

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química

Darliane Aparecida Martins

Complexos de Cu(II) de algumas fluorquinolonas: sínteses, atividade  
anti-*T.cruzi* e investigação do mecanismo de ação

Belo Horizonte  
2011

UFMG/ICEx/DQ 863<sup>a</sup>  
D. 459<sup>a</sup>

Darliane Aparecida Martins

Complexos de Cu(II) de algumas fluorquinolonas:  
sínteses, atividade anti-*T.cruzi* e investigação do  
mecanismo de ação

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Química do Instituto  
de Ciências Exatas da Universidade  
Federal de Minas Gerais como  
requisito parcial para obtenção do grau  
de Mestre em Química – Química  
Inorgânica

Belo Horizonte  
2011

Martins, Darliane Aparecida  
M379c Complexos de Cu(II) de algumas fluorquinolonas:  
2011 sínteses, atividade anti-T.cruzi e investigação do  
D mecanismo de ação / Darliane Aparecida Martins. 2011.  
86 f. : il.

Orientadora: Letícia Regina de Souza Teixeira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais. Departamento de Química.

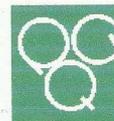
Inclui bibliografia e apêndice.

1. Química inorgânica - Teses 2. Complexos  
metálicos - Teses 3. Tripanossoma cruzi - Teses 4.  
Química bioinorgânica - Teses 5. Antibióticos - Teses  
I. Teixeira, Letícia Regina de Souza, Orientadora II.  
Título.

CDU 043



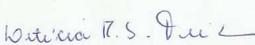
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3499-5732  
FAX: 031 - 3499-5700  
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br

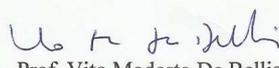


**"Complexos de Cu(II) de Algumas Fluorquinolonas: Sínteses, Atividade anti-T.cruzi e Investigação do Mecanismo de Ação"**

**Darliane Aparecida Martins**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Profa. Leticia Regina de Souza Teixeira - Orientadora  
UFMG

  
Prof. Vito Modesto De Bellis  
UFMG

  
Prof. Bernardo Lages Rodrigues  
UFMG

Belo Horizonte, 18 de julho de 2011.

Este trabalho foi desenvolvido sob orientação  
da Profª Dra. Leticia Regina Teixeira

Dedico este trabalho a minha família por  
todo amor e dedicação.

## *AGRADECIMENTOS*

A Professora Doutora Letícia Regina de Souza Teixeira pela orientação, apoio e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico.

Aos meus amigos de laboratório Antônio, Ligiane e Meiriane pela colaboração nos experimentos e pela amizade adquirida durante este trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo Jorge Sanches Barbeira por ter disponibilizado o UV e o fluorímetro para medidas.

A Professora Doutora Sonia Louro pelo empenho e pela realização das medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica.

A Professora Doutora Nazaré Soeiro pelos testes de atividade anti *T.cruzi*.

Aos orientados do Professor Doutor Paulo Barbeira pelo carinho e acolhida, dentre eles em especial ao Pedro Moreno pela paciência e dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Química da UFMG.

Aos meus pais que estiveram sempre ao meu lado, sendo meu porto seguro.

As minhas irmãs que com muita paciência e amor apoiaram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus sobrinhos pelo amor sincero e inocente.

Ao CNPq, Capes e Fapemig

E a todos da minha família e aos amigos que não foram citados pelas orações e dedicação.

## Resumo

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma parasitose endêmica com cerca de 12 milhões de casos na América Latina. As duas únicas drogas usadas para o tratamento da doença são o Nifurtimox e a Benznidazole, que causam sérios efeitos colaterais. As limitações da corrente quimioterapia para esta enfermidade justificam a busca por novos fármacos e estimulam o desenho, síntese e pesquisa de agentes que possam ser efetivos e seletivos contra este parasito, mas que exerçam baixa toxicidade e cuja produção envolva baixo custo.

As fluorquinolonas, uma importante classe de antibióticos sintéticos, tiveram sua atividade antiparasitária relatada na literatura, especialmente frente a *Leishmania panamensis*. Levando-se em consideração que complexos metálicos podem ser mais ativos que seus ligantes livres, preparamos complexos de Cu(II) de norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) e esparfloxacin (SPAR), contendo ou não os seguintes co-ligantes: piridina (py), 2,2'-bipiridina (bipy) ou 1,10-fenantrolina (fen) e testamos sua atividade frente as formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Doze complexos foram obtidos do tipo  $[CuCl_2(H_2O)(L)]$ ,  $[CuCl_2(py)(L)]$ ,  $[CuCl(bipy)(L)]Cl$  e  $[CuCl_2(fen)(L)]$  (L = NOR, LEVO e SPAR), nos quais os ligantes coordenam-se ao íon Cu(II) na forma zwitteriônica e de modo bidentado através da carbonila cetônica e da carbonila do ácido carboxílico. Dentre esses compostos aqueles contendo fenantrolina mostraram ser os mais promissores como agentes tripanocidas.

As propriedades de ligação dos complexos com o ADN foram investigadas através de espectroscopia de UV-vis. A afinidade dos complexos pela albumina bovina (BSA) foi igualmente estudada, por espectroscopia de fluorescência, uma vez que essa proteína é responsável pelo transporte de drogas nos mamíferos. As constantes de interação droga-ADN são da ordem de  $10^3$  a  $10^5 M^{-1}$  e a interação ocorre via intercalação com clivagem da estrutura secundária do ADN. As constantes de interação droga-BSA são da ordem de  $10^5$  e  $10^6 M^{-1}$ , ou seja, as drogas estudadas têm maior afinidade pela BSA do que pelo ADN.

Em resumo, acreditamos que com esse trabalho contribuimos para um melhor conhecimento da química das fluorquinolonas e de seus complexos metálicos e de suas diversas propriedades antiparasitárias.

**Palavras-chave:** Fluorquinolonas, complexos de Cu(II), atividade anti-*T. cruzi*, interação com ADN, interação com albumina bovina

## *Abstract*

Chagas' disease, caused by the *Trypanosoma cruzi* protozoa, is an endemic parasitosis which affects about 12 million people in Latin America. The only two available drugs for the treatment of Chagas' disease are Nifurtimox and Benznidazole, but both exhibit grave side effects. The limitations of the current chemotherapy for this illness justify the search for new drug candidates that could be effective and selective against this parasite, but with low toxicity and low costs.

Fluorquinolones are an important class of synthetic antibacterial agents whose anti-parasitic activity was reported in the literature, especially against the *Leishmania panamensis*. Taking into account that metal complexes could be more active than their free ligands, in this work we prepare Cu(II) complexes of norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) and sparfloxacin (SPAR), containing or not pyridine (py), 2,2'-bipyridine (bipy) or 1,10-phenanthroline as co-ligands. The complexes were evaluated for their ability to suppress *in vitro* the growth of tripomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Twelve new complexes were obtained: [CuCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)(L)], [CuCl<sub>2</sub>(py)(L)], [CuCl(bipy)(L)]Cl and [CuCl<sub>2</sub>(fen)(L)] (L = NOR, LEVO e SPAR). In all cases the ligands coordinate with the metal centre via both the pyridone and one carboxylate oxygen in the neutral zwitterionic form. Complexes containing 1,10-phenanthroline as co-ligands revealed to be the most active among all studied compounds.

The interaction of the complexes with DNA has been investigated using UV-vis spectroscopy. The affinity of the complexes with bovine serum albumin (BSA) was also investigated using fluorescence spectroscopy, since this protein is responsible for drug transportation in mammals. The intrinsic binding constants for drug-DNA interactions were found in the 10<sup>3</sup> a 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> range and are supposed to be due to intercalation with cleavage of the secondary structure of DNA. The binding constants for drug-BSA interaction were found in the 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> range, i.e., the studied compounds are revealed to have more affinity with BSA.

In short, with this work we believe to have contributed to a better understanding not only of the fluorquinolones and their metal complexes' chemistry, but of their anti-parasitic properties as well.

**Keywords: fluorquinolones, Cu(II) complexes, anti-*T.cruzi* activity, interaction with DNA, interaction with bovine serum albumin**

## *Sumário*

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 A Doença de Chagas	1
1.2 As Fluorquinolonas	6
1.3 Complexação aos íons metálicos	12
1.4 Interação com macromoléculas biológicas	14
Capítulo 2 - Metodologia	18
2.1 Material e Métodos	18
2.1.1 Reagentes	18
2.1.2 Equipamentos	18
2.2 Sínteses	20
2.2.1 Síntese dos Complexos de Cu(II) de NOR, LEVO, SPAR	20
2.2.2 Síntese dos precursores $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ e $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})_2]$	22
2.2.3 Síntese de Complexos de Cu(II) de NOR, LEVO e SPAR contendo piridina	22
2.2.4 Síntese de Complexos de Cu(II) de NOR, LEVO e SPAR contendo 2,2'-bipiridina	23
2.2.5 Síntese de Complexos de Cu(II) de NOR, LEVO ou SPAR contendo 1,10-fenantrolina	24
2.3 Estudo de interação com alvos biológicos	25
2.3.1 Interação com ADN calf-thymus (CT ADN)	25
2.3.2 Interação com a Albumina Bovina (BSA)	26
2.4 Testes de atividade anti-T.cruzi	26

Capítulo 3 - Síntese, caracterização e atividade anti-T. cruzi de complexos de Cu(II) de algumas fluorquinolonas	28
3.1 Dados de Microanálises e Medidas de Condutividade	28
3.2 Espectroscopia na região do infravermelho	29
3.3 Análise Termogravimétrica	33
3.4 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	34
3.4.1 Espectros de RPE dos complexos de Cu(II), em pó, a temperatura ambiente	34
3.4.2 Espectros de RPE dos complexos de Cu(II), em solução aquosa e em DMSO, a 77 K	39
3.5 Atividade anti-T.cruzi das fluorquinolonas livres e de seus complexos de Cu(II)	46
Capítulo 4 -Estudo da interação dos complexos de Cu(II) de algumas fluorquinolonas com o ADN	53
4.1 Determinação da concentração de CT -ADN	54
4.2 Estudo da interação dos precursores [CuCl <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> ], [CuCl <sub>2</sub> (bipy)], [CuCl <sub>2</sub> (fen)] com o ADN	55
4.3 Estudo da interação da levofloxacina e de seus complexos com o ADN	58
4.4 Estudo da interação da esparfloxacina e de seus complexos com o ADN	61
Capítulo 5 - Estudo da interação dos complexos de Cu(II) de algumas fluorquinolonas com a albumina	66
5.1 Estudo da interação dos precursores [CuCl <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> ], [CuCl <sub>2</sub> (bipy)], [CuCl <sub>2</sub> (fen)] com albumina bovina	68
5.2 Estudo da interação da levofloxacina e de seus complexos de Cu(II) com a albumina bovina	70
5.3 Estudo da interação da esparfloxacina e de seus complexos com o BSA	72
Capítulo 6 - Conclusão	77
Capítulo 7 - Referencias Bibliográficas	80

## Lista de Figuras

Figura 1.1 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Figura 1.2 - Estrutura da nitrofurazona	4
Figura 1.3 - Estruturas de (a) Nifurtimox e (b) Benznidazole	5
Figura 1.4 - Estrutura do ácido nalidixico	7
Figura 1.5 - Estrutura da Flumequina	7
Figura 1.6 - Estrutura da Norfloxacin	7
Figura 1.7 - Ilustração do modo de ligação da FQ à DNA-girase. (a) Representação de quatro moléculas de fluorquinolonas (retângulos) numa cavidade do DNA anexado à DNA-girase. (b) Representação da ligação de quatro moléculas de fluorquinolonas através de ligações de hidrogênio à parte interna do DNA	11
Figura 1.8 - Fita dupla do ADN, mostrando as fendas menor e maior e as ligações de hidrogênio entre os pares de bases nitrogenadas Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) e Guanina (G)	14
Figura 1.9 - Representação da estrutura da albumina Humana	16
Figura 2.1 - Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de norfloxacin (NOR)	21
Figura 2.2 - Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de levofloxacin (LEVO)	21
Figura 2.3 - Equação de obtenção do complexo e Cu(II) de esparfloxacin (SPAR)	21
Figura 2.4 - Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de norfloxacin (NOR) contendo piridina	23
Figura 2.5 - Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de levofloxacin contendo 2,2'bipiridina	24
Figura 2.6 - Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de esparfloxacin contendo 1,10-fenantrolina	25
Figura 3.1 - Espectros de IV de a) LEVO, b) [CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(LEVO)] ( <b>5</b> ), c) [CuCl <sub>2</sub> (py)(LEVO)].1,5H <sub>2</sub> O ( <b>6</b> ), d) [CuCl(bipy)(LEVO)]Cl.3H <sub>2</sub> O ( <b>7</b> ), e) [CuCl <sub>2</sub> (fen)(LEVO)].4H <sub>2</sub> O ( <b>8</b> ). O círculo azul destaca o estiramento $\nu(\text{COOH})$ em 1725 cm <sup>-1</sup> no espectro da LEVO	32

Figura 3.2 - Curvas TG/DTG de [CuCl <sub>2</sub> (py)(LEVO)].1,5H <sub>2</sub> O (6)	34
Figura 3.3 - Curvas TG/DTG de [CuCl(bipy)(LEVO)]Cl.3H <sub>2</sub> O (7)	34
Figura 3.4 - Curvas TG/DTG de [CuCl <sub>2</sub> (fen)(LEVO)].4H <sub>2</sub> O (8)	34
Figura 3.5 - Espectros de RPE, banda X, para os complexos (1), (5) e (9) (pó, temperatura ambiente)	35
Figura 3.6 - Espectros de RPE, banda X, para os complexos (2), (6) e (10) (pó, temperatura ambiente)	36
Figura 3.7 - Espectros de RPE, banda X, para (3), (7) e (11) (pó, temperatura ambiente)	37
Figura 3.8 - Espectros de RPE, banda X, para (4), (8) e (12) (pó, temperatura ambiente)	38
Figura 3.9 - Espectros de RPE, banda X, dos complexos: a) (1), (5) e (9) (0,5 mg/mL); b) (2), (6) e (10) (0,8 mg/mL); c) (3), (7) e (11) (0,8 mg/mL); d) (4), (8) e (12) (0,8 mg/mL). Solução aquosa congelada, a 77 K.	40
Figura 3.10 - Espectro de RPE, banda X, para os complexos (2), (6) e (10), em DMSO (0,8 mg/mL), a 77K	41
Figura 3.11 - Espectros de RPE, banda X, dos complexos: a) (3), (7) e (11); b) (4), (8) e (12). Solução de DMSO (0,8 mg/mL), a 77 K	42
Figura 3.12 - Estruturas propostas para os complexos (1), (5) e (9)	44
Figura 3.13 - Estruturas propostas para os complexos (2), (6) e (10)	44
Figura 3.14 - Estruturas propostas para os complexos (3), (7) e (11)	45
Figura 3.15 - Estruturas propostas para os complexos (4), (8) e (12)	45
Figura 3.16 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
Figura 3.17 - Valores de IC <sub>50</sub> sobre <i>T.cruzi</i> para as fluorquinolonas livres e seus complexos de Cu(II). Série 1: ligantes; Série 2: complexos sem co-ligante; Série 3: complexos que contém py; Série 4 complexos com bipy; Série 5: complexos com fen	50
Figura 3.18 - Atividade dos complexos (4) e (12) sob as formas amastigotas intracelulares do <i>T.cruzi</i> (cepa Y)	51
Figura 4.1 – Estrutura da guanina.	53

Figura 4.2 - Espectro de UV-vis do CT-ADN obtido entre 220 e 800 nm, em tampão Universal (pH = 7,4) 55

Figura 4.3 - Espectros de absorção de (a)  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ , (b)  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$ , (c)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$  na ausência e na presença de concentrações crescentes de ADN (período de incubação = 30 minutos). Reta inserida – plotagem de  $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{ADN}] \text{ L}^{-1}$ .  $\{[\text{ADN}] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol}$  e  $[\text{Composto}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , a temperatura ambiente}. As setas mostram as mudanças na absorção dos compostos após a adição de ADN. 56

Figura 4.4 - Espectros de absorção de (a) LEVO, (b)  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEVO})]$  (5), (c)  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}$  (7) e (d)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})]$  (8) na ausência e na presença de concentrações crescentes de ADN (período de incubação = 30 minutos). Reta inserida – plotagem de  $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{ADN}] \text{ L}^{-1}$ .  $\{[\text{ADN}] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol}$  e  $[\text{Composto}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , a temperatura ambiente}. As setas mostram as mudanças na absorção dos compostos após a adição de ADN. 59

Figura 4.5 - Espectros de absorção de (a) SPAR, (b)  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})]$  (9), (c)  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})]$  (10) (d)  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}$  (11) e (e)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{SPAR})]$  (12) na ausência e na presença de concentrações crescentes de ADN (período de incubação = 30 minutos). Reta inserida – plotagem de  $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{ADN}] \text{ L}^{-1}$ .  $\{[\text{ADN}] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol}$  e  $[\text{Composto}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , a temperatura ambiente}. 62

Figura 5.1 - Estrutura quaternária da HSA com os resíduos de cisteína e triptofano 67

Figura 5.2 - Espectro de emissão da BSA na presença de concentrações crescentes de (a)  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ , (b)  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$  e (c)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$ . Comprimento de onda de excitação = 285 nm.  $[\text{BSA}] = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Os pontos em vermelho não foram levados em consideração nos cálculos das constantes. 68

Figura 5.3 - Espectro de emissão da BSA na ausência e na presença de concentrações crescentes da (a) levofloxacina, (b)  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEVO})]$ , (c)  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}$  e (d)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})]$ . Comprimento de onda de excitação = 285 nm.  $[\text{BSA}] = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Os pontos em vermelho não foram levados em consideração nos cálculos das constantes. 70

Figura 5.4 - Espectro de emissão da BSA na ausência e na presença de concentrações crescentes da (a) esparfloxacina, (b)  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})]$ , (c)  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})]$ , (d)  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}$  e (e)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})]$ . Comprimento de onda de excitação = 285 nm.  $[\text{BSA}] = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Os pontos em vermelho não foram levados em consideração nos cálculos das constantes. 72

## *Lista de Tabelas*

Tabela 1.1 - Evolução das quinolonas, considerando as gerações	8
Tabela 2.1 - Faixa de decomposição (°C) e rendimento das reações dos complexos de Cu(II) de norfloxacin, levofloxacin e esparfloxacin	21
Tabela 2.2 - Faixa de decomposição (°C) e rendimento das reações dos complexos de Cu(II) de norfloxacin, levofloxacin e esparfloxacin contendo piridina	22
Tabela 2.3 - Faixa de decomposição (°C) e rendimento das reações dos complexos de Cu(II) de norfloxacin, levofloxacin e esparfloxacin contendo 2,2'-bipiridina	23
Tabela 2.4 - Faixa de decomposição (°C) e rendimento das reações dos complexos de Cu(II) de norfloxacin, levofloxacin e esparfloxacin contendo 1,10-fenantrolina	24
Tabela 3.1 – Dados de análise elementar (valores calculados entre parênteses) para os precursores de Cu(II)	28
Tabela 3.2 – Dados de análise elementar (valores calculados entre parênteses) e condutividade ( $\Lambda$ , $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) para os complexos de Cu(II)	29
Tabela 3.3 – Principais números de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) e atribuições de bandas na região do infravermelho para as fluorquinolonas e seus complexos de Cu(II)	30
Tabela 3.4 – Porcentagens de perda de moléculas de água de hidratação calculadas e obtidas das curvas TG/DTG dos complexos de Cu(II)	33
Tabela 3.5 - Parâmetros de RPE dos complexos de Cu(II), no pó, a temperatura ambiente.	38
Tabela 3.6 - Parâmetros de RPE dos complexos de Cu(II), em DMSO a 77K.	43
Tabela 3.7 – Atividade (media $\pm$ SD) e índice de seletividade (IS) para as fluorquinolonas e seus complexos de Cu(II) sob as formas tripomastigotas sanguíneas do <i>T. cruzi</i> (cepa Y), <i>in vitro</i> (24 h de incubação a 37 °C).	48
Tabela 3.8 – Atividade (media $\pm$ SD) e índice de seletividade (IS) para a NOR, SPAR e seus complexos de Cu(II) sob as formas amastigotas intracelulares do <i>T. cruzi</i> (cepa Y) <i>in vitro</i> .	50
Tabela 4.1 - Constantes de ligação ( $K_b$ ) para a interação ADN–droga e porcentagem de hipercromismo	58
Tabela 4.2 - Constantes de ligação ( $K_b$ ) para a interação ADN–droga e porcentagem de hipercromismo para a LEVO e seus complexos	61
Tabela 4.3 - Constantes de ligação ( $K_b$ ) para a interação ADN–droga e porcentagem de hipercromismo para a esparfloxacin e seus complexos	65
Tabela 5.1 - Constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) e de supressão dinâmica de fluorescência ( $k_q$ ) para a interação BSA-droga e constantes de ligação ( $K_b$ ) para a interação ADN–droga	76

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ADN = ácido desossiribonucleico

Bipy = 2,2'bipiridina

BSA = albumina bovina

°C = grau Celsius

CARD = cardíaca

Cys = cisteína

CT-ADN = ácido desossiribonucleico *calf thimus*

DIG = digestiva

DMSO = dimelsufóxido

EPR = Ressonância Paramagnética Nuclear

F = intensidade de fluorescência na presença do agente de extinção

F<sub>0</sub> = intensidade de fluorescência na ausência do agente de extinção

Fen = 1,10 fenantrolina

g = gramas

LEVO = levofloxacina

K = Kelvin

k<sub>b</sub> = constantes de interação droga/ADN

K<sub>SV</sub> = constante de associação

k<sub>q</sub> = constante biomolecular de velocidade do processo de extinção

SD = desvio padrão

SFB = soro fetal bovino

SPAR = esparfloxacina

IC<sub>50</sub> = dose mínima de cada composto capaz de matar 50% dos parasitos.

IS<sub>50</sub> = (Índice de seletividade) – Razão entre LC<sub>50</sub>/ IC<sub>50</sub>. Identifica a dose efetiva dos complexos contra o parasito, mas que não exerça toxicidade para a célula hospedeira.

IND = indeterminada

LC<sub>50</sub> = concentração da droga que diminui em 50% a viabilidade de células cardíacas não infectadas.

mg = miligramas

NOR = norfloxacina

*P. aeruginosa*

Q = agente de extinção

Py = piridina

*S. aureus*

*T. cruzi* = *Trypanosoma cruzi*

Trp = triptofano

$\epsilon$  = coeficiente de extinção

$\epsilon_a$  = coeficiente de extinção aparente, que corresponde à razão entre a absorvância

$\epsilon_b$  = coeficiente de extinção do composto ligado ao ADN

$\epsilon_f$  = coeficiente de extinção do composto livre em solução

$\square_0$  = tempo de vida na ausência e presença do agente de extinção

$v$  = estiramento

$v_{ass}$  = estiramento assimétrico

$v_s$  = estiramento simétrico

# *Capítulo 1 - Introdução*

## **1.1 A Doença de Chagas**

Milhões de pessoas são afetadas por doenças parasitárias nas diferentes regiões geográficas mais pobres do mundo. Dentre essas doenças encontram-se: a malária, a doença de chagas, a tripanossomíase africana (doença do sono), leishmaniose e esquistossomose. As doenças parasitárias são responsáveis por incapacitar anualmente uma fração significativa da população de vários países em desenvolvimento, principalmente no continente Africano (KETTLER e MARJANOVIC, 2004).

A maioria das mortes devido a doenças parasitárias ocorre no hemisfério Sul, que é predominante pobre. O fato de essas doenças afetarem principalmente regiões pobres leva a um baixo investimento na pesquisa e desenvolvimento de novas alternativas para a profilaxia e tratamento das mesmas. Este baixo investimento ocorre apesar da necessidade de novas alternativas de tratamento serem claras e os fármacos e vacinas serem extremamente insuficientes (KETTLER e MARJANOVIC, 2004; NWAKA e RIDLEY, 2003). Em função disso as doenças parasitárias são denominadas - Doenças Órfãs ou Doenças Negligenciadas (NWAKA e RIDLEY, 2003).

A doença de chagas afeta cerca de 17 milhões de pessoas só na América Latina (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010), levando a aproximadamente 50.000 mortes por ano. Mais de 100 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco de contaminação por esta doença (DIAS e DESSOY, 2009).

No Brasil, a doença de Chagas é a quarta maior causa de morte entre as doenças infecto parasitárias e ocorre em uma área de três milhões de quilômetros quadrados. São cerca de 2450 municípios, cuja população exposta ao risco de contaminação é superior a 28 milhões de pessoas e a população infectada é de aproximadamente cinco milhões de indivíduos (DIAS, 1997).

Carlos Chagas, em 1909, descobriu a tripanossomíase americana. Esta descoberta foi um dos mais bem sucedidos e completos achados da história geral da

medicina tropical. Carlos Chagas descobriu uma nova doença humana, identificou seu parasito e seu vetor. Ele descobriu que os gatos eram reservatórios domésticos do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que levavam este, ao contato humano (CHAGAS e VILELA, 1922).

A tripanossomíase americana, ou doença de chagas, é uma doença zoonótica causada por protozoário *Trypanosoma cruzi*. Este nome foi dado por Carlos Chagas em homenagem ao seu mestre Oswaldo Cruz. A transmissão aos seres humanos pode ocorrer por vetores hematófagos triatomíneos, por transfusão sanguínea ou por transmissão congênita. Carlos Chagas identificou o barbeiro (*Triatoma infestans*) como principal vetor da doença de Chagas no país (CHAGAS e VILELA, 1922).

Após cair na corrente sanguínea, o *T. cruzi* afeta os gânglios, o fígado e o baço. Posteriormente se localiza no coração, intestino e esôfago. Na fase crônica da doença pode haver destruição da musculatura que provoca aumento desses três últimos órgãos citados. Essas lesões são definitivas, irreversíveis. O aumento do coração é chamado, quando por consequência da infecção pelo *T. cruzi*, de cardite chagásica (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010).

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae e gênero *Trypanosoma*. O parasito possui um ciclo biológico complexo que envolve um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado, apresenta três formas distintas: epimastigota (forma presente no vetor e em cultura axênica), tripomastigota (forma sanguínea circulante e infectante) e amastigota (forma de replicação intracelular) (HOARE e WALLACE, 1996) (Figura 1.1).

Além da transmissão vetorial, casos de transmissão alternativos, como a via transfusional, congênita por transplantes de órgãos ou acidentes laboratoriais, podem ser identificados (DIAS e DESSOY, 2009).

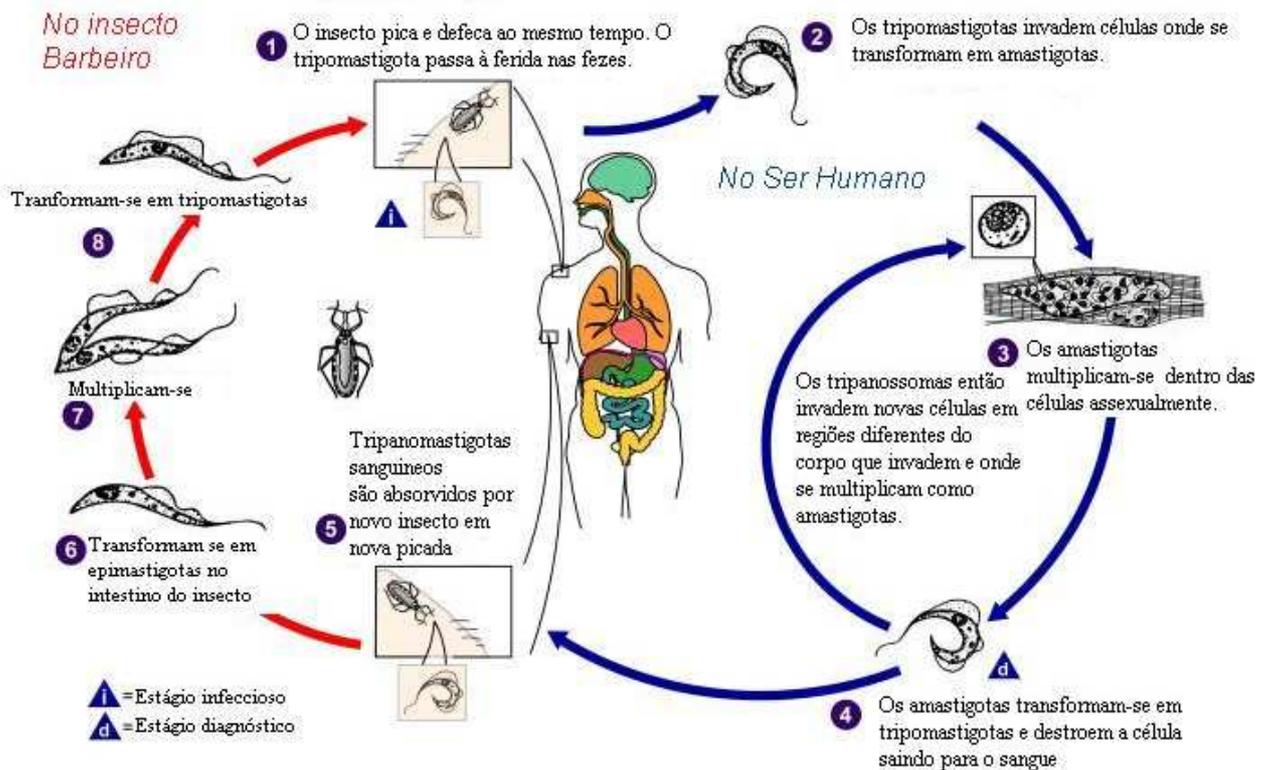


Figura 1.1 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma\\_cruzi](http://pt.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma_cruzi)

A infecção chagásica é dividida em fases, primeiramente ocorre a fase aguda que dura cerca de dois meses, sucedida por uma fase crônica que dura geralmente o resto da vida do hospedeiro. Normalmente a primeira fase da doença é oligossintomática, principalmente em adultos, quando não é identificada pelo infectado, nem pelos agentes de saúde. A fase aguda sintomática ocorre principalmente em crianças menores de dez anos, cujos sintomas são febre e manifestações clínicas, tais como, alterações eletrocardiográficas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia, os quais podem provocar até a morte do hospedeiro definitivo (DIAS, 1993; BOAINAIN, 1979).

A evolução da fase aguda para a fase crônica, que pode durar de poucas semanas a meses, é acompanhada pelo gradativo desaparecimento das manifestações clínicas e diminuição da parasitemia (COURA, 2010) Os indivíduos portadores da infecção crônica podem ser classificados do ponto de vista clínico como pertencentes às formas indeterminada (IND), cardíaca (CARD), digestiva (DIG) e cardiodigestiva. A imensa maioria dos infectados evolui para uma forma crônica indeterminada, caracterizada pela sorologia positiva, ausência de sinais, sintomas da doença e eletrocardiograma e raio-X (coração, esôfago e cólon) normais. Os pacientes apresentam de forma geral, bom estado de saúde, desconhecendo, muitas vezes, a presença da infecção. Estima-se que

cerca de 50-60% dos indivíduos infectados apresentam essa forma clínica. Embora se reconheça que o prognóstico é favorável, sabe-se que anualmente 2 a 5% desses indivíduos evoluem para formas sintomáticas da doença. Após 20-30 anos de infecção, cerca de 20 a 30% dos indivíduos portadores da forma clínica IND desenvolvem a forma CARD, resultante de danos progressivos ao miocárdio, secundários à miocardite fibrosante (DIAS, 1997). A infecção chagásica pode levar ainda a dilatações do esôfago e cólon, principais manifestações da forma clínica DIG. Essa forma clínica ocorre em menos de 10% dos indivíduos portadores da doença e como consequência, principalmente, da formação de fibrose e da destruição dos neurônios do sistema nervoso autônomo do trato gastrointestinal (DA SILVEIRA, 2007). Pessoas infectadas pelo *T. cruzi* com o sistema imune debilitado (AIDS, quimioterapia, terapias imunossupressoras) podem reativar a doença de Chagas com abundante parasitemia sanguínea e tecidual.

A história da terapêutica da doença de Chagas pode ser dividida em três períodos:

- O primeiro período inicia-se com a descoberta da doença em abril de 1909, compreende a morte de Carlos Chagas em novembro de 1934 e encerra-se em 1935 com o lançamento do “Manual de Doenças Tropicais e Infectuosas” por Evandro Chagas. A obra anteriormente citada contém o relato do insucesso dos medicamentos testados como tripanossomicidas.

- O segundo período compreende os anos de 1936 a 1960, quando numerosas drogas foram experimentadas empiricamente com resultados controversos.

- O terceiro período teve início em 1961, quando Zigman Brenner descobriu que a 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona, Figura 1.2) era capaz de curar camundongos infectados pelo *T. cruzi*, quando submetidos a tratamentos de duração prolongada (50 dias em média) na dose de 100 mg/kg/dia (BRENER e ANDRADE, 1979).

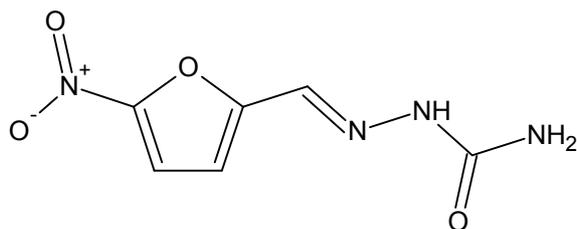


Figura 1.2 - Estrutura da nitrofurazona

CHIN, DE MIRANDA E FERREIRA trataram dez casos agudos da doença com nitrofurazona, com bons resultados e poucos efeitos colaterais, mas em seguida verificaram que cinco deles voltaram a ter xenodiagnóstico positivo (DIAS e DESSOY, 2009).

No final da década de 1960 e início de 1970 duas novas drogas surgiram com melhores perspectivas para o tratamento da doença de Chagas, tanto pelo potencial curativo, particularmente para a fase aguda da doença, como pela tolerância. Trata-se do Nifurtimox, desenvolvido por Bock e colaboradores e, da Benznidazole, desenvolvida por Richle (Figura 1.3) que se mostraram ativos *in vitro* e *in vivo* contra o *T. cruzi*. O Nifurtimox é um nitrofurano, {4-[(5-nitrofurfurilideno)-amino]-3-metiltiomorfoline-1,1-dioxido}, comercializado com o nome de Lampit e, a Benznidazole [(N-benzil-2-nitro-1-imidazoleacetamido)] é comercializada com o nome de Rochagan® no Brasil e Radanil® na Argentina (DIAS e DESSOY, 2009). Essas drogas contêm um grupo nitro (NO<sub>2</sub>) e o mecanismo de ação de ambas envolve a redução desse grupo.

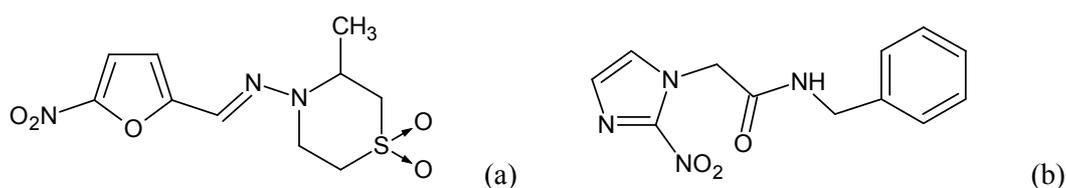


Figura 1.3 - Estruturas de (a) Nifurtimox e (b) Benznidazole.

Os resultados obtidos com ambas as drogas variaram de acordo com a fase da doença, com a duração do tratamento, com a idade dos infectados e com a área geográfica de sua origem. Os melhores resultados foram obtidos na fase aguda da doença, em crianças e pessoas com infecção recente, usando-se o Nifurtimox, na dose de 8 a 10 mg/kg/dia, ou a Benznidazole na dose de 5 a 7,5 mg/kg/dia, durante 60 a 90 dias. Na fase crônica e em infectados adultos o percentual de cura é de 10 a 20%. Os efeitos colaterais mais frequentes com o Nifurtimox foram anorexia, perda de peso, excitabilidade psíquica ou sonolência e manifestações digestivas como náuseas, vômitos e ocasionalmente cólicas intestinais. Os efeitos colaterais com a Benznidazole podem ser classificados em três tipos: manifestações de hipersensibilidade, edema Peri-orbital ou generalizado e depressão da medula óssea. Entre as manifestações de hipersensibilidade tem-se, como exemplo, dermatite com erupção cutânea (usualmente aparecendo entre o 7º e 10º dia de tratamento). O edema peri-orbital ou generalizado compreende reações como febre, linfadenopatia e dores musculares e articulares. A

depressão da medula óssea compreende a neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica; polineuropatia periférica representada por parestesias e polineurite (COURA e CASTRO, 2002).

A droga ideal para o tratamento da doença de chagas deveria produzir a cura parasitológica de casos agudos e crônicos e evitar a evolução da doença, assim como, ser eficaz com poucas doses em curto prazo; não produzir efeitos colaterais importantes; não induzir resistência parasitária; ser barata, de fácil aplicação e acessível aos pacientes.

Vários grupos de pesquisa vêm desenvolvendo estudos de modo a identificar vias metabólicas e moléculas do parasito que possam representar importantes alvos para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas naturais e/ou sintéticos. Alternativamente, a análise do efeito de agentes quimioterápicos já utilizados na clínica ou em estudos pré-clínicos para outros patógenos representa uma interessante ferramenta durante a triagem de drogas efetivas contra o *T. cruzi*. Entre estes agentes estão as Fluorquinolonas, que representam uma importante classe de antibióticos sintéticos e cuja atividade antiparasitária já foi descrita na literatura contra a *Leishmania panamensis* (CORTAZAR, COOMBS e WALKER, 2007) e o *T. brucei*. (NERNORTAS, BURRI e SHAPIRO, 1999). Portanto, nesse trabalho, testamos a atividade anti-*T. cruzi* de algumas fluorquinolonas.

## 1.2 As Fluorquinolonas

A descoberta dos antibióticos possibilitou o controle efetivo de muitos micróbios patogênicos causadores de incapacitação prolongada ou morte de seres humanos. A era da quimioterapia antimicrobiana iniciou-ser em 1936 com a introdução, na clínica, das sulfonamidas. Em 1941, a introdução da penicilina revolucionou os princípios terapêuticos usados nas doenças infecciosas, constituiu-se, portanto, um grande passo na história da medicina. Conhecem-se centenas de antibióticos e todos os anos este número aumenta (SOUZA e cols., 2004).

Dentre os antibióticos supracitados se destacam as quinolonas, que desde sua descoberta na década de 1960, despertaram interesse científico e clínico. Isso porque, as quinolonas apresentam atributos necessários a um antibiótico ideal. Elas combinam um amplo espectro de atividade com boa biodisponibilidade oral (ANDERSSON e MACGOWAN, 2003).

A primeira quinolona a apresentar atividade antibacteriana foi o ácido nalidíxico (Figura 1.4), tendo sido sintetizado e patenteado por Lescher e colaboradores em 1962 (LESHER *e cols.*, 1962). Como o ácido nalidíxico não alcançava a concentração adequada na maioria dos tecidos e órgãos, sua indicação passou a ser restrita ao tratamento de infecções urinárias simples (HEEB *e cols.*, 2001).

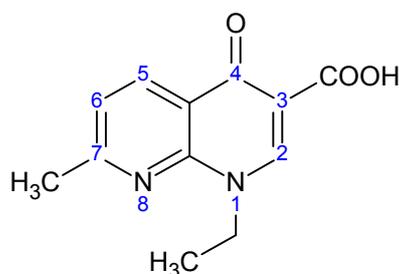


Figura 1.4 - Estrutura do ácido nalidíxico

O primeiro composto com um átomo de flúor em posição C-6 foi a flumequina, (Figura 1.5), patenteada em 1973, a qual apresentou importantes indicações de que esta classe poderia ser utilizada no combate a infecções bacterianas (APPELBAUM, 2000).

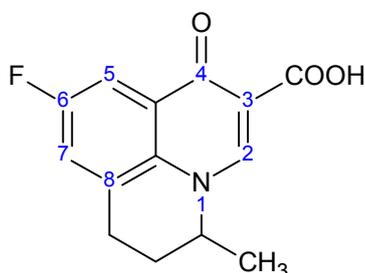


Figura 1.5 - Estrutura da Flumequina

No entanto, o grande avanço da quimioterapia antibacteriana das fluorquinolonas ocorreu no final da década de 1970, quando a introdução de um átomo de flúor em posição C-6 e um grupo piperazila em posição C-7, conferiu um amplo e potente espectro de atividade antimicrobiana. Obteve-se, assim, a norfloxacin (Figura 1.6), patenteada em 1978, sendo a primeira fluorquinolona a apresentar potente atividade antibacteriana (SOUZA *e cols.*, 2004; APPELBAUM, 2000).

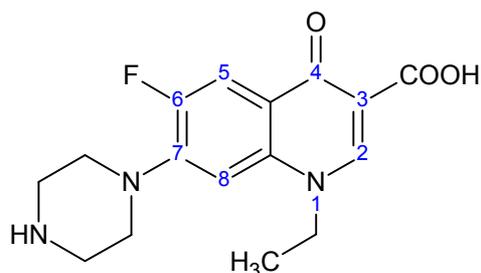


Figura 1.6 - Estrutura da Norfloxacin

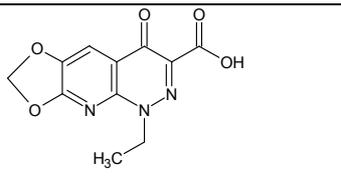
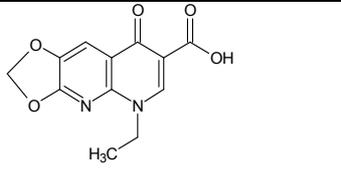
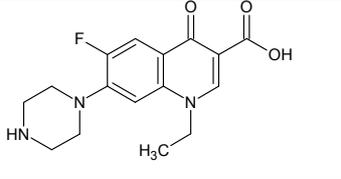
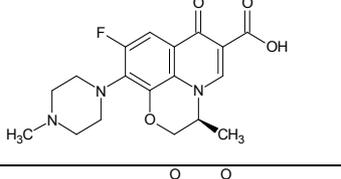
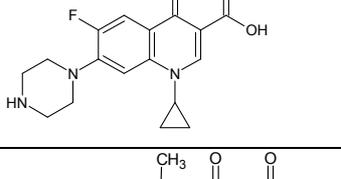
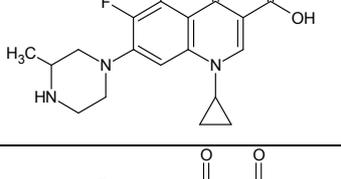
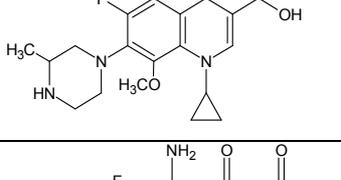
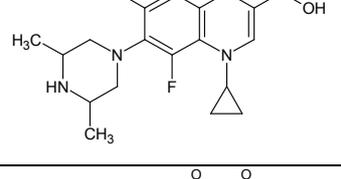
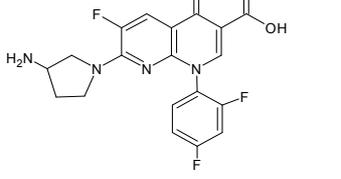
Várias substituições têm sido feitas em diferentes posições do anel quinolônico, no entanto, as posições críticas para a atividade biológica são a C-6 (contendo um átomo de flúor), C-7 (contendo grupos piperazila e pirrolidinila) e N-1 (contendo grupos etila, ciclopropila, ter-butila e arilas fluorados). Existem, também, algumas fluorquinolonas que possuem modificações em posições C-5 e/ou C-8 com potente atividade antibactericida como a perfloxacin, fleroxacin e a esparfloxacin (SOUZA *et cols.*, 2004).

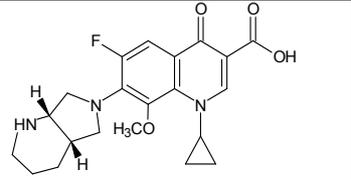
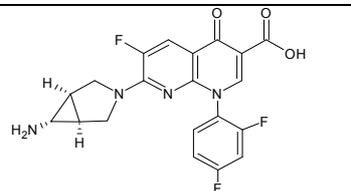
As quinolonas disponíveis para uso clínico foram classificadas em quatro gerações, principalmente, com base em seu espectro de atividade. A primeira geração é representada pelo ácido nalidíxico. A segunda geração de quinolonas tem como característica principal um flúor (F) na posição 6, daí o nome da fluorquinolonas frequentemente dada a toda a classe, o que levou a um aumento da atividade. Estes primeiros compostos foram mais potentes contra bactérias gram-negativas. Os outros membros da segunda geração, esparfloxacin e grepafloxacin, devem ser considerados separadamente, devido ao seu substituinte na posição 5 e ao volume dos seus substituintes na posição 7. Esses compostos apresentaram melhoras significativas a sua atividade contra *Streptococcus pneumoniae*.

A terceira geração de moléculas é caracterizada pela presença de uma piperazina alquil-substituído ou pirrolidina na posição 7 e de um metoxi na posição 8. A quarta geração tem a garenoxacin como seu primeiro representante, esse composto não apresenta o flúor na posição 6 e é denominado des-fluorquinolonas (VAN BAMBEKE *et cols.*, 2005).

A Tabela 1.1 mostra a estrutura de algumas Fluorquinolonas, assim como a evolução dessa classe de compostos segundo as gerações.

Tabela 1.1 - Evolução das quinolonas, considerando as gerações

Geração	Estrutura	Nomenclatura
<b>1ª Geração</b>		Cinoxacina
		Ácido oxalínico
<b>2ª Geração</b>		Norfloxacin (NOR)
		Levofloxacin (LEVO)
		Ciprofloxacin
<b>3ª Geração</b>		Grepafloxacin
		Gatifloxacin
		Sparfloxacin (SPAR)
		Tosufloxacin

<b>4ª Geração</b>		Moxifloxacina
		Trovafloxacina

As fluorquinolonas vêm sendo estudadas devido à sua capacidade quelante e suas aplicações como agentes antimicrobianos, antituberculose e antitumorais (APPELBAUM, 2000; WANG e cols, 2008). As fluorquinolonas são usadas no tratamento de bronquite crônica, pneumonia, infecções do trato urinário, sinusite, tuberculose, dentre outras. Além disso, são agentes alternativos no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), como a blenorragia ou gonorréia. Esta última é a mais comum das DST's (WANG e cols., 2008).

As fluorquinolonas combatem as infecções bacterianas através da inibição de duas enzimas envolvidas na síntese do ADN bacteriano, ambas são topoisomerases do ADN bacteriano e são essenciais para sua replicação. As enzimas são a DNA-girase e a topoisomerase IV (BLONDEAU, 2004; EVSTIGNEEV, 2006). A ADN girase é uma enzima essencial envolvida na replicação, transcrição e reparação do ADN bacteriano. A ADN girase bacteriana é um tetrâmero, composto de duas subunidades A e duas subunidades B. Esta enzima tem a função de introduzir superespirais negativos (processo que ocorre na direção oposta da fita helicoidal de ADN) na molécula do ADN bacteriano, além de desempenhar pelo menos quatro funções que são: manter o nível de espiralização, facilitar o movimento dos complexos de replicação e transcrição (removendo os superespirais positivos), remover os “nós” que se formam no ADN bacteriano e ajudar a curvar e dobrar o mesmo (BLONDEAU, 2004). A topoisomerase IV também é um tetrâmero composto por duas subunidades C e duas subunidades E, codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respectivamente. Tais genes são homólogos (substâncias que têm a mesma função, mas diferem pelo número de 27 átomos de carbono da cadeia principal) aos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. Sua principal função é separar o ADN cromossômico replicado nas células-filhas durante a divisão

celular (BLONDEAU, 2004; EVSTIGNEEV, 2006). As fluorquinolonas interagem com o complexo formado entre a ADN-girase e o ADN bacteriano ou com um complexo formado entre a topoisomerase IV com o ADN bacteriano para criar modificações conformacionais que resultam na inibição de suas atividades enzimáticas (Figura 1.7). O novo complexo formado fluorquinolonas-enzima-ADN bloqueia progressivamente a sua replicação, inibindo a síntese normal do DNA bacteriano, o que resulta na morte rápida da célula da bactéria. Nos organismos Gram-negativos, a ADN-girase tende a ser o alvo preliminar das fluorquinolonas, enquanto que nos organismos Gram-positivos o alvo preliminar tende a ser a topoisomerase IV.

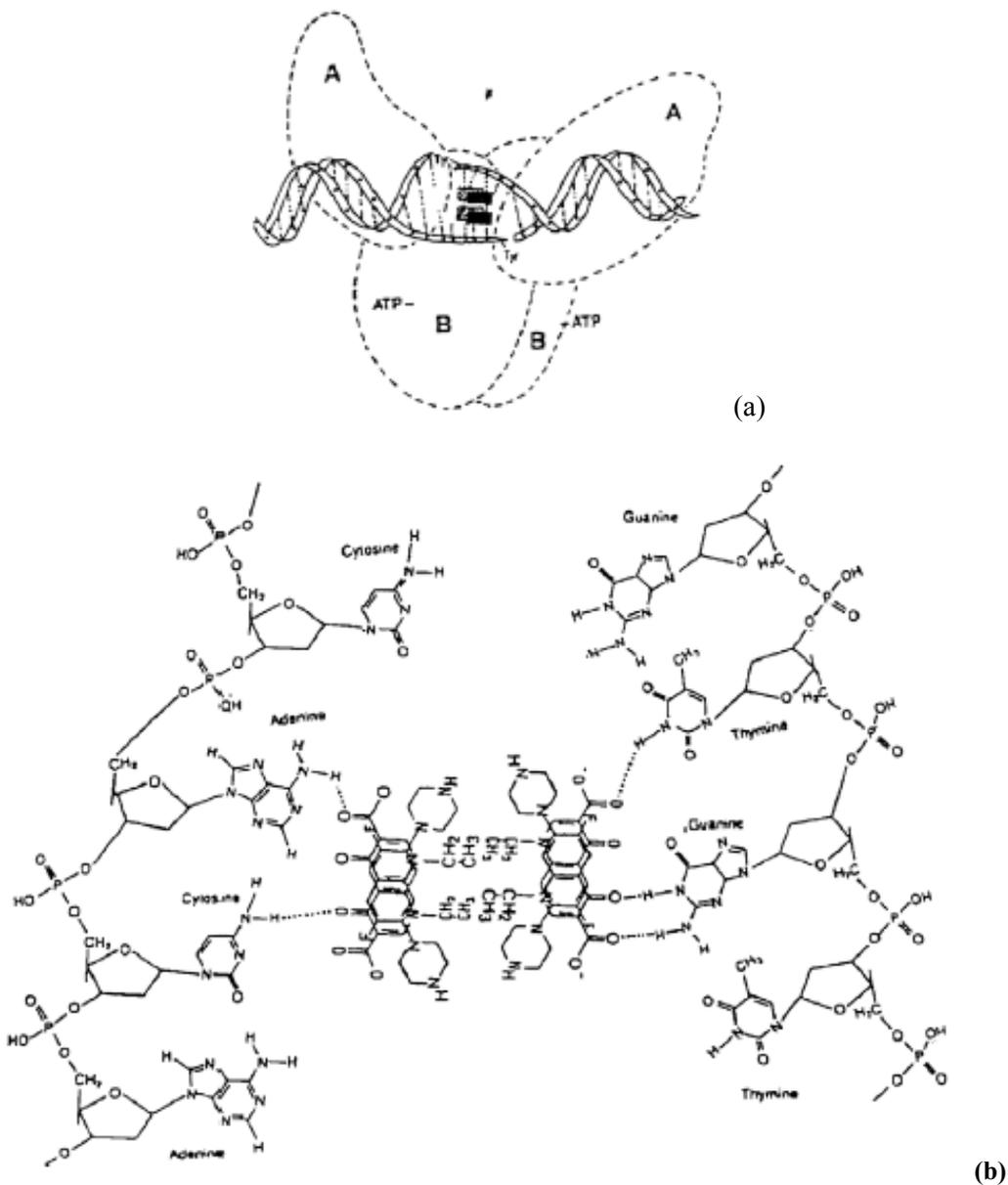


Figura 1.7 - Ilustração do modo de ligação da FQ à DNA-girase. (a) Representação de quatro moléculas de fluorquinolonas (retângulos) numa cavidade do DNA anexado à DNA-girase. (b)

Representação da ligação de quatro moléculas de fluorquinolonas através de ligações de hidrogênio à parte interna do DNA (VIEIRA, 2007).

A bactéria pode resistir à ação das quinolonas de diversas maneiras, dependendo do medicamento e do organismo. No caso dos agentes mais recentes, parece necessário mais de um mecanismo para o desenvolvimento de resistência clinicamente significativa.

Um mecanismo comum de resistência ao fármaco é a modificação do alvo do medicamento. A mutação do gene *gyrA* pode tornar a subunidade A da DNA girase imprópria para a ligação ao fármaco (VIEIRA, 2007).

Alterações ou características naturais da superfície bacteriana que reduzam a penetração ou que causem o efluxo rápido do fármaco constituem outro mecanismo importante de resistência (GOOTZ e BRIGHTY, 1996)

Após o uso do ácido nalidíxico em 1962, houve um rápido desenvolvimento de resistência deste composto pelas bactérias. Os fatores que predisporiam esta resistência incluem a terapia com concentrações subinibitórias da droga e terapia prolongada (HOOPER, 1999).

A modificação na estrutura da molécula da droga (ligante) é a estratégia mais comum para se obter uma nova geração eficaz de fármacos (ANDERSSON e MACGOWAN, 2003). Alternativamente, a formação de complexos dos ligantes com metais confere uma nova abordagem para obter novos fármacos, possibilitando o aumento do arsenal terapêutico frente aos microorganismos que já adquiriram resistência às drogas tradicionais.

### **1.3 Complexação aos íons metálicos**

Vários medicamentos apresentam mudanças em suas propriedades farmacológicas e toxicológicas quando administrados sob a forma de complexos metálicos. Sabe-se que a complexação a metais pode levar a uma significativa redução da resistência celular e a um aumento da atividade das fluorquinolonas. Provavelmente isto ocorre devido a um aumento da lipofilia que leva a uma maior acumulação intracelular. Vários estudos sobre a interação entre as fluorquinolonas e cátions metálicos vêm sendo relatados na literatura.

HOFFKEN e colaboradores (1985) descreveram a síntese de complexos de

magnésio e alumínio de ciprofloxacina. A partir desta data, vários outros complexos de fluorquinolonas foram relatados na literatura.

Provavelmente, o cátion mais amplamente estudado para a complexação de medicamentos é o Cu(II), visto que seus complexos têm apresentado efeito benéfico comprovado contra várias doenças, como tuberculose, artrite reumatóide, úlceras gástricas e câncer (REFAT, 2007).

São relatados na literatura alguns exemplos de complexos de Cu(II) de fluorquinolonas. MENDONÇA-DIAZ e colaboradores (1987) descreveram um complexo de Cu(II) contendo 1,10-fenantrolina e o ácido nalidíxico. Foram descritos ainda complexos de Cu(II) com ciprofloxacina (TUREL *e cols.*, 1994; TUREL, 2002) e cinoxifloxacina (RUIZ, 1997).

EFTHIMIADOU e colaboradores (2007) sintetizaram três novos complexos de Cu(II) de esparfloxacina (SPAR) contendo 2,2-bipiridina, 1-10 fenantrolina ou 2,2-dipiridilamina, do tipo [Cu(SPAR)(N-doador)Cl], nos quais a SPAR estaria coordenada de modo bidentado e na forma aniônica. Esses complexos mostraram-se mais ativos contra *Escherichia coli* do que a esparfloxacina livre. Complexos de cobre contendo esparfloxacina e ligantes nitrogenados estão entre os mais ativos contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, quando comparados com outros complexos de cobre que contêm quinolonas. A atividade antimicrobiana desses complexos cresce na seguinte ordem: 2,2-dipiridilamina < 2,2-bipiridina = 1,10-fenantrolina.

P. RUIZ e colaboradores (2007) sintetizaram o complexo [Cu(HNOR)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], que possui estrutura octaédrica, além dos complexos [Cu(NOR)(fen)(H<sub>2</sub>O)](NO<sub>3</sub>) e [Cu(NOR)(fen)(H<sub>2</sub>O)](NO<sub>3</sub>), nos quais o Cu(II) encontra-se pentacoordenado. REFAT (2007) sintetizou o complexo [Cu(NOR)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)]SO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O que apresentou atividade superior ao ligante livre contra o *Bacillus subtilis*.

KATSAROU e colaboradores (2008) sintetizaram e caracterizaram um complexo de Cu(II) com N-propil-norfloxacina e 1,10-fenantrolina e, posteriormente, estudaram suas propriedades como agente antimicrobiano. O complexo se mostrou mais ativo que a fluorquinolona livre contra os microorganismos Gram(-) *E.coli* e *P. aeruginosa*, e contra o microorganismo Gram(+) *S. aureus*.

CHANG-YUN CHEN e colaboradores (2009) sintetizaram o complexo [Cu(ofloxacina)(fen)(H<sub>2</sub>O)](NO)<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O, determinaram sua estrutura como pirâmide de

base quadrada distorcida e fizeram o estudo de sua interação com o ADN. Concluíram que a interação do complexo ocorre por meio de intercalação e interação eletrostática.

Neste trabalho, preparamos complexos de Cu(II) de norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) e esparfloxacin (SPAR) contendo ou não os seguintes co-ligantes: piridina (py), 2,2'-bipiridina (bipy) e 1,10-fenantrolina (fen). A atividade anti-*T. cruzi* dos complexos foi testada frente as formas tripomastigotas e amastigotas do parasito e comparada a atividade das fluorquinolonas livres. Embora existam na literatura vários estudos mostrando a eficácia de complexos metálicos de fluorquinolonas, muito pouco, ou quase nada, pode ser encontrado em se tratando de atividade parasitária, sobretudo atividade anti-*T. cruzi*. Além disso, foram feitos estudos espectroscópicos e de interação com alvos biológicos.

#### **1.4 Interação com macromoléculas biológicas**

Estudos de interação entre macromoléculas biológicas e drogas geram importantes informações sobre os sítios de ligação, transporte e metabolismo de moléculas no corpo humano (GUIZADO, 2007 e GÓES FILHO, 2005).

Os complexos de metais de transição têm sido amplamente explorados em estudos de interação com macromoléculas com o objetivo de desenvolver novas drogas com propriedades farmacológicas significativas.

O ácido desoxirribonucleico (ADN) possui uma estrutura de dupla hélice composta por duas fitas de ADN que se enrolam em torno do eixo das hélices. As deoxi-riboses ficam na parte externa expostas ao meio aquoso. As bases nitrogenadas estão pareadas entre as duas fitas e são responsáveis por manter a estrutura de dupla hélice. As ligações glicosídicas no ADN, entre as deoxi-riboses e as bases nitrogenadas, não estão diretamente opostas na dupla-hélice, gerando duas cavidades desiguais em seu contorno. As duas cavidades são denominadas cavidade maior ou cavidade menor. Nessas cavidades, especialmente na maior, as bases estão expostas ao meio ou ao solvente e são quimicamente distinguíveis. A Figura 1.8 mostra a estrutura da dupla-hélice do ADN (ZAHA, 2000).

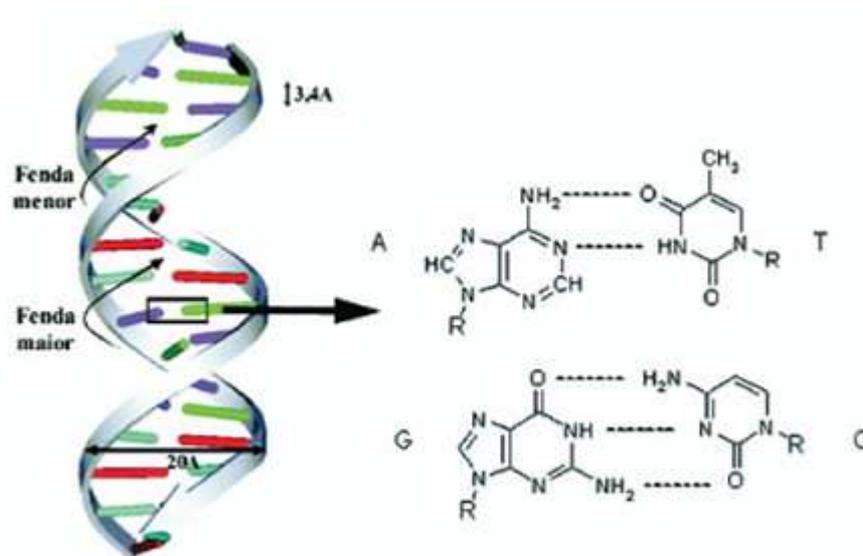


Figura 1.8 - Fita dupla do ADN, mostrando as fendas menor e maior e as ligações de hidrogênio entre os pares de bases nitrogenadas Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) e Guanina (G) (ALMEIDA e cols., 2005).

Estudos de interação envolvendo complexos metálicos e o ADN, relatados na literatura, mostram que, na maioria dos casos, os íons metálicos atuam como centro redox e os ligantes são responsáveis pelo reconhecimento do ADN. Os principais modos de reconhecimento são através de interações eletrostáticas, intercalação, ligações com as cavidades do ADN e/ou ligações de hidrogênio (UMA, 2007).

No estudo de interação via ultravioleta-visível, os resultados das titulações são ajustados com a utilização da equação de Scatchard (Equação 1.1), com o objetivo de determinar os valores das constantes de ligação ( $K_b$ ). A constante de ligação ( $K_b$ ) pode ser obtida pela razão da inclinação com a interseção da reta  $[ADN]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  em função da concentração de ADN,  $[ADN]$  (SKYRIANOU, 2010 e PARAGINSKI, 2007).

$$\frac{[ADN]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[ADN]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)_q} + \frac{1}{[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]} \quad (1.1)$$

Onde:

$[ADN]$  é a concentração do par de bases do ADN,

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

$\epsilon_b$  = coeficiente de extinção do composto ligado ao ADN;

$\epsilon_f$  = coeficiente de extinção do composto livre em solução (na ausência de ADN).

Por outro lado, a albumina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo (KANDAGAL e cols, 2006). Ela participa da regulação da pressão colóide osmótica, do transporte de uma variedade de ligantes endógenos e exógenos, como os fármacos, metabólitos, ácidos graxos e é responsável principalmente pela manutenção do pH (SHAIKH e cols, 2005, SHAIKH e cols, 2007).

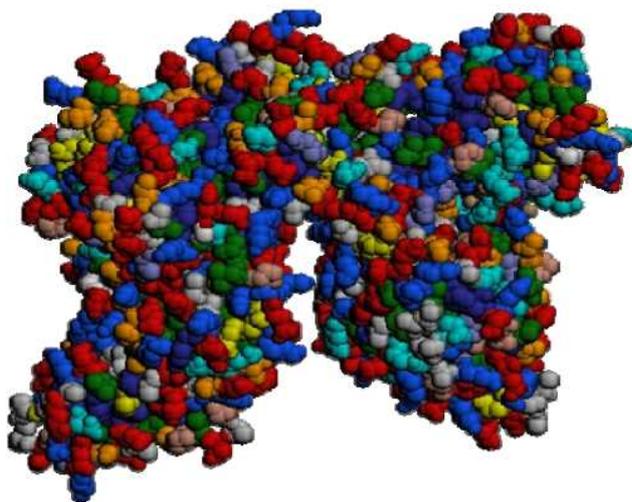


Figura 1.9 – Representação da estrutura da albumina Humana (SILVEIRA, 2008)

O metabolismo e a eficácia de muitos fármacos no corpo estão correlacionados com as suas afinidades com a albumina. A investigação de compostos a respeito de sua ligação com essa proteína tem se tornado importante, visto que os resultados fornecem informações sobre as características estruturais que influenciam na eficácia terapêutica dos fármacos (SHAIKH e cols., 2005).

Dentre os tipos de albuminas comerciais, a do soro bovino é a mais empregada, pois sua semelhança estrutural com a do soro humano é de 76%, aliada ao baixo custo e estabilidade (SHAIKH e cols., 2007).

A BSA é composta de três domínios homólogos (I, II, III), sendo que cada um dos domínios é constituído por dois subdomínios (IA, IB, IIA, IIB, IIIA e IIB). A estrutura é predominantemente R-helicoidal (67%) e a sequência de aminoácidos contém dois resíduos de triptofano, Trp-134 e Trp-212. O Trp-212 está localizado dentro de uma cavidade hidrofílica e o Trp-134 está localizado na superfície da proteína. Esses resíduos de triptofano tornam a BSA altamente fluorescente. Essa fluorescência intrínseca da proteína pode ser utilizada para encontrar detalhes dos sítios de interação droga-BSA.

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, faz-se necessário a existência de contato entre o fluoróforo e o agente de supressão (OLIVEIRA, 2000; SANTOS, 2007).

A interação entre os compostos estudados neste trabalho e a albumina bovina pode ser avaliada através da fluorescência, visto que a albumina apresenta fluorescência e os compostos estudados são agentes supressores de fluorescência.

No caso de supressão de fluorescência dinâmica pode-se descrever o processo, segundo a equação de Stern-Volmer, considerando o tempo de vida do processo:

$$\frac{F_0}{F} = k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1.2)$$

Onde:

$F_0$  = intensidade de fluorescência na ausência do agente de extinção;

$F$  = intensidade de fluorescência na presença do agente de extinção;

$k_q$  = constante bimolecular de velocidade do processo de extinção;

$\tau_0$  = tempo de vida na ausência e presença do agente de extinção;

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

Desse modo, o presente trabalho envolve síntese de complexos metálicos de fluorquinolonas, testes de atividade anti-T.cruzi e estudos de interação de ligantes e complexos com o ADN e a albumina bovina (BSA). Com este trabalho, esperamos poder contribuir para uma melhor compreensão da química, das propriedades estruturais e farmacológicas das fluorquinolonas e seus complexos metálicos.

## Capítulo 2 - Metodologia

### 2.1. Material e Métodos

#### 2.1.1 Reagentes

Norfloxacina, levofloxacina e esparfloxacina são de procedência Sigma. Os sais de Cu(II) utilizados,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$  (fen = 1,10-fenantrolina), são de procedência Aldrich. A piridina e a 2,2'-bipiridina são de procedência Vetec.

Os solventes utilizados nas sínteses são de procedência Merck, Vetec ou Synth. Os solventes orgânicos utilizados nas medidas de luminescência foram submetidos à purificação prévia, segundo os métodos usuais.

O tampão Universal foi preparado a partir de uma solução estoque 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  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  de hidróxido de sódio (*Nuclear*) (PERRIN e DEMPSEY, 1974).

O tampão fosfato foi preparado a partir de uma solução estoque de fosfato ácido de sódio anidro,  $66 \text{ mmol L}^{-1}$  (*Synth*) e uma solução estoque de fosfato de sódio dibásico anidro,  $66 \text{ mmol L}^{-1}$  (*Synth*).

#### 2.1.2 Equipamentos

**Balança** - As pesagens foram feitas em uma balança eletrônica, modelo AY220 da Shimadzu.

**Evaporador Rotatório** - Para evaporação de solvente utilizou-se um aparelho evaporador rotatório da Fisatom modelo 550.

**Ponto de Fusão** - As análises de ponto de fusão dos complexos sintetizados foram observadas em um aparelho digital modelo 430D da Fisatom.

**pHmetro** - Para a determinação do pH das soluções foi utilizado um aparelho

digital modelo PG1000 da Gehaka.

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

**Análise elementar** - As porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes nas amostras foram determinadas com o auxílio do equipamento PE 2400 CHN Elemental Analyzer (Departamento de Química, UFMG). As amostras foram pesadas (2 – 2,5 mg) em balança analítica com precisão de  $10^{-4}$  g em cápsulas de estanho. Os elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio foram analisados simultaneamente, mediante curva de calibração obtida com padrões secos e de alta pureza, com tempo de queima de 600 segundos, sob temperatura de 1000°C e fluxo de gás hélio. As análises foram feitas em duplicata.

**Espectroscopia na região do Infravermelho** - Espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando o aparelho Mattson Instruments Galaxy 3000 (Departamento de Química, UFMG) na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . 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  $\text{kg m}^{-2}$ , originando uma pastilha de concentração 1 % massa/massa, que foi utilizada para obtenção dos espectros.

**Espectroscopia na Região do UV-vis** - Os espectros na região do ultravioleta foram obtidos, em temperatura ambiente (25°C), utilizando-se o espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta visível Hewlett Packard 8451. Foi analisada a solução do complexo na concentração de  $1 \times 10^{-5}$   $\text{mol L}^{-1}$ , em pH 7,4, visto que este é o pH fisiológico. As soluções foram submetidas a varredura espectrofotométrica de 800 a 200 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e volume de 4 mL. Os máximos de absorção foram determinados diretamente nos espectros obtidos.

**Espectroscopia de Fluorescência** – Espectros de fluorescência foram obtidos através de um espectrofotômetro de emissão Shimadzu RF 5301PC.

**Medidas de Condutividade** - As medidas de condutimetria foram feitas em um condutivímetro de bancada modelo Q405M da Quimis, à temperatura ambiente. As soluções foram preparadas, nos respectivos solventes, na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$   $\text{mol L}^{-1}$ .

**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, à temperatura ambiente (para amostras no pó) e à temperatura de N<sub>2</sub> líquido, 77K (para amostras em solução aquosa e solução de DMSO).

**Termogravimetria** – As curvas termogravimétricas foram obtidas em uma Termobalança Shimadzu TGA-5H. Foi utilizado atmosfera de ar com razão de fluxo de 50 mL/min. A razão de aquecimento foi 10°C min<sup>-1</sup> e a temperatura final alcançada foi de 750°C.

## 2.2 Sínteses

### 2.2.1 Síntese dos Complexos de Cu(II) de NOR, LEVO, SPAR.

Os complexos foram obtidos dissolvendo-se 0,31 mmol do ligante norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) ou esparfloxacin (SPAR), em aproximadamente 20 mL de acetona. A esta solução foi adicionada a mesma quantidade (em mol) do sal de Cu(II), CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, previamente dissolvido em cerca de 20 mL de acetona. A mistura permaneceu sob agitação por aproximadamente 24 horas, com temperatura em torno de 25 °C. Os precipitados formados foram filtrados a vácuo, lavados com éter etílico e secos. Três novos complexos de Cu(II) foram obtidos: [CuCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)(NOR)].H<sub>2</sub>O (**1**), [CuCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)(LEVO)] (**5**), [CuCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)(SPAR)].H<sub>2</sub>O (**9**). A Tabela 2.1 lista a faixa de decomposição (°C) e o rendimento das reações. As Figuras 2.1 a 2.3 mostram as equações de obtenção dos complexos.

Tabela 2.1 - Faixa de decomposição (°C) e rendimento das reações dos complexos de Cu(II) de norfloxacin, levofloxacin e esparfloxacin

Composto	Faixa de decomposição (°C)	Rendimento da reação (%)
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(NOR)].H <sub>2</sub> O (1)	190-196	40
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(LEVO)] (5)	217-222	71
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(SPAR)].H <sub>2</sub> O (9)	216-225	78

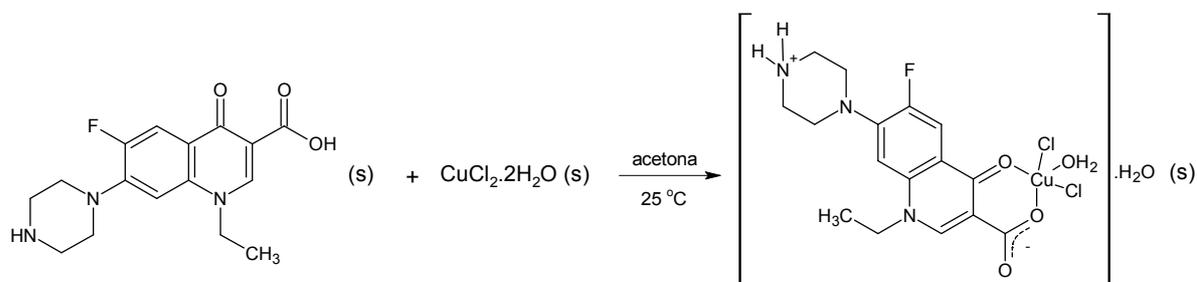


Figura 2.1 - Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de norfloxacin (NOR)

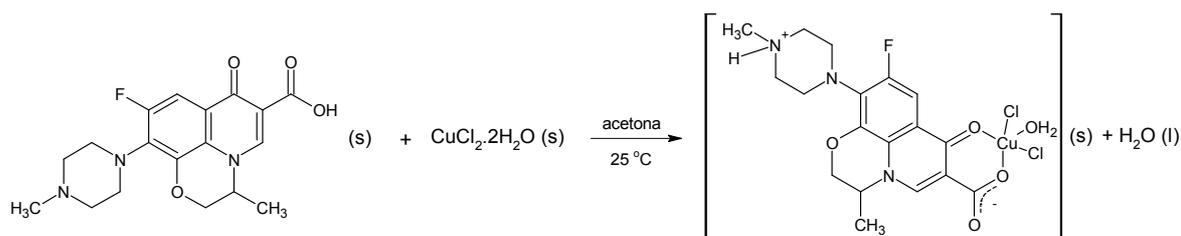


Figura 2.2 - Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de levofloxacin (LEVO)

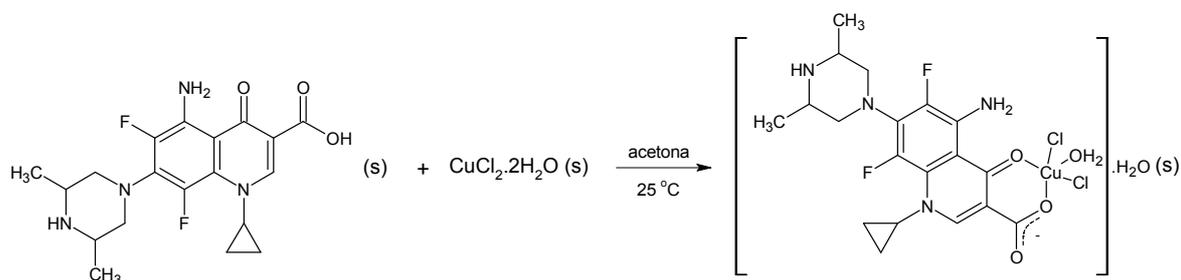


Figura 2.3 - Equação de obtenção do complexo e Cu(II) de esparfloxacin (SPAR)

## 2.2.2 Síntese dos precursores [CuCl<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>] e [CuCl<sub>2</sub>(bipy)<sub>2</sub>]

Para obtenção do precursor  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$  dissolveu-se 0,4 mmol do sal  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em aproximadamente 20 mL de acetona. Posteriormente, adicionou-se 0,2 mL de piridina. A mistura foi deixada sob agitação e refluxo por 24 horas. O precipitado formado foi separado por filtração a vácuo. Rendimento 90 %.

A síntese do precursor  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$  foi feita solubilizando-se quantidades equimolares do sal  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e da 2,2'-bipiridina (1,74 mmol) em aproximadamente 20 mL de acetona. A mistura permaneceu sob agitação por 24 horas e, posteriormente, foi filtrada a vácuo. Rendimento 91 %.

### **2.2.3 Síntese de Complexos de Cu(II) de NOR, LEVO e SPAR contendo piridina**

Os complexos de Cu(II) do tipo  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{L})]$  foram sintetizados através da mistura de quantidades equimolares de  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$  e da respectiva fluorquinolona (0,38 mmol), ambos dissolvidos de acetona (~ 40 mL). A mistura permaneceu sob agitação por 24 horas, a temperatura ambiente. Após esse período a mistura foi resfriada por 24 horas. Os precipitados formados foram separados por filtração a vácuo e secos. Três novos complexos foram obtidos  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (**2**)  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{LEVO})] \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$  (**6**),  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})]$  (**10**). A Tabela 2.2 lista a faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ ) e o rendimento das reações para os três complexos. A Figura 2.4 mostra, como exemplo, a equação de obtenção do complexo com a norfloxacin.

Tabela 2.2 - Faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ ) e rendimento das reações dos complexos de Cu(II) de norfloxacin, levofloxacin e esparfloxacin contendo piridina

Composto	Faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ )	Rendimento da reação (%)
$[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ ( <b>2</b> )	175-209	96
$[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{LEVO})] \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ ( <b>6</b> )	166-171	61
$[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ ( <b>10</b> )	144-167	43

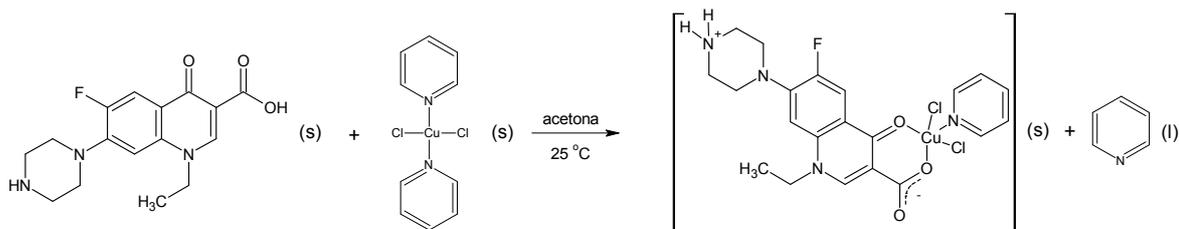


Figura 2.4 - Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de norfloxacina (NOR) contendo piridina

### 2.2.4 Síntese de Complexos de Cu(II) de NOR, LEVO e SPAR contendo 2,2'-bipiridina

Na síntese dos complexos do tipo  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{L})]\text{Cl}$  foram dissolvidas quantidades equimolares do precursor  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$  e da respectiva fluorquinolona (0,31mmol), em 40 mL de acetona. A mistura permaneceu sob agitação por 24 horas, a temperatura ambiente. Após esse período a mistura foi resfriada por 24 horas. Os precipitados formados foram separados por filtração a vácuo e secos. Três novos complexos foram obtidos:  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (**3**)  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (**7**),  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**11**). A Tabela 2.3 lista a faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ ) e o rendimento das reações. A Figura 2.5 mostra, como exemplo, a equação de obtenção do complexo  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .

Tabela 2.3 - Faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ ) e rendimento das reações dos complexos de Cu(II) de norfloxacina, levofloxacina e esparfloxacina contendo 2,2'-bipiridina

Composto	Faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ )	Rendimento da reação (%)
$[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ( <b>3</b> )	200-210	73
$[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ( <b>7</b> )	190-195	61
$[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ( <b>11</b> )	180-193	92

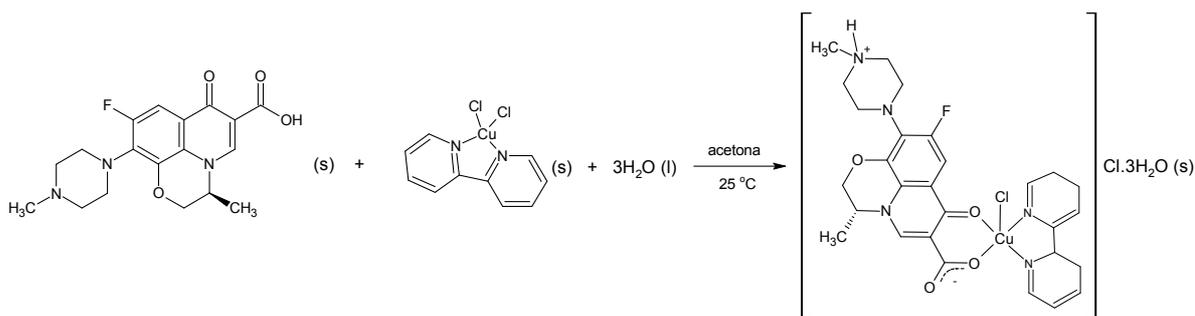


Figura 2.5 - Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de levofloxacina contendo 2,2' biperidina

### 2.2.5 Síntese de Complexos de Cu(II) de NOR, LEVO ou SPAR contendo 1,10-fenantrolina

Os complexos do tipo  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{L})]$  foram obtidos dissolvendo-se 0,31 mmol dos ligantes em, aproximadamente, 40 mL de acetona, com exceção da levofloxacina que foi dissolvida em metanol. Após a dissolução 0,31 mmol de dicloro(1,10-fenatrolina)cobre(II), previamente dissolvido em metanol, foi adicionado a solução. A mistura permaneceu sob agitação por aproximadamente 24 horas. O volume de solvente foi reduzido utilizando um evaporador rotatório. Os precipitados formados foram filtrados a vácuo, lavados com éter etílico e secos. Três complexos foram obtidos:  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{NOR})].4\text{H}_2\text{O}$  (**4**),  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})].4\text{H}_2\text{O}$  (**8**) e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{SPAR})].3\text{H}_2\text{O}$  (**12**). A Tabela 2.4 lista a faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ ) e rendimento das reações dos complexos. A Figura 2.6 mostra, como exemplo, a equação de obtenção do complexo  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{SPAR})].3\text{H}_2\text{O}$ .

Tabela 2.4 - Faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ ) e rendimento das reações dos complexos de Cu(II) de norfloxacin, levofloxacina e esparfloxacin contendo 1,10-fenantrolina.

Composto	Faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ )	Rendimento da reação (%)
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{NOR})].4\text{H}_2\text{O}$ ( <b>4</b> )	210 – 219	90
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})].4\text{H}_2\text{O}$ ( <b>8</b> )	178 – 187	65
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{SPAR})].3\text{H}_2\text{O}$ ( <b>12</b> )	180 – 189	76

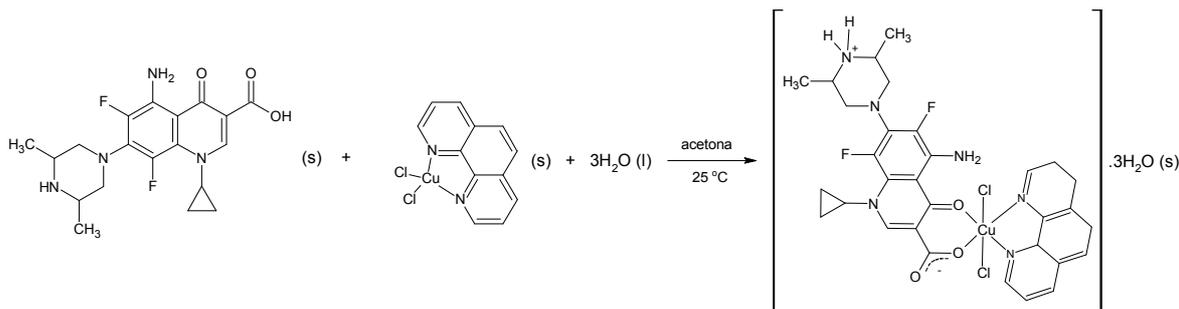


Figura 2.6 - Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de esparfloxacina contendo 1,10-fenantrolina

## 2.3 Estudo de interação com alvos biológicos

### 2.3.1 Interação com ADN *calif-thymus* (CT ADN)

Os estudos de interação das drogas com CT-DNA foram feitos utilizando os espectroscopia na região do UV- visível.

Foram preparadas duas soluções de CT-ADN, uma em tampão fosfato e outra em tampão universal. As concentrações das soluções de CT-DNA foram determinadas através de espectros na região do UV-visível. Os cálculos foram feitos através da lei de Beer que relaciona a concentração e a absorvidade molar ( $\epsilon$ ). Para o CT-ADN, em  $\lambda$  de 260 nm,  $\epsilon$  é igual a 6600 (EFTHIMIADOU, 2008).

Para as fluorquinolonas e seus complexos foram preparadas soluções estoque de concentração  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , em DMSO. Posteriormente as soluções foram diluídas em tampão até a concentração utilizada nas interações,  $25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . As diluições das soluções de LEVO e dos precursores e dos complexos  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEVO})]$  (5),  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (7),  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (8) foram feitas em tampão fosfato. As diluições da SPAR e de  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (9),  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (10),  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (11) e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{SPAR})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (12) foram feitas em tampão Universal. Todas as soluções utilizadas foram preparadas em pH fisiológico (pH = 7,4).

No estudo da interação ADN-droga foi feita uma titulação em que a 2 mL da solução da droga foram adicionadas alíquotas de 0,125 mL da solução de CT-ADN. Foi adotado um período de incubação de 30 minutos, com subsequente varredura de 200 a

800 nm. Os espectros obtidos foram ajustados a equação de Scatchard (equação 1.1) o que possibilitou também o cálculo das constantes de interação ( $k_b$ ) entre os compostos e o CT-ADN.

### **2.3.2 Interação com a Albumina Bovina (BSA)**

O estudo das interações BSA-droga para ligantes, precursores e complexos de Cu(II) foi feito através da espectroscopia de fluorescência. Inicialmente foram preparadas soluções estoque das drogas de concentração  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , em dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, as soluções foram diluídas em tampão Universal até a concentração de  $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . O pH do tampão foi previamente ajustado para 7,4. A solução de BSA de concentração  $8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada, diretamente em tampão Universal, pH 7,4.

Neste estudo 2 mL da solução de BSA ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi titulada com alíquotas de 0,1 mL das soluções das drogas ( $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Após cada adição foi feita leitura na faixa de 220 a 700 nm, com uma excitação de 285 nm. Após a adição da droga em estudo, observou-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 1.2). O gráfico ( $F_0/F$  vs [composto]) é representado por uma reta e o coeficiente angular da reta é a constante de associação ( $K_{SV}$ ).

## **2.4 Testes de atividade anti-*T.cruzi***

Os ensaios de atividade anti-*T.cruzi* foram feitos em colaboração com a Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro, do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ – RJ.

Os testes de atividade tripanocida foram feitos sobre as formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do parasito. A cepa Y foi obtida a partir de punção cardíaca de camundongos suíços previamente infectados (após eutanásia em câmara com saturação de  $\text{CO}_2$ ) durante o pico da parasitemia. A purificação dos parasitos foi feita por centrifugação diferencial (MEIRELLES e cols., 1986).

As soluções dos compostos foram preparadas na concentração de 50 mM utilizando água como solvente e foram armazenadas a 4°C até a realização dos experimentos. Os ensaios (no mínimo de 3 ensaios) foram feitos em duplicata.

Para a análise da atividade tripanocida *in vitro* as formas tripomastigotas do parasito foram tratados por 24 h/37°C com crescentes doses dos complexos 0-250 µM, para determinação do número de parasitos vivos e dos valores de IC<sub>50</sub>. Os parasitos vivos foram quantificados usando o microscopio óptico (através de câmara de Neubauer). O valor de IC<sub>50</sub> é a dose mínima de cada composto capaz de matar 50% dos parasitos. Os ensaios foram conduzidos em meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB).

Para analisar o efeito das drogas 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 então tratados ou não por 24-72h com diferentes concentrações dos complexos, seguindo 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.

Para identificar a dose efetiva dos complexos contra o parasito, mas que não exerce toxicidade para a célula hospedeira *in vitro* (IS<sub>50</sub>), o método de metil tiazolil tetrazólio foi utilizado, onde a viabilidade das células cardíacas expostas a doses crescentes dos complexos foi averiguada.

## Capítulo 3-

### *Síntese, caracterização e atividade anti-T. cruzi de complexos de Cu(II) de algumas fluorquinolonas*

A reação entre  $\text{CuCl}_2$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$  e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$  (py = piridina, bipy = 2,2'-bipiridina, fen = 1,10-fenantrolina) e as fluorquinolonas norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) e esparfloxacin (SPAR) levou à obtenção de doze complexos, solúveis ou parcialmente solúveis em água. Dois desses complexos já haviam sido preparados por outro membro do nosso grupo. Os complexos obtidos foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade, espectroscopias na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e termogravimetria. A atividade anti-*T. Cruzi* dos ligantes, dos complexos e dos precursores foi testada sob as formas tripomastigota sanguínea e amastigota do *Trypanosoma Cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas.

#### 3.1 Dados de Microanálises e Medidas de Condutividade

A Tabela 3.1 apresenta os dados de análise elementar para os precursores de Cu(II) obtidos:  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$  e  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$  (py = piridina, bipy = 2,2'-bipiridina). O precursor  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$  (fen = 1,10-fenantrolina) é comercial.

Tabela 3.1 – Dados de análise elementar (valores calculados entre parênteses) para os precursores de Cu(II)

Precursor	% C	% H	% N
$[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$	41,0 (40,7)	3,4 (3,0)	9,6 (9,7)
$[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$	41,4 (41,3)	2,6 (2,4)	9,6 (9,8)

A Tabela 3.2 apresenta os dados de análise elementar e condutividade para os complexos de Cu(II). Os dados sugerem a formação de complexos neutros, com exceção dos complexos que contém bipy, que são eletrólitos 1:1. Os complexos obtidos são do tipo  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{L})]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{L})]$ ,  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{L})]\text{Cl}$  e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{L})]$ , onde L = NOR, LEVO ou SPAR. Os dados de análise elementar sugerem ainda que alguns complexos possuam moléculas de água de hidratação. A presença das moléculas de água de hidratação, na maioria dos casos, pode ser confirmada pelas curvas TG-DTG dos complexos (*vide infra*).

Tabela 3.2 – Dados de análise elementar (valores calculados entre parênteses) e condutividade ( $\Lambda$ ,  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) para os complexos de Cu(II)

Complexos	% C	% H	% N	$\Lambda$
$[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})].\text{H}_2\text{O}$ (1)	38,9 (39,2)	3,8 (4,5)	8,7 (8,6)	a
$[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})].\text{H}_2\text{O}$ (2)	45,0 (45,8)	3,5 (4,6)	10,4 (10,2)	65*
$[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}.\text{H}_2\text{O}$ (3)	46,5 (49,7)	3,8 (4,5)	10,9 (11,2)	230*
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{NOR})].4\text{H}_2\text{O}$ (4)	48,5 (47,6)	4,7 (4,8)	10,1 (9,9)	64*
$[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEVO})]$ (5)	42,3 (42,1)	3,6 (4,3)	8,1 (8,2)	a
$[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{LEVO})].1,5\text{H}_2\text{O}$ (6)	41,9 (45,9)	4,1 (4,7)	8,5 (9,3)	36**
$[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}.\text{H}_2\text{O}$ (7)	45,4 (47,6)	4,6 (4,8)	9,8 (9,9)	142*
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})].4\text{H}_2\text{O}$ (8)	47,4 (48,2)	5,0 (4,8)	9,0 (9,4)	38**
$[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})].\text{H}_2\text{O}$ (9)	40,4 (40,6)	4,9 (4,7)	9,7 (10,0)	29**
$[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})].\text{H}_2\text{O}$ (10)	47,3 (46,2)	4,7 (4,7)	11,8 (11,2)	47**
$[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}.\text{H}_2\text{O}$ (11)	47,6 (48,4)	4,4 (4,8)	11,5 (11,7)	148*
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{SPAR})].3\text{H}_2\text{O}$ (12)	49,1 (48,9)	4,8 (4,8)	10,9 (11,0)	37**

<sup>a</sup> pouco solúvel; \* solução aquosa; \*\* solução de DMF

As medidas de condutividade em solução aquosas de eletrólitos 1:1 apresentam valores de condutividade de cerca de  $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ , e de cerca de  $250 \mu\text{S cm}^{-1}$  para eletrólitos 1:2. Os valores de condutividade utilizando Dimetilformamida como solvente entre  $65\text{-}90 \mu\text{S cm}^{-1}$  indicam eletrólitos 1:1, entre  $130\text{-}170 \mu\text{S cm}^{-1}$  eletrólitos 1:2 de  $200\text{-}240 \mu\text{S cm}^{-1}$  indicam eletrólitos 1:3 (GEARY, 1971).

### 3. Espectroscopia na região do infravermelho

As bandas dos espectros do infravermelho mais úteis na determinação do modo de coordenação das fluorquinolonas ao íon Cu(II) são mostradas na Tabela 3.3.

Os espectros da NOR, LEVO e SPAR livres mostram absorções entre 1716 e 1731  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas à vibração de estiramento do grupo carboxílico,  $\nu(\text{COOH})$ , (SADEEK e EL-SHIWINIY, 2010), ausentes nos espectros dos complexos, o que indica o envolvimento do grupo carboxílico na interação com os íons metálicos.

A banda atribuída ao estiramento  $\nu(\text{C}=\text{O})$  de cetona aparece entre 1617 e 1641  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros das fluorquinolonas livres (DOROFEEV, 2004). Nos espectros dos complexos, essa banda desloca-se para regiões de mais baixa frequência, indicando a coordenação da carbonila cetônica aos íons metálicos.

Tabela 3.3 – Principais números de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) e atribuições de bandas na região do infravermelho para as fluorquinolonas e seus complexos de Cu(II)

Compostos	$\nu(\text{COOH})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-)$	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$	$\Delta\nu$
Norfloxacina (NOR)	1731 F	1617 F	-	-	-
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(NOR)].H <sub>2</sub> O (1)	-	1590 m	1624 F	1382 m	242
[CuCl <sub>2</sub> (py)(NOR)].H <sub>2</sub> O (2)	-	1550 m	1636 F	1382 m	263
[CuCl(bipy)(NOR)]Cl.H <sub>2</sub> O (3)	-	1570 m	1630 F	1394 m	246
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(NOR)].4H <sub>2</sub> O (4)	-	1581 F	1629 F	1383 m	236
Levofloxacina (LEVO)	1725 F	1620 F	-	-	-
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(LEVO)] (5)	-	1592 m	1630 F	1344 f	286
[CuCl <sub>2</sub> (py)(LEVO)].1,5H <sub>2</sub> O (6)	-	1522 F	1618 F	1342 f	276
[CuCl(bipy)(LEVO)]Cl.3H <sub>2</sub> O (7)	-	1518 F	1617 F	1343 m	248
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(LEVO)].4H <sub>2</sub> O (8)	-	1584 F	1643 F	1395 m	274
Esparfloxacina (SPAR)	1716 F	1641 F	-	-	-
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(SPAR)]. H <sub>2</sub> O (9)	-	1573 F	1636 F	1385 m	251
[CuCl <sub>2</sub> (py)(SPAR)].H <sub>2</sub> O (10)	-	1568 F	1634 F	1387 f	247
[CuCl(bipy)(SPAR)]Cl.2H <sub>2</sub> O (11)	-	1568 F	1611 F	1384 m	249
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(SPAR)].3H <sub>2</sub> O (12)	-	1574 F	1632 m	1383 m	227

F = banda de forte intensidade, m = banda de média intensidade e f = banda de fraca intensidade.

Nos espectros dos complexos de Cu(II) observa-se o surgimento de duas novas bandas atribuídas ao estiramento assimétrico do grupo carboxilato,  $\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-)$ , entre 1643-1624  $\text{cm}^{-1}$ , e ao estiramento simétrico do grupo carboxilato,  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ , entre 1395-1344  $\text{cm}^{-1}$ , indicando, novamente, o envolvimento desse grupo na coordenação (SADEEK E EL-SHIWINIY, 2010; EFTHIMIADOU ET AL, 2006).

O grupo carboxilato pode coordenar-se aos íons metálicos de modo monodentado, bidentado ou em ponte. A frequência de separação entre os modos vibracionais simétrico e assimétrico desse grupo ( $\Delta\nu = \nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ ) pode ser usada para distinguir entre os diferentes modos de coordenação (SADEEK, 2005; REFAT, 2007). Deacon e Phillips, 1980, investigaram as frequências de estiramento simétrico e assimétrico de um grande número de complexos carboxilatos, cujas estruturas cristalográficas são 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 esta coordenado de modo bidentado;
- (ii)  $\Delta\nu \sim 150 \text{ cm}^{-1}$ , o grupo carboxilato esta coordenado em ponte;
- (iii)  $\Delta\nu > 200 \text{ cm}^{-1}$ , o grupo carboxilato esta coordenado de modo monodentado.

Os valores de  $\Delta\nu$  observados para os complexos de Cu(II) obtidos nesse trabalho estão entre 236 e 286 (ver Tabela 3.3), o que sugere a coordenação do grupo carboxilato de modo monodentado.

Logo, os dados de infravermelho indicam que nos doze complexos obtidos a NOR, LEVO e SPAR estão coordenadas ao Cu(II) de modo bidentado através da carbonila da cetona e do grupo carboxilato e na forma zwitterionica.

As bandas características dos co-ligantes piridina (py), bipyridina (bipy) e fenatrolina (fen) também puderam ser observadas nos espectros dos complexos.

Para os complexos que contem py, como co-ligante, observou-se nos espectros de IV uma banda fraca, próxima a 1214  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas a deformações no plano das ligações C-H da py. (DUNSTAN, 1997). Essa banda também está presente no espectro do precursor  $[\text{CuCl}_2(\text{py})]$ .

Para os complexos que contem bipy, o deslocamento da banda característica da vibração da ligação C=N observada em 1579  $\text{CM}^{-1}$ , indica a coordenação do N pirinídico ao Cu(II) (RODRIGES, 2010). Essas bandas também podem ser observadas no espectro do precursor  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$ .

Para os complexos que contém fen observou-se uma banda em torno de  $724\text{ cm}^{-1}$  atribuída às vibrações fora do plano dos átomos de hidrogênio dos anéis heterocíclicos da 1,10-fenantrolina.

A Figura 3.1 mostra, como exemplo, os espectros de infravermelho da levofloxacina e de seus complexos de Cu(II).

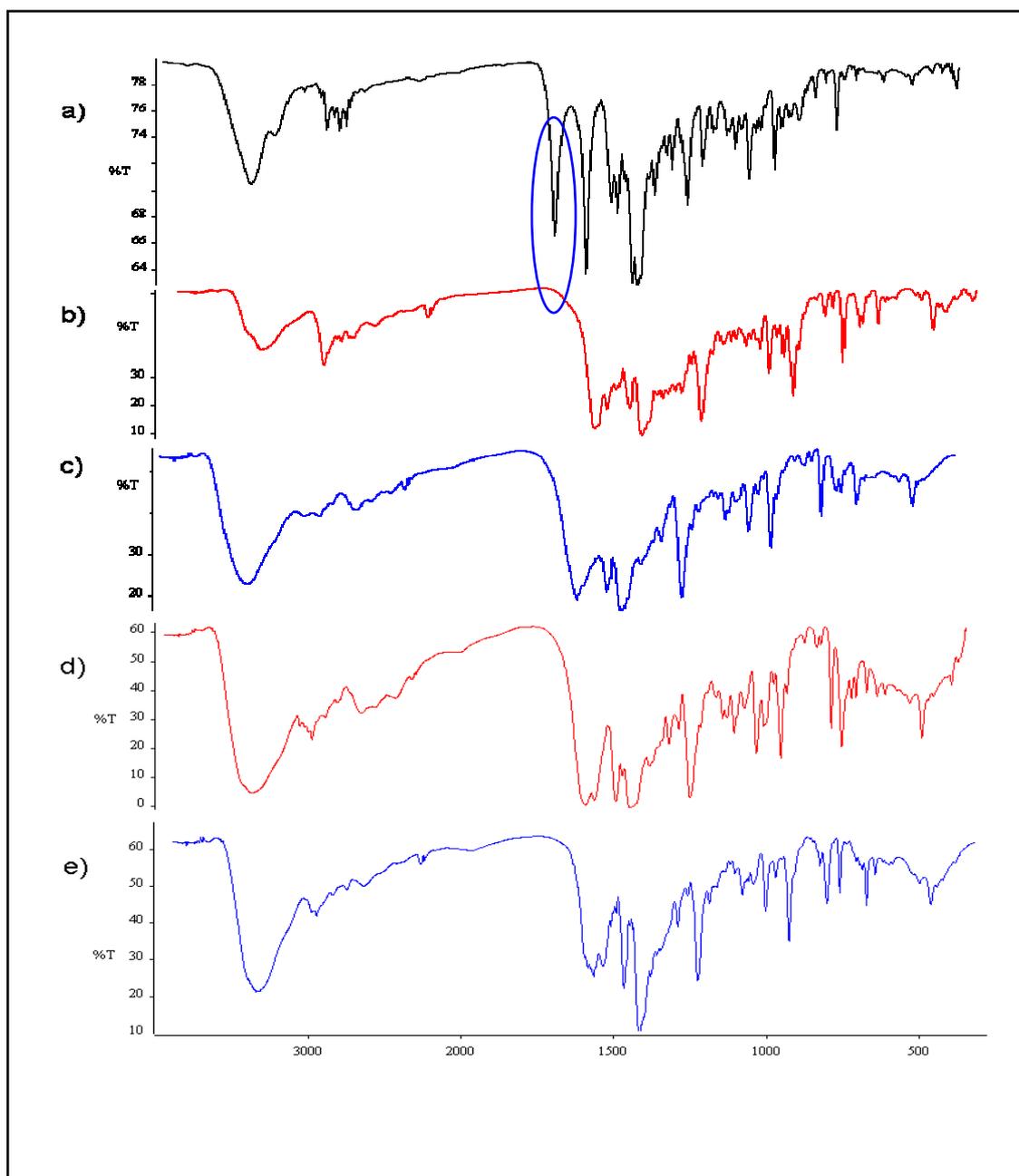


Figura 3.1 – Espectros de IV de a) LEVO, b)  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEVO})]$  (5), c)  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{LEVO})].1,5\text{H}_2\text{O}$  (6), d)  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}.3\text{H}_2\text{O}$  (7), e)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})].4\text{H}_2\text{O}$  (8). O círculo azul destaca o estiramento  $\nu(\text{COOH})$  em  $1725\text{ cm}^{-1}$  no espectro da LEVO.

### 3.2 Análise Termogravimétrica

As curvas TG/DTG para os complexos de Cu(II) foram obtidas entre 30 e 750 °C, em atmosfera de ar, com taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. Em todos os casos, foi possível confirmar a presença das moléculas de água (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Porcentagens de perda de moléculas de água de hidratação calculadas e obtidas das curvas TG/DTG dos complexos de Cu(II)

Complexos	MM (g mol <sup>-1</sup> )	% H <sub>2</sub> O (calculado)	% H <sub>2</sub> O (experimental)
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(NOR)].H <sub>2</sub> O (1)	489,8	7,3	*
[CuCl <sub>2</sub> (py)(NOR)].H <sub>2</sub> O (2)	550,9	3,3	3,7
[CuCl(bipy)(NOR)]Cl.H <sub>2</sub> O (3)	628,0	2,9	*
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(NOR)].4H <sub>2</sub> O (4)	706,0	10,2	10,8
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(LEVO)] (5)	513,8	3,5	2,7
[CuCl <sub>2</sub> (py)(LEVO)].1,5H <sub>2</sub> O (6)	601,9	4,5	4,6
[CuCl(bipy)(LEVO)]Cl.3H <sub>2</sub> O (7)	706,0	7,6	7,9
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(LEVO)].4H <sub>2</sub> O (8)	748,1	9,6	9,1
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(SPAR)].H <sub>2</sub> O (9)	562,9	6,4	6,9
[CuCl <sub>2</sub> (py)(SPAR)].H <sub>2</sub> O (10)	624,0	2,9	3,5
[CuCl(bipy)(SPAR)]Cl.2H <sub>2</sub> O (11)	719,0	5,0	*
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(SPAR)].3H <sub>2</sub> O (12)	761,1	7,0	10,8

\* a saída das moléculas de água não foi mostrada separadamente.

Nas curvas dos complexos (1), (3) e (11) a perda das moléculas de água não pode ser observada separadamente. No entanto, observa-se uma perda de massa em baixa temperatura, característica de moléculas de água de hidratação. Para o complexo (12), as porcentagens de perda de água calculada e experimental estão muito discrepantes. No entanto, como os dados de C,H,N para esse complexo estão bem fechados, sugerimos que a porcentagem de 10,8, indicada na Tabela 3.4, não corresponda apenas a perda de água.

As Figuras 3.2 a 3.4 mostram, como exemplo, as curvas TG/DTG obtidas para os complexos de levofloxacina.

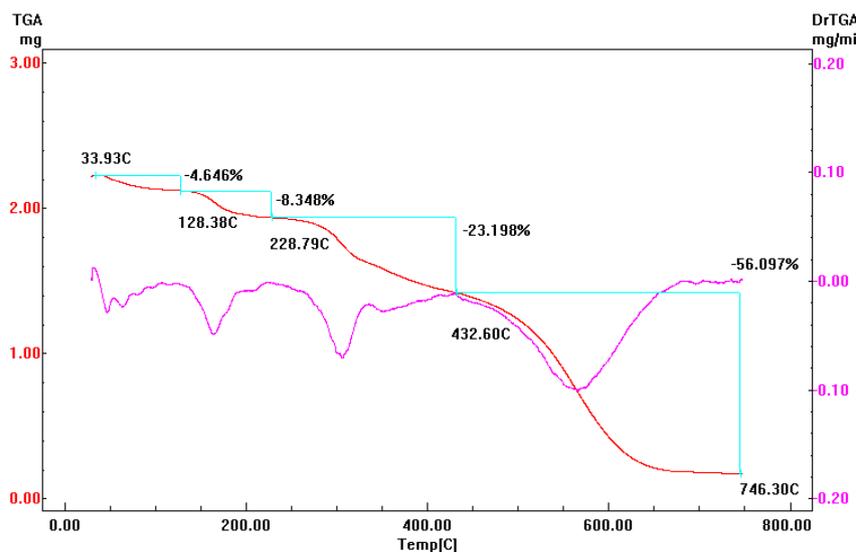


Figura 3.2 – Curvas TG/DTG de  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{LEVO})] \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$  (6)

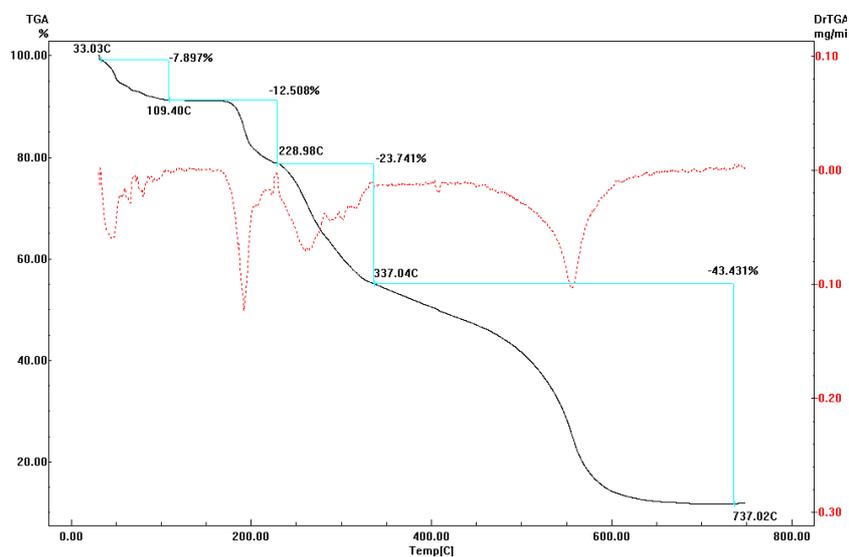


Figura 3.3 – Curvas TG/DTG de  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (7)

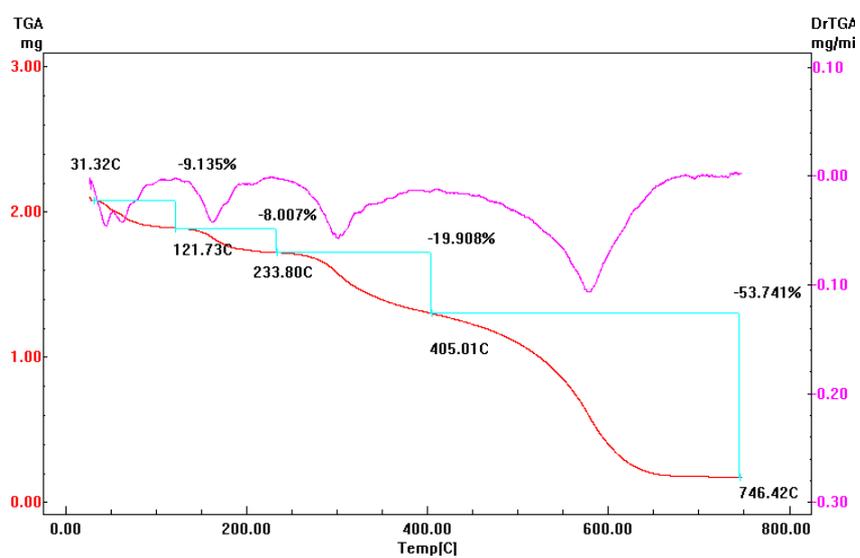


Figura 3.4 – Curvas TG/DTG de  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (8)

### 3.3 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

#### 3.4.1 Espectros de RPE dos complexos de Cu(II), em pó, a temperatura ambiente

Os espectros de RPE dos complexos (1), (5) e (9) são característicos de simetria axial e não apresentam desdobramento hiperfino, que seria esperado pela interação do elétron desemparelhado com o núcleo de cobre ( $I=3/2$ ), como frequentemente se observa em amostras sólidas de complexos de Cu(II) em que interações de troca estão presentes (HATHAWAY e BILLING, 1970) (Figura 3.5).

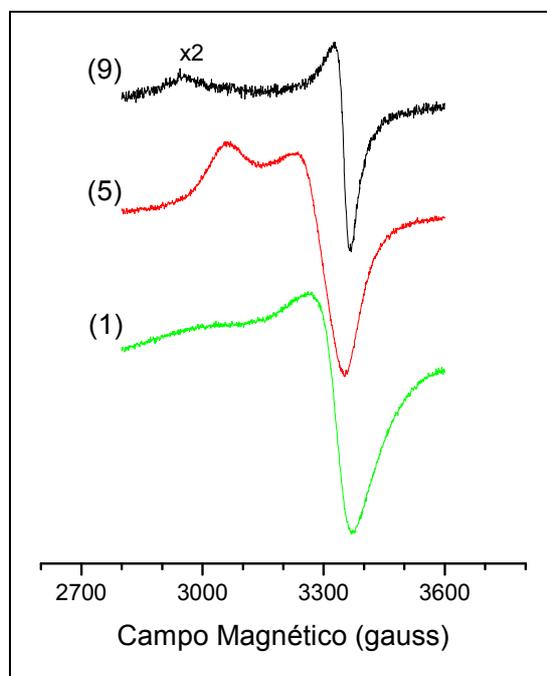


Figura 3.5 - Espectros de RPE, banda X, para os complexos (1), (5) e (9) (pó, temperatura ambiente).

Para os complexos (2), (6) e (10), que contém piridina, os espectros de RPE têm duas componentes: uma componente sem estrutura hiperfina, com linhas em  $g_{||}$  e  $g_{\perp}$  e com linhas relativamente estreitas (ver setas na Figura 3.6); e uma segunda componente larga, diferente para cada complexo. Para o complexo (2), ela apresenta desdobramento hiperfino na região de  $g_{||}$  do espectro. Para o complexo (6) ela predomina sobre a

primeira componente e é muito semelhante à única componente do complexo (5); Para o complexo (10), a segunda componente é muito larga.

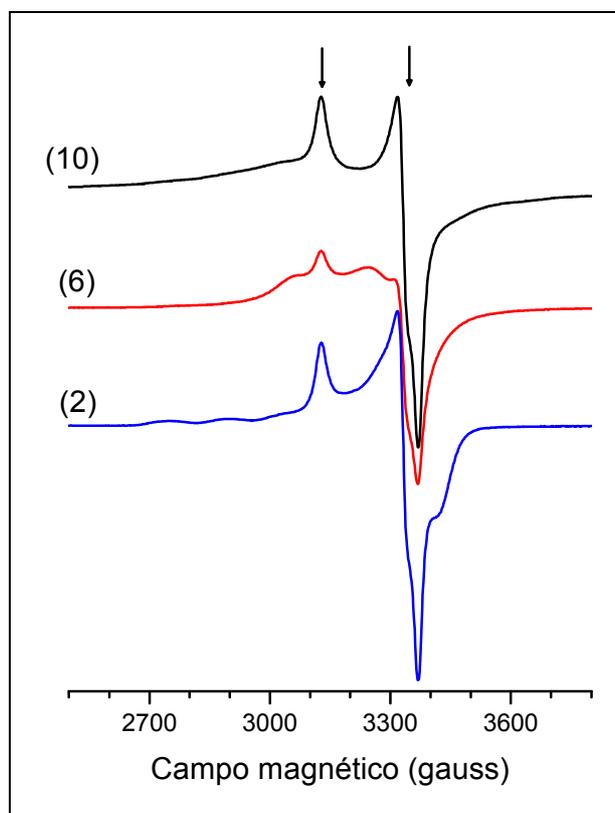


Figura 3.6 - Espectros de RPE, banda X, para os complexos (2), (6) e (10) (pó, temperatura ambiente)

Os espectros de EPR dos complexos que contém biperidina (3), (7) e (11), à temperatura ambiente, indicam a presença de complexos binucleares (SINGH, DEVI, 2010). O complexo (7) é puramente binuclear, e apresenta claramente o desdobramento hiperfino com 7 linhas devido a spin nuclear  $I=3$  ( $-3/2, +3/2$ ), dos dois núcleos de cobre. Os complexos (3) e (11) contem, além de componente binuclear, contribuição de complexo mononuclear.

O espectro de um sistema binuclear com dois íons de Cu(II) acoplados, com  $S=1$ ,  $m_s = 0, \pm 1$ , consiste de duas linhas na Figura 3.7, correspondentes às transições  $\Delta m_s = \pm 1$  (WEIL, BOLTON, WERTZ, 1993). Sinais muito mais fracos devidos a transições proibidas com  $\Delta m_s = \pm 2$  devem aparecer em campos magnéticos com metade do valor das transições permitidas, da ordem de 1600 G. Esses sinais foram observados para os complexos (3), (7) e (11) (ver inserção na Figura 3.7).

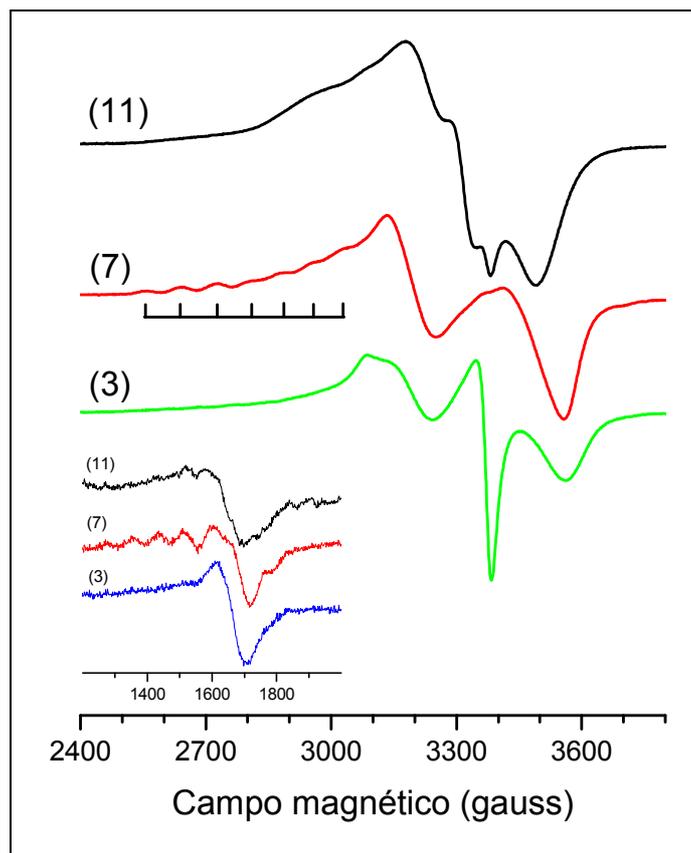


Figura 3.7 - Espectros de RPE, banda X, para (3), (7) e (11) (pó, temperatura ambiente)

Os espectros de pó dos complexos que contém fenantrolina (4), (8) e (12) são muito alargados e também sugerem a presença de complexos binucleares, porém em menor proporção do que os complexos com bipyridina. As linhas das transições proibidas  $\Delta m_s = \pm 2$  em campo cerca de 1600 gauss não foram observadas, provavelmente por causa das linhas muito largas e pobre relação sinal-ruído (Figura 3.8). O espectro do precursor  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$  é apresentado na mesma figura, para comparação, e é característico de simetria axial  $g_{\parallel} = 2,257$  e  $g_{\perp} = 2,069$ , e não apresenta estrutura hiperfina, indicando ocorrência de interação de troca (HATHAWAY, BILLING, 1970).

A Tabela 3.5 lista os parâmetros de RPE obtidos para os complexos de Cu(II) (1)-(12) no pó, a temperatura ambiente.

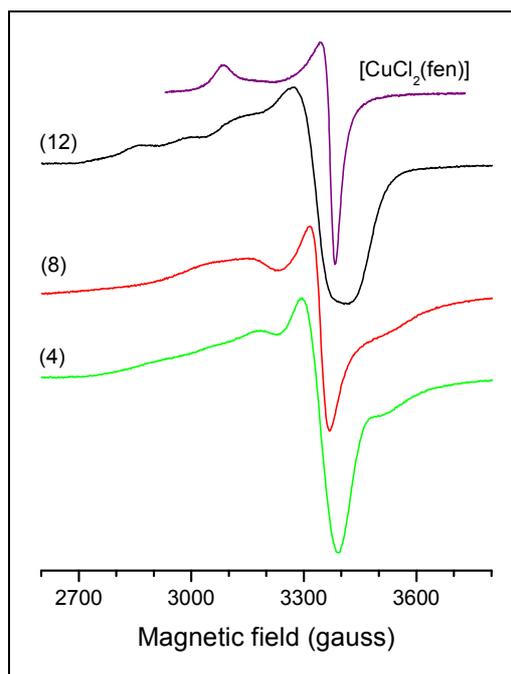


Figura 3.8 - Espectros de RPE, banda X, para (4), (8) e (12) (pó, temperatura ambiente)

Tabela 3.5 - Parâmetros de RPE dos complexos de Cu(II), no pó, a temperatura ambiente.

	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (gauss)	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (gauss)
[CuCl <sub>2</sub> (fen)]	2,292	2,074	155			
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(NOR)].H <sub>2</sub> O (1)	2,099	2,330	0	-	-	-
[CuCl <sub>2</sub> (py)(NOR)].H <sub>2</sub> O (2)	2,090	2,226	0	2,09	2,340	140
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(LEVO)] (5)	2,133	2,274	0	-	-	-
[CuCl <sub>2</sub> (py)(LEVO)].1,5H <sub>2</sub> O (6)	2,090	2,226	0	2,09	2,275	-
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(SPAR)]. H <sub>2</sub> O (9)	2,082	2,360	0	-	-	-
[CuCl <sub>2</sub> (py)(SPAR)].H <sub>2</sub> O (10)	2,090	2,226	0	-	-	-
	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (gauss)	$g_{\text{binucl}}$	D	$A_{\text{binucl}}$
[CuCl(bipy)(NOR)]Cl.H <sub>2</sub> O (3)	2,068	2,25	0	2,08	425	-
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(NOR)].4H <sub>2</sub> O (4)	2,08	Indeterm.	Indeterm.	-	-	-
[CuCl(bipy)(LEVO)]Cl.3H <sub>2</sub> O (7)	-	-	-	2,08	425	75
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(LEVO)].4H <sub>2</sub> O (8)	2,08	2,28	0	-	-	-
[CuCl(bipy)(SPAR)]Cl.2H <sub>2</sub> O (11)	2,087	2,36	0	2,08	320	-
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(SPAR)].3H <sub>2</sub> O (12)	2,08	2,28	130			

### 3.4.2 Espectros de RPE dos complexos de Cu(II), em solução aquosa e em DMSO, a 77 K

Os espectros de EPR dos complexos em solução aquosa e em DMSO foram obtidos a 77 K. Soluções aquosas congeladas apresentam espectros muito alargados por causa da formação de cristais de gelo que segregam os complexos, formando agregados com forte interação dipolar magnética. Foi feita uma experiência com o complexo (2) adicionando-se glicerol, para impedir a formação de cristais de gelo. Nesse caso, o espectro a 77 K ficou bem similar ao da solução em DMSO. No entanto, o glicerol pode modificar a vizinhança do íon de Cu(II), já que pode atuar como ligante.

Em solução aquosa, os complexos (1), (5), (9) e (2), (6), (10) não apresentaram evidências de presença de complexos binucleares, com exceção de (2) que apresentou bem pequena porcentagem do dublete binuclear (ver setas, Figura 3.9 a e b).

Dentre os complexos com bipyridina, em água, o (7) apresentou espectro predominantemente binuclear. Finalmente, dentre os complexos com fenantrolina, tanto o (4) quanto o (8) apresentaram espectros com o dublete característico dos binucleares [Figura 3.9 (c e d)].

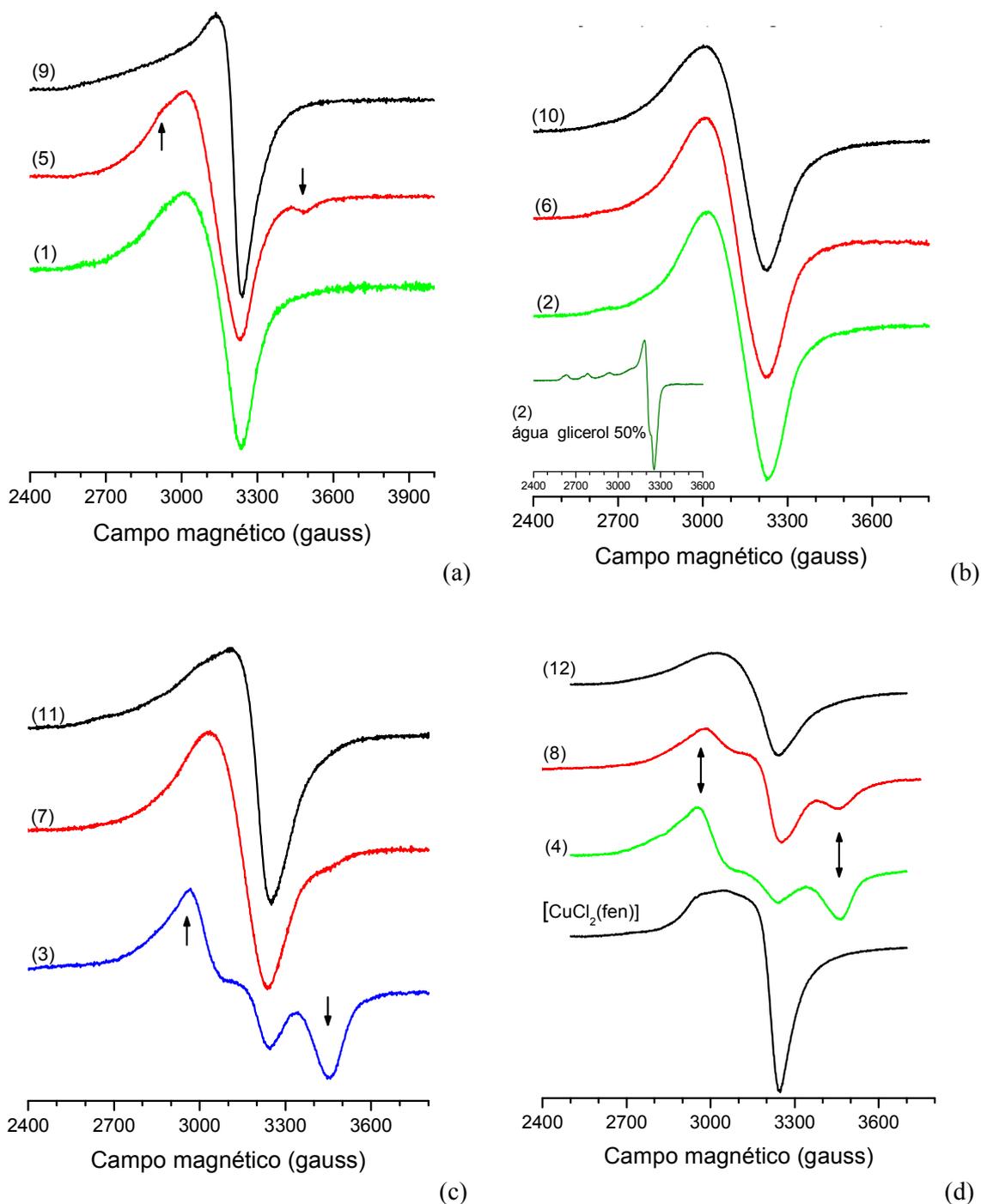


Figura 3.9 - Espectros de RPE, banda X, dos complexos: a) (1), (5) e (9) (0,5 mg/mL); b) (2), (6) e (10) (0,8 mg/mL); c) (3), (7) e (11) (0,8 mg/mL); d) (4), (8) e (12) (0,8 mg/mL). Solução aquosa congelada, a 77 K.

Nos espectros dos complexos em DMSO, por não haver agregação após congelamento, fica bem mais nítida a identificação dos diferentes componentes espectrais. Para os complexos (1), (5) e (9) não foram obtidos espectros em DMSO. Observa-se que os complexos com piridina (2), (6) e (10) apresentam espectros com

simetria axial, sem qualquer indício de complexo binuclear, sendo que os espectros de (6) e (10) têm duas componentes axiais (com diferentes valores de  $g_{\parallel}$  e  $A_{\parallel}$ ) (Figura 3.10).

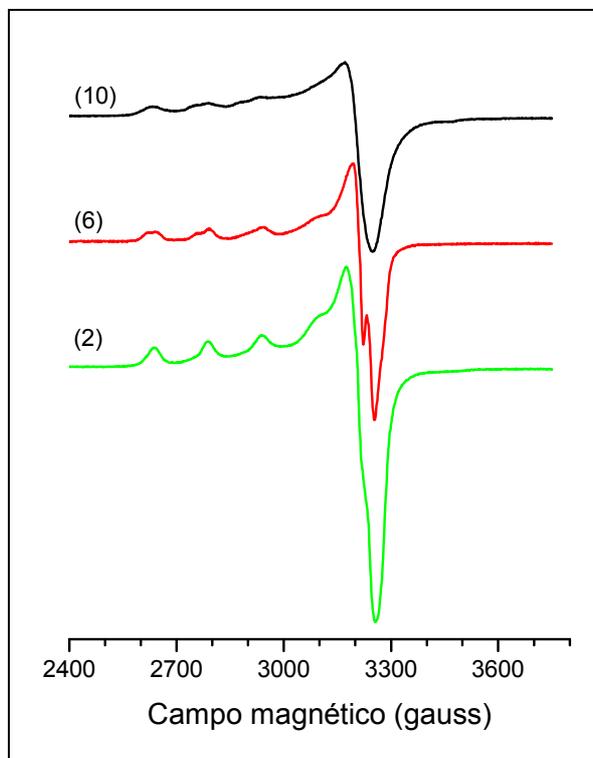


Figura 3.10 – Espectro de RPE, banda X, para os complexos (2), (6) e (10), em DMSO (0,8 mg/mL), a 77K

Em contraste, todos os complexos que contém bipy e fen apresentam misturas de complexos mononucleares e binucleares. Nestes complexos foram identificados os sinais correspondentes à transição proibida  $\Delta m_s = \pm 2$  (sete linhas hiperfinas,  $(2I+1)$  de  $I = 3/2+3/2$  dos dois núcleos de cobre) que ocorrem no campo magnético metade do da transição permitida  $\Delta m_s = \pm 1$  (ver espectros inseridos com centro em  $\sim 1600$  gauss) (Figura 3.11 a e b).

Nos espectros com componentes mono e binucleares, a linha central na forma de primeira derivada em  $g \sim 2,08$  é atribuída à componente de  $g_{\perp}$  de Cu(II) mononuclear. A componente  $g_{\parallel}$  dessa espécie cai na região de  $g \approx 2,2$  e espera-se que apareça desdobrada em quatro linhas hiperfinas. Por causa dos sinais superpostos de  $\Delta m_s = m \pm 1$  dos sistemas binucleares, esse desdobramento pode não ser tão evidente, como nos espectros de (4), (8) e (12).

A distância entre os dois íons de Cu(II) pode ser estimada a partir do parâmetro  $D$  do desdobramento em campo nulo. A distância média  $r$  entre dois elétrons desemparelhados acoplados pode ser calculada usando-se a equação  $D = 3/2 g\beta/r^3 = 1.39 \times 10^4 (g/r^3)$ , com  $D$  em gauss e  $r$  em Angstroms (EATON, MORE, 1983). A distância estimada  $r$  para o complexo binuclear (12) é 4,0 Å em DMSO; a distância para (8) é 3,9 Å, em água e, 4,1 Å em DMSO. Essas distâncias são semelhantes às obtidas para complexos binucleares de Cu(II) encontrados em (SAHA, SANDBHOR, 2004 E PSOMAS, TARUSHI, 2006).

A Tabela 3.6 lista os parâmetros de RPE obtidos para os complexos de Cu(II) (1)-(12) em solução de DMSO a 77 K.

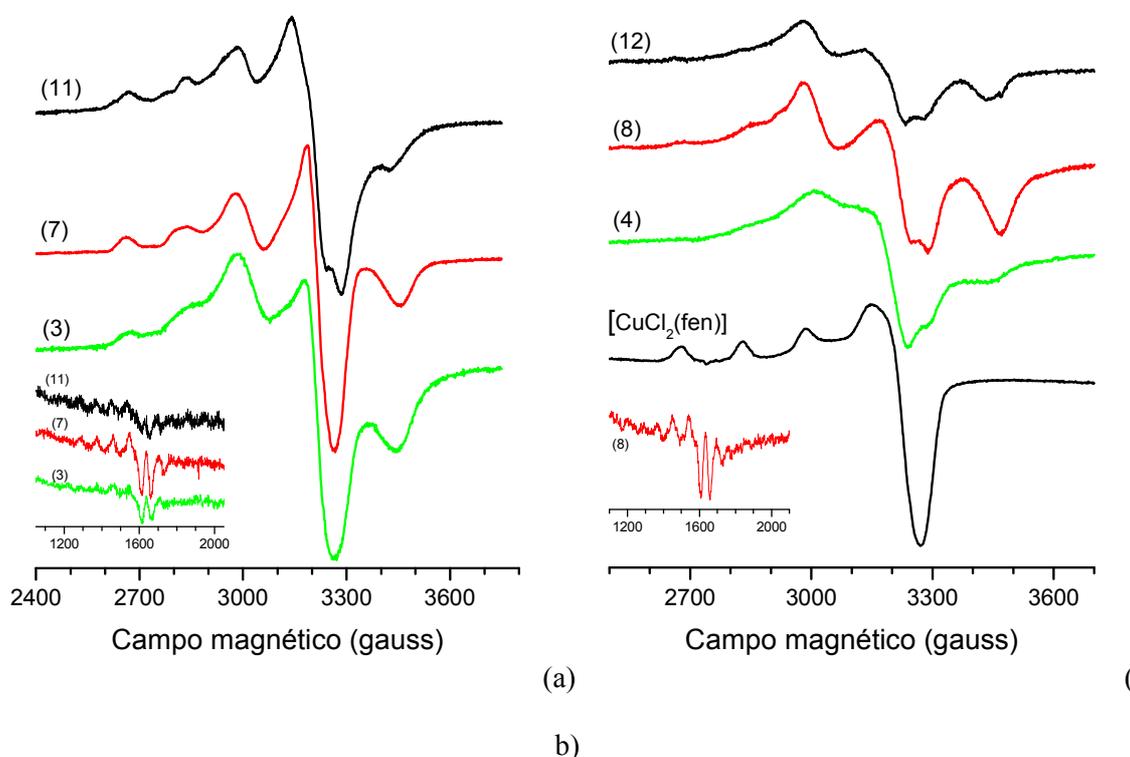


Figura 3.11 - Espectros de RPE, banda X, dos complexos: a) (3), (7) e (11); b) (4), (8) e (12). Solução de DMSO (0,8 mg/mL), a 77 K.

Tabela 3.6 - Parâmetros de RPE dos complexos de Cu(II), em DMSO a 77K.

	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (gauss)	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (gauss)
[CuCl <sub>2</sub> (fen)]	2,074	2,292	155	-	-	-
[CuCl <sub>2</sub> (py)(NOR)].H <sub>2</sub> O ( <b>2</b> )	2,077	2,327	150	-	-	-
[CuCl <sub>2</sub> (py)(LEVO)].1,5H <sub>2</sub> O ( <b>6</b> )	2,077	2,33	150	2,07	2,36	140
[CuCl <sub>2</sub> (py)(SPAR)].H <sub>2</sub> O ( <b>10</b> )	2,083	2,33	150	2,08	2,36	140
	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (gauss)	$g_{\text{binucl}}$	D	$A_{\text{binucl}}$
[CuCl(bipy)(NOR)]Cl.H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> )	2,073	2,28	170	2,07	460	
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(NOR)].4H <sub>2</sub> O ( <b>4</b> )				2,064	436	
[CuCl(bipy)(LEVO)]Cl.3H <sub>2</sub> O ( <b>7</b> )	2,073	2,28	170	2,07	475	-
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(LEVO)].4H <sub>2</sub> O ( <b>8</b> )	-	-	-	2,064	488	-
[CuCl(bipy)(SPAR)]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>11</b> )	2,08	2,28	170	2,07	442	-
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(SPAR)].3H <sub>2</sub> O ( <b>12</b> )	-	-	-	2,073	455	-

Com base nos dados de análise elementar, condutividade, infravermelho, TG/DTG e RPE, sugerimos as estruturas seguintes para os complexos.

Os complexos (**1**), (**5**) e (**9**) são monoméricos, a relação M:L é de 1:1, os átomos de cloro estão coordenados ao Cu(II). As fluorquinolonas coordenam-se de modo bidentado através dos oxigênios carboxílico e cetônico e na forma zwitteriônica. Sugerimos que uma molécula de água também esteja coordenada ao Cu(II) nesses complexos, já que há vários exemplos na literatura de complexos de Cu(II) com número de coordenação cinco (Figura 3.12 a-c)

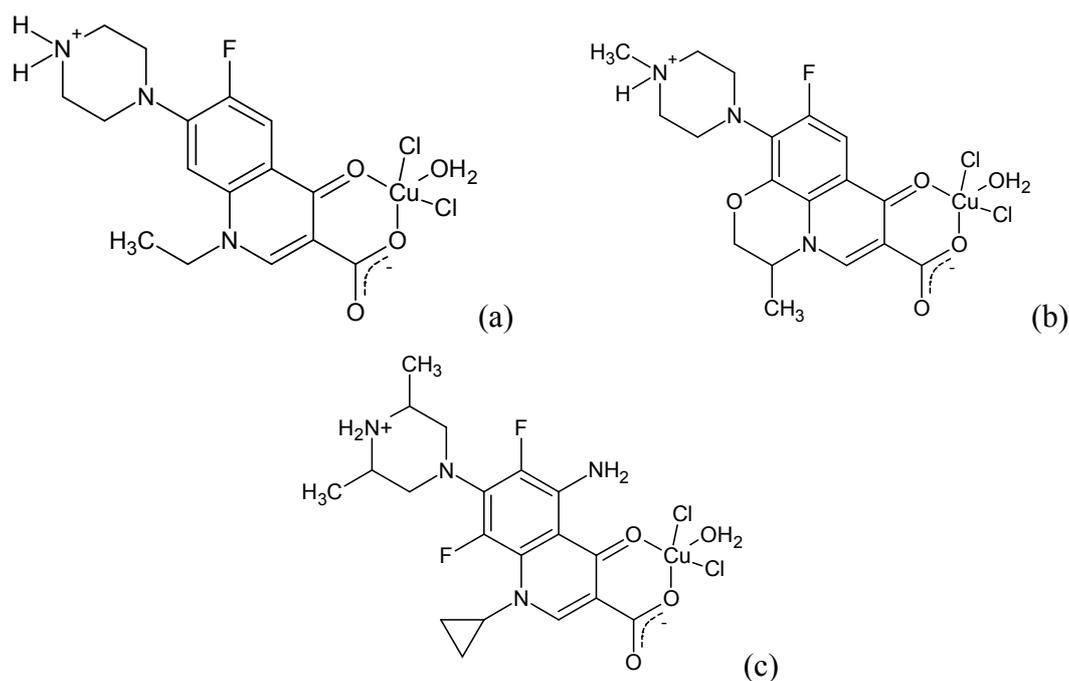


Figura 3.12 – Estruturas propostas para os complexos (1), (5) e (9)

Os complexos (2), (6) e (10) também são monoméricos, a relação M:L:py é de 1:1:1, os átomos de cloro estão coordenados ao Cu(II). Novamente, as fluorquinolonas coordenam-se de modo bidentado através dos oxigênios carboxílico e cetônico e na forma zwitteriônica (Figura 3.13 a-c).

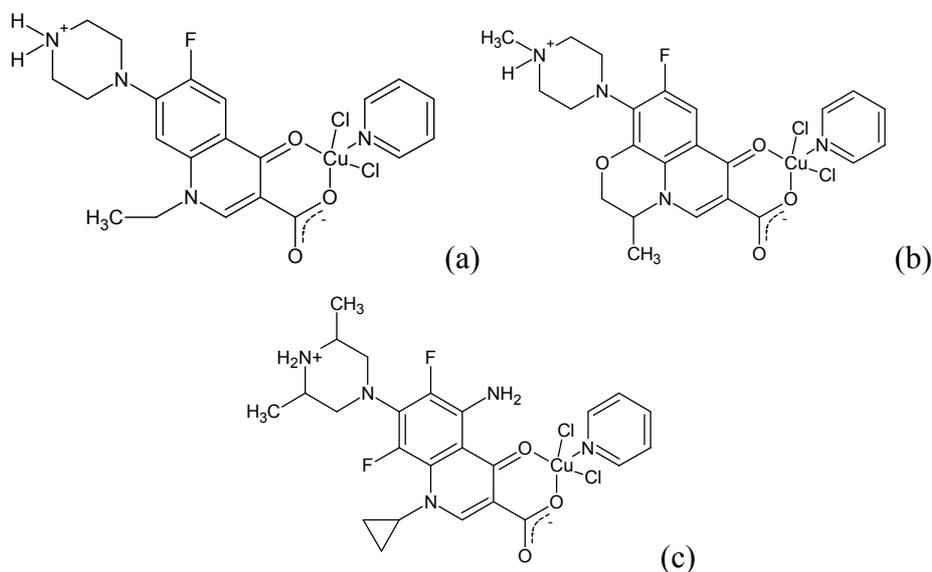


Figura 3.13 - Estruturas propostas para os complexos (2), (6) e (10)

Nos complexos (3), (7) e (11) a relação M:L:bipy é de 1:1:1, um átomo de cloro está coordenado ao Cu(II) e o outro como contra-íon e, as fluorquinolonas coordenam-se de modo bidentado através dos oxigênios carboxílico e cetônico e na forma

zwiteriônica. O complexo (7) é puramente dimérico e os complexos (3) e (11) têm mistura das formas diméricas e monoméricas. A Figura 3.14 mostra a estrutura sugerida para os dímeros.

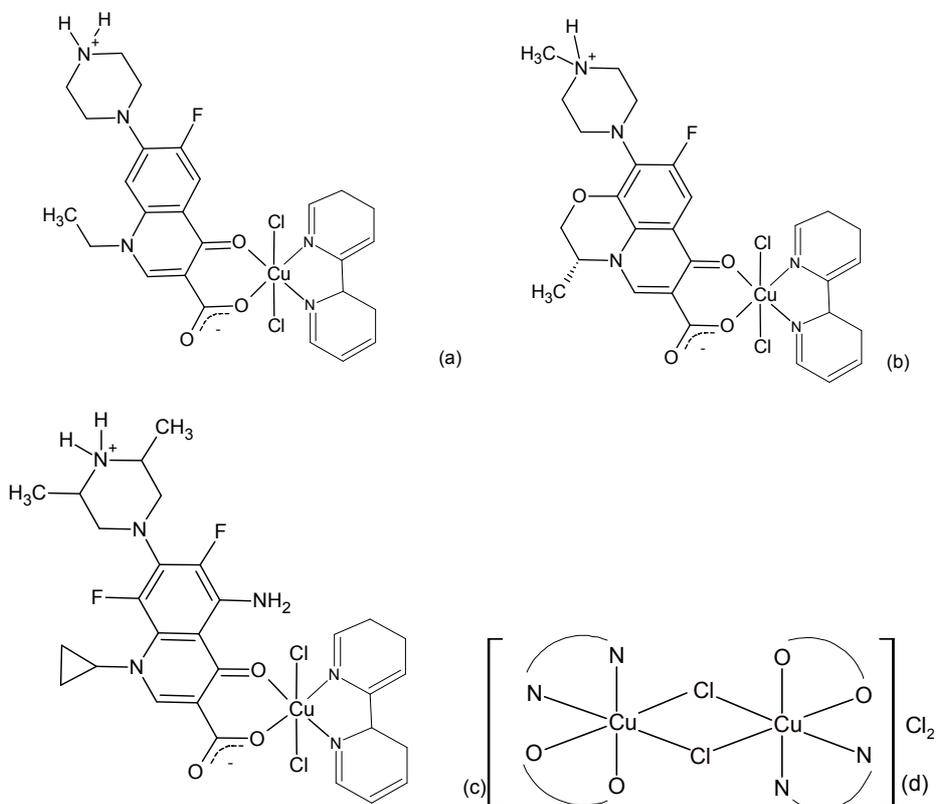


Figura 3.14 – Estruturas propostas para os complexos (3), (7) e (11)

Nos complexos (4), (8) e (12) a relação M:L:fen é de 1:1:1, os átomos de cloro estão coordenados ao Cu(II) e as fluorquinolonas coordenam-se de modo bidentado através dos oxigênios carboxílico e cetônico e na forma zwiteriônica. Nos três complexos há mistura das formas diméricas e monoméricas, no entanto as formas monoméricas prevalecem (Figura 3.15 a-c).

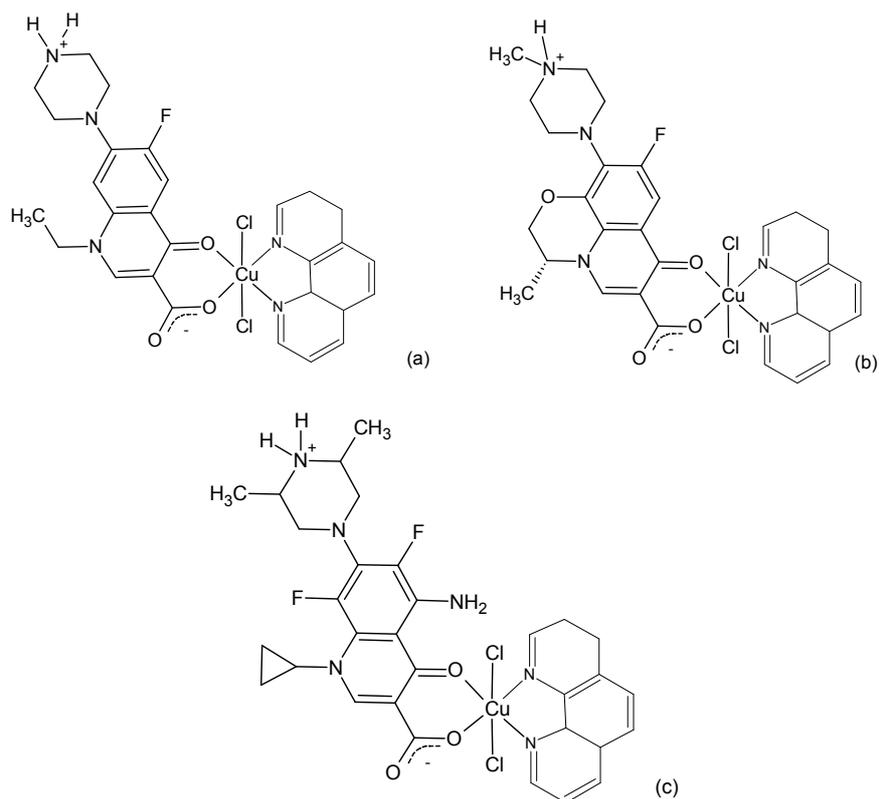


Figura 3.15 – Estruturas propostas para os complexos (4), (8) e (12)

Na literatura há alguns exemplos de complexos de Cu(II) de fluorquinolonas. Embora alguns sejam parecidos com os que foram obtidos no presente trabalho, nenhum complexo com exatamente a mesma estrutura foi encontrado. Os complexos (4) e (12) foram sintetizados pela primeira vez por outro membro do nosso grupo. Essas sínteses foram repetidas no presente trabalho para dar continuidade aos testes de atividade anti-*T.cruzi* e para os estudos de interação com alvos biológicos. Na literatura os exemplos de complexos de fluorquinolonas com atividade antiparasitária são raríssimos.

### 3.4 Atividade anti-*T.cruzi* das fluorquinolonas livres e de seus complexos de Cu(II)

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* é uma parasitose endêmica com cerca de 12 milhões de casos na América Latina. As duas únicas drogas usadas na clínica para o tratamento da doença são o Nifurtimox e a Benznidazole, introduzidos nas décadas de 1960-70. Estes 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 (DIAS, 2007). Assim, as limitações da corrente quimioterapia para esta enfermidade justificam a busca por novos fármacos e estimulam o desenho, síntese e pesquisa de agentes que possam ser efetivos e seletivos contra este parasito, mas que exerçam baixa toxicidade e cuja produção envolva baixo custo.

O *Trypanosoma cruzi* possui um ciclo biológico complexo que envolve um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado, apresenta três formas distintas: epimastigota (forma presente no vetor e em cultura axênica), tripomastigota (forma sanguínea circulante e infectante) e amastigota (forma de replicação intracelular) (HOARE & WALLACE, 1996). As formas evolutivas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares são as formas relevantes para a infecção humana (Figura 3.16).

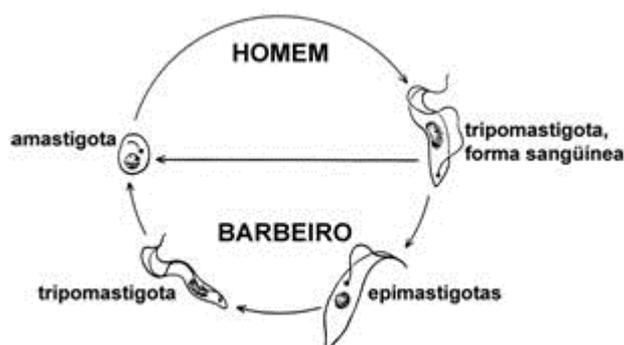


Figura 3.16 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

(<http://www.sbimunologia.com.br/sbinarede/SBINarede70/default.asp?action=artigo>)

Nesse trabalho, a atividade tripanocida das fluorquinolonas livres (NOR, LEVO, SPAR), dos complexos de Cu(II) {(1)-(12)}, do sal de Cu(II) ( $\text{CuCl}_2$ ), dos precursores de Cu(II) {[ $\text{CuCl}_2(\text{py})_2$ ], [ $\text{CuCl}_2(\text{bipy})$ ], [ $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ ] } e da droga de referência para doença de Chagas, o Benznidazole, foi testada sob as formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. Para os compostos selecionados foram feitos também testes sob as formas amastigotas do parasito. De modo a selecionar os compostos que serão futuramente testados *in vivo*, os seguintes parâmetros foram determinados:

**IC<sub>50</sub>** – concentração da droga que mata 50% os parasitas;

**LC<sub>50</sub>** – concentração da droga que diminui em 50% a viabilidade de células cardíacas não infectadas;

**IS** (Índice de seletividade) – Razão entre **LC<sub>50</sub>/ IC<sub>50</sub>**. Identifica a dose efetiva dos complexos contra o parasito, mas que não exerça toxicidade para a célula hospedeira.

A Tabela 3.7 lista os valores de IC<sub>50</sub> (μmol L<sup>-1</sup>, μM) e os índices de seletividade (IS) obtidos para os compostos sob as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*. Os valores correspondem a média de três replicatas ± desvio padrão (SD).

Tabela 3.7 – Atividade (média ± SD) e índice de seletividade (IS) para as fluorquinolonas e seus complexos de Cu(II) sob as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* (cepa Y), *in vitro* (24 h de incubação a 37 °C).

Compostos	IC <sub>50</sub> (μM)	Índice de Seletividade (IS)*
Norfloxacina (NOR)	126 ± 30	>1,25
[CuCl <sub>2</sub> (NOR)].2H <sub>2</sub> O (1)	78 ± 12	0,8
[CuCl <sub>2</sub> (py)(NOR)].H <sub>2</sub> O (2)	87 ± 41	2,86
[CuCl(bipy)(NOR)]Cl.H <sub>2</sub> O (3)	15,8 ± 4	4
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(NOR)].4H <sub>2</sub> O (4)	4,4 ± 1	2,68
Levofloxacina (LEVO)	211 ± 38	a
[CuCl <sub>2</sub> (LEVO)] (5)	59,7 ± 9	a
[CuCl <sub>2</sub> (py)(LEVO)].1,5H <sub>2</sub> O (6)	Nd	a
[CuCl(bipy)(LEVO)]Cl.3H <sub>2</sub> O (7)	15 ± 3	4,18
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(LEVO)].4H <sub>2</sub> O (8)	1,6 ± 1,4	19
Esparfloxacina (SPAR)	114 ± 20	>1,75
[CuCl <sub>2</sub> (SPAR)].2H <sub>2</sub> O (9)	45,0 ± 30	a
[CuCl <sub>2</sub> (py)(SPAR)] (10)	52 ± 22	0,12
[CuCl(bipy)(SPAR)]Cl (11)	18,2 ± 4	3,4
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(SPAR)].3H <sub>2</sub> O (12)	4,7 ± 0,1	2,86
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	82,5 ± 3	6
1,10-fenantrolina (fen)	11,0 ± 3	a
[CuCl <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> ]	54,3 ± 7	0,6
[CuCl <sub>2</sub> (bipy)]	13,8 ± 7	4,5
[CuCl <sub>2</sub> (fen)]	7,2 ± 5	<4
Benznidazole	13 ± 2	77

IS = LC<sub>50</sub>/ IC<sub>50</sub>. \*Os dados são expressos como média ± SD de três experimentos independentes. <sup>a</sup>testes em andamento

NOR, LEVO, SPAR não mostraram atividade significativa sob as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, exibindo valores de IC<sub>50</sub> de 126, 211 e 114 µM, respectivamente. A associação do Cu(II) às fluorquinolonas levou a um aumento da atividade. Observa-se que nos complexos (1), (5) e (9) os valores de IC<sub>50</sub> são significativamente menores que nas fluorquinolonas livres (78, 60 e 45 µM, respectivamente) e aproximadamente da mesma ordem de grandeza do CuCl<sub>2</sub> (82 µM).

A introdução da piridina (py) como co-ligante não foi uma estratégia eficaz para a melhora da atividade. Nos complexos (2) e (10) os valores de IC<sub>50</sub> são de 87 e 52 µM, respectivamente, ou seja, da mesma ordem de grandeza dos complexos que não contem piridina em sua estrutura. Adicionalmente, o precursor [CuCl<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>] revelou IC<sub>50</sub> = 54 µM.

A associação da 2,2'-bipiridina (bipy) ao cobre e às fluorquinolonas levou a uma diminuição significativa dos valores de IC<sub>50</sub> e, portanto, a um aumento da atividade. Para os complexos (3), (7) e (11) os valores de IC<sub>50</sub> são 16, 15 e 18 µM, ou seja, cerca de três vezes menores que para os complexos citados anteriormente. Essa atividade deve-se a presença da bipy, pois no precursor [CuCl<sub>2</sub>(bipy)] apresenta IC<sub>50</sub> igual a 14 µM. Além disso, esses complexos apresentam altos índices de seletividade (IS ≈ 4).

A estratégia mais eficaz para o aumento da atividade anti-*T. cruzi* dos complexos foi a introdução do grupo 1,10-fenantrolina (fen). Os complexos (4), (8) e (12) mostraram-se ativos em concentrações de cerca de 4, 2 e 5 µM, respectivamente. Ou seja, esses complexos são até 36 vezes mais ativos que os complexos análogos, sem a fen. Além disso, eles são significativamente mais ativos que a benzinidazole, que é a droga de referência. Embora a fenantrolina livre e seu precursor, [CuCl<sub>2</sub>(fen)], mostrem atividade significativa, os complexos que unem o Cu(II), às fluorquinolonas e a fen, são mais ativos, em especial o complexo (8), que apresenta também o maior índice de seletividade (IS = 19), sendo portanto o mais promissor da série estudada.

A Figura 3.17 compara os valores de IC<sub>50</sub> das fluorquinolonas livres e de seus complexos de Cu(II). Na Série 1 são mostrados os ligantes; na Série 2 os complexos sem co-ligantes – (1), (5) e (9); na Série 3 os complexos que contem py – (2), (6) e (10); na Série 4 os complexos com bipy – (3), (7) e (11); e, na Série 5 os complexos com fen (4), (8) e (12). Observa-se claramente uma diminuição nos valores de IC<sub>50</sub>, muito pronunciada nas Séries 4 e 5, para os três complexos de cada série.

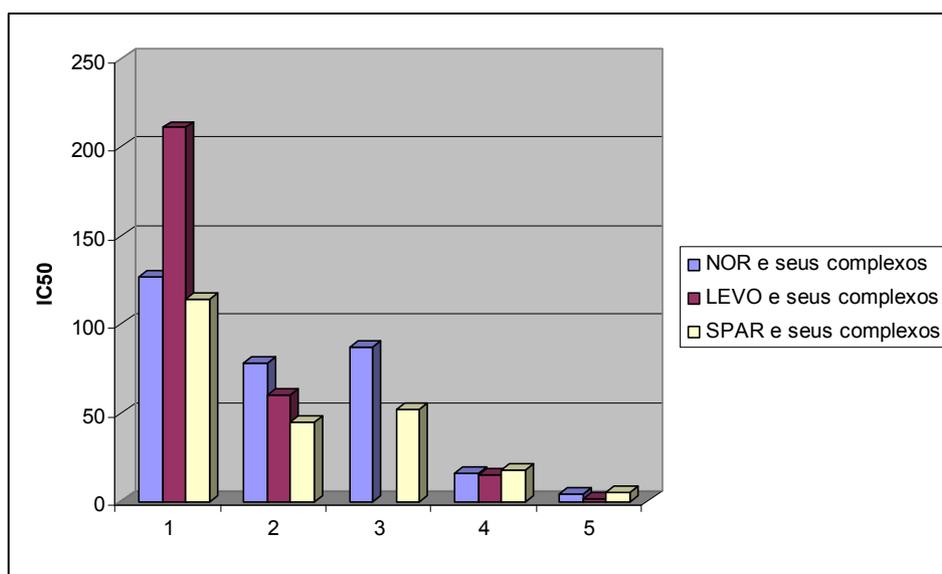


Figura 3.17 - Valores de IC<sub>50</sub> sobre *T.cruzi* para as fluorquinolonas livres e seus complexos de Cu(II). Série 1: ligantes; Série 2: complexos sem co-ligante; Série 3: complexos que contém py; Série 4 complexos com bipy; Série 5: complexos com fen.

Os complexos da Série 5 foram selecionados para os testes sob as formas amastigotas intracelulares do *T.cruzi*, assim como seus respectivos ligantes. No entanto, serão descritos apenas os resultados para os complexos (4) e (12) e seus ligantes, já que os testes para o complexo (8) encontram-se em andamento. A Tabela 3.8 lista os valores de IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $\mu\text{M}$ ) e os índices de seletividade (IS) obtidos para a NOR e SPAR e seus complexos sob as formas amastigotas intracelulares do *T.cruzi* (48 horas de tratamento a 37 °C).

Tabela 3.8 – Atividade (media  $\pm$  SD) e índice de seletividade (IS) para a NOR, SPAR e seus complexos de Cu(II) sob as formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi* (cepa Y) *in vitro*.

Compostos	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Índice de Seletividade (IS)*
Norfloxacina (NOR)	172 $\pm$ 17	>1,16
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(NOR)].4H <sub>2</sub> O (4)	1,6 $\pm$ 0,1	2,66
Levofloxacina (LEVO)	a	a
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(LEVO)].4H <sub>2</sub> O (8)	a	a
Esparfloxacina (SPAR)	129 $\pm$ 43	>1,55
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(SPAR)].3H <sub>2</sub> O (12)	2 $\pm$ 1	2,57
Benznidazole	2,7 $\pm$ 2	> 360

IS = LC<sub>50</sub>/ IC<sub>50</sub>. \*Os dados são expressos como média  $\pm$  SD de três experimentos independentes. <sup>a</sup>testes em andamento.

As fluorquinolonas NOR e SPAR não têm atividade significativa sob as formas amastigotas do *T.cruzi*, exibindo valores de IC<sub>50</sub> de 172 e 129 µM, respectivamente. A coordenação ao Cu(II) e a fen levou a um aumento significativo da atividade. Os complexos (4) e (12) mostram valores de IC<sub>50</sub> de 1,6 e 2 µM, sendo 80 e 77% mais ativos que seus respectivos ligantes livres (Tabela 3.8). Além disso, esses complexos são mais seletivos que as drogas livres (IS ~ 2,6).

A Figura 3.18 mostra o efeito dos complexos (4) e (12) sob as formas amastigotas intracelulares do parasito, obtido através da quantificação do percentual de inibição do índice endocítico (IE) que representa a multiplicação entre o percentual de células hospedeiras infectadas pelo número de parasitos por célula infectada.

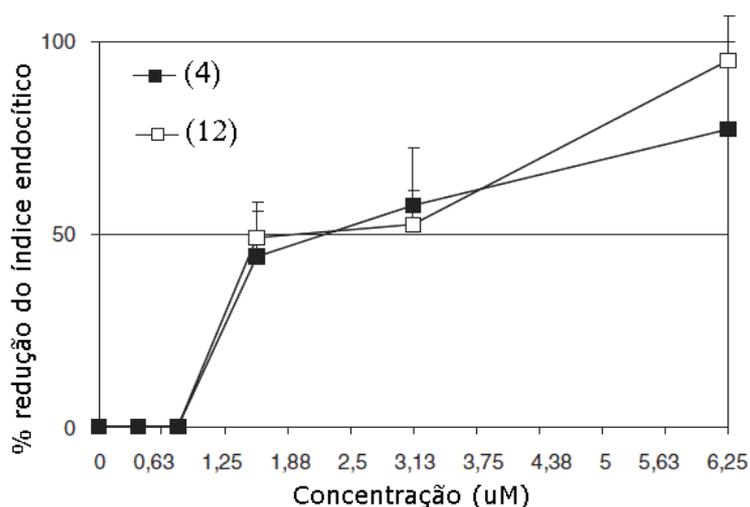


Figura 3.18 – Atividade dos complexos (4) e (12) sob as formas amastigotas intracelulares do *T.cruzi* (cepa Y).

Os dados obtidos mostram que os complexos de Cu(II) estudados têm atividade superior as fluorquinolonas livres nas duas formas do *T.cruzi* relevantes para a infecção em mamíferos: tripomastigota sanguínea e amastigota. Os complexos que contém o grupo fen como co-ligante são os mais ativos. Isso pode ser devido a maior facilidade desses complexos de transpor membranas biológicas, incluindo a dos parasitos e de suas células hospedeiras, já que a fen é um grupo muito hidrofóbico e/ou potencial de atuar sobre distintos alvos celulares (incluindo ADN-mitocondrial ou ADN nuclear).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com outros descritos na literatura que demonstram que as fluorquinolonas são ativas contra várias parasitoses. Estudos recentes mostram que a enoxacina e a ciprofloxacina são ativas frente as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania panamensis* (ROMERO e cols, 2005). Em outro estudo a atividade de fluorquinolonas sob as formas promastigotas de *Leishmania panamensis* foi avaliada e os autores sugerem que o efeito leshimanicida por ser devido,

em parte, a inibição da enzima TOPPII (CORTAZAR e cols, 2007). A atividade das fluorquinolonas foi também testada, *in vitro*, sob as formas sanguíneas do *T. brucei* (NENORTAS e cols,1999) e os valores de IC<sub>50</sub> e IS obtidos para a NOR e a SPAR são similares aos descritos para o *T.cruzi* no presente trabalho (CORTAZAR e cols, 2007; NENORTAS e cols,1999).

Embora várias classes de compostos tenham sido testadas contra o *T.cruzi*, *in vitro* e *in vivo*, poucos chegaram em fase de ensaios clínicos, desde a introdução do Nifurtimox e da Benznidazole na prática clínica. Portanto, o potencial anti-parasitário de várias fluorquinolonas, juntamente com a atividade anti-*T.cruzi* dos complexos de Cu(II) descrita no presente trabalho, especialmente dos complexos (4), (8) e (12), justificam novos estudos *in vitro* e *in vivo* e sugerem que a associação fluorquinolona – cobre - fen, em um mesmo composto, pode representar uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos agentes anti-*T.cruzi*.

## Capítulo 4 -

### *Estudo da interação dos complexos de Cu(II) de algumas fluorquinolonas com o ADN*

Complexos de metais de transição podem ligar-se ao ADN covalentemente, quando um ligante lábil é substituído pelo nitrogênio de uma das bases do ADN (o nitrogênio N7 de uma guanina, por exemplo – Figura 4.1) ou podem interagir com o ADN de modo não-covalente, através de intercalação, interação eletrostática ou alquilação.

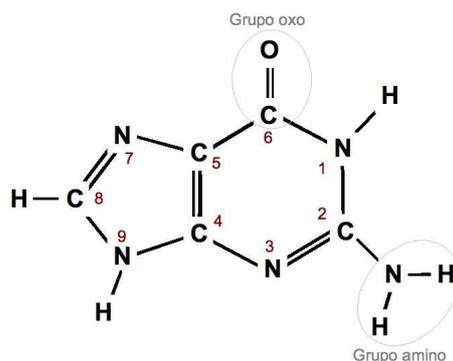


Figura 4.1 – Estrutura da guanina.

Nesse trabalho, fizemos estudos de interação entre os complexos de Cu(II) de levofloxacina (LEVO) e esparfloxacina (SPAR) e a dupla hélice do ADN com o objetivo de verificar a existência de interações e tentar compreender a natureza e a intensidade das mesmas. A interação da LEVO e da SPAR livres e dos precursores [CuCl<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>], [CuCl<sub>2</sub>(bipy)], [CuCl<sub>2</sub>(fen)] (py = piridina, bipy = 2,2'-bipiridina (bipy) e fen = 1,10-fenantrolina) também foi estudada para efeito de comparação.

O estudo da interação das fluorquinolonas e de seus complexos de Cu(II) com o ADN é importante, visto que, os possíveis alvos de ação das drogas anti-*T.cruzi* podem incluir o ADN-mitocondrial ou ADN nuclear do parasito.

Para estudar a natureza da ligação do ADN aos complexos metálicos fizemos titulações de alíquotas de CT-ADN (ADN 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, hipercromismo ou hipocromismo, podem fornecer evidências de interações e da natureza das mesmas. Em geral, o hipercromismo indica o rompimento da estrutura secundária do ADN e o hipocromismo sugere que a ligação do complexo ao ADN pode ser eletrostática ou via intercalação, o que estabiliza a dupla hélice do ADN. Além disso, um deslocamento para o vermelho (deslocamento batocrômico) indica a estabilização da dupla fita do ADN.

As constantes de interação CT-ADN/complexo ( $K_b$ ) foram calculadas utilizando-se a equação:

$$\frac{[ADN]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[ADN]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]},$$

onde, [DNA] é a concentração do par de bases do ADN;  $\epsilon_a$  é o coeficiente de extinção aparente, que corresponde à razão entre a absorvância medida e a concentração de composto em estudo ( $A_{obs}/[composto]$ );  $\epsilon_b$  é o coeficiente de extinção do composto ligado ao ADN e  $\epsilon_f$  é o coeficiente de extinção do composto livre em solução (na ausência de ADN).

#### 4.1 Determinação da concentração de CT -ADN

Antes de dar início aos estudos de interação droga-ADN, calculou-se a concentração de CT-ADN nas soluções a serem tituladas, utilizando-se sua absorvância máxima, em 260 nm (Figura 4.2), e sua absorvância molar ( $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (EFTHIMIADOU, 2008). As concentrações de CT-ADN utilizadas no presente trabalho foram  $0,160 \text{ mmol L}^{-1}$  (em tampão fosfato, pH=7,4) e  $0,190 \text{ mmol L}^{-1}$  (em tampão Universal, pH=7,4).

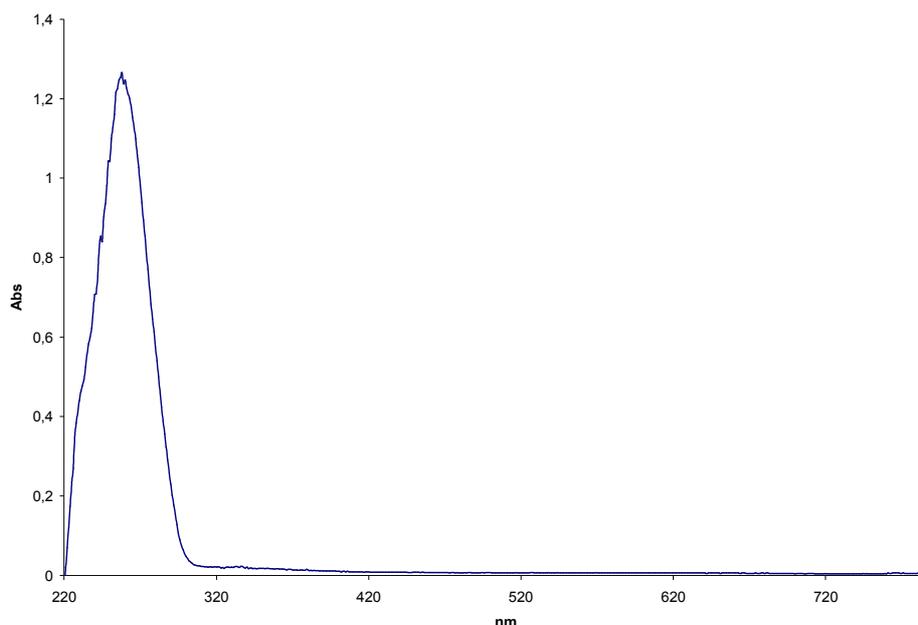


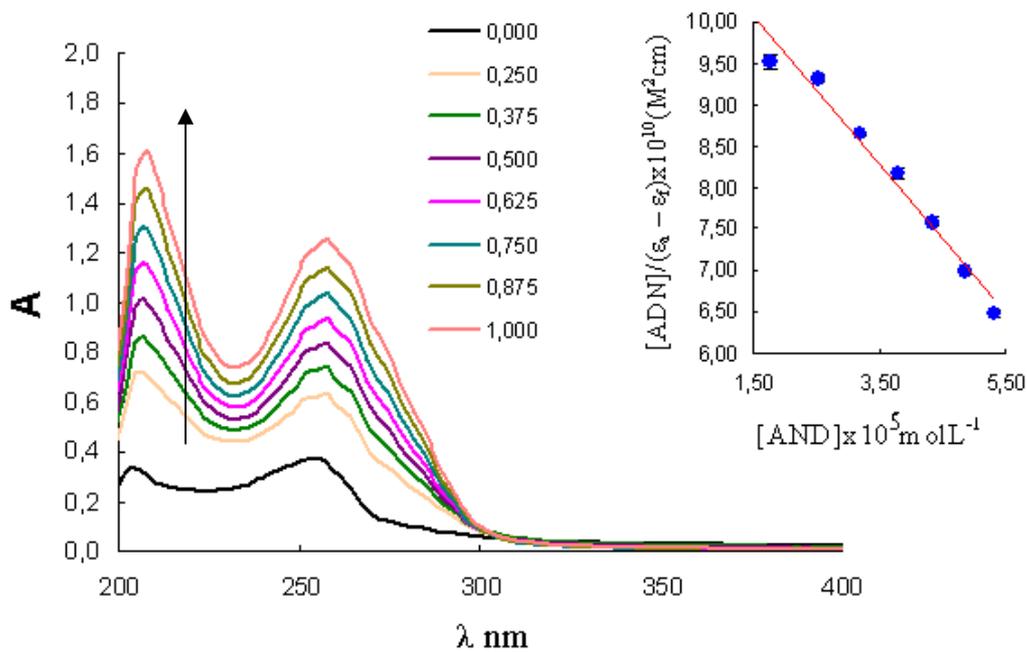
Figura 4.2 - Espectro de UV-vis do CT-ADN obtido entre 220 e 800 nm, em tampão Universal (pH = 7,4)

Calculou-se ainda a razão das absorbâncias em 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), com o objetivo de verificar se as soluções de CT-ADN estavam suficientemente livres de contaminação por proteínas (KALLIOPI *e colaboradores*, 2010). Os valores obtidos 1,8 (tampão fosfato) e 1,9 (tampão fosfato), indicaram que as soluções de CT-ADN estavam adequadas ao uso.

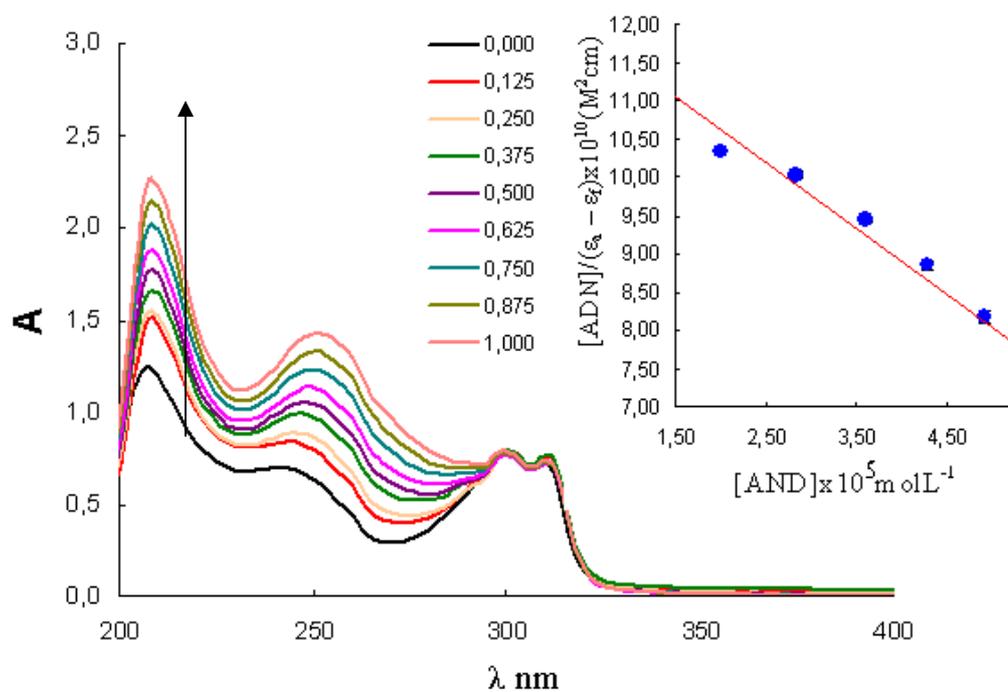
#### 4.2 Estudo da interação dos precursores $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ , $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$ , $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$ com o ADN

As mudanças observadas nos espectros dos precursores  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$  durante a titulação com CT-ADN são mostradas na Figura 4.3 a-c. O espectro inicial (em preto) refere-se ao precursor livre, na ausência de CT-ADN. Na região do UV-vis, as bandas de absorção observadas podem ser atribuídas às transições internas da py, bipy ou fen. Não são observados deslocamentos significativos das bandas dos compostos após a adição de alíquotas sucessivas de CT-ADN (0,125 mL), no entanto, a intensidade das bandas aumenta, resultando em hipercromismo, sugerindo a quebra da estrutura secundária do ADN.

Sugerimos, então, que os precursores de Cu(II) sejam agentes intercalantes que causam a clivagem do ADN.



(a)



(b)

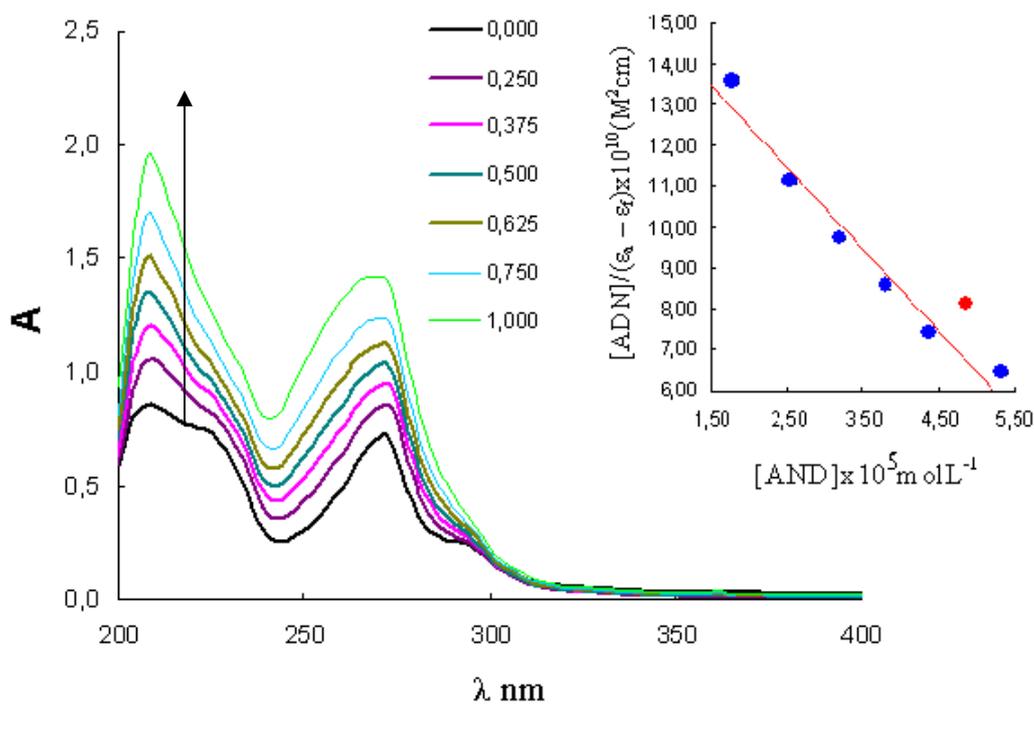


Figura 4.3 - Espectros de absorção de (a)  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ , (b)  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$ , (c)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$  na ausência e na presença de concentrações crescentes de ADN (período de incubação = 30 minutos). Retra inserida – plotagem de  $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{ADN}] \text{ L}^{-1}$ .  $\{[\text{ADN}] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol e } [\text{Composto}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}, \text{ a temperatura ambiente}\}$ . As setas mostram as mudanças na absorção dos compostos após a adição de ADN.

A aplicação da equação de Scatchard permite a obtenção de uma reta, sendo que a constante de ligação ADN-droga é obtida através da razão entre o coeficiente angular e o coeficiente linear dessa reta. Na Tabela 4.1 são listados os valores das constantes de associação dos precursores de Cu(II) com a ADN, em pH 7,4. Para efeito de comparação foram listados na Tabela 4.1 os valores das constantes de interação para os co-ligantes py, bipy e fen.

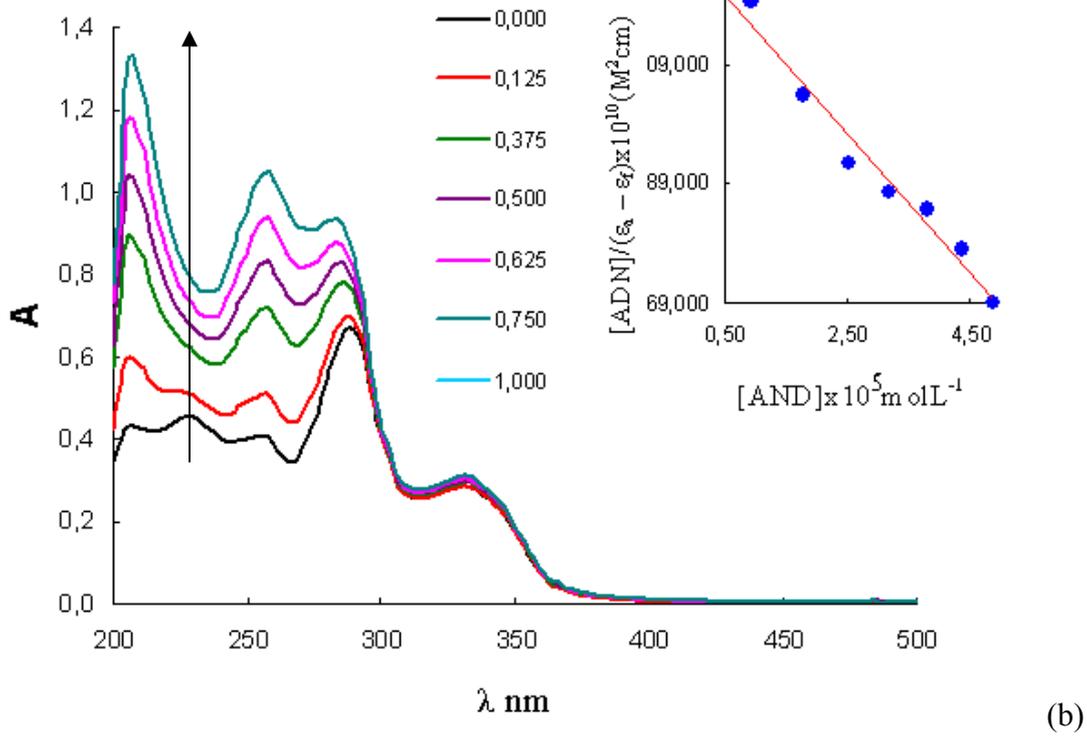
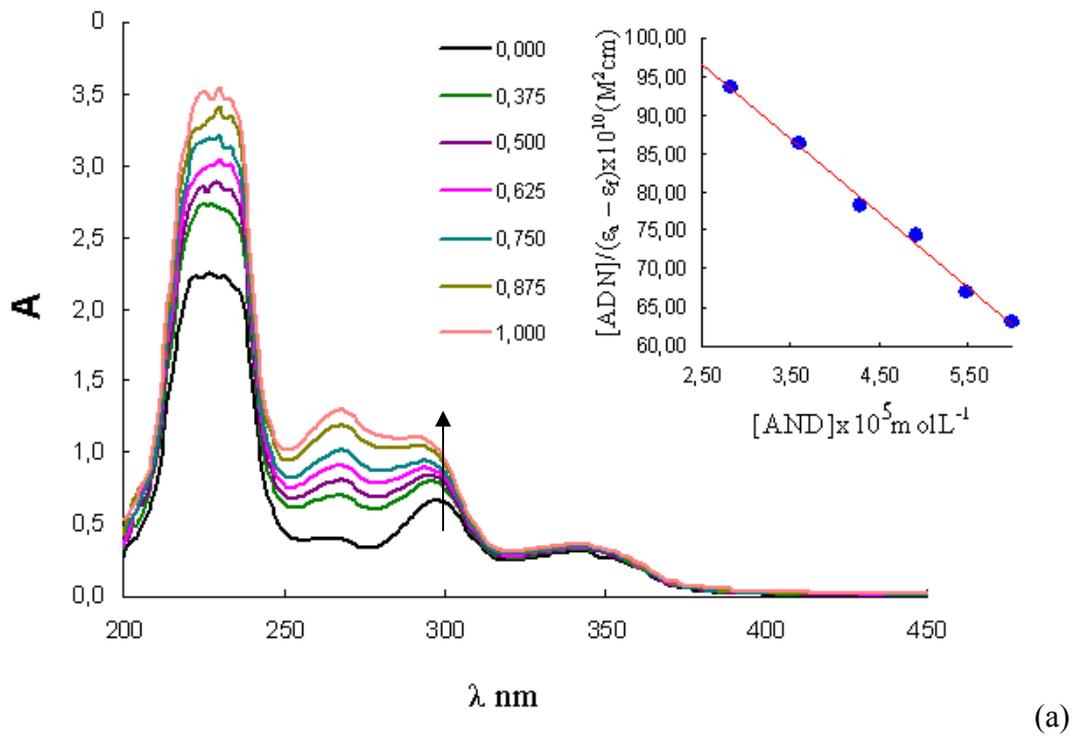
Observa-se que os precursores  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$  e os ligantes py, bipy e fen possuem constantes de associação com o ADN da ordem  $10^3$  e  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . A associação ao Cu(II) aumenta a constante de ligação droga-ADN apenas para o precursor que contém fenantrolina. As porcentagens de hiper Cromismo são de 367, 80 e 126 para  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$ , respectivamente.

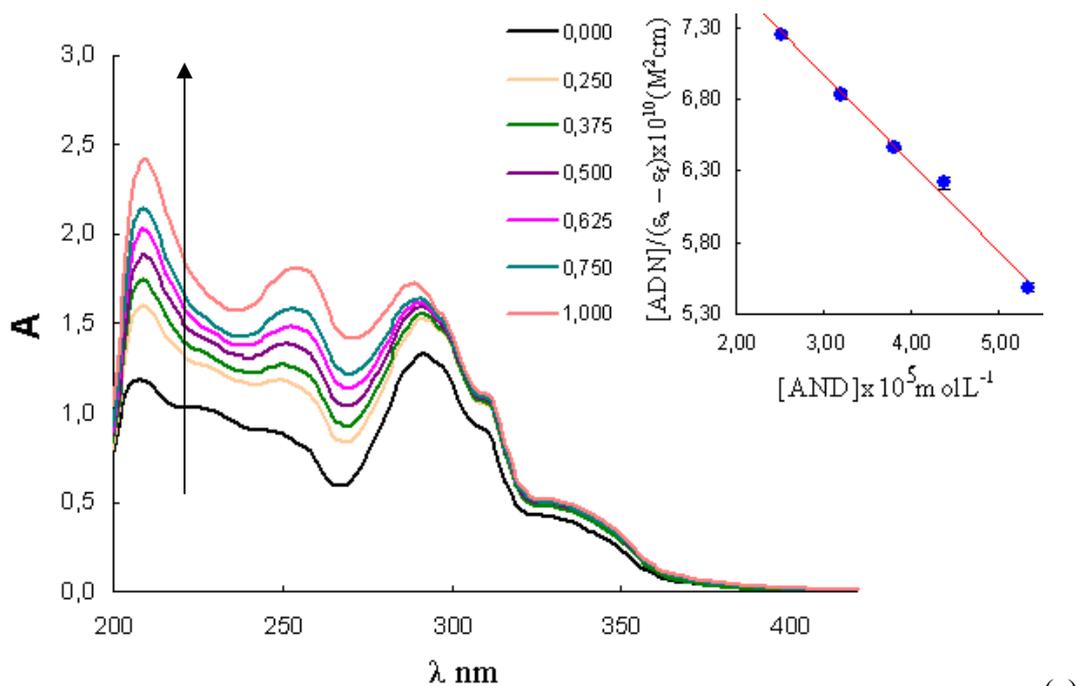
Tabela 4.1 - Constantes de ligação ( $K_b$ ) para a interação ADN–droga e porcentagem de hipercromismo

	$K_b$ ( $M^{-1}$ )	Hipercromismo (%)
ADN/piridina	$1,15 \times 10^4$	-
ADN/2,2' bipyridina	$9,3 \times 10^3$	-
ADN/1,10-fenantrolina	$4,1 \times 10^3$	-
ADN/[CuCl <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> ]	$5,72 \times 10^3$	367
ADN/[CuCl <sub>2</sub> (bipy)]	$5,12 \times 10^3$	80
ADN/[CuCl <sub>2</sub> (fen)]	$1,28 \times 10^4$	126

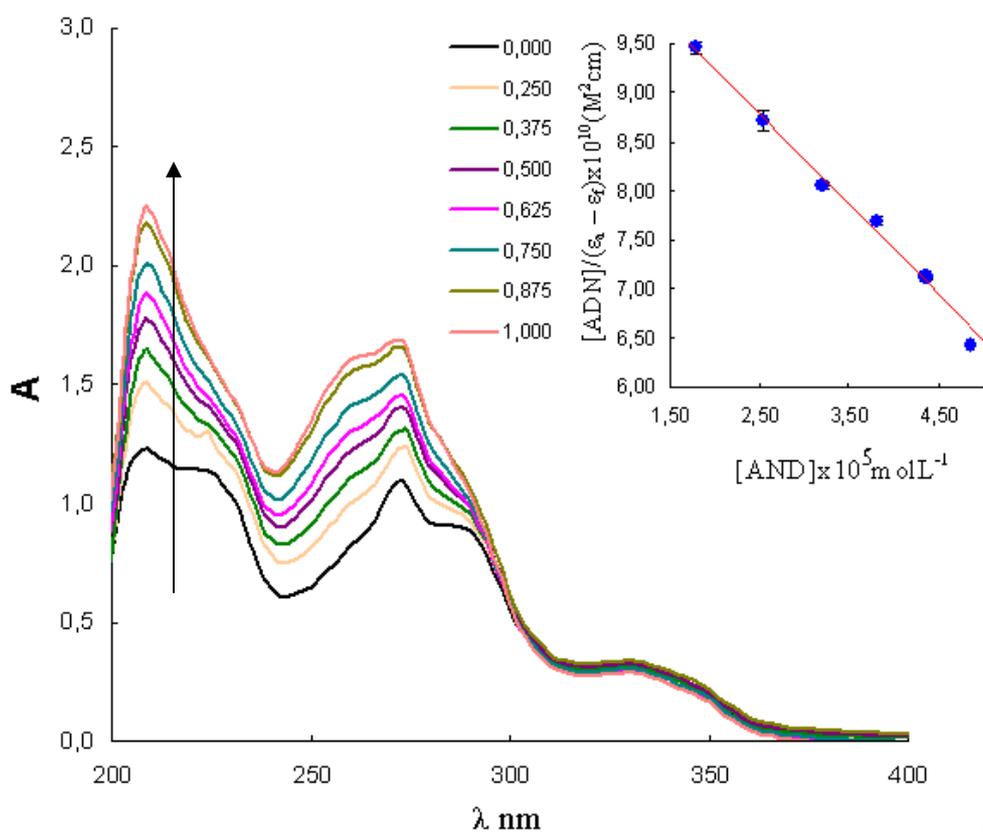
## 4.2 Estudo da interação da levofloxacina e de seus complexos com o ADN

Os espectros da levofloxacina e de seus complexos [CuCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)(LEVO)] (5), [CuCl(bipy)(LEVO)]Cl (7) e [CuCl<sub>2</sub>(fen)(LEVO)] (8) durante a titulação com CT-ADN são mostradas na Figura 4.4 a-d. O espectro inicial, em preto, refere-se a droga livre, na ausência de CT-ADN. Na região do UV-vis, as bandas de absorção observadas podem ser atribuídas às transições internas da levofloxacina e do co-ligante, no caso dos complexos que contém a bipy ou a fen. Não são observados deslocamentos significativos das bandas dos compostos após a adição de alíquotas sucessivas de CT-ADN (0,125 mL), no entanto, a intensidade das bandas aumenta, resultando em hipercromismo, sugerindo que a interação entre o ADN e estes compostos leva a quebra da estrutura secundária do ADN.





(c)



(d)

Figura 4.4 - Espectros de absorção de (a) LEVO, (b)  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEVO})]$  (5), (c)  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}$  (7) e (d)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})]$  (8) na ausência e na presença de concentrações crescentes de ADN (período de incubação = 30 minutos). Reta inserida – plotagem de  $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{AND}] \text{ L}^{-1}$ .  $\{[\text{ADN}] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol}$  e  $[\text{Composto}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , a temperatura ambiente $\}$ . As setas mostram as mudanças na absorção dos compostos após a adição de ADN.

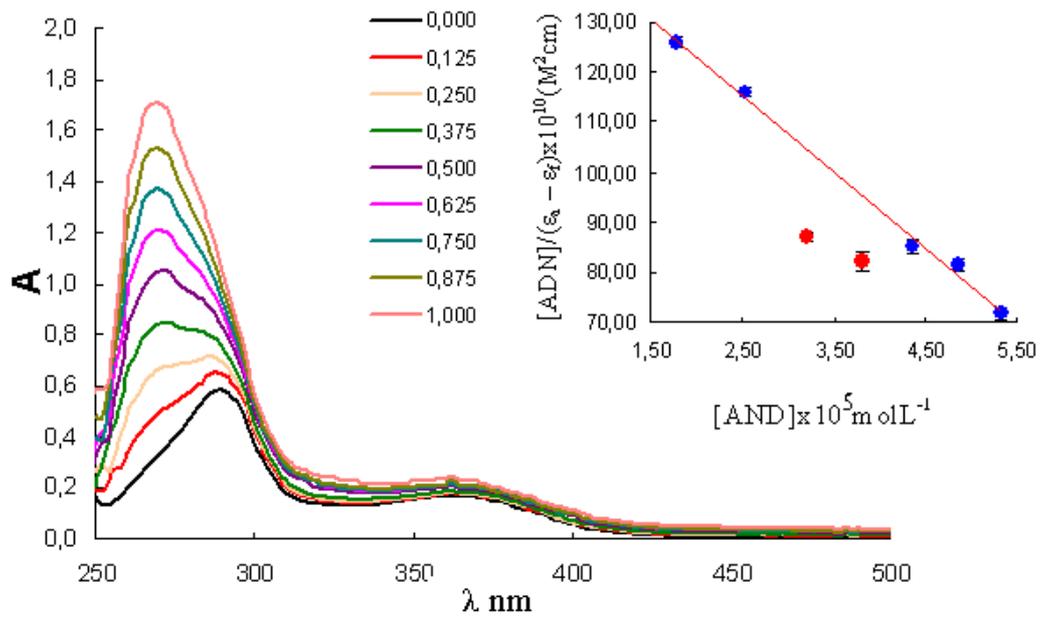
As constantes de interação ADN-droga para a LEVO e seus complexos são da ordem de  $10^3 \text{ M}^{-1}$ . No entanto o complexo  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEVO})]$  apresenta uma constante de interação da ordem de  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , o que indica que este complexo interage de forma mais eficiente com o ADN que a forma livre da fluorquinolona e que os demais complexos que possuem co-ligante.

Tabela 4.2 - Constantes de ligação ( $K_b$ ) para a interação ADN–droga e porcentagem de hipercromismo para a LEVO e seus complexos.

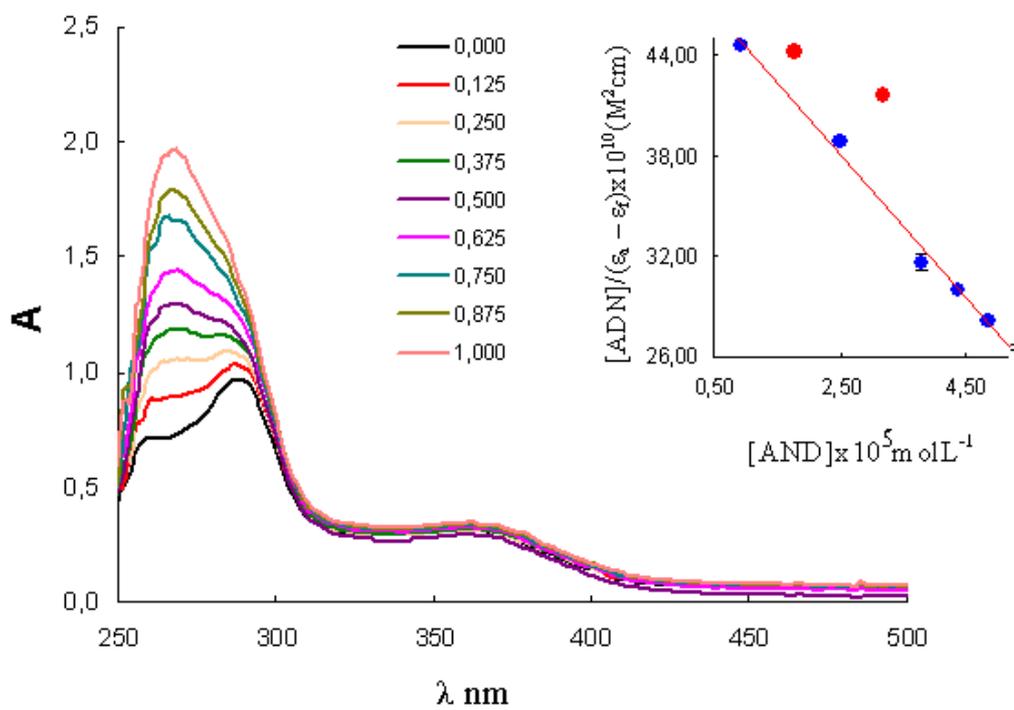
	$K_b (\text{M}^{-1})$	Hipercromismo (%)
ADN/LEVO	$4,1 \times 10^3$	39
ADN/ $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEVO})]$ (5),	$1,1 \times 10^5$	274
ADN/ $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}$ (7)	$3,3 \times 10^3$	102
ADN/ $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})]$ (8)	$6,6 \times 10^3$	82

## 4.2 Estudo da interação da esparfloxacina e de seus complexos com o ADN

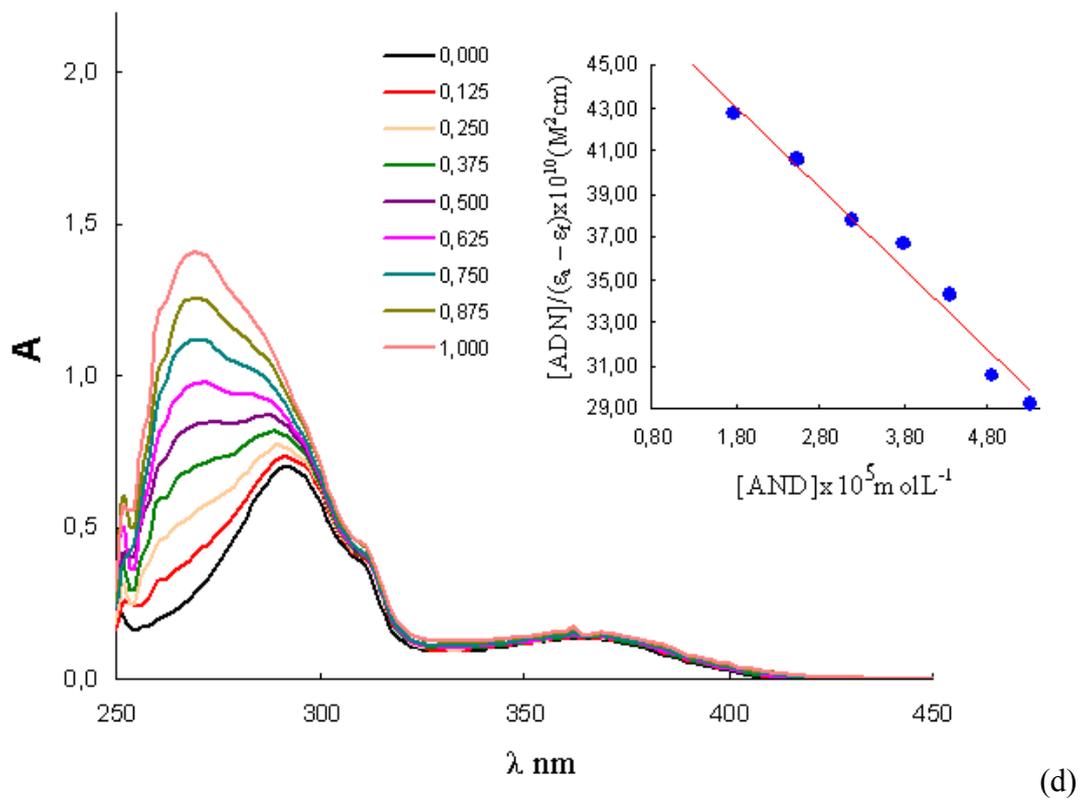
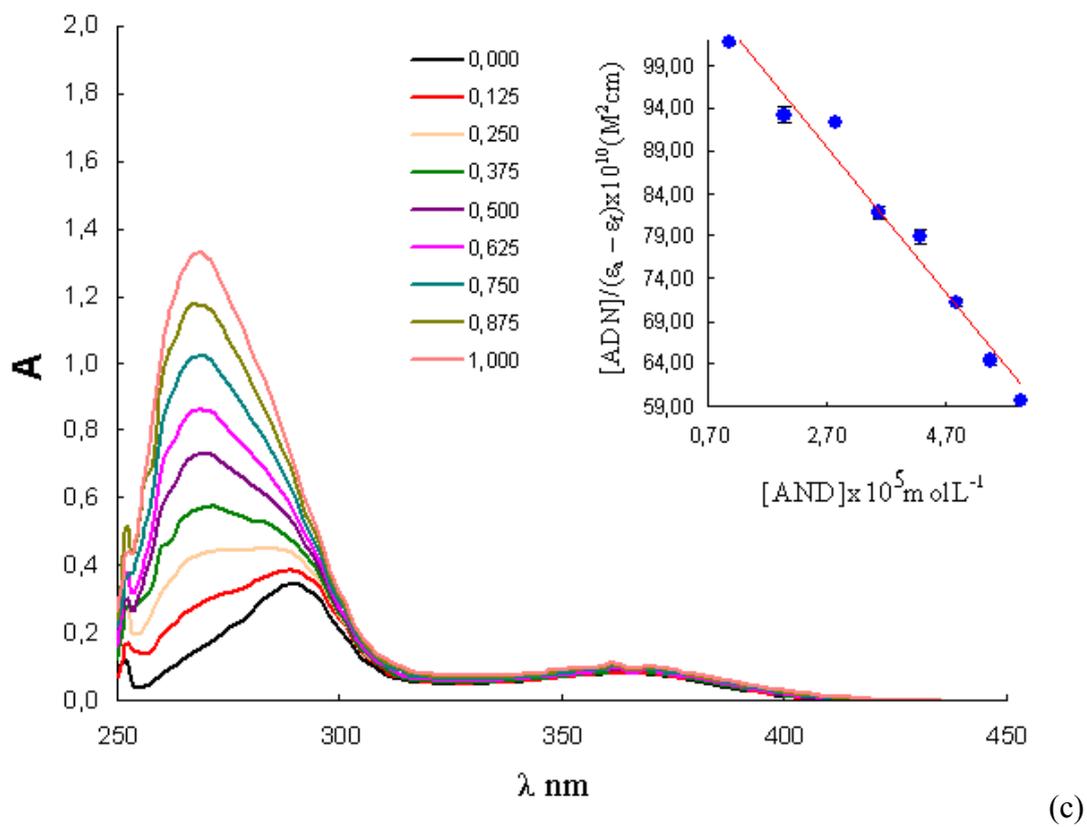
Os espectros da esparfloxacina e dos complexos  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})]$  (9),  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})]$  (10),  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}$  (11) e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{SPAR})]$  (12) durante a titulação com CT-ADN são mostradas na Figura 4.4 a-d. O espectro inicial (em preto) refere-se ao precursor livre, na ausência de CT-ADN. Na região do UV-vis, as bandas de absorção observadas podem ser atribuídas às transições internas sparfloxacina e dos co-ligantes py, bipy ou a fen. São observados aumentos na intensidade das bandas após a adição de alíquotas sucessivas de CT-ADN, resultando em hipercromismo e sugerindo que a interação entre o ADN e estes compostos leva a quebra da estrutura secundária do ADN.

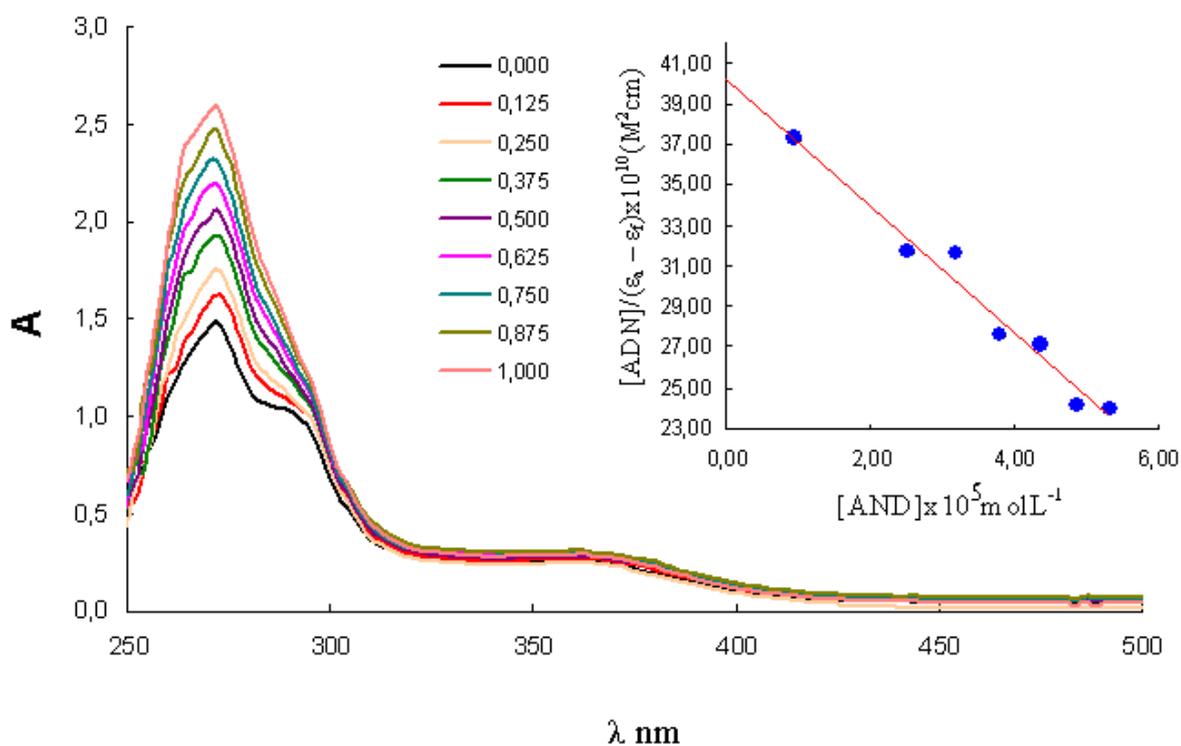


(a)



(b)





(e)

Figura 4.5 - Espectros de absorção de (a) SPAR, (b)  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})]$  (9), (c)  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})]$  (10) (d)  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}$  (11) e (e)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{SPAR})]$  (12) na ausência e na presença de concentrações crescentes de ADN (período de incubação = 30 minutos). Reta inserida – plotagem de  $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{ADN}] \text{ L}^{-1}$ .  $\{[\text{ADN}] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol e } [\text{Composto}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}, \text{ a temperatura ambiente}\}$ .

A porcentagem de hipercromismo e as constantes de interação calculadas através da equação Scatchard estão para a SPAR e seus complexos estão listadas na Tabela 4.3. Como se pode observar, os valores de  $K_b$  são todos da mesma ordem de grandeza. Para os complexos (10), (11) e (12) esses valores são praticamente idênticos. No caso da SPAR e de seus complexos, as mudanças espectrais foram as menores observadas, o que pode ser constatado pelos valores de porcentagem de hipercromismo, que variam entre 11 e 39 %.

Tabela 4.3 - Constantes de ligação ( $K_b$ ) para a interação ADN–droga e porcentagem de hipercromismo para a esparfloxacina e seus complexos

	$K_b$ ( $M^{-1}$ )	Hipercromismo (%)
ADN/SPAR	$8,7 \times 10^3$	39
ADN/[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(SPAR)] ( <b>9</b> )	$8,2 \times 10^3$	11
ADN/[CuCl <sub>2</sub> (py)(SPAR)] ( <b>10</b> )	$9,3 \times 10^3$	38
ADN/[CuCl(bipy)(SPAR)]Cl ( <b>11</b> )	$5,8 \times 10^3$	30
ADN/[CuCl <sub>2</sub> (fen)(SPAR)] ( <b>12</b> )	$6,9 \times 10^3$	22

Portanto, os precursores [CuCl<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>], [CuCl<sub>2</sub>(bipy)] e [CuCl<sub>2</sub>(fen)], os ligantes LEVO e SPAR e seus complexos de Cu(II) interagem com o ADN com constantes que variam entre  $10^3$  e  $10^5 M^{-1}$ , via intercalação com clivagem da estrutura secundária do ADN. Não foi possível encontrar correlação entre a atividade anti-*T.cruzi* dos compostos e os valores de  $K_b$ . Provavelmente, esse não deve ser o principal mecanismo de ação anti-*T.cruzi* dessas drogas.

Embora não tenham sido encontrados na literatura estudos de interação com o ADN da levofloxacinina, encontram-se resultados para seu isômero óptico, a ofloxacinina (OFL) e seus complexos de Cu(II). PATEL e colaboradores (2010) estudaram a interação com ADN de complexos de Cu(II) de OFL que continham co-ligantes nitrogenados e encontraram constantes da ordem de  $10^4 M^{-1}$ . Além disso ele sugeriu que a interação complexo-ADN ocorre via intercalação, mas sem prejuízo a estrutura secundária da molécula de ADN.

EFTHIMIADOU e colaboradores (2008) estudaram a interação entre o ADN, a esparfloxacinina e seu complexo [Co(SPAP)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)] e encontraram valores de  $K_b$  da ordem de  $10^5 M^{-1}$ . Esses valores são mais elevados do que os obtidos no presente trabalho.

Em outro trabalho, EFTHIMIADOU e colaboradores (2010) fizeram estudo de interação droga-ADN para a esparfloxacinina e os complexos [Fe(SPAP)<sub>3</sub>], [VO(SPAP)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)], [Mn(SPAP)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>], [Ni(SPAP)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)] e [UO(SPAP)<sub>2</sub>]. Para os complexos com íons divalentes, Ni<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>, os autores sugeriram o mesmo modo de interação que foi sugerido no presente trabalho e constantes da mesma ordem de grandeza.

## *Capítulo 5 -*

### *Estudo da interação dos complexos de Cu(II) de algumas fluorquinolonas com a albumina*

Estudos de interação entre macromoléculas biológicas e drogas geram importantes informações sobre os sítios de ligação, transporte e metabolismo no corpo humano (GUIZADO, 2008 e GÓES FILHO, 2005).

A Albumina sérica é uma das proteínas mais estudadas e é a mais abundante no plasma, com uma concentração típica de 5g/100mL. Muitos pesquisadores têm estudado a estrutura e as propriedades da albumina sérica e suas interações com outras proteínas com o intuito de compreender todas as suas funções no organismo (FRIEDLI, 1977).

Existem resultados contraditórios e muitas discussões sobre a determinação da estrutura da albumina, porém com base em experimentos de hidrodinâmica e espalhamento de raios-X, a albumina sérica aproxima-se de um elipsóide de 140 x 40 Angstroms, com três domínios homólogos. Albuminas são caracterizadas por conterem um número pequeno de resíduos de triptofano e metionina e um grande número de cistina e aminoácidos carregados, ácidos aspártico e glutâmico, lisina e arginina. O conteúdo de glicina e isoleucina é menor que a média encontrada em proteínas. A Figura 5.1 mostra a estrutura de cadeias de duas moléculas de albumina humana (HSA), onde os resíduos Cys34 e Trp214 aparecem como esferas.

Talvez, a mais interessante propriedade da albumina seja sua capacidade de ligar-se reversivelmente a uma grande variedade de compostos. A albumina é a principal transportadora de ácidos graxos, que são insolúveis no plasma sanguíneo. Também possui muitas outras funções, como sequestrar radicais livres de oxigênio e inativar vários metabólitos lipofílicos tóxicos como a bilirrubina. A albumina tem uma grande afinidade por ácidos graxos, hematina, bilirrubina e por pequenos compostos aromáticos negativamente carregados. Forma ligações covalentes com fosfato piridoxil,

cisteína, glutatona e vários metais como cobre, níquel, mercúrio, prata e ouro. No plasma circulante, aproximadamente 30% dos grupos –SH livres, Cys34, são oxidados por cisteína e glutatona. Como a albumina é uma proteína transportadora multifuncional, acredita-se que ela possa ser uma transportadora ou reservatório de óxido nítrico, e possa estar relacionada com processos fisiológicos ainda não compreendidos envolvendo o NO.

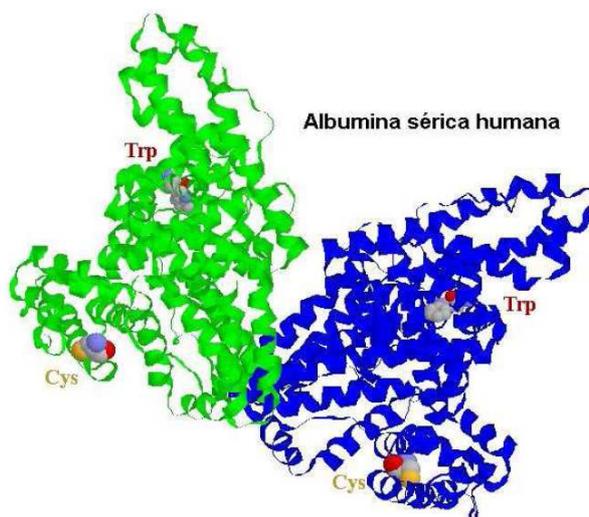


Figura 5.1 - Estrutura quaternária da HSA com os resíduos de cisteína e triptofano

Tanto a albumina bovina (BSA) quanto a humana (HSA) possuem apenas um resíduo de cisteína livre, Cys34. Os outros formam 17 pontes dissulfeto ajudando a manter a estrutura terciária. A albumina bovina (BSA) possui 2 resíduos de triptofano, Trp134 e Trp212 e a humana (HSA) apenas um, Trp214 (ver Figura 5.1).

A albumina bovina (BSA) é extensamente utilizada em estudos de interação com drogas, graças a sua semelhança estrutural com a albumina humana (HSA) e a seu baixo custo. Em solução, a BSA exibe forte sinal fluorescente, devido aos resíduos de triptofano, com máximo em 343 nm, quando excitada em 295 nm. Portanto, a fluorescência é a técnica mais utilizada para os estudos de interação BSA-droga.

Nesse trabalho, fizemos estudos de interação entre os complexos de Cu(II) de levofloxacina (LEVO) e esparfloxacina (SPAR) e a BSA com o objetivo de verificar a existência de interações e tentar compreender a natureza e a intensidade das mesmas. A interação da LEVO e da SPAR livres e dos precursores  $[CuCl_2(py)_2]$ ,  $[CuCl_2(bipy)]$ ,  $[CuCl_2(fen)]$  (py = piridina, bipy = 2,2'-bipiridina (bipy) e fen = 1,10-fenantrolina) também foi estudada para efeito de comparação.

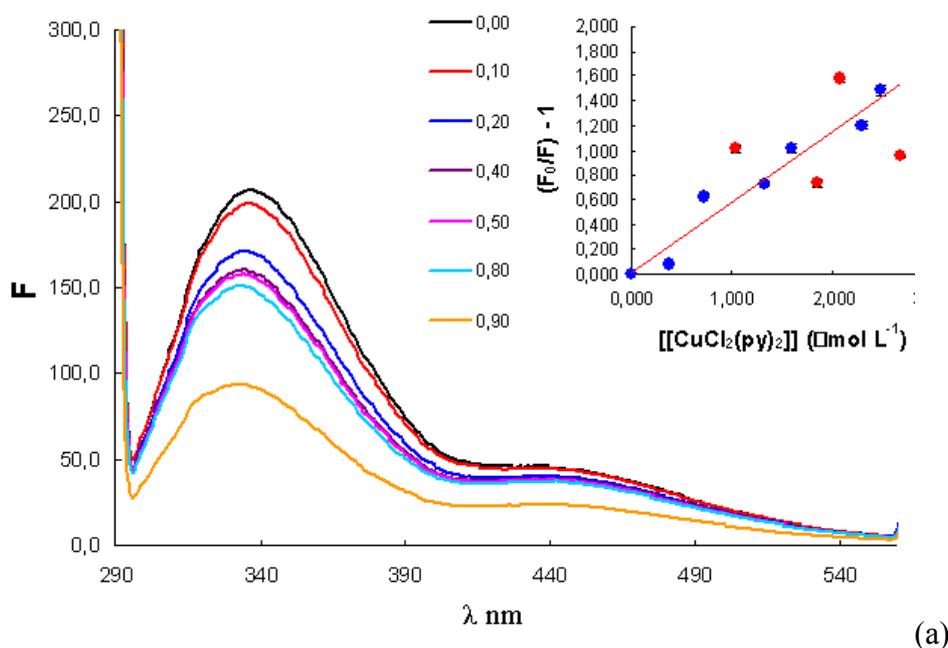
## 5.1 Estudo da interação dos precursores $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ , $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$ , $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$ com albumina bovina

As mudanças observadas nos espectros de emissão da BSA durante a titulação com os precursores  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$ , são mostradas na Figura 5.1 a-c. O espectro inicial (em preto) refere-se a BSA livre na ausência dos precursores. A solução de BSA, em pH 7,4, possui uma intensidade máxima de fluorescência em 348 nm, quando o comprimento de onda de excitação é de 285 nm. Após adição de alíquotas sucessivas dos precursores, observa-se supressão do sinal fluorescente dos triptofanos. A mudança da fluorescência em 343 nm,  $(F_0-F)$ , foi plotada em função da concentração dos precursores de Cu(II) (inserção na Figura 5.2 a-c) e os dados foram ajustados com a equação de Stern-Volmer,

$$F/F_0 = 1 + K_{SV} [Q]$$

onde,  $F_0$  é a intensidade de fluorescência na ausência do agente de extinção;  $F$  é a intensidade de fluorescência na presença do agente de extinção;  $[Q]$  é a concentração de agente de extinção e  $K_{SV}$  é a constante de supressão de Stern-Volmer que é igual a constante de associação droga-BSA.

Para os precursores  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$  e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$  os valores de  $K_{SV}$  encontrados foram de  $5,4 \times 10^5$ ;  $8,4 \times 10^4$  e  $4,8 \times 10^5$ , respectivamente. Esses valores indicam forte interação entre esses precursores e a BSA.



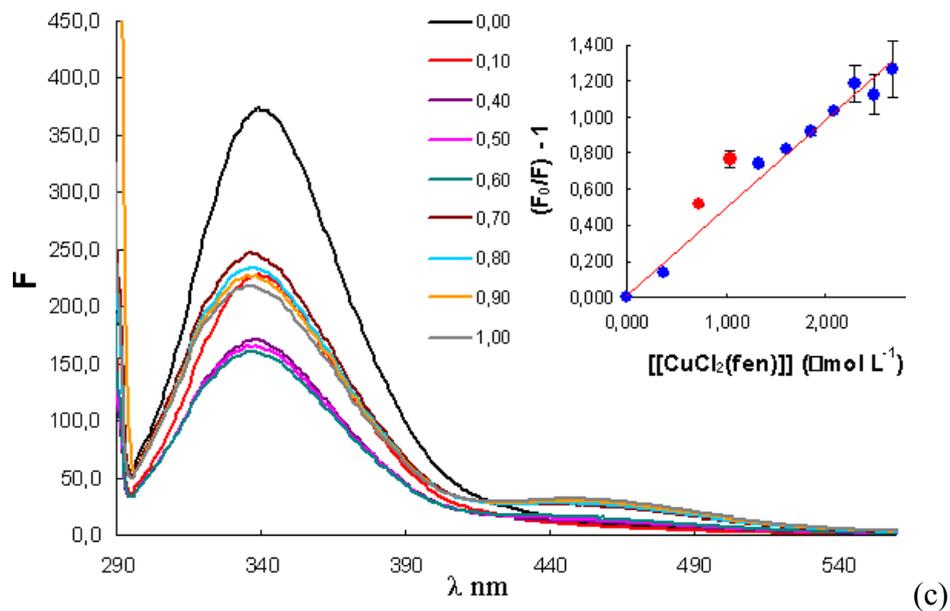
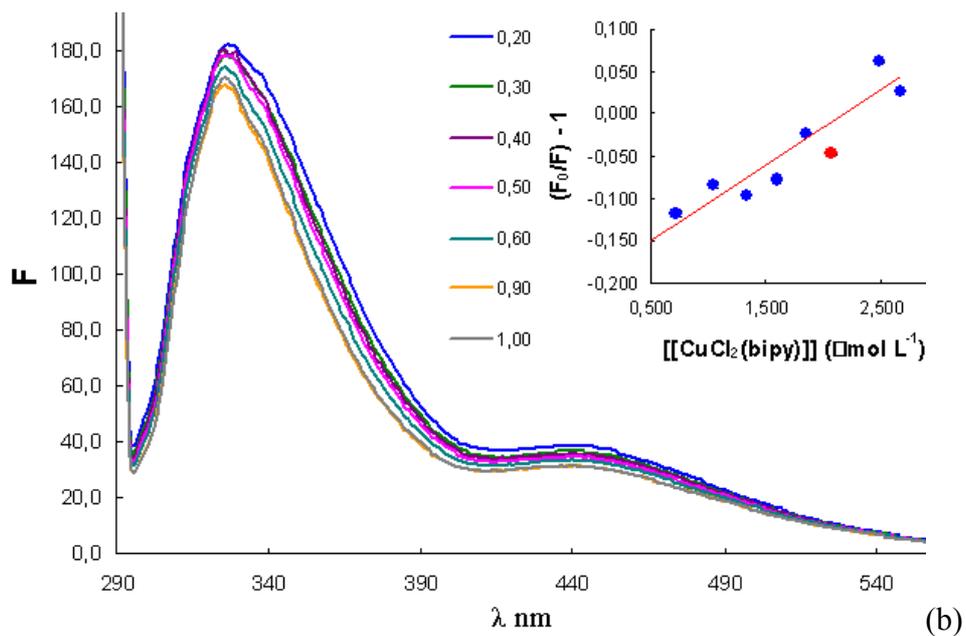
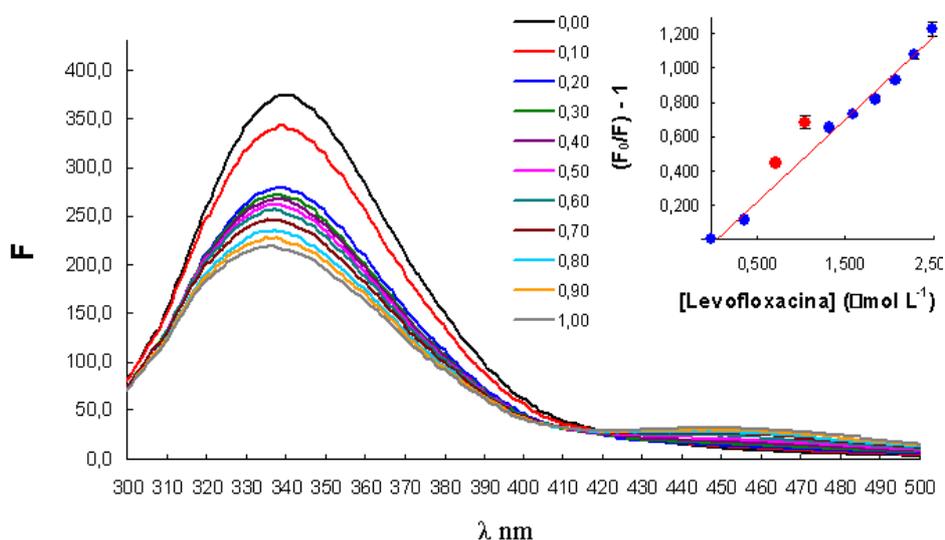


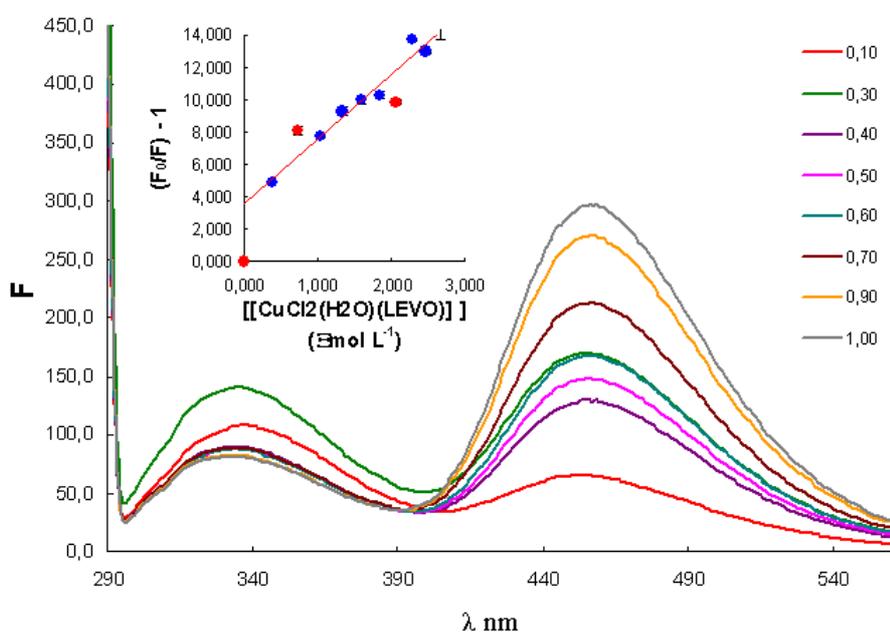
Figura 5.2 - Espectro de emissão da BSA na presença de concentrações crescentes de (a)  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ , (b)  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$  e (c)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$ . Comprimento de onda de excitação = 285 nm.  $[\text{BSA}] = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Os pontos em vermelho não foram levados em consideração nos cálculos das constantes.

## 5.2 Estudo da interação da levofloxacina e de seus complexos de Cu(II) com a albumina bovina.

As mudanças observadas nos espectros de fluorescência da BSA durante a titulação com a levofloxacina e seus complexos  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEVO})]$  (5),  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}$  (7) e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})]$  (8) são mostradas na Figura 5.3 a-d. A mudança da fluorescência em 343 nm,  $(F_0-F)$ , foi plotada em função da concentração dos precursores de Cu(II) (inserção na Figura 5.3 a-d) e os dados foram ajustados com a equação de Stern-Volmer.



(a)



(b)

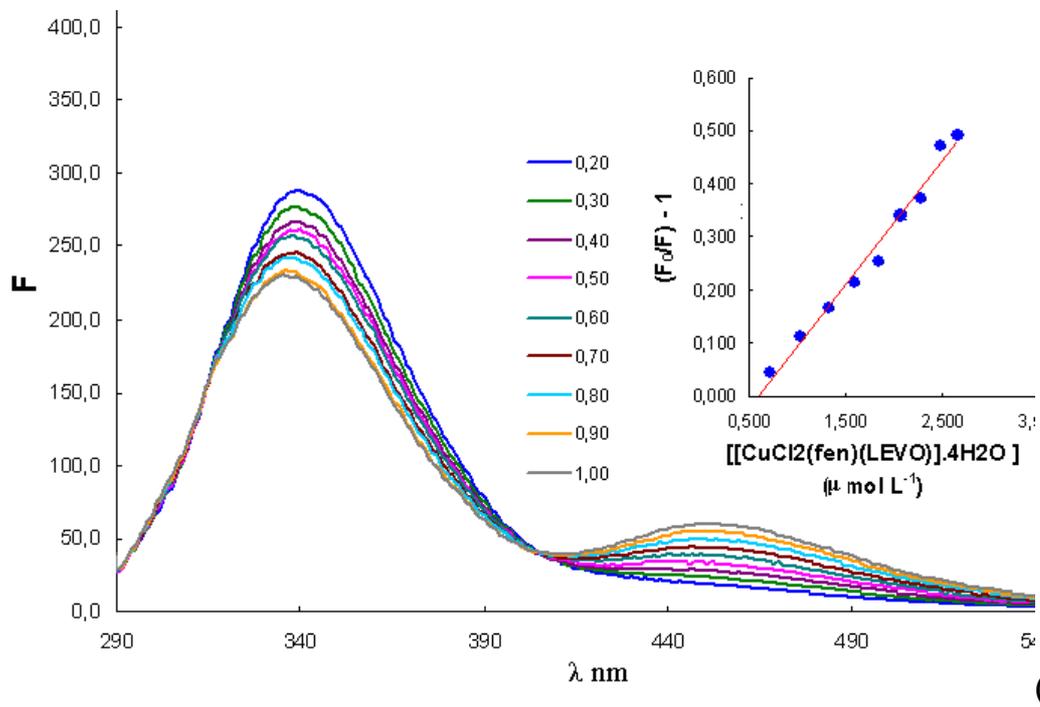
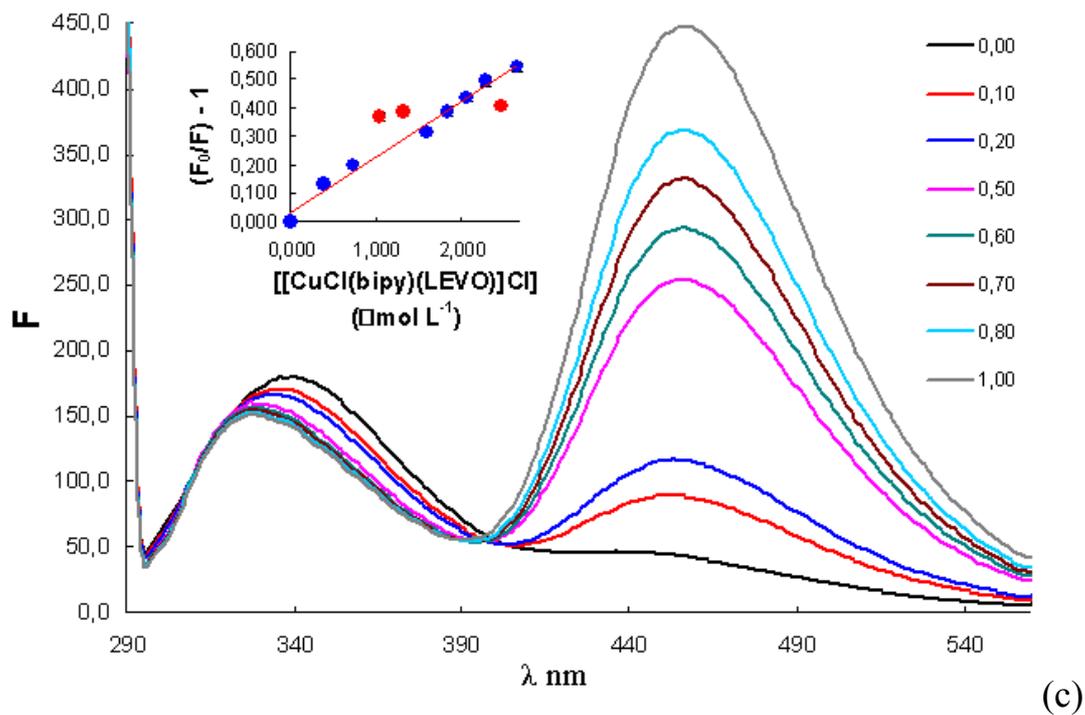
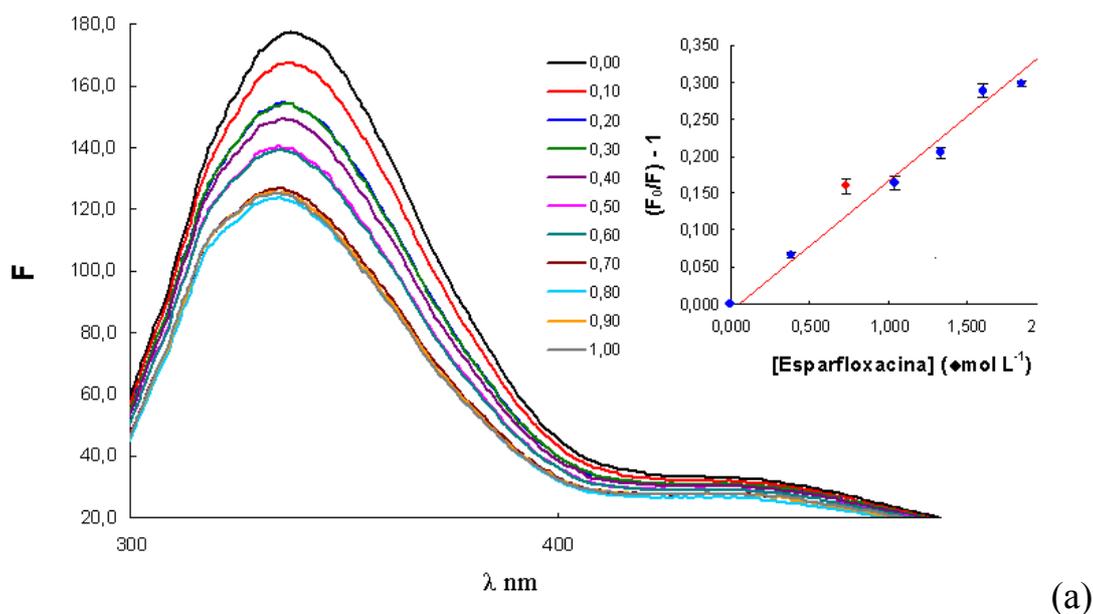


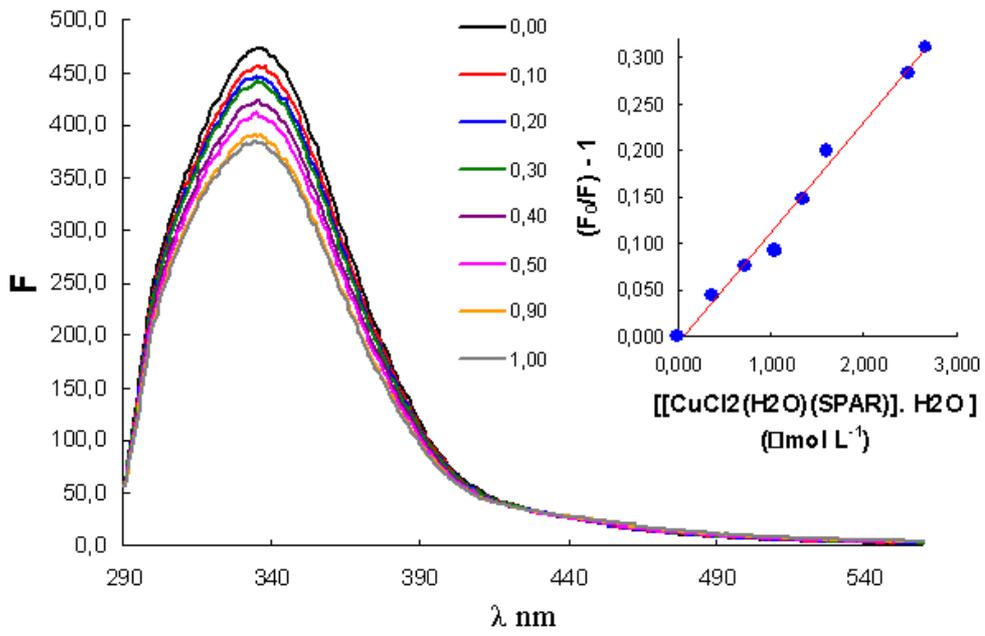
Figura 5.3 - Espectro de emissão da BSA na ausência e na presença de concentrações crescentes da (a) levofloxacina, (b)  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEVO})]$ , (c)  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}$  e (d)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})].4\text{H}_2\text{O}$ . Comprimento de onda de excitação = 285 nm.  $[\text{BSA}] = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Os pontos em vermelho não foram levados em consideração nos cálculos das constantes.

Para a levofloxacina e seus complexos  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEVO})]$  (**5**),  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}$  (**7**) e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})]$  (**8**) os valores de  $K_{\text{SV}}$  encontrados foram de  $4,9 \times 10^5$ ,  $3,7 \times 10^6$ ,  $1,9 \times 10^5$  e  $1,9 \times 10^5$ , respectivamente. Esses valores indicam forte interação com a BSA, sendo que o complexo (**5**) é o que tem a maior constante e, portanto, o que interage mais fortemente com a BSA.

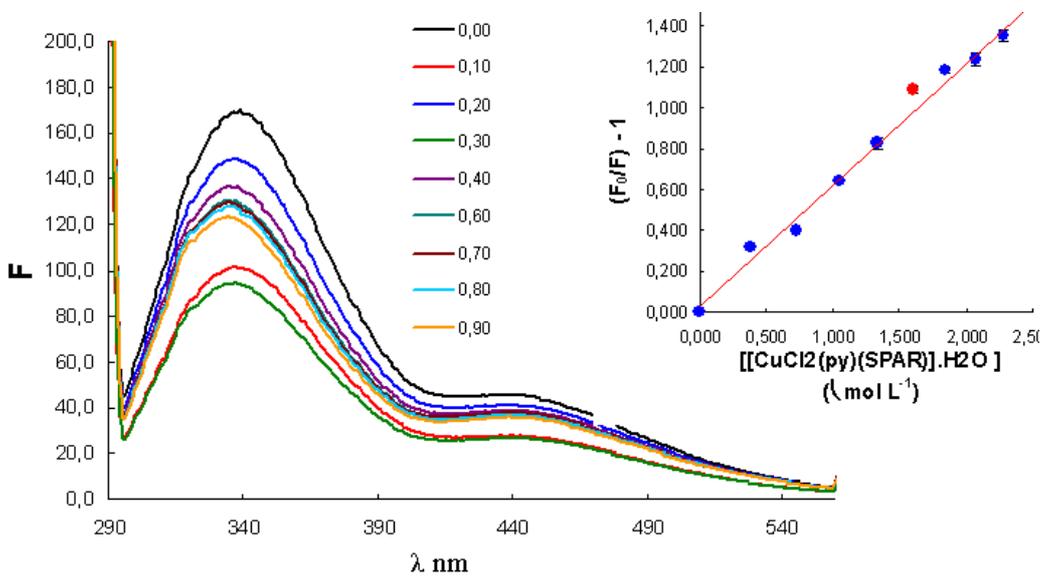
### 5.3 Estudo da interação da esparfloxacina e de seus complexos com o BSA

As mudanças observadas nos espectros de emissão da BSA durante a titulação com a esparfloxacina e dos complexos  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})]$  (**9**),  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})]$  (**10**),  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}$  (**11**) e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{SPAR})]$  (**12**) são mostradas na Figura 5.3 a-e. A mudança da fluorescência em 343 nm,  $(F_0-F)$ , foi plotada em função da concentração dos precursores de Cu(II) (inserção na Figura 5.3 a-e) e os dados foram ajustados com a equação de Stern-Volmer.





(b)



(c)

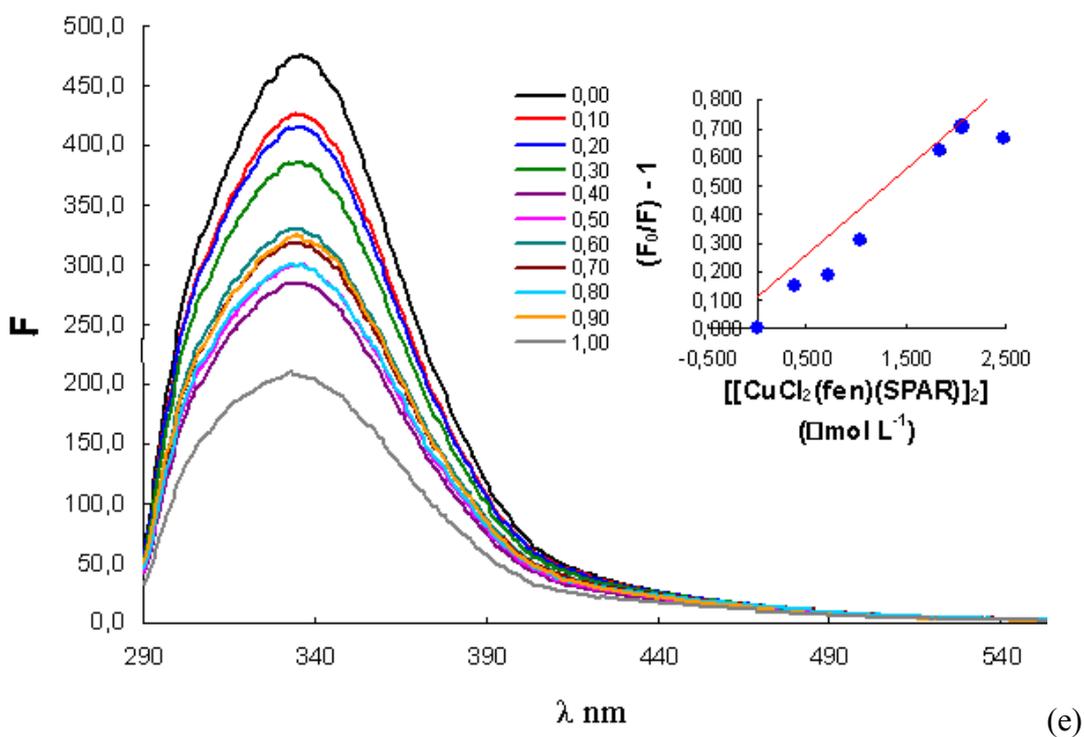
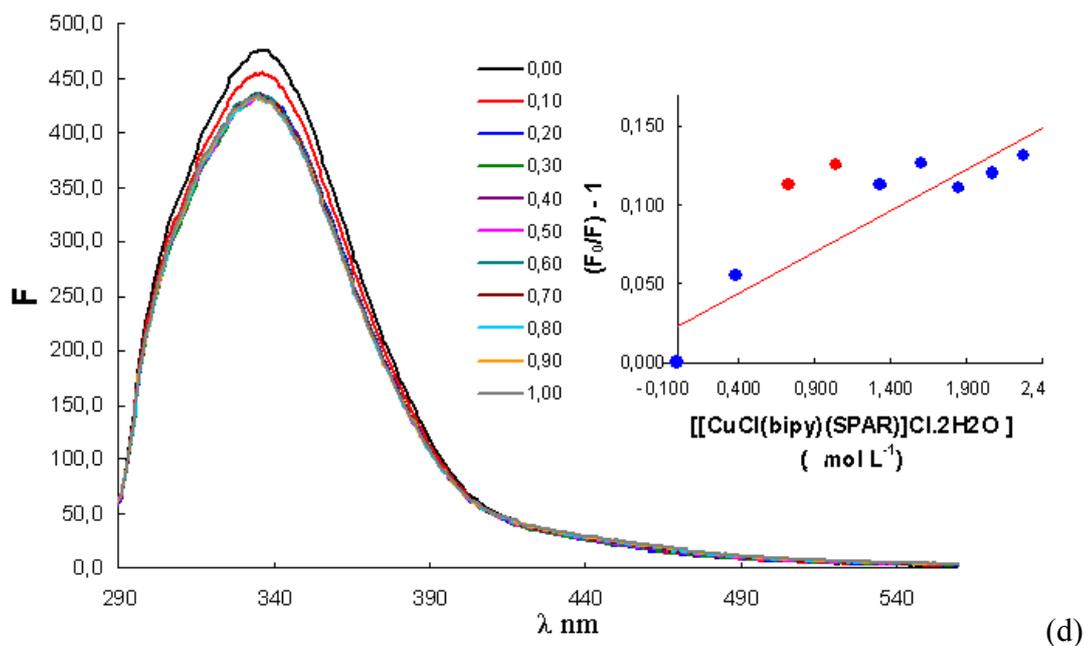


Figura 5.4 - Espectro de emissão da BSA na ausência e na presença de concentrações crescentes da (a) esparfloxacina, (b)  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})]$ , (c)  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})]$ , (d)  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$  e (e)  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})]$ . Comprimento de onda de excitação = 285 nm.  $[\text{BSA}] = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Os pontos em vermelho não foram levados em consideração nos cálculos das constantes.

Para a esparfloxacina e seus complexos  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})]$  (9),  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})]$  (10)  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}$  (11) e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{SPAR})]$  (12) os valores de  $K_{\text{SV}}$  encontrados foram  $1,8 \times 10^5$ ;  $1,1 \times 10^5$ ;  $5,2 \times 10^5$ ;  $5,1 \times 10^4$  e  $3,0 \times 10^5$ , respectivamente. Esses são da mesma ordem de grandeza dos relatados anteriormente e, novamente, indicam forte interação com a BSA.

A Tabela 5.1 resume os valores obtidos para as constantes de interação com a BSA ( $K_{\text{SV}}$ ), assim como os valores da constante de supressão dinâmica ( $k_q$ ). Os valores de  $k_q$  foram obtidos através da equação de Stern-Volmer e considerando que o tempo de vida ( $\tau_0$ ) de um triptofano na albumina é de, aproximadamente,  $10^{-8}$  s (SKYRIANOU, 2010).

$$\frac{F_0}{F} = k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{\text{sv}} [Q]$$

onde,  $F_0$  é a intensidade de fluorescência na ausência do agente de extinção;  $F$  é a intensidade de fluorescência na presença do agente de extinção;  $\tau_0$  é o tempo de vida na ausência e presença do agente de extinção e  $[Q]$  é a concentração de agente de extinção.

$k_q$  depende da probabilidade de colisão entre a proteína e o compostos em estudo e mede a exposição do triptofano a droga. O limite máximo de  $k_q$  esperado para um processo bimolecular, controlado por difusão, é  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (SKYRIANOU *et al.*, 2009).

Na Tabela 5.1 foram incluídos, para efeito de comparação, os valores das Constantes de ligação ( $K_b$ ) para a interação ADN–droga.

Os valores obtidos para  $K_{\text{SV}}$  mostram que a intensidade das interações não varia significativamente quando comparamos LEVO e SPAR livres com seus respectivos complexos de Cu(II). A magnitude no presente estudo ( $10^{12}$  -  $10^{14} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) indica que o processo não ocorre inteiramente por difusão e que deve haver uma interação mais específica albumina-droga (SKYRIANOU *et al.*, 2009).

Portanto, os precursores  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$  e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$ , os ligantes LEVO e SPAR e seus complexos de Cu(II) interagem com a BSA com constantes que variam entre  $10^4$  e  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . Novamente, não foi possível encontrar correlação entre a atividade anti-*T.cruzi* dos compostos e os valores de  $K_{\text{SV}}$ .

Tabela 5.1 - Constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) e de supressão dinâmica de fluorescência ( $k_q$ ) para a interação BSA-droga.

	$K_{SV} (M^{-1})$	$k_q (M^{-1} s^{-1})$
BSA/[CuCl <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> ]	5,4 x 10 <sup>5</sup>	~10 <sup>13</sup>
BSA/[CuCl <sub>2</sub> (bipy)]	8,4 x 10 <sup>4</sup>	~10 <sup>12</sup>
BSA/[CuCl <sub>2</sub> (fen)]	4,8 x 10 <sup>5</sup>	~10 <sup>12</sup>
BSA/LEVO	4,9 x 10 <sup>5</sup>	~10 <sup>13</sup>
BSA/[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(LEVO)] (5)	3,7 x 10 <sup>6</sup>	~10 <sup>14</sup>
BSA/[CuCl(bipy)(LEVO)]Cl.3H <sub>2</sub> O (7)	1,94 x 10 <sup>5</sup>	~10 <sup>13</sup>
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(LEVO)].4H <sub>2</sub> O (8)	1,92 x 10 <sup>5</sup>	~10 <sup>12</sup>
BSA/SPAR	1,8 x 10 <sup>5</sup>	~10 <sup>13</sup>
[CuCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)(SPAR)]. H <sub>2</sub> O (9)	1,1 x 10 <sup>5</sup>	~10 <sup>13</sup>
[CuCl <sub>2</sub> (py)(SPAR)].H <sub>2</sub> O (10)	5,2 x 10 <sup>5</sup>	~10 <sup>13</sup>
[CuCl(bipy)(SPAR)]Cl.2H <sub>2</sub> O (11)	5,1 x 10 <sup>4</sup>	~10 <sup>12</sup>
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(SPAR)].3H <sub>2</sub> O (12)	3,0 x 10 <sup>5</sup>	~10 <sup>13</sup>

As constantes de interação entre a albumina humana e as fluorquinolonas levofloxacina, esparfloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina foram determinadas por SEEDHER E AGARWAL (2010). Os valores encontrados são da ordem de 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>, semelhantes, portanto, aos obtidos no presente trabalho.

EFTHIMIADOU e colaboradores (2010) fizeram estudo de interação droga-BSA e droga-HSA para a esparfloxacina e os complexos [Fe(SPAR)<sub>3</sub>], [VO(SPAR)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)], [Mn(SPAR)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>], [Ni(SPAR)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)] e [UO(SPAR)<sub>2</sub>] e também encontraram constantes de interação da ordem de 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>.

SKYRIANOU e colaboradores (2009) estudaram a interação da esparfloxacina e seus complexos de Ni(II) com BSA e encontram constantes da ordem de 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>.

Portanto, os valores das constantes de interação BSA-droga, obtidos no presente trabalho, são próximos de outros encontrados na literatura para essa mesma classe de compostos.

## Capítulo 6 - Conclusão

Inicialmente relatamos a síntese de doze complexos de Cu(II) de norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEVO) e esparfloxacin (SPAR) contendo ou não os seguintes co-ligantes: piridina (py), 2,2'-bipiridina (bipy) ou 1,10-fenantrolina (fen). Os complexos obtidos são do tipo  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{L})]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{L})]$ ,  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{L})]\text{Cl}$  e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{L})]$  (L = NOR, LEVO e SPAR), nos quais os ligantes coordenam-se ao íon Cu(II) na forma zwitteriônica e de modo bidentado através da carbonila cetônica e da carbonila do ácido carboxílico. Dados de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), obtidos no pó, a temperatura ambiente, sugerem que os complexos  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{L})]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{L})]$ , (L = NOR, LEVO e SPAR) não apresentaram evidências de presença de complexos binucleares, com exceção de  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})]$ , que apresentou bem pequena porcentagem do dublete binuclear. Já nos complexos que contém bipiridina como co-ligante, a forma dimérica prevalece, sendo que  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{LEVO})]\text{Cl}$  é puramente binuclear, enquanto  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}$  e  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}$  contêm, além de componente binuclear, contribuição de complexo mononuclear. Os espectros de pó dos complexos que contém fenantrolina são muito alargados e também sugerem a presença de complexos binucleares, porém em menor proporção do que os complexos com bipiridina.

A atividade tripanocida das fluorquinolonas livres (NOR, LEVO, SPAR), dos complexos de Cu(II), do sal de Cu(II) ( $\text{CuCl}_2$ ), dos precursores de Cu(II)  $\{[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$ ,  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]\}$  e da droga de referência para doença de Chagas, o Benznidazole, foi testada sob as formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. NOR, LEVO, SPAR não mostraram atividade significativa sob as formas tripomastigotas do *T. cruzi*. A associação do Cu(II) às fluorquinolonas levou a um aumento da atividade. Observa-se que nos complexos do tipo  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{L})]$  os valores de  $\text{IC}_{50}$  são significativamente menores que nas fluorquinolonas livres e aproximadamente da mesma ordem de grandeza do  $\text{CuCl}_2$ . Embora a introdução da

piridina (py) como co-ligante não tenha sido uma estratégia eficaz para a melhora da atividade, a associação da 2,2'-bipiridina (bipy) ao cobre e às fluorquinolonas levou a uma diminuição significativa dos valores de IC<sub>50</sub> e, portanto, a um aumento da atividade. No entanto, a estratégia mais eficaz para o aumento da atividade anti-*T.cruzi* dos complexos foi a introdução do grupo 1,10-fenantrolina (fen). Os complexos do tipo [CuCl<sub>2</sub>(fen)(L)] mostraram-se ativos em baixas concentrações e significativamente mais ativos que a benzinidazole, que é a droga de referência. Embora a fenantrolina livre e seu precursor, [CuCl<sub>2</sub>(fen)], mostrem atividade significativa, os complexos que unem o Cu(II), às fluorquinolonas e a fen, são mais ativos, em especial o complexo [CuCl<sub>2</sub>(fen)(LEVO)], que apresenta também o maior índice de seletividade (IS = 19), sendo portanto o mais promissor da série estudada. Testes sob as formas amastigostas sanguíneas do *T.cruzi* estão em andamento. Embora várias classes de compostos tenham sido testadas contra o *T.cruzi*, *in vitro* e *in vivo*, poucos chegaram em fase de ensaios clínicos. Portanto, a atividade anti-*T.cruzi* dos complexos de Cu(II) descrita no presente trabalho justificam novos estudos *in vitro* e *in vivo* e sugerem que a associação fluorquinolona – cobre - fen, em um mesmo composto, pode representar uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos agentes anti-*T.cruzi*.

Uma vez constatado que os complexos de Cu(II) obtidos no presente trabalho tinham potencial para agir como agentes anti-*T.cruzi*, passamos aos estudos de investigação dos possíveis mecanismos de ação dessas drogas, através do estudo de interação dos complexos com o ADN e a albumina bovina (BSA).

Inicialmente fizemos estudos de interação entre os complexos de Cu(II) de levofloxacin (LEVO) e esparflocacin (SPAR) e a dupla hélice do ADN com o objetivo de verificar a existência de interações e tentar compreender a natureza e a intensidade das mesmas (K<sub>b</sub>). A interação da LEVO e da SPAR livres e dos precursores [CuCl<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>], [CuCl<sub>2</sub>(bipy)], [CuCl<sub>2</sub>(fen)] (py = piridina, bipy = 2,2'-bipiridina (bipy) e fen = 1,10-fenantrolina) também foi estudada para efeito de comparação. O estudo da interação das fluorquinolonas e de seus complexos de Cu(II) com o ADN é importante visto que os possíveis alvos de ação das drogas anti-*T.cruzi* podem incluir o ADN-mitochondrial ou ADN nuclear do parasito. Constatamos que os precursores [CuCl<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>], [CuCl<sub>2</sub>(bipy)] e [CuCl<sub>2</sub>(fen)], os ligantes LEVO e SPAR e seus complexos de Cu(II) interagem com o ADN com constantes que variam entre 10<sup>3</sup> e 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>, via intercalação com clivagem da estrutura secundária do ADN. No entanto, não foi possível encontrar correlação entre o potencial tripanocida dos compostos e os

valores de  $K_b$ . Provavelmente, esse não deve ser o principal mecanismo de ação anti-*T.cruzi* dessas drogas.

Em seguida, passamos aos estudos de interação com a albumina bovina (BSA). A Albumina sérica é uma das proteínas mais estudadas e é a mais abundante no plasma, com uma concentração típica de 5g/100mL. A BSA é extensamente utilizada em estudos de interação com drogas, graças a sua semelhança estrutural com a albumina humana (HSA) e a seu baixo custo. Em solução, a BSA exibe forte sinal fluorescente, devido aos resíduos de triptofano, com máximo em 343 nm, quando excitada em 295 nm. Portanto, a fluorescência é a técnica mais utilizada para os estudos de interação BSA-droga. Nesse trabalho, fizemos estudos de interação entre os complexos de Cu(II) de levofloxacin (LEVO) e esparflocacina (SPAR) e a BSA com o objetivo de verificar a existência de interações e tentar compreender a natureza e a intensidade das mesmas. A interação da LEVO e da SPAR livres e dos precursores  $[CuCl_2(py)_2]$ ,  $[CuCl_2(bipy)]$ ,  $[CuCl_2(fen)]$  (py = piridina, bipy = 2,2'-bipiridina (bipy) e fen = 1,10-fenantrolina) também foi estudada para efeito de comparação. Para obter as constantes de interação droga-BSA ( $K_{SV}$ ) traçamos o gráfico de mudança da fluorescência em 343 nm, ( $F_0/F$ ) em função da concentração de droga e os dados foram ajustados com a equação de Stern-Volmer:  $F/F_0 = 1 + K_{SV} [Q]$ , onde,  $F_0$  é a intensidade de fluorescência na ausência do agente de extinção;  $F$  é a intensidade de fluorescência na presença do agente de extinção;  $[Q]$  é a concentração de agente de extinção e  $K_{SV}$  é a constante de supressão de Stern-Volmer que é igual a constante de associação droga-BSA. Os precursores  $[CuCl_2(py)_2]$ ,  $[CuCl_2(bipy)]$  e  $[CuCl_2(fen)]$ , os ligantes LEVO e SPAR e seus complexos de Cu(II) interagem com a BSA com constantes que variam entre  $10^4$  e  $10^6 M^{-1}$ . Novamente, não foi possível encontrar correlação entre a atividade anti-*T.cruzi* dos compostos e os valores de  $K_{SV}$ .

## Capítulo 7 –

### Referencias Bibliográficas

ANDERSSON, MI; MACGOWAN, AP. Development of the quinolones. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 51 (2003) 1-11.

APPELBAUM, PC; HUNTER, PA. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents** 16 (2000) 5-15.

BLONDEAU, JM. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey of Ophthalmology** 49 (2004) suplemento 2.

BOAINAIN, E; RASSI, A. Terapêutica etiológica da doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 32/6 (1979) 395-399.

BRENER, Z; ANDRADE, Z. *Tripanosoma cruzi e doenças de chagas*. Rio de Janeiro, **Guanabara koogan** (1979).

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology** 27 (1973) 347-382.

CHAGAS, C. Nova tripanossomiase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo o achizotrypanum cruzi n. gen., agente etiológico de uma nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 1(1909) 159-218.

CHAGAS, CRJ; CHAGAS, E. *Manual de doenças tropicais e infecciosas*. Parte Geral. Rio de Janeiro, **Almanack Laemmert** (1935).

CHAGAS, C; VILELA, E. Forma cardíaca da trypanosomiase americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 14 (1922) 5-61.

CHEN, CHANG-YUN; CHEN, QUAN-ZHAN, WANG, XIAO-FENG, LIU MIN-SHENG; CHEN, YUN-FENG. Synthesis, characterization, DNA binding properties, and biological activities of a mixed ligand copper(II) complex of ofloxacin. **Transition Metal Chemistry** 34 (2009) 757-763.

CHIN, CM; DEMIRANDA, MTM; FERREIRA, EI. Potential antichagasic prodrugs. Synthesis of mannich base of cipeptide primaquine and nitrofurazone. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society** 211 (1996) 187.

CORTAZAR, TM; COOMBS, GH; WALKER J. 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** 116 (2007) 475-482.

COURA, JR; CASTRO, SL. A critical review on disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 97 (2002) 3-24.

COURA, JR; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta tropica** 15 (2010) 5-13.

DA SILVEIRA, VC. **Investigação da Atividade Biológica de Complexos de cobre(II), com Ligantes Inspirados em Biomoléculas** (2008). Tese de doutorado em Química - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

DA SILVEIRA, ABM; ADAD, SJ; CORREA-OLIVEIRA R; FURNESS, JB; D'AVILA REIS D. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. **Parasitology** 134 (2007) 789-796.

DIAS, LC; DESSOY, MA. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova** 32 (2009) 2444-2457.

DIAS, JCP; A Doença de Chagas e seu Controle na América Latina. Uma Análise de Possibilidades. **Caderno de Saúde Pública** 9 (1993) 201-209.

DIAS, JPC, Clínica e terapêutica da doença de chagas. Um manual prático para o clinico geral. **Editora Fiocruz**, Rio de Janeiro (1997).

DIAS, JCP. Epidemiologia. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Rio de Janeiro **Guanabara Kogan** (2000).

DOROFEEV, VL. Infrared spectra and the structure of drugs of the fluoroquinolone group. **Pharmaceutical Chemistry Journal** 38 (2004) 693-697.

DUSTAN, PO. Thermochemistry of adducts of nickel(II) acetylacetonate chelate with heterocyclic bases. **Thermochimica Acta** 317 (1988) 165-174.

EATON, SS; MORE, KM; SAWANT, BM; EATON, GR. 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. **Journal of the American Chemical Society** 105 (1983) 6560-6567.

EFTHIMIADOU, EK; KATSAROU, ME; KARALIOTA, A; PSOMAS, G. Copper(II) complexes with sparfloxacin and nitrogen-donor heterocyclic ligands: structure–activity relationship. **Journal of Inorganic Biochemistry** 102 (2008) 910-920.

EFTHIMIADOU, EK; SANAKIS, Y; RAPTOPOULOU, CP; KARALIOTA, A; KATSAROSA, N; PSOMAS, G. Crystal structure, spectroscopic, and biological study of the copper(II) complex with third-generation quinolone antibiotic sparfloxacin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 16 (2006) 3864-3867.

EFTHIMIADOU, EK; KARALIOTA, A; PSOMAS, G. Metal complexes of the third-generation quinolone antimicrobial drug sparfloxacin: structure and biological evaluation. **Journal of Inorganic Biochemistry** 104 (2010) 455-466.

EVSTIGNEEV; RYBAKOVA, KA; DAVIES DB. Complexation of norfloxacin with DNA in the presence of caffeine. **Biophysical Chemistry** 121 (2006) 84-95.

FRIEDLI, H; FOURNIER, E; VOLK T. Studies on new process procedures in plasma fractionation on an industrial scale - IV. Comparison of two semipermeable membrane systems for the concentration of albumin solutions. **Vox Sanguinis** 33 (1977) 93-96.

GARCIA, ES; AZAMBUJA, P. Development and interactions of Trypanosoma cruzi within the insect vector. **Parasitol Today** 7 (1991) 240-244.

GEARY, WL. The use of conductivity measurement in organic solvent for characterization of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews** 7 (1971) 81-122.

GÓES FILHO, LS. **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 – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

GUIZADO, TRCG. **Estudos computacionais da interação de porfirinas e seus complexos de ferro com albumina sérica humana** (2008) 111 p. Dissertação Mestrado em Física – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

GOOTZ, TD; BRIGHTY, KE; Fluoroquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance, and clinical aspects. **Medicinal Research Reviews** 16 (1996) 433-486.

HATHAWAY, BJ; BILLING, DE. Electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of copper(II) ion. **Coordination Chemistry Reviews**. 5 (1970) 143-207.

HEEB, S; FLETCHER, MP; CHHABRA, SR; DIGGLE, SP; WILLIAMS, P; CÁMARA, M. Quinolones: from antibiotics to auto inducers. **FEMS Microbiology Reviews** 35 (2001) 247-274.

HOARE, CA; WALLACE, FG. Developmental stages of trypanosomadit flagellates – a new terminology. **Nature** 212 (1966) 1385-1386.

HOFFKEN, G; LODE, H; PRINZING, C. Pharmacokinetics of ciprofloxacin afther oral and parental admistration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 27 (1985) 375-379.

HOOPER, DC. Mode of action of fluoroquinolones. **Drugs** 58 (1999) 6-10.

LESHER, GY; FROELICH, ED; GRUET, MD; BAILEY, JH; BRUNDAGE, RP. 1-8 naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. **Journal Medicinal Pharmaceutical Chemistry** 5 (1962) 1063.

LIU-GONZALEZ, M; SANZ-RUI'Z, F. Synthesis, structure, and nuclease properties of several binary and ternary complexes of copper(II) with norfloxacin and 1,10-phenantroline. **Journal of Inorganic Biochemistry** 101 (2007) 831-840.

KANDAGAL, PB; ASHOKA, S; SEETHARAMAPPA, J; SHAIKH, SMT; JADEGOUD, Y; IJARE, OB. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 41 (2006) 393-399.

KATSAROU, ME; EFTHIMIADOU, EK; PSOMAS, G; KARALIOTA, A; VOURLIUMIS, D. Novel copper(II) complex of *N*-propyl-norfloxacin and 1,10-phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities. **Journal Medicinal Chemistry** 51 (2008) 470-478.

KETTLER, HE; MARJANOVIC, S. Engaging biotechnology companies in the development of innovative solutions for diseases of poverty. **Nature Rewiews** 3 (2004) 171-176.

MEIRELLES, MNL; DE ARAUJO-JORGE, TC; MIRANDA, CF. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. **European Journal of Cell Biology** 41 (1986) 198-206.

MENDOZA-DÍAZ, G; MARTINEZ-AGUILERA LMR; PEREZ-ALONSO R. Synthesis and characterization of mixed ligand complexes of copper with nalidixic acid and (N-N) donors. Crystal structure of [Cu(Phen)(Nal)-(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O. **Inorgánica Chimica Acta** 138 (1987) 41-47.

NERNORTAS, E; BURRI, C; SHAPIRO, TA. Antitrypanosomal Activity of Fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 43 (1999) 2066-2068.

NWAKA, S; RIDLEY, G. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. **Nature Reviews** 2 (2003) 919-928.

OLIVEIRA, CJS. **Caracterização de ácidos fúlvicos extraídos de resíduos reciclados para actividades agrícolas** (2000). 283 p. Dissertação Mestrado em Química - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Lisboa, Portugal.

PATEL MN; PARMAR PA; GANDHI DS. Antibacterial, SOD-mimic and nuclease activities of copper(II) complexes containing ofloxacin and neutral bidentate ligands. **Applied Organometallic Chemistry** 25 (2011) 27-33.

PEREZ-GUAITA, D; SAYEN, S; BOUDESOCQUE, S; GUILON, E. Copper(II) influence on flumequine retention in soils: macroscopic and molecular investigations **Journal of Colloid and Interface Science** 357 (2011) 453-459.

PERRIN, DD; DEMPEY, B. Buffers and pH and metal ion control, **Chapman and Hall**, London (1974).

PSOMAS, G; TARUSHI, A; EFTHIMIADOU, E K; SANAKIS ; RAPTOPOULOU, CP; KATSAROS, N. Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with oxolinic acid. **Journal of Inorganic Biochemistry** 100 (2006) 1764-1773.

REFAT, MS. Synthesis and characterization of norfloxacin-transition metal complexes (group 11, IB): Spectroscopic, thermal, kinetic measurements and biological activity. **Spectrochimica Acta** 68 (2007) 1393-1405.

RODRIGES, C. **Estudos sobre o mecanismo de reação de hidrogenação em complexos do tipo  $[RuCl_2(P)N_2]$  P = mono ou biofosfina, N= piridina ou derivados** (2010). Dissertação mestrado em Química - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil.

RUI'Z, M; ORTIZ, R; PERELT, L; LATORRE, J; SERVER-CARRI, J. Potentiometric and spectroscopic studies of transition-metal ions complexes with a quinolone derivative (Cinoxacin). Cristal structures of new Cu(II) and Ni(II) cinoxacin complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry** 65 (1997) 87-96.

RUI'Z, P.; ORTIZ, R; PERELLO, L; ALZUET, G; GONZÁLEZ-ALVAREZ, M; LIU-GONZÁLEZ, M; SANZ-RUÍZ, F. Synthesis, structure, and nuclease properties of several binary and ternary complexes of copper(II) with norfloxacin and 1,10 phenantroline. **Journal of Inorganic Biochemistry** 101 (2007) 831-840.

SADEEK, AS; REFAT, MS; HASHEM, HA. Complexation and thermogravimetric investigation on tin(II) and tin(IV) with norfloxacin as antibacterial agent. **Journal of Coordination Chemistry** 59 (2006) 759-775.

SADEEK, AS. Synthesis, thermogravimetric analysis, infrared, electronic and mass spectra of Mn(II), Co(II) and Fe(III) norfloxacin complexes. **Journal of Molecular Structure** 753 (2005) 1-12.

SAHA, DK; SANDBHOR; SHIRISHA, UK; PADHYE, S; DEOBAGKAR, D; ANSON, CE; POWELL, AK. A novel mixed-ligand antimycobacterial dimeric copper complex of ciprofloxacin and phenanthroline. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 14 (2004) 3027-3032.

SANTOS, WG. **Estudo de transferência de energia eletrônica entre poli(p-fenilenovinileno) e corantes iônicos em solução** (2007) 79 p. Dissertação de Mestrado em Físico-química – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

SHAIKH, SMT; SEETHARAMAPPA, J; KANDAGAL, PB; ASHOKA, S. Binding of the bioactive component isothipendyl hydrochloride with bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure** 786 (2006) 46-52.

SHAIKH, SMT; SEETHARAMAPPA, J; KANDAGAL, PB; MANJUNATHA, DH; ASHOKA, S. Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin. **Dyes and Pigments** 74 (2007) 665-671.

SEEDHER, N; AGARWAL, P. Complexation of fluoroquinolone antibiotics with human serum albumin: a fluorescence quenching study. **Journal of Luminescence** 130 (2010) 1841-1848.

SKYRIANOU, KC; PERDIH, F; TUREL, I; KESSISSOGLU, DP; PSOMAS, G. Nickel–quinolones interaction. Part 1 - Nickel(II) complexes with the antibacterial drug sparfloxacin: structure and biological properties. **Journal of Inorganic Biochemistry** 103 (2009) 1617-1625.

SKYRIANOU, KC; PERDIH, F; TUREL, I; KESSISSOGLU, DP; PSOMAS, G. Nickel–quinolones interaction. Part 3 - Nickel(II) complexes of the antibacterial drug flumequine. **Journal of Inorganic Biochemistry** 104 (2010) 740-749.

SINGH, LJ; DEVI, NS; DEVI, SP; DEVI, WB; SINGH, RKH.; RAJESWARI, B; KADAM, RM; Spectroscopic studies on bis(1-amidino-*O*-alkylurea) copper sulfate complexes where alkyl = methyl, ethyl, *n*-propyl or *n*-butyl: EPR evidence for binuclear complexes. **Inorganic Chemistry Communications** 13 (2010) 365-368.

SOUZA, MVN; ALMEIDA, V; SILVA, AD; COURI, MRC. Ciprofloxacina, uma importante fluorquinolona no combate ao antraz. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 85 (2004) 13.

TUREL, I. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. **Coordination Chemistry Reviews** 232 (2002) 27-47.

UMA, R; FORSYTH, JS; STRUTHERS, AD; FRASER, CG; MURPHY, DJ. The influence of mode of delivery and ACE genotype on serum angiotensin converting enzyme (ACE) activity in the mother and infant at term. **European Journal of Obstetric Gynecology and Reproductive Biology** 134 (2007) 179-183.

VAN BAMBEKE, F; MICHOT, JM; VAN ELDERE, J; TULKENS, PM. Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases** 11 (2005) 256-280.

VIEIRA, L. M. M. **Síntese e caracterização de complexos de paládio(II), platina(II), zinco(II) e cobre(II) com ligantes do grupo das fluorquinolonas** (2007) Dissertação Mestrado em Química - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de fora, Brasil.

ZANA, A. **Biologia Molecular Básica**. Ed Mercado Aberto (2000).

KETTLER, HE; MARJANOVIC, S. Engaging biotechnology companies in the development of innovative solutions for diseases of poverty. **Nature Reviews** 3 (2004) 171-176.

WANG, J; LIU, Z; LIU, J; LIU, S; SHEN, W. Study on the interaction between fluoroquinolones and erythrosine by absorption, fluorescence and resonance Rayleigh scattering spectra and their application. **Spectrochimica Acta Part A** 699 (2008) 956-963.

WEIL, JA; BOLTON, JR; WERTZ, JE. Electron paramagnetic resonance, elementary theory and practical applications, **John Wiley & Sons** (1993).

## Anexo I - Curvas de TG/DTG

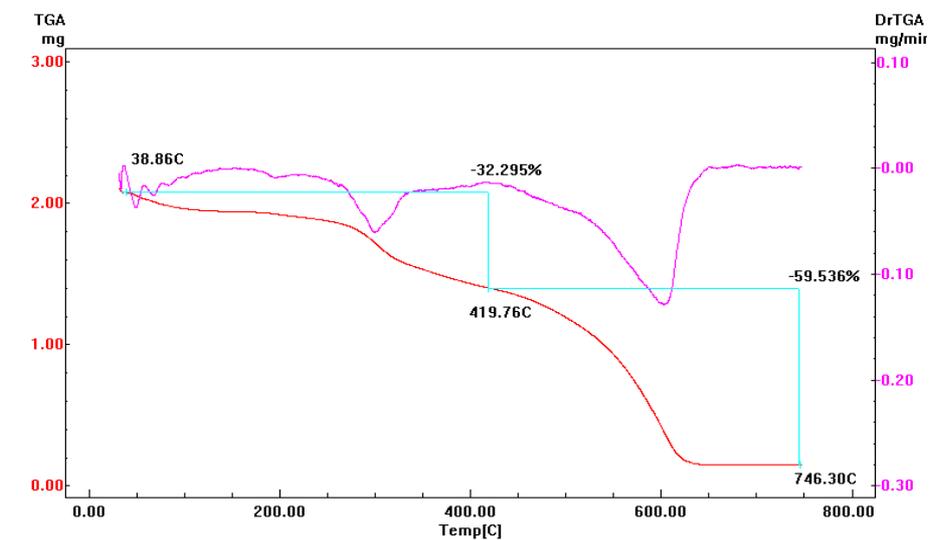


Figura.1 – Curvas TG/DTG de  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$  (1)

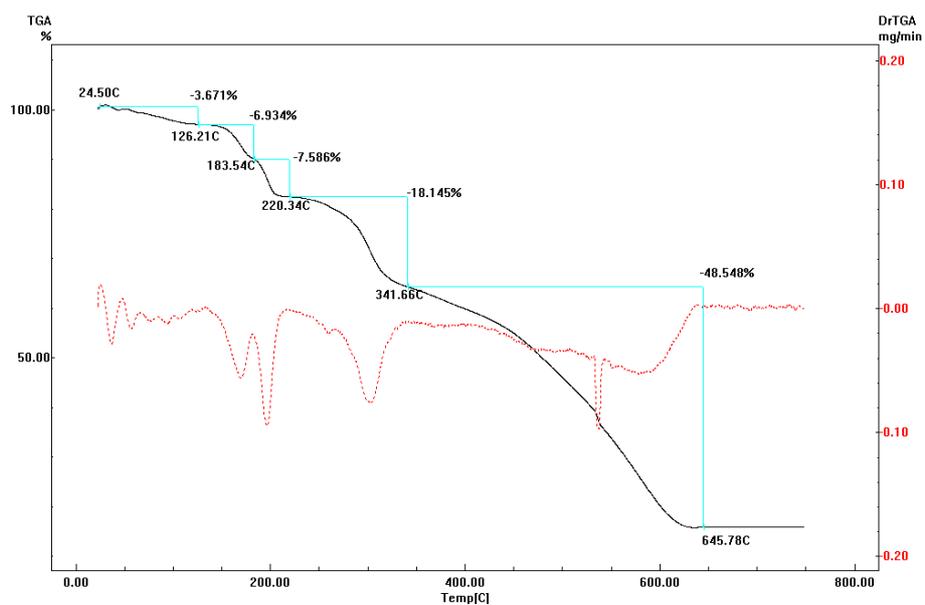


Figura.2 – Curvas TG/DTG de  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$  (2)

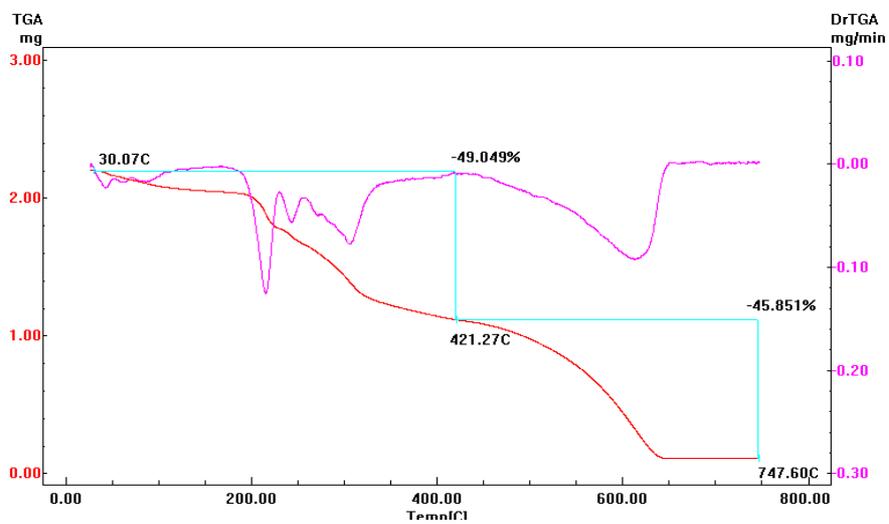


Figura.3 – Curvas TG/DTG de  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (3)

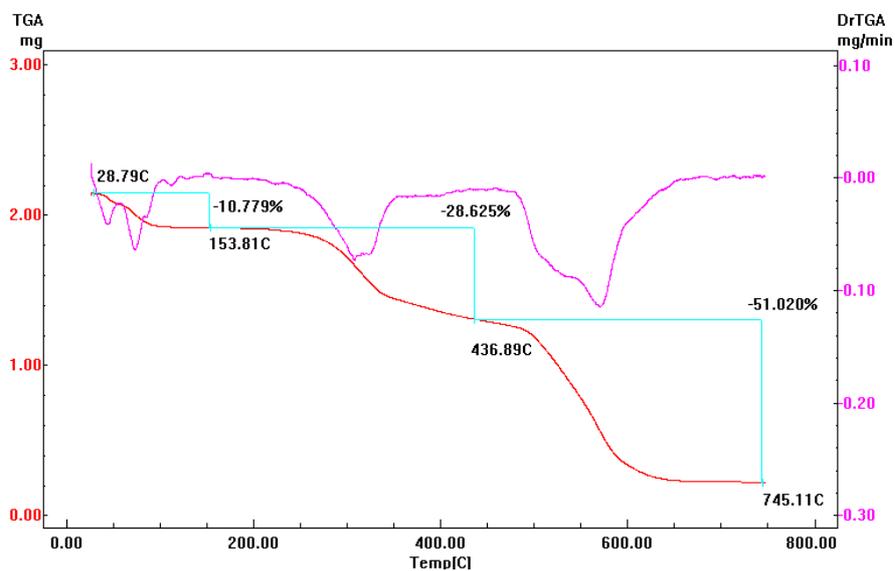


Figura.4 – Curvas TG/DTG de  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{NOR})]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (4)

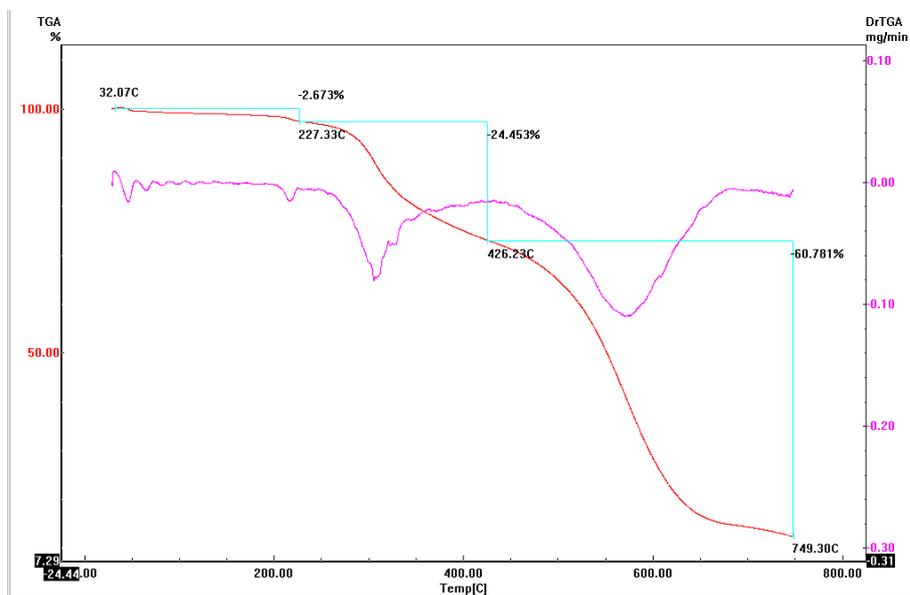


Figura.5 – Curvas TG/DTG de  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{LEVO})]$  (5)

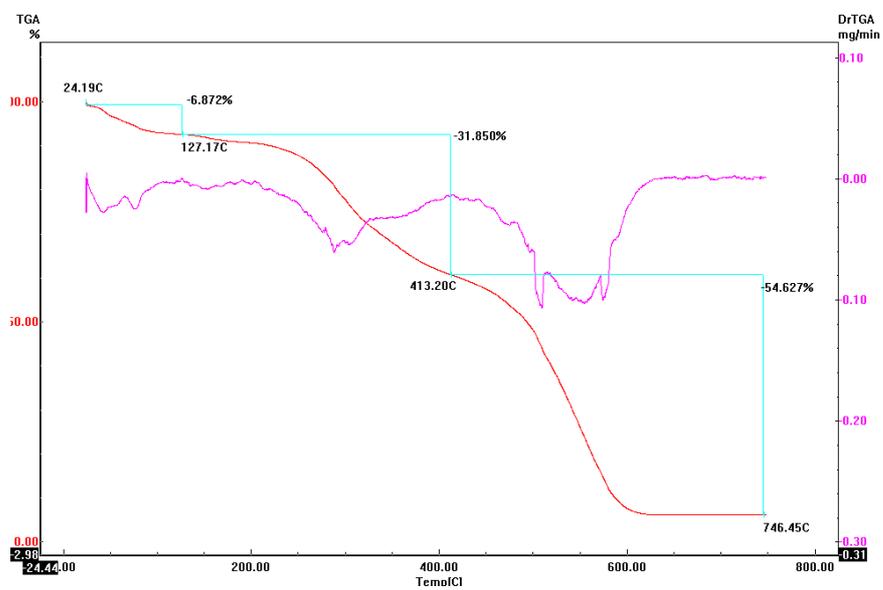


Figura.6 – Curvas TG/DTG de  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (9)

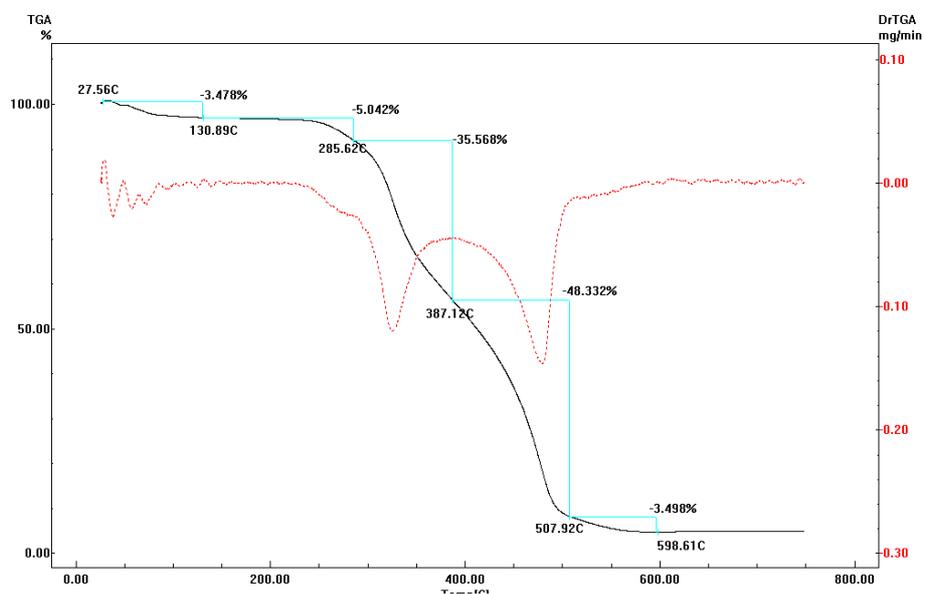


Figura.7 – Curvas TG/DTG de  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$  (10)

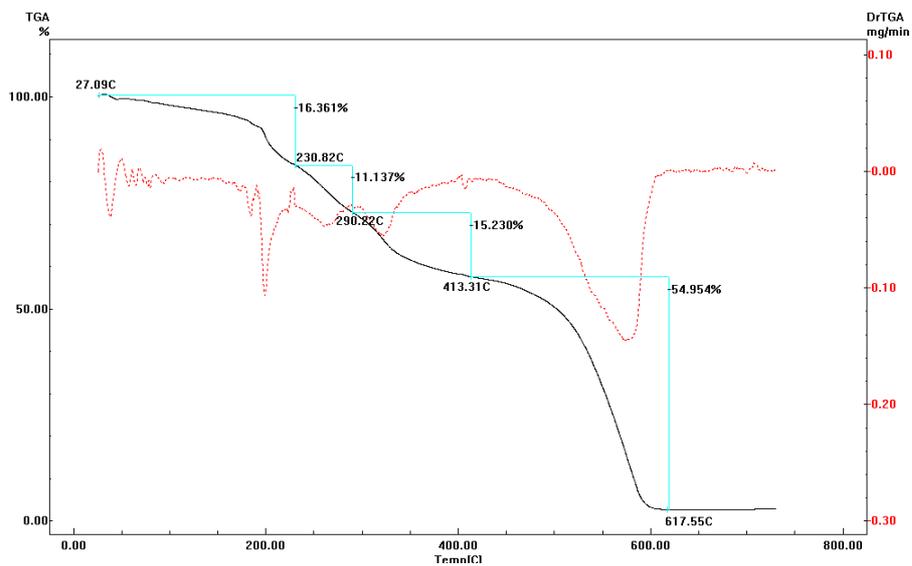


Figura.8 – Curvas TG/DTG de  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (11)

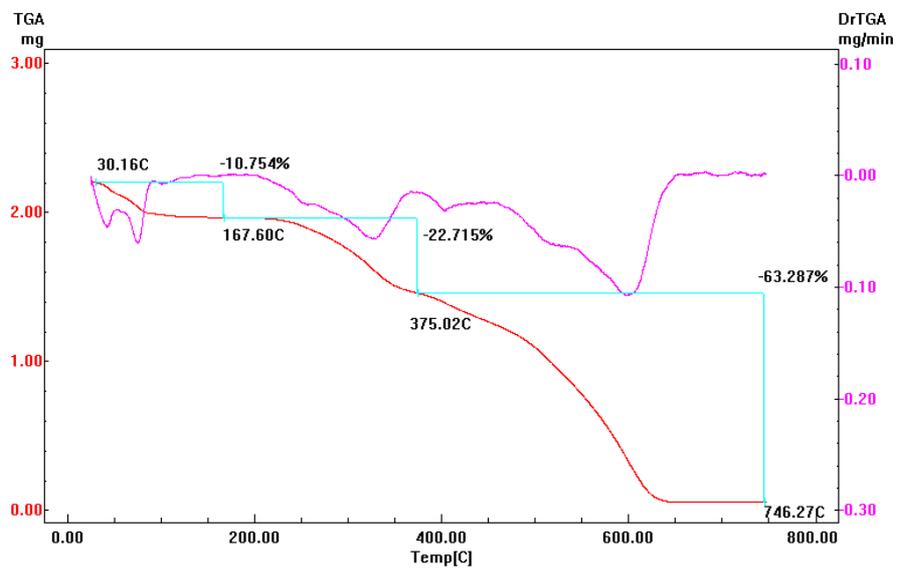


Figura.9 – Curvas TG/DTG de  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{SPAR})].3\text{H}_2\text{O}$  (12)

## Anexo II - Espectros na região do Infravermelho

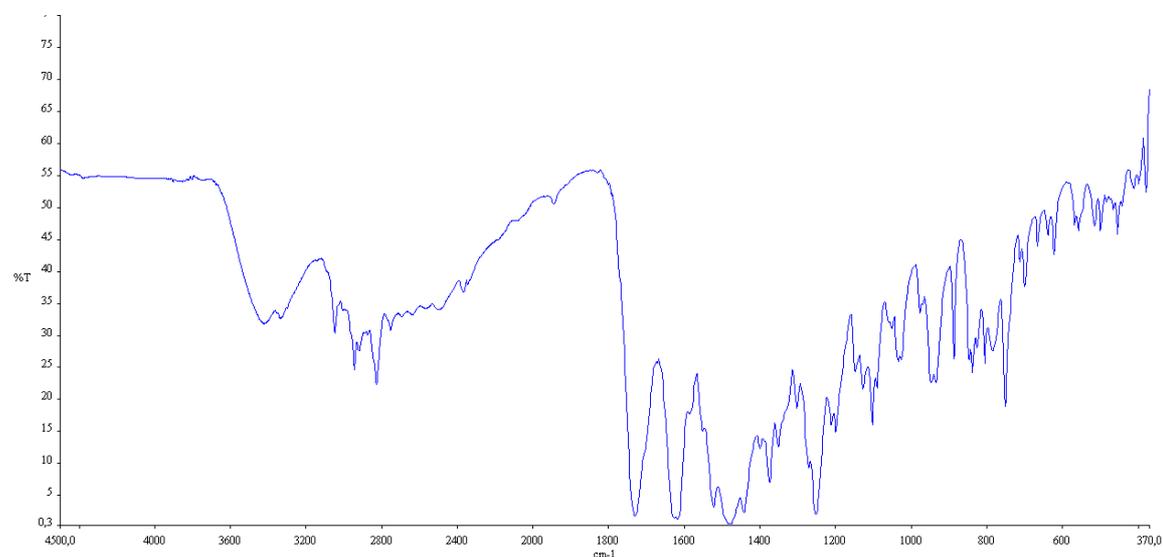


Figura 10 – Espectros de IV de Norfloxacina

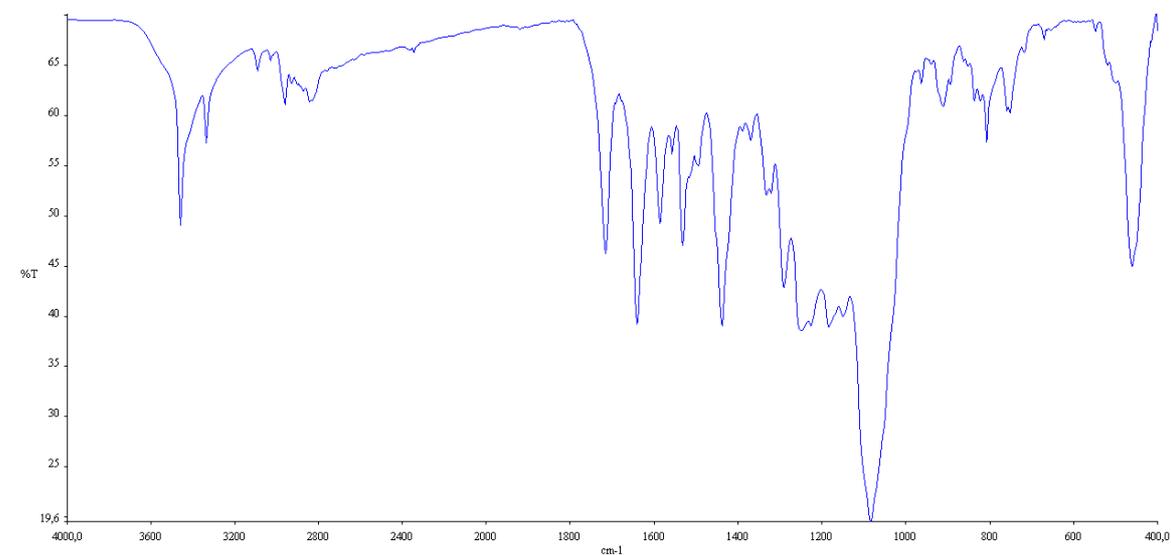


Figura 11 – Espectros de IV de Esparfloxacina

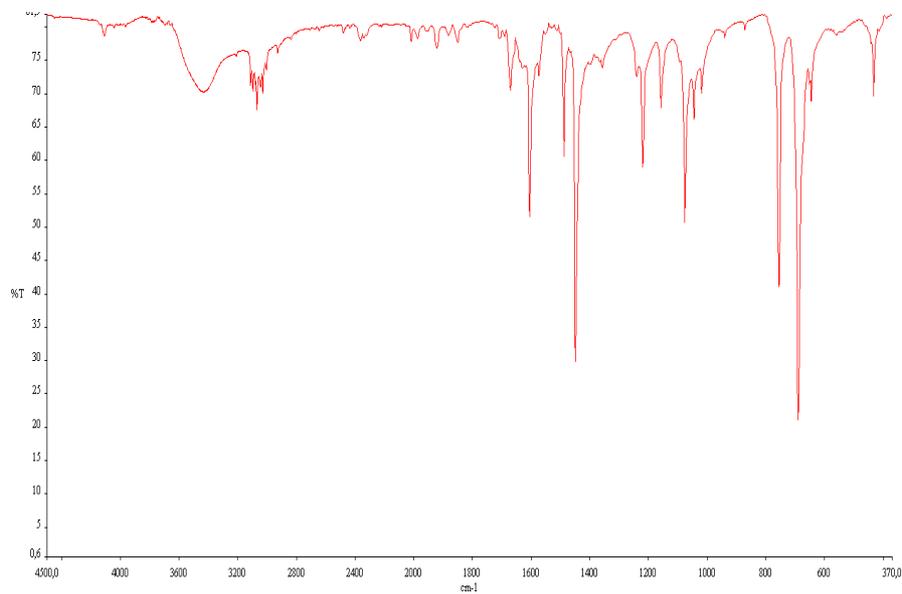


Figura 12 – Espectros de IV  $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$

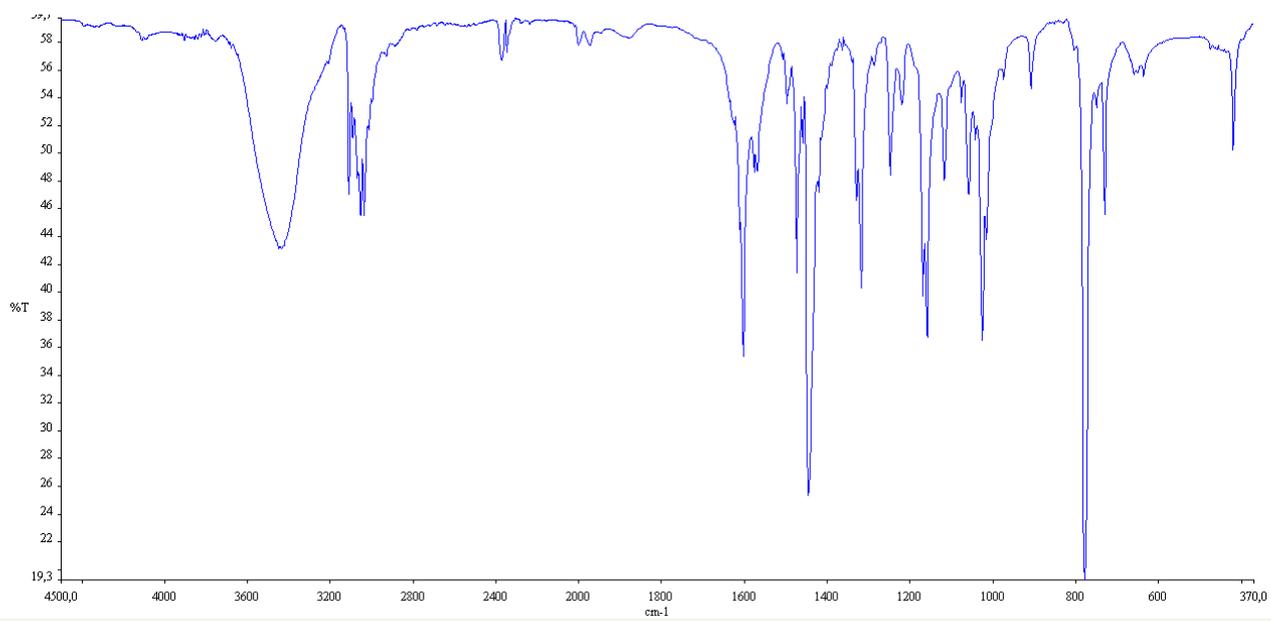


Figura 13 – Espectros de IV  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$

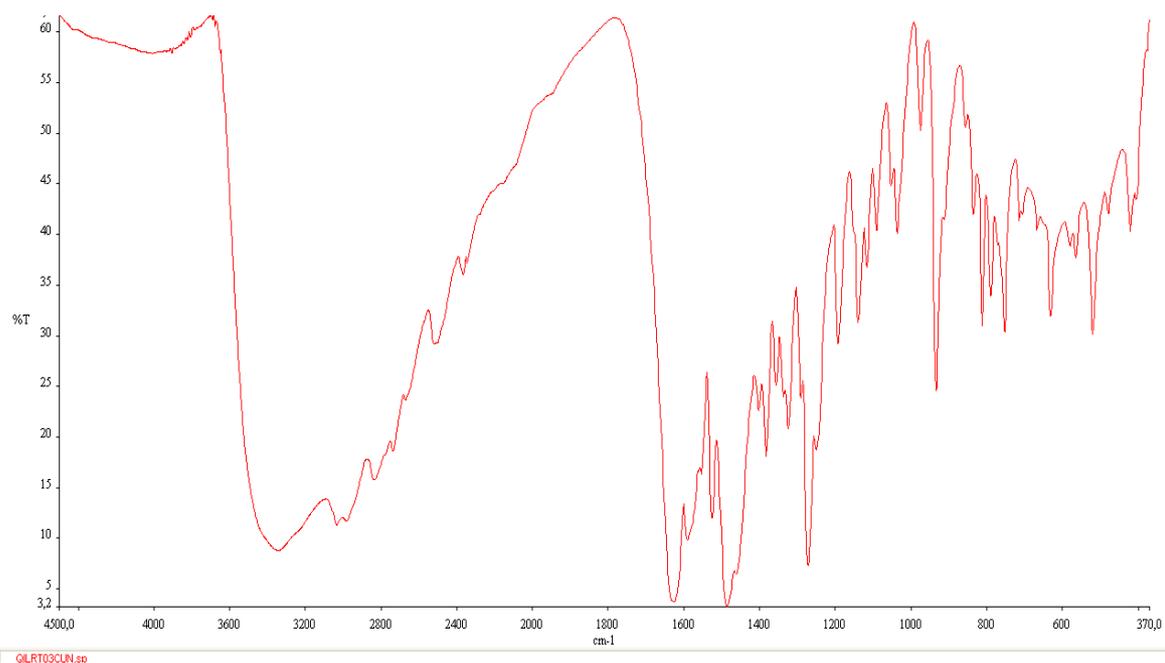


Figura 14 – Espectros de IV  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})].\text{H}_2\text{O}$  (1)

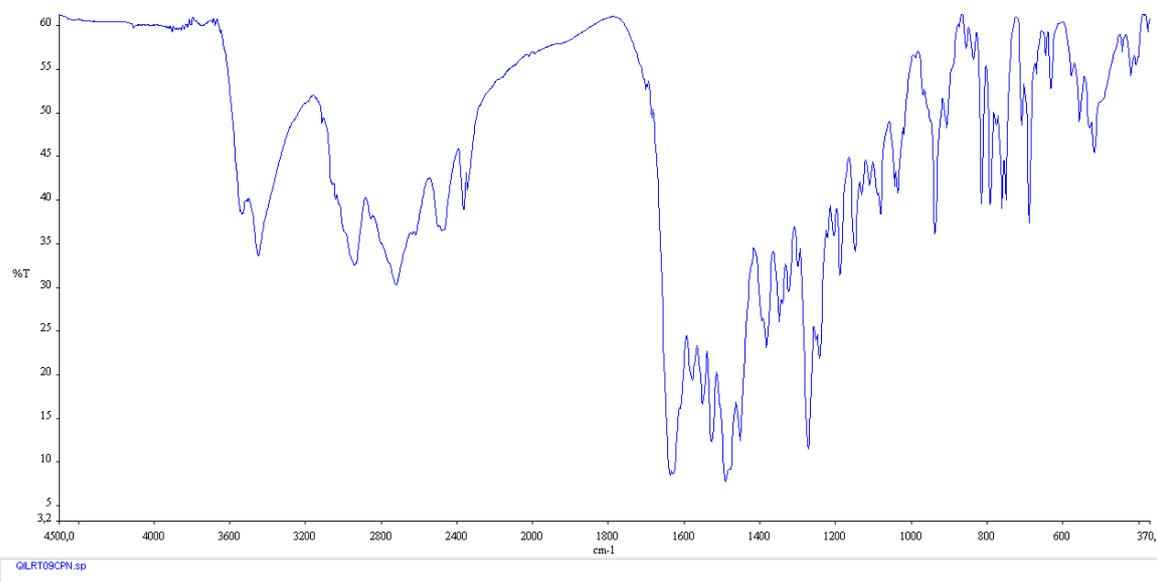


Figura 15 – Espectros de IV  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})].\text{H}_2\text{O}$  (2)

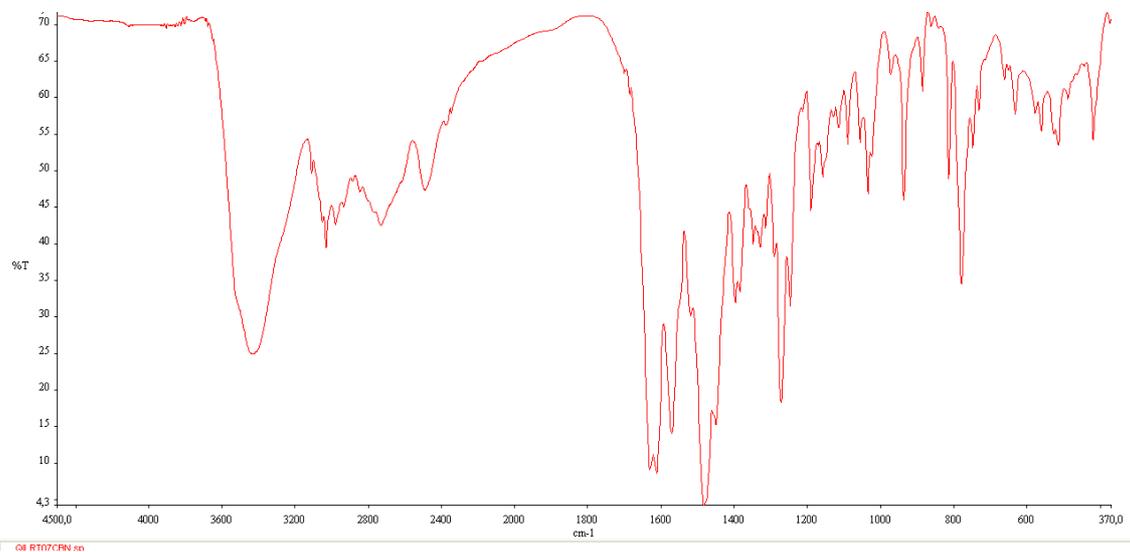


Figura 16 – Espectros de IV [CuCl(bipy)(NOR)]Cl.H<sub>2</sub>O (3)

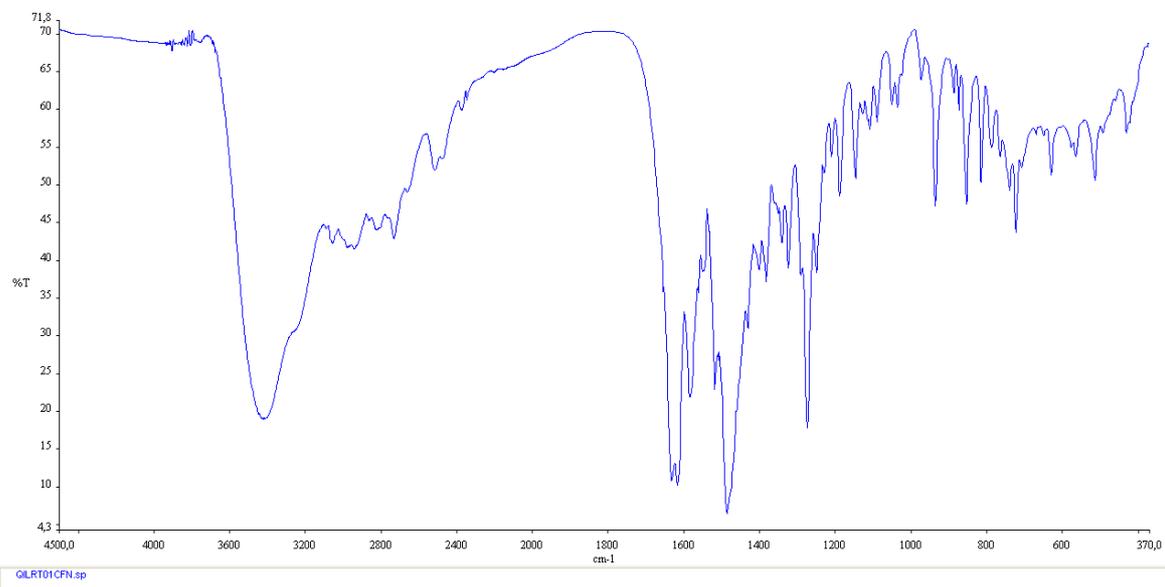


Figura 17 – Espectros de [CuCl<sub>2</sub>(fen)(NOR)].4H<sub>2</sub>O (4)

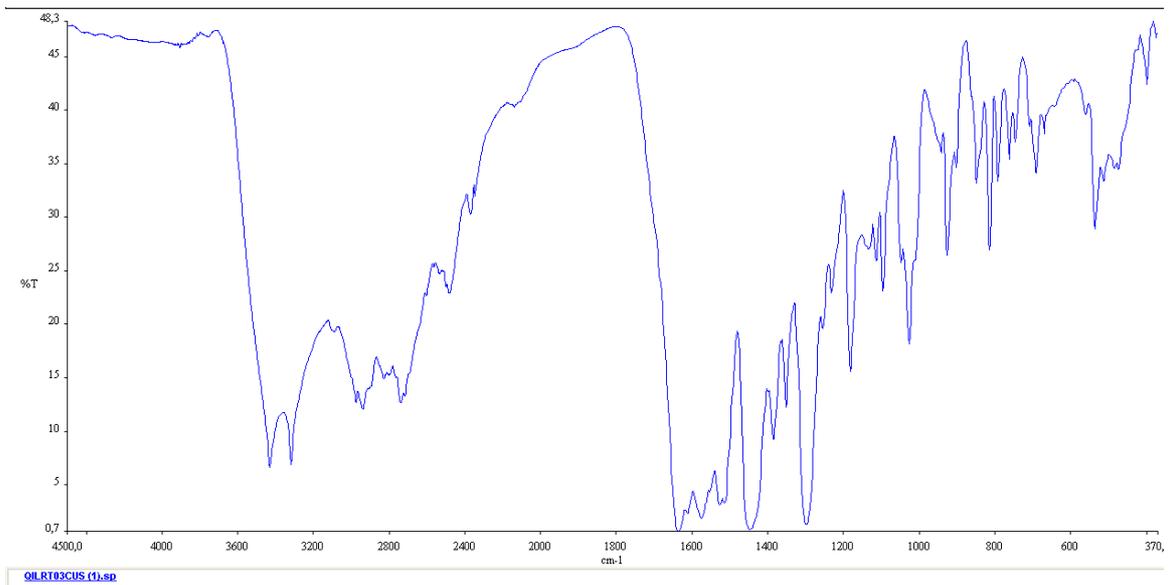


Figura 18 – Espectros de  $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{SPAR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (9)

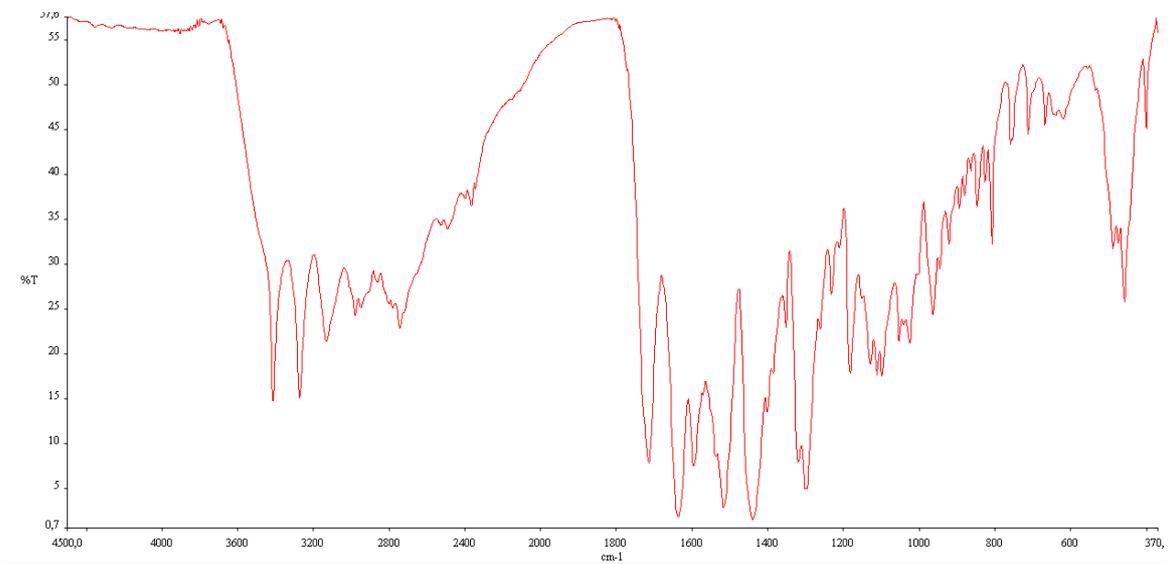


Figura 19 – Espectros de  $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{SPAR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (10)

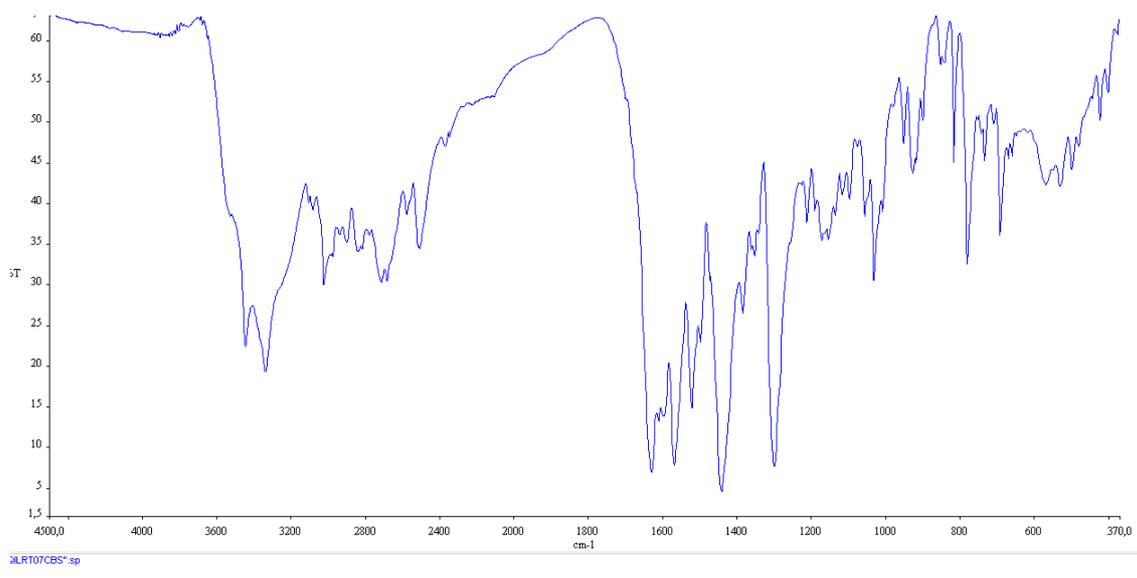


Figura 20 – Espectros de  $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{SPAR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (11)

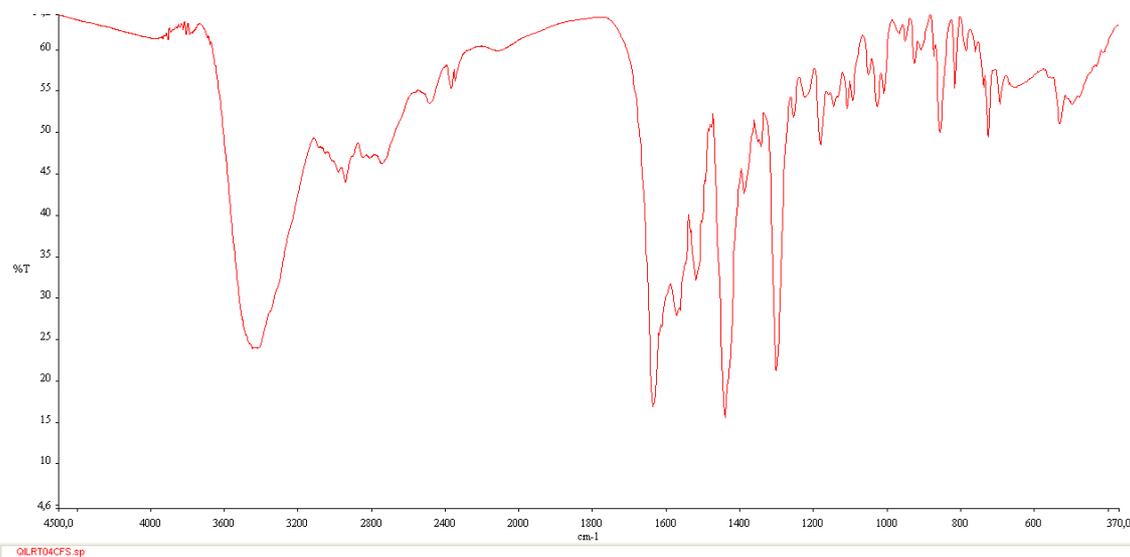


Figura 21 – Espectros de  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{SPAR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (12)