8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\lambda_{\text{excitation}} = 318 \text{ nm}$

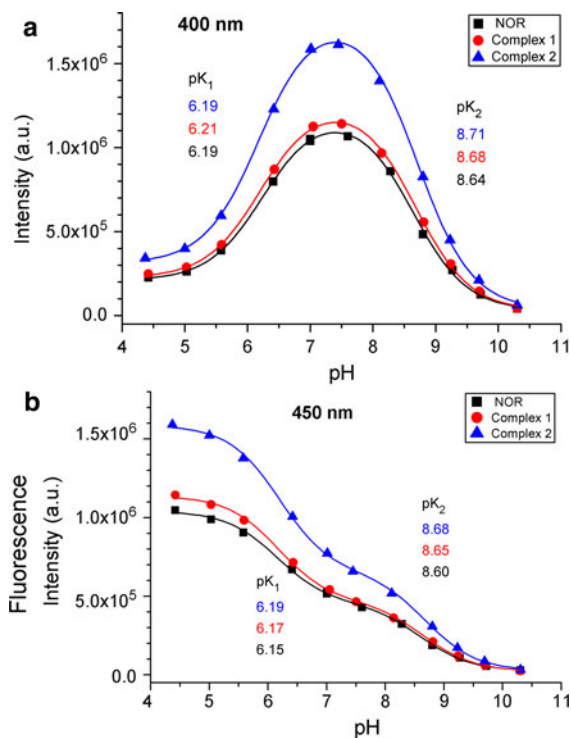


Fig. 4 Fluorescence intensities at wavelengths of maximal variations **a** 400 nm and **b** 450 nm, as function of pH, for NOR and complexes 1 and 2. The curves show the transition between the cationic–zwitterionic (pK_1) and zwitterionic–anionic (pK_2) species. Solid lines are the best fits using Eq. (2)

complexes with Zn(II) and several other metals, at physiological pH. The value obtained for Zn(II)–NOR was $7.9 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$. Using this value of K_f it was possible to calculate the expected pK_1 shift, under the

assumption that Zn(II) competes with H⁺ for the carboxylic acid site. The expression for competitive interactions is (Hulme and Trevethick 2010):

$$K_{1\text{ app}} = K_1(1 + [\text{Zn}]/K_{d\text{ Zn}}) \quad (6)$$

where K_1 and $K_{1\text{ app}}$ are the real and apparent dissociation constant of the NOR carboxylic acid radical and $K_{d\text{ Zn}}$ is the dissociation constant of Zn(II). Then

$$\begin{aligned} \log(K_{1\text{ app}}/K_1) &= \log(1 + [\text{Zn}]/K_{d\text{ Zn}}) \\ \rightarrow \text{p}K_1 - \text{p}K_{1\text{ app}} &= \log(1 + [\text{Zn}]/K_{d\text{ Zn}}) \end{aligned} \quad (7)$$

Substituting $1/K_f$ for $K_{d\text{ n}}$ and $[\text{Zn}] = 8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, a pK shift of 0.027 was obtained, which was negligible, and explained the results of pH titrations.

Next, the interaction of the complexes with DNA and BSA was evaluated since DNA may be a potential target of anti-*T. cruzi* drugs, which may include both mitochondrial and/or nuclear DNA (Soeiro and Castro 2011). On the other hand, as this protozoan has a blood stage which is relevant for mammalian infection (Bloodstream trypanomastigotes) and novel blood bank therapies are largely desirable (Silva et al. 2012), the potential binding of the Zn(II) complexes with the BSA was considered since it is one of the most abundant plasma protein in mammals and is responsible for the blood transportation of chemicals (Martins et al. 2012; Skyrianou et al. 2010).

Interaction with DNA

Transition metal complexes can bind to DNA via covalent and/or non-covalent interactions. In non-covalent interactions, DNA can provide three distinct binding sites for quinolone metal complexes (groove binding, electrostatic binding to phosphate group and intercalation). Electronic absorption spectroscopy is normally used to examine the binding modes of DNA with metal complexes (Cox et al. 2009).

The absorption spectra of the interaction of CT DNA with Zn(II) complexes (Fig. 5) were recorded to calculate the binding constants to CT DNA (K_b). The intensity of the bands of complexes **1** and **2** at 272 and 271 nm, respectively, in the presence of CT DNA exhibited a considerable hypochromism.

The binding constants, K_b , of Zn(II) complexes to DNA were calculated from Eq. (2). The calculated K_b values are given in Table 1 and suggested a moderate binding of the Zn(II) complexes to CT DNA. The K_b values of both Zn(II) complexes were similar. The addition of phen did not significantly change the constant values. The hypochromic effect observed might have been due to the interaction between the aromatic chromophore (from norfloxacinato ligand) of the complexes and DNA base pairs consistent with the intercalative binding mode (Cox et al. 2009; Skyrianou et al. 2009).

Interaction with BSA

As above briefly reported, BSA acts on the transport of metal ions and metal drug complexes in the human

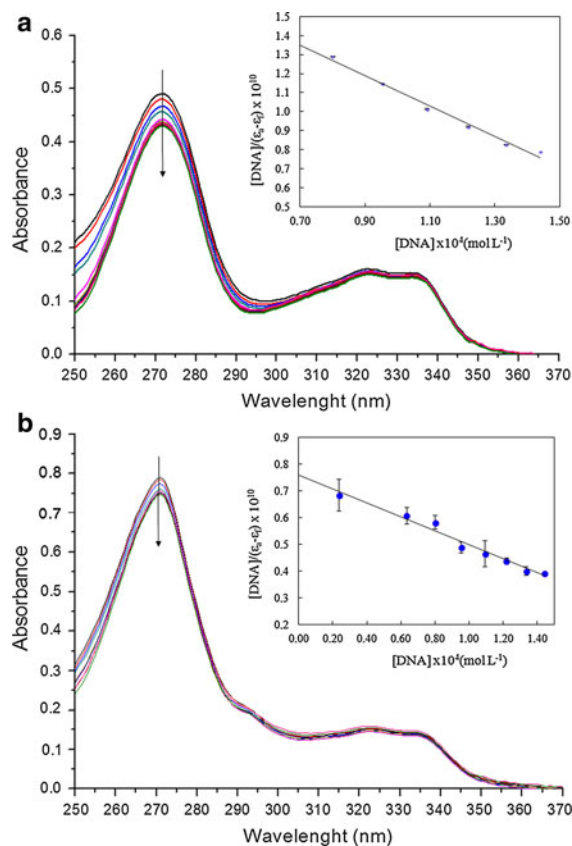


Fig. 5 UV-Vis spectra of **a** $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$, **b** $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ with increasing amounts of CT DNA. The arrows show the changes upon increasing amounts of CT DNA. $[\text{Compound}] = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ at pH 7.4. Insets plots of $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ at **a** 272 nm, **b** 271 nm

body. BSA, is the most extensively studied serum protein, and has two tryptophan residues, Trp-134 and Trp-212, embedded in the sub-domain IB and sub-domain IIA, respectively (Kamat 2005; Dhar et al. 2005). In this section, the interaction of two Zn(II) complexes with BSA was studied using tryptophan fluorescence-quenching experiments.

The BSA solution exhibited a strong fluorescence emission with a peak at 338 nm due to the tryptophan residues (excited at 285 nm). Figure 6 shows the fluorescence spectra of BSA in the presence of increasing amounts of the Zn(II) complexes. The addition of Zn(II) complexes to BSA resulted in a significant fluorescence quenching at 338 nm, and the appearance of an emission peak at longer wavelengths. Since the emission spectrum of Trp residues overlaps with the absorption spectrum of NOR, resonance energy transfer (RET) may have occurred. To evaluate if the development of the emission peak of the complexes comes from RET or from a direct excitation, the fluorescence spectra of the complexes were obtained under the same experimental conditions, but in the absence of BSA. The results are also presented in Fig. 6 (spectra peaked at 412 nm). It could be observed that direct excitation explained the growth of the fluorescence peak from the complex. This became more evident when subtracting the spectra of the pure complexes from the corresponding spectra in the presence of BSA and led to the fluorescence contribution of Trp, as observed in Fig. 7. The inset in Fig. 7 shows Stern–Volmer plots for the quenching of Trp fluorescence. In this plot, the fluorescence at 338 nm was corrected for the inner filter effect, according to the Eq. (8) (Lakowicz and Weber 1973).

$$F = F_{obs}10^{A_{exc}/2}. \quad (8)$$

where F_{obs} is the observed fluorescence at 338 nm, and A_{exc} is the absorbance at 285 nm.

Linear Stern–Volmer plots may either indicate the existence of a single type of quenching, or reveal the occurrence of just one binding site for the quencher in the proximity of the fluorophore. As static quenching does not require diffusion through the medium, the

quenching is more efficient and the observed quenching constant is higher. If dynamic quenching occurs, the approximate bimolecular quenching constant (k_q , $L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) may be calculated from Eq. (3) taking the average fluorescence lifetime (τ_0) of tryptophan in BSA around 10^{-8} s. In the case of static quenching, the binding constant is the Stern–Volmer constant itself (Skyrianou et al. 2009).

The calculated value of K_{SV} for the interaction of complex **1** with BSA is given in Table 2 indicating good binding. In case of dynamic quenching, the bimolecular quenching constant k_q depends on the probability of a collision between fluorophore and quencher and are a measure of the exposure of tryptophan residues to the drug. The upper limit of k_q expected for a diffusion-controlled bimolecular process is $10^{10} L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The magnitude of k_q for complex **1** was in the order of $10^{13} L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which was much greater than this upper limit. For this reason, the process could not be diffusion controlled, and specific drug-protein interactions were involved (Wang et al. 2007).

It is important to mention that the obtained binding constants were related to binding sites near the Trp residues. We can not exclude the existence of other binding sites, which do not modify the intrinsic BSA fluorescence.

When a protein contains several Trp residues that are in distinct environments, each residue usually has different accessibilities to quenchers. The fluorescence of accessible Trp residues decreases in the presence of a quencher, whereas the buried residues are not quenched. Downward curvature of Stern–Volmer plots is expected if some tryptophan residues are not accessible to quenchers (Lakowicz and Weber 1973). This was the case of quenching by complex **2**. The inset in Fig. 7 shows that complex **2** interacted preferentially with only one Trp residue.

A modified Stern–Volmer plot can be used to analyze differing accessibilities of tryptophan residues in proteins (Wang et al. 2007). When examining two populations of fluorophores, one of which is accessible to quenchers (a) and the other being buried (b), the Stern–Volmer equation becomes

Table 1 The DNA binding constants (K_b) obtained for the Zn(II) complexes

Compounds	K_b ($10^3 L \text{ mol}^{-1}$)	R^{2a}	Hypochromism (%)
[ZnCl ₂ (NOR)]·H ₂ O (1)	(4.45 ± 0.05)	0.9866	12
[ZnCl ₂ (NOR)(phen)]·2H ₂ O (2)	(3.5 ± 0.1)	0.9731	6

^a Linear regression

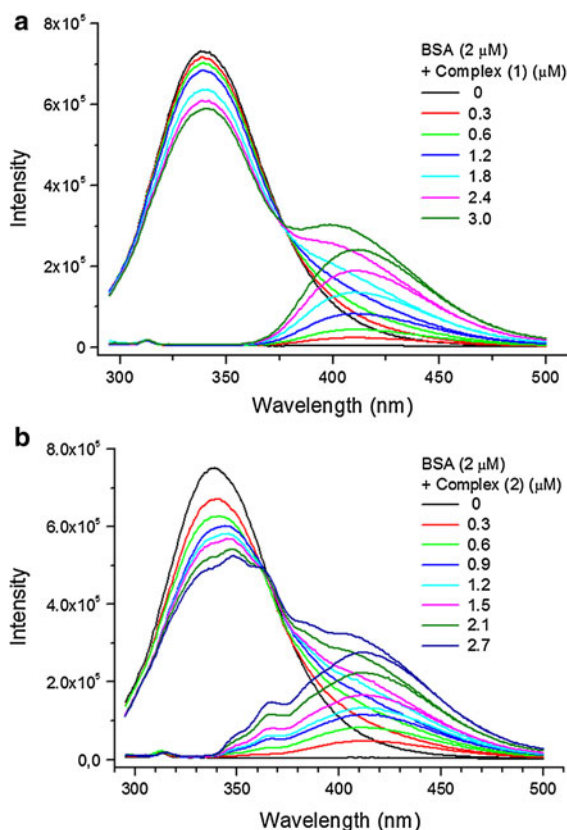


Fig. 6 Fluorescence spectra of BSA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) in the presence of increasing amounts of **a** $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**) and **b** $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**). $[\text{Complex}] = 8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ at pH 7.4

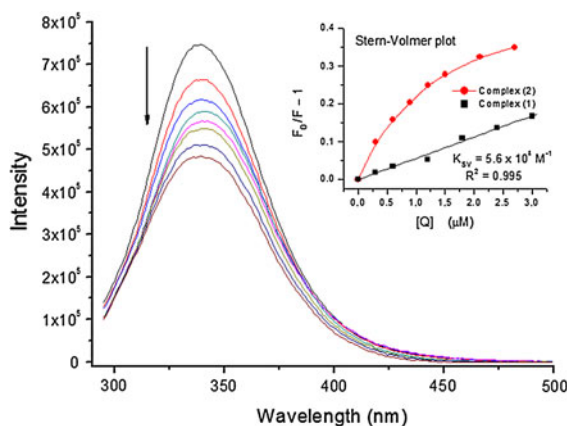


Fig. 7 Subtractions of the fluorescence spectra in Fig. 6b (BSA + complex **2** – pure complex **2**). Inset Stern–Volmer plots obtained from the fluorescence at 338 nm, for the quenching with complexes **1** and **2**

Table 2 Binding constants K_b (equal to the Stern–Volmer constants, K_{SV}) obtained for the interaction between the Zn(II) complexes and BSA

Compounds	K_{SV} (L mol^{-1})	R^{2a}
$[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1)	5.6×10^4	0.99
$[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2)	1.2×10^6	0.99

^a Linear regression

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a} + \frac{1}{f_a K_a [Q]} \quad (9)$$

where f_a is the fraction of the initial fluorescence that is accessible to quencher and K_a is the Stern–Volmer quenching constant of the accessible fraction, F_0 is the total fluorescence in the absence of quencher, and $[Q]$ is the concentration of quencher. A plot of $F_0/\Delta F$ versus $1/[Q]$ allows f_a and K_a to be determined [f_a^{-1} is the intercept and $(f_a K_a)^{-1}$ the slope]. Figure 8 presents the modified plot for quenching by complex **2**. A linear fit gave $f_a = 0.33$ and $K_a = 1.24 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$.

Fluorescence lifetimes

Fluorescence decay curves for the BSA samples in the absence and presence of different concentrations of complexes **1** and **2** were obtained. Figure 9 shows the typical decay curves. These curves exhibited a small decrease in the average fluorescence lifetime with the increasing concentration of quenchers, as observed by the slope in the logarithmic plot. The curves were first analyzed individually using a three exponential expression.

$$I(t) = A + \sum_{i=1}^3 \alpha_i \exp(t/\tau_i) \quad (10)$$

It was observed that the three obtained lifetimes were very similar for all the decay curves, and the fractional contribution for each lifetime varied. This was in accordance with the mechanism of static quenching, which does not change the lifetimes. It was also observed that the contribution of the shorter lifetime ($<1 \text{ ns}$) was smaller ($<6 \%$). Therefore another approach was used: the mean lifetimes with the greatest contribution were calculated $\langle \tau_1 \rangle = 7.03 \text{ ns}$ and $\langle \tau_2 \rangle = 3.62 \text{ ns}$. Then a global analysis

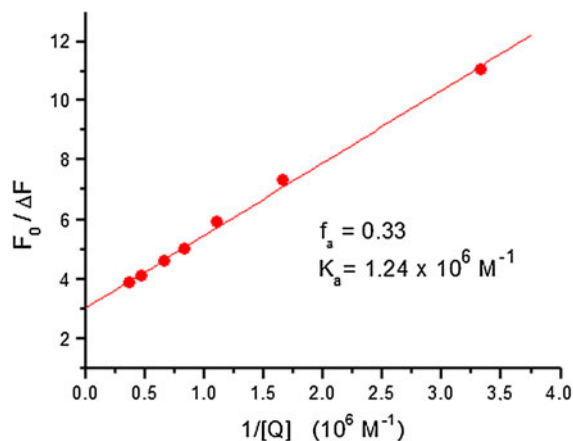


Fig. 8 Modified Stern–Volmer plot for the fluorescence quenching data obtained with complex **2** (BSA fluorescence intensity at 338 nm)

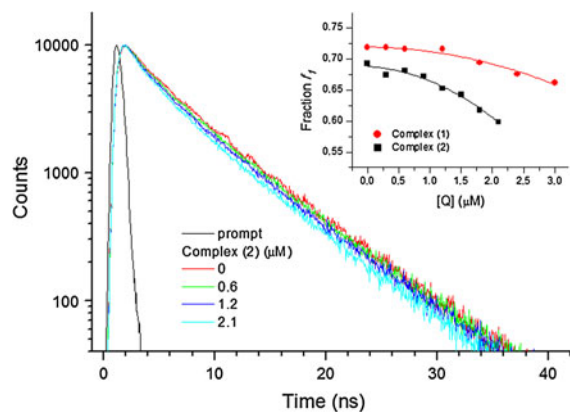


Fig. 9 Fluorescence decay curves for BSA (excitation at 282 nm, emission at 338 nm) at different concentrations of complex **2**. *Inset* fractional contribution of the longest lifetime as a function of the of the complexes concentration

was performed using all the decay curves for each quencher, **1** and **2**. The global analysis yielded the lifetimes that fit all the data and gives the fractional contributions of the lifetimes for each decay. In this global analysis the two principal lifetimes were fixed at the calculated average values above. The third lifetime τ_3 and the pre-exponential factor α_i were the fitting parameters: $\tau_1 = 7.03$ ns (fixed) and $\tau_2 = 3.62$ ns (fixed), and $\tau_3 = 0.51$ ns for complex **1** or $\tau_3 = 0.78$ ns for complex **2**. The inset of Fig. 9 depicts the fractional contribution (f_1) of τ_1 normalized to the contributions of the two main lifetimes as a function of quencher concentration, according to Eq.

(11). (The contribution of τ_3 was random and less significant because of the width of the light pulse).

$$f_1 = \frac{\alpha_1 \tau_1}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_1} \quad (11)$$

The contribution of the longest lifetime decreases slightly with increasing complex concentrations, and this can be explained by the different accessibility of the two BSA Trp residues.

Anti-*Trypanosoma cruzi* activity

Finally, the biological effect of the studied compounds was investigated in vitro. Table 3 shows the effect of all the compounds and of benznidazole (Bz), the reference drug, against bloodstream trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Y strain) expressed as IC_{50} values.

Free NOR exerted a low trypanocidal effect against the bloodstream trypomastigote form. The association of Zn(II) with NOR in the complex **1** did not increase trypanocidal activity (Table 3).

The introduction of 1,10-phen as co-ligand was shown to be an effective strategy for improving the activity. In fact, the complex **2** was 16 times more active than the analogous without the phen and exhibited IC_{50} value of $12 \mu\text{mol L}^{-1}$, comparable to benznidazole activity, the reference drug for Chagas disease. Although the free phen and its precursor, $[\text{ZnCl}_2(\text{phen})]$, showed significant activity, the addition of a hydrophobic moiety could decreased the polarity of the compound and changed the solubility, thus helping transportation throughout the body (Arounaguirri et al. 2000; Saha 2004).

Table 3 Activity (mean \pm SD) of the compounds and of benznidazole (Bz) upon bloodstream trypomastigotes (BT) forms of *T. cruzi* (Y strain), in vitro (24 h of incubation at 37 °C)

Compounds	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Norfloracin (NOR)	127 ± 30
1,10-phenantroline (phen)	11 ± 3
ZnCl_2	>250
$[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1)	197 ± 75
$[\text{ZnCl}_2(\text{phen})]$	14 ± 2
$[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2)	12 ± 2
Benznidazole (Bz)	13 ± 2

Conclusion

In this work, two new Zn(II) complexes with the antibacterial drug NOR were synthesized: the single ligand $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ and mixed-ligand $[\text{ZnCl}_2(\text{NOR})(\text{phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

The biological activity of complexes **1** and **2** was directly related to the acid ionization constant (pK). Drugs with pK outside the 6–8 range can be ionized and poorly absorbed through the cell membrane (Patrick 1995). Using fluorescence spectroscopy, pK values of the acidic group (carboxylic group), pK_1 , and the basic group (amine group), pK_2 , of these compounds were obtained. The differences were negligible. This was explained by a formation constant of the order of 10^4 L mol^{-1} (Park et al. 2002).

Spectrophotometric studies showed that the complexes interact with DNA with binding constants in the order of 10^3 L mol^{-1} , which characterized moderate affinity. The K_b values of Zn(II) complexes were similar, and the presence of phen did not change significantly the affinity. The observed hypochromism probably appeared as a consequence of the intercalative binding mode and is due to $\pi \rightarrow \pi^*$ stacking interactions in DNA (Pyle et al. 1989).

Interaction of the complexes with BSA was studied using fluorescence. The fluorescence of the complexes did not change in the presence of BSA. However, the strong fluorescence emission of BSA due to the two tryptophan residues was quenched by the complexes. RET from Trp residues to NOR was not observed. Static quenching allowed obtaining the BSA binding constants for the two complexes. Complex **2** preferentially quenches one the Trp residues. As the Trp-134 is located on the protein surface, its fluorescence is more easily suppressed by complex **2**. On the other hand the Trp-212 is located in a hydrophobic cavity which has a more difficult access (Lakowicz 2004). The presence of phen in the complex increased the affinity for BSA by a factor of 20.

Finally, our present results related to the efficacy of the Zn(II) complexes with NOR showed that a considerable increase in the levels of parasite lyses was achieved with complex **2**. Due to the lack of successful therapy for several neglected diseases including Chagas disease, the synthesis and screening of new candidates still represents a relevant challenge justifying the current analysis and furthers studies in this line of investigation.

Acknowledgments The present study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and PDTIS/Fiocruz.

References

- Appelbaum PC, Hunter PA (2000) The fluoroquinolones: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents* 16:5–15
- Arounaguiri S, Easwaramoorthy D, Ashokkumar A, Dattagupta A, Maiya BG (2000) Cobalt(III), nickel(II) and ruthenium(II) complexes of 1,10-phenanthroline family of ligands: DNA binding and photocleavage studies. *Proc Indian Acad Sci* 112:1–17
- Batista DGJ da, Silva PB da, Stivanin L, Lachter DR, Silva RS, Felcman J, Louro SRW, Teixeira LR, Soeiro M de NC (2011) Co(II), Mn(II) and Cu(II) complexes of fluoroquinolones: synthesis, spectroscopical studies and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. *Polyhedron* 30:1718–1725
- Batista DGJ, Pacheco MGO, Kumar A, Branowska D, Ismail MA, Hu L, Boykin DW, Soeiro MNC (2009) Biological, ultrastructural effect and subcellular localization of aromatic diamidines in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 137:251–259
- Batista DGJ, Silva PB, Garcia LS, Lachter DR, Silva RS, Felcman J, Louro SRW, Teixeira LR, Soeiro MNC (2011) Co(II), Mn(II) and Cu(II) complexes of fluoroquinolones: synthesis, spectroscopical studies and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. *Polyhedron* 30:1718–1725
- Coura JR, Dias JC (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:31–40
- Cox PJ, Psomas G, Bolos CA (2009) Characterization and DNA-interaction studies of 1,1-dicyano-2,2-ethylene dithiolate Ni(II) mixed-ligand complexes with 2-amino-5-methyl thiazole, 2-amino-2-thiazoline and imidazole. Crystal structure of $[\text{Ni}(\text{i-MNT})(2\text{-a-5mt})(2)]$. *Bioorg Med Chem* 17:6054–6062
- Daliry A, da Silva PB, da Silva CF, Batista MM, de Castro SL, Tidwell RR, Soeiro MNC (2009) In vitro analyses of the effect of aromatic diamidines upon *Trypanosoma cruzi*. *J Antimicrob Chemother* 64:747–750
- Deacon GB, Phillips RJ (1980) Relationships between the carbon–oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination. *Coord Chem Rev* 33:227–250
- Dhar S, Nethaji M, Chakravarty AR (2005) Effect of charge transfer bands on the photo-induced DNA cleavage activity of [1-(2-thiazolylazo)-2-naphtholato]copper(II) complexes. *J Inorg Biochem* 99:805–812
- Dias JC (2007) Southern cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:11–18
- Dorofeev VL (2004) Infrared spectra and the structure of drugs of the fluoroquinolone group. *Pharm Chem J* 38:693–697

- Dudev T, Lim C (2000) Tetrahedral vs. octahedral Zn^{2+} complexes with ligands of biological interest: a DFT/CDM study. *J Am Chem Soc* 122:11146–11153
- Emami S, Shafiee A, Foroumadi A (2005) Quinolones: recent structural and clinical developments. *Iran J Pharm Res* 3:123–136
- Gao F, Yang P, Xie J, Wang H (1995) Synthesis, characterization and antibacterial activity of novel Fe(III), Co(II), and Zn(II) complexes with norfloxacin. *J Inorg Biochem* 60:61–67
- Geary WJ (1971) The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. *Coord Chem Rev* 7:81–122
- Hooper DC (1999) Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updates* 2:38–55
- Hulme EC, Trevethick MA (2010) Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br J Pharmacol* 161:1219–1237
- Kamat BP (2005) Study of the interaction between fluoroquinolones and bovine serum albumin. *J Pharm Biomed Anal* 39:1046–1050
- Lakowicz JR (2004) Principles of fluorescence spectroscopy, 2nd edn. Springer, New York
- Lakowicz JR, Weber G (1973) Quenching of fluorescence by oxygen: probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry* 12:4161–4170
- Luiz FCL, Garcia LS, Goes Filho LS, Teixeira LR, Louro SRW (2011) Fluorescence studies of gold(III)–norfloxacin complexes in aqueous solutions. *J Fluoresc* 21:1933–1940
- Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 3:208–218
- Martins DA, Gouvea LR, Gama JBD da, Silva PB da, Louro SR, Soeiro M de NC, Teixeira LR (2012) Copper(II)–fluoroquinolone complexes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and DNA binding ability. *BioMetals* 25:951–960
- Meirelles MN, de Araujo-Jorge TC, de Souza W (1982) Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. *Z Parasitenkd* 68:7–14
- Park H-R, Kim TH, Bar K-M (2002) Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *Eur J Med Chem* 37:443–460
- Patrick GL (1995) An introduction to medicinal chemistry. Oxford University Press, New York
- Perrin DD, Dempsey B (1974) Buffers for pH and metal ion control. Chapman and Hall, New York
- Pyle AM, Rehmann JP, Meshoyrer R, Kumar CV, Turro NJ, Barton JK (1989) Mixed-ligand complexes of ruthenium(II): factors governing binding to DNA. *J Am Chem Soc* 111:3051–3058
- Refat MS (2007) Synthesis and characterization of norfloxacin-transition metal complexes (group 11, IB): spectroscopic, thermal, kinetic measurements and biological activity. *Spectrochim Acta A* 68:1393–1405
- Refat MS, Mohamed GG, de Farias RF, Powell AK, El-Garib MS, El-Korashy SA, Hussien MA (2010) Spectroscopic, thermal and kinetic studies of coordination compounds of Zn(II), Cd(II) and Hg(II) with norfloxacin. *J Therm Anal Calorim* 102:225–232
- Sadeek SA (2005) Synthesis, thermogravimetric analysis, infrared, electronic and mass spectra of Mn(II), Co(II) and Fe(III) norfloxacin complexes. *J Mol Struct* 753:1–12
- Saha DK (2004) A novel mixed-ligand antimycobacterial dimeric copper complex of ciprofloxacin and phenanthroline. *Bioorg Med Chem Lett* 14:3027–3032
- Shaikh AR, Giridhar R, Yadav MR (2007) Bismuth–norfloxacin complex: synthesis, physicochemical and antimicrobial evaluation. *Int J Pharm* 332:24–30
- Silva CF, Batista DG, Oliveira GM, Souza EM, Hamer ER, da Silva PB, Daliry A, Araujo JS, Brito C, Rodrigues ACM, Liu Z, Farahat AA, Kumar A, Boykin D, Blader I, Soeiro MNC (2012) *In vitro* and *in vivo* investigation of the efficacy of arylimidamide DB1831 and its mesylated salt form—DB1965—against *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS One* 7:30356
- Skyrianou KC, Efthimiadou EK, Psycharis V, Terzis A, Kessissoglou DP, Psomas G (2009) Nickel–quinolones interaction. Part 1—nickel(II) complexes with the antibacterial drug sparfloxacin: structure and biological properties. *J Inorg Biochem* 103:1617–1625
- Skyrianou KC, Perdih F, Turel I, Kessissoglou DP, Psomas G (2010) Nickel–quinolones interaction. Part 3—nickel(II) complexes of the antibacterial drug flumequine. *J Inorg Biochem* 104:740–749
- Soeiro MNC de, Castro SL de (2011) Screening of potential anti-*Trypanosoma cruzi* candidates: *in vitro* and *in vivo* studies. *Open Med Chem J* 5:21–30
- Wang Y, Zhang H, Zhang G, Tao W, Tang S (2007) Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *J Lumin* 126:211–218
- Yesilel OZ, Soyulu MS, Olmez H, Buyukgungor O (2006) Synthesis and spectrothermal studies of vitamin B13 complexes of cobalt(II) and nickel(II) with 4-methylimidazole: crystal structure of $[Ni(HOr)(H_2O)(4-Meim)_3]_2 \cdot 5H_2O$. *Polyhedron* 25:2985–2992