

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciência exatas

Departamento de química

Darliane Aparecida Martins

**Síntese, atividade biológica e estudos de interação com biomoléculas de
complexos metálicos de ligantes com interesse farmacológico**

Belo Horizonte
2016

UFMG/ ICEx/ DQ 1141^a

T. 512^a

DARLIANE APARECIDA MARTINS

Síntese, atividade biológica e estudos de interação com biomoléculas de complexos metálicos de ligantes com interesse farmacológico

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

Belo Horizonte
2016

M379s Martins, Darliane Aparecida
2016 Síntese, atividade biológica e estudos de interação
T com biomoléculas de complexos metálicos de ligantes
com interesse farmacológico [manuscrito] / Darliane
Aparecida Martins. 2016.
[xvii], 118 f. : il.

Orientadora: Letícia Regina de Souza Teixeira.
Coorientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro.

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

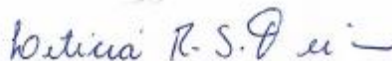
1. Química inorgânica - Teses 2. Antibióticos -
Teses 3. Schiff, Bases de - Teses 4. Compostos de
cobre - Teses 5. Ouro - Teses 6. DNA - Teses 7.
Albumina - Teses I. Teixeira, Letícia Regina de Souza,
Orientadora II. Louro, Sônia Renaux Wanderley,
Coorientadora III. Título.

CDU 043

"Síntese, Atividade Biológica e Estudos de Interação com Biomoléculas de Complexos Metálicos de Ligantes com Interesse Farmacológico"

Darliane Aparecida Martins

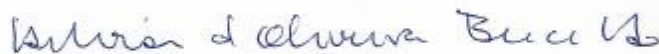
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Profa. Leticia Regina de Souza Teixeira - Orientadora
UFMG



Profa. Sônia Renaux Wanderley Louro - Coorientadora
PUC-RIO



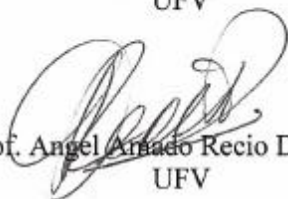
Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo
UFMG



Prof. Gilson de Freitas Silva
UFMG



Prof. Marcelo Ribeiro Leite de Oliveira
UFV



Prof. Angel Arnado Recio Despaigne
UFV

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho a minha família

Agradecimentos

Agradeço à toda a minha família por toda a compreensão, amor e apoio. Em especial aos meus pais, que me ajudaram em todas as etapas da minha formação.

À Professora Doutora Letícia Regina de Souza Teixeira pela orientação e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento.

À Professora Doutora Sônia Louro por todo conhecimento compartilhado e as várias contribuições para esse trabalho.

À professora Doutora Maria de Nazaré Soeiro que pelos testes de atividade *anti-T.cruzi*.

Aos professores Ângelo de Fátima e Cleiton Moreira da Silva que possibilitaram a síntese das bases de Schiff utilizadas neste trabalho.

Aos colegas de Laboratório que tornaram essa jornada mais agradável e contribuíram para o desenvolvimento da parte experimental desse trabalho. Especialmente à Ligiane, à Meiriane e ao Marcelo.

Aos amigos que se tornaram minha vida melhor compartilhando comigo momentos felizes e tristes.

Aos meus familiares que sempre me dedicaram atenção e oração apesar da minha ausência.

Aos funcionários do Departamento de química.

Ao CNPq, a Capes e a Fapemig pelo financiamento dessa pesquisa.

O trabalho descrito nesta tese foi realizado sob a orientação da Profa. Letícia Regina Teixeira e coorientação da Profa. Sônia R. W. Louro.

Síntese, atividade biológica e estudos de interação com biomoléculas de complexos metálicos de ligantes com interesse farmacológico

Resumo

Nesse trabalho oito complexos metálicos foram estudados sendo, quatro já relatados na literatura (**1-4**) e, quatro inéditos (**5-8**). Os complexos inéditos foram caracterizados por técnicas físico-químicas e espectrofotométricas: $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**), $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**4**), $[\text{AuS}(\text{CH}_3)_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (**5**), $[\text{Au}(\text{pyc})(\text{NOR})_2]2\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**6**), $[\text{CuCl}(\text{L1})(\text{phen})]\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (**7**) e $[\text{CuCl}(\text{L2})(\text{phen})]\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (**8**), onde NOR é o antibiótico da classe das fluorquinolonas norfloxacina, py é a piridina, bipy é a 2,2'-bipiridina, phen é a 1,10-fenantrolina, pyc é o ácido piridino-2-carboxílico e L1 e L2 representam as bases de Schiff 2-((5-nitrofurano-2-il)metilamino)fenol e 2-(4-nitrobenzilidenoamino)fenol, respectivamente.

Os complexos **3**, **4** e **7** mostraram promissora atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, sendo ativos em doses de 0,94 a 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os complexos **1-6** foram ativos contra diferentes cepas de bactérias, embora, em alguns casos a NOR livre tenha mostrado atividade superior. Os complexos **7** e **8** foram ativos frente a sete linhagens de células tumorais em doses menores que 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ou 3,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$). O complexo **7** mostrou-se ainda ativo contra algumas cepas de fungos.

Os complexos **1-8** interagiram com o DNA, sendo essas interações de fraca a moderada ($K_b \approx 10^3\text{-}10^4$). A interação dos complexos **1**, **7** e **8** ocorreu, provavelmente, por intercalação, e, os demais, provavelmente interagiram com a parte externa do DNA.

Os complexos **1-4**, **7** e **8** foram capazes de interagir com as albuminas séricas bovina (BSA) e humana (HSA). Essas interações foram moderadas e ocorreram, pelo menos em parte, por um mecanismo estático ($K_{sv} \approx 10^4\text{-}10^5$). Os complexos **5** e **6** interagiram com a HSA por um mecanismo, predominantemente, dinâmico e estático, respectivamente. Os valores negativos obtidos para a energia livre de Gibbs (ΔG) mostraram que **5** e **6** interagem espontaneamente com a HSA.

Palavras Chave: norfloxacina, bases de Schiff, cobre, ouro, DNA, albuminas, atividade biológica

Synthesis, biological activity and biomolecules interaction studies of metal complexes with bioactive ligands

Abstract

In the present work eight metal complexes were studied being four already related in the literature and, four new complexes. The new complexes were characterized using physico-chemical and spectroscopic techniques: $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**), $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**4**), $[\text{AuS}(\text{CH}_3)_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (**5**), $[\text{Au}(\text{pyc})(\text{NOR})_2]2\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**6**), $[\text{CuCl}(\text{L1})(\text{phen})]\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (**7**) and $[\text{CuCl}(\text{L2})(\text{phen})]\cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (**8**), where NOR is the fluoroquinolone antibiotic norfloxacin, py = pyridine, bipy = 2,2'-bipyridine, phen = 1,10-phenanthroline, pyc = piridin-2-carboxylic acid and L1 and L2 represent the Schiff bases 2-((5-nitrofuran-2-il)metilamino)fenol and 2-(4-nitrobenzilidenoamino) fenol.

Complexes **3**, **4** and **7** showed promising activity against *Tripanossoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease ($0.94 - 16 \mu\text{mol L}^{-1}$), whereas **1-6** proved to be active against different bacteria strains. In some cases, however, the free NOR demonstrated superior activity. Complexes **7** and **8** were active against seven cancer cell lines in doses lower than $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (or $3.4 \mu\text{mol L}^{-1}$), whilst **7** also showed antifungal activity in some fungi strains.

Complexes **1-8** interacted with DNA on a scale of weak to moderate ($K_b \approx 10^3-10^4$). The interaction of complexes **1**, **7** and **8** with DNA, which was perhaps due to intercalation, whilst the other complexes probably interacted with the DNA's external structure.

Complexes **1-4**, **7** and **8** Interacted with the bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins. These interactions were moderate and occurred, at least in part, through a static mechanism. Complexes **5** and **6** interacted with HSA through a mainly dynamic and static mechanism respectively. The negative values of Gibbs free energy (ΔG) showed that **5** and **6** interacted spontaneously with HSA.

Keywords: norfloxacin, Schiff bases, copper, gold, DNA, albumins, biological tests

Índice de Figuras

Figura 1.1	Representação da estrutura da flumequina com indicação de alguns átomos de carbono.	1
Figura 1.2	Representação da estrutura da norfloxacin com indicação de alguns átomos de carbono.	2
Figura 1.3	Representações das estruturas das fluorquinolonas (a) perfloxacin e fleroxacin e (b) esparfloxacin.	2
Figura 1.4	Representação da reação de obtenção das bases de Schiff (R = H, aril ou aquil).	3
Figura 1.5	Representações das estruturas das bases de Schiff (a) HL1 e (b) HL2	3
Figura 1.6	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 1.7	Representações das estruturas: (a) Nifurtimox e (b) Benznidazol	5
Figura 1.8	Representação da base de Schiff derivada de 5-nitroisoquinolina com atividade antimalárica.	6
Figura 1.9	Representações das estruturas química: do taxol (1), vimblastina (2), cisplatina (3), carboplatina (4).	7
Figura 1.10	Representação da estrutura de um complexo de Au(III) com uma base Schiff tetradentada.	8
Figura 1.11	Representação das estruturas das bases de Schiff e seus complexos de Cu(II)	9
Figura 1.12	Representação da estrutura do fluconazol	10
Figura 1.13	Representação da estrutura química do composto 2-(benzilidenoamino)fenol	11
Figura 1.14	Representação da estrutura química da cumarina (E)-7-(2-hidroxi-3,5-diiodobenzilidenoamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona e seu correspondente complexo com cobre.	11

Figura 1.15	Fita dupla do DNA, mostrando as cavidades menor e maior e as ligações de hidrogênio entre os pares de bases nitrogenadas Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) e Guanina (G)	12
Figura 1.16	Representações das estruturas secundárias das albuminas séricas bovina (BSA) e humana (HSA).	14
Figura 3.1	Equação de obtenção do complexo de Au(I) de norfloxacin (NOR) contendo dimetilsulfeto.	21
Figura 3.2	Equação de obtenção do complexo de Au(III) de norfloxacin (NOR) contendo ácido piridino-2-carboxílico.	21
Figura 3.3	Equações de obtenção de HL1 e de HL2	22
Figura 3.4	Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de fenantrolina de HL1	22
Figura 3.5	Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de fenantrolina de HL2	22
Figura 4.1	Estruturas propostas para os monômeros dos complexos (a) $[CuCl_2(H_2O)(NOR)]$ (1), (b) $[CuCl_2(py)(NOR)]$ (2), (c) $[CuCl(bipy)(NOR)]Cl$ (3) e (d) $[CuCl_2(phen)(NOR)]$ (4).	30
Figura 4.2	Espectros de fluorescência da BSA na ausência e na presença de quantidades crescentes de (a) $CuCl_2$, (b) $[CuCl_2(H_2O)(NOR)].H_2O$ (1), (c) $[CuCl_2(py)_2]$, (d) $[CuCl_2(py)(NOR)].H_2O$ (2), (e) $[CuCl_2(bipy)]$, (f) $[CuCl(bipy)(NOR)]Cl.2H_2O$ (3), (g) $[CuCl_2(phen)]$, (h) $[CuCl_2(phen)(NOR)].3H_2O$ (4), (i) NOR. A concentração das albuminas foi de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, temperatura 296 K.	34
Figura 4.3	Espectros de fluorescência da HSA na ausência e na presença de quantidades crescentes de (a) $CuCl_2$, (b) $[CuCl_2(H_2O)(NOR)].H_2O$ (1), (c) $[CuCl_2(py)_2]$, (d) $[CuCl_2(py)(NOR)].H_2O$ (2), (e) $[CuCl_2(bipy)]$,	36

	(f) $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3), (g) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$, (h) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4), (i) NOR. Temperatura 296 K	
Figura 4.4	Retas de Stern-Volmer para a interação da BSA com (a) 38 CuCl_2 , (b) $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (1), (c) $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$, (d) $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (2), (e) $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$, (f) $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3), (g) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$, (h) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4) e (i) NOR.	
Figura 4.5	Retas de Stern-Volmer para a interação da HSA com (a) 39 CuCl_2 , (b) $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (1), (c) $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$, (d) $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (2), (e) $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$, (f) $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3), (g) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$, (h) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4) e (i) NOR.	
Figura 4.6	Espectro de EPR, banda X, para Cu(II)-HSA e Cu(II)-BSA (a 43 e b, respectivamente) e para os precursores Cu(II)-bipy e Cu(II)-phen com HSA (c e d, respectivamente). A concentração de Cu, HSA e BSA é de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, 77 K. (b') e (c') são os espectros simulados de b e c utilizando o programa <i>easyspin</i> (Stoll e Schweiger, 2006). Os parâmetros são mostrados na Tabela 4.8.	
Figura 4.7	Espectro de EPR, banda X, para o complexo 3 , Cu(II)-bipy, 45 complexo 4 e Cu(II)-phen com quantidades equimolares de HSA ou BSA (concentração $0,5 \text{ mmolL}^{-1}$, pH 7,4, 77K). (a) 3 :HSA; (b) Cu(II)-bipy:HSA; (c) 3 :BSA; (d) Cu(II)-bipy:BSA; (e) 4 :HSA; (f) Cu(II)-phen:HSA; (g) 4 :BSA; (h) Cu(II)-phen:BSA.	
Figura 4.8	Espectros de absorção de (a) norfloxaciana, 47 (b) $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (1), (c) $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (2), (d) $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3) e (e) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4) na ausência e na presença de concentrações crescentes de DNA (período de	

incubação = 30 minutos). Reta inserida – plotagem de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}] \text{ mol L}^{-1}$. $[\text{DNA}] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{composto}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a temperatura ambiente.

Figura 5.1	Representação da estrutura da norfloxacin	54
Figura 5.2	Representação das estruturas propostas para os complexos (a) $[\text{AuS}(\text{CH}_3)_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (5) e (b) $[\text{Au}(\text{pyc})(\text{NOR})_2]\text{Cl}_2$ (6).	54
Figura 5.3	Espectros de absorção de (a) norfloxacin, (b) complexo 5 e (c) complexo 6 na ausência e na presença de concentrações crescentes de DNA (período de incubação = 30 minutos). Reta inserida – plotagem de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}] \text{ mol L}^{-1}$. $[\text{composto}] = 3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a temperatura ambiente.	56
Figura 5.4	Espectros de fluorescência da HSA na ausência e na presença de quantidades crescentes de (a) norfloxacin a 25 °C, (b) complexo 5 a 298 K, (c) complexo 5 a 310 K, (d) complexo 6 a 298 K e (e) complexo 6 a 310 K. A concentração das albuminas foi de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	58
Figura 5.5	Gráfico de $\log\{(F_0-F)/F\}$ versus [Complexo] nas duas temperaturas 25 °C (linha azul) e 37 °C (linha vermelha) para (a) complexo 5 e (b) complexo 6	61
Figura 6.1	Representações das estruturas das bases de Schiff (a) HL1 e (b) HL2	65
Figura 6.2	Espectro de RMN de ^1H para HL1 (200MHz, DMSO- d_6).	66
Figura 6.3	Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 de HL1 (200 MHz, DMSO- d_6).	67
Figura 6.4	Espectros de absorção na região do UV-visível para os complexos (a) 7 e (b) 8 na mistura DMSO/tampão fosfato e concentração de 5×10^{-5} e em DMSO na concentração de $1,5 \times 10^{-3}$	70

Figura 6.5	Espectros de EPR, banda X, para 7 e 8 (em MeOH:DMSO 1:1, temperatura 77 K)	71
Figura 6.6	Estruturas propostas para (a) [CuCl(L1)(phen)] (7) e (b) [CuCl(L2)(phen)] (8)	72
Figura 6.7	Porcentagens de crescimentos de diferentes linhagens de células de tumores humanos após 48 horas de incubação, na presença de diferentes concentrações da doxorrubina.	75
Figura 6.8	Porcentagens de crescimentos de diferentes linhagens de células de tumores humanos após 48 horas de incubação, na presença de: (a) HL1 , (b) HL2 , (c) 7 , (d) 8 , (e) [CuCl ₂ (phen)] e (f) 1,10-fenantrolina.	76
Figura 6.9	Espectros de absorção de (a) HL2 e (b) [CuCl(L2)(phen)].2,5H ₂ O na ausência e na presença de concentrações crescentes de DNA (período de incubação = 30 minutos). Reta inserida – plotagem de [DNA]/(ε _a - ε _f) versus [DNA] x 10 ⁵ mol L ⁻¹	80
Figura 6.10	Espectros de fluorescência das albuminas na ausência e na presença de quantidades crescentes das bases de Schiff e as retas de Stern-Volmer. (a) BSA – HL1 , (b) BSA – HL2 , (c) HSA – HL1 e (d) HSA – HL2 , a 310 K.	82
Figura 6.11	Espectros de fluorescência das albuminas na ausência e na presença de quantidades crescentes dos complexos de Cu(II) de base de Schiff e as retas de Stern-Volmer. (a) BSA - complexo 7 , (b) BSA – complexo 8 , (c) HSA – complexo 7 e (d) HSA – complexo 8 , a 310 K.	83

Índice de Tabelas

Tabela 3.1	Fórmulas moleculares, massas molares, faixa de decomposição (°C) e rendimento das reações dos complexos de Au(I) e Au(III) de Norfloxacin, das base de Schiff e seus complexos de Cu(II).	23
Tabela 4.1	Dados de análise elementar (valores calculados entre parênteses) para os complexos de Cu(II).	30
Tabela 4.2	- Atividade (média \pm SD) e índice de seletividade (IS) para os precursores, a norfloxacin 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)	31
Tabela 4.3	Valores de IC ₅₀ (μ mol L ⁻¹) para a NOR, para os complexos de Cu(II) e para o precursor [CuCl ₂ (phen)] frente a oito linhagens de bactérias	32
Tabela 4.4	Valores das constantes de Stern-Volmer, K _{sv} (L mol ⁻¹) e os coeficientes de linearidade, R ² , para as titulações das albuminas BSA e HSA com os precursores e os complexos de Cu(II) de NOR, a 296 K.	41
Tabela 4.5	Parâmetros de EPR obtidos simulando a interação dos complexos e precursores de Cu(II) com as albuminas	46
Tabela 4.6	Constantes de ligação (K _b) para a interação do DNA com a norfloxacin e seus complexos de Cu(II)	49
Tabela 5.1	Dados de análise elementar e condutividade para os complexos de Au(I) e Au(III) de NOR.	52
Tabela 5.2	Principais deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C para a NOR e seus complexos de Au(I) e Au(III), em DMSO-d ⁶ , 400 MHz.	54

Tabela 5.3	Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) para a os complexos de Au(I) e Au(III) de norfloxacin frente a quatro linhagens de bactérias.	55
Tabela 5.4	Constantes de ligação (K_b) e coeficientes de linearidade (R^2) para a interação da norfloxacin e dos complexos de Au(I) e Au(III) com o DNA.	57
Tabela 5.5	Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv} , L mol^{-1}) e dos coeficientes de linearidade, R^2 , para as titulações da HSA com a norfloxacin e seus complexos de ouro, a 298 e 310 K.	60
Tabela 5.6	Valores das constantes de ligação (K_a), número de sítios ligantes (n) e coeficientes de linearidade (R^2) em 298 e 310 K.	62
Tabela 5.7	Parâmetros termodinâmicos associados à interação dos complexos de ouro de NOR com HSA em diferentes temperaturas.	63
Tabela 6.1	Temperatura de fusão ou decomposição e dados de análise elementar (valores calculados entre parênteses).	65
Tabela 6.2	Principais deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para as bases de Schiff, em DMSO-d^6 , 200 MHz.	67
Tabela 6.3	Dados de análise elementar (valores calculados entre parênteses) e condutividade para os complexos de Cu(II).	68
Tabela 6.4	Principais números de ondas (cm^{-1}) e atribuições de bandas na região do infravermelho para as bases de Schiff livres e seus complexos de Cu(II).	69
Tabela 6.5	Parâmetros de EPR dos complexos de Cu(II) em solução a 77K.	72

Tabela 6.6	Atividade (media \pm SD) e índice de seletividade (IS) para o sal de Cu(II), o precursor [CuCl ₂ (phen)], as bases de Schiff 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).	73
Tabela 6.7	Valores de CI ₅₀ (μ mol mL ⁻¹) obtidos para, o [CuCl ₂ (phen)], a fenantrolina, as bases de Schiff, seus complexos de Cu(II) e a droga de referência doxorubicina frente a diferentes linhagens tumorais (os índices de seletividade são mostrados entre parênteses).	78
Tabela 6.8	Concentração inibitória mínima (CIM) para as bases de Schiff, seus complexos de Cu(II) e a droga de referência fluconazol frente aos fungos <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Aspergillus niger</i>	79
Tabela 6.9	Valores das constantes de associação (K _b) das bases de Schiff livres e de seus complexos de Cu(II) com a DNA, em pH 7,4 e o coeficiente de linearidade das retas (R ²).	81
Tabela 6.10	Valores das constantes K _{sv} (L mol ⁻¹) e K _q (L mol ⁻¹ s ⁻¹) para a interação entre as bases de Schiff livres, seus complexos e Cu(II) e as albuminas (BSA e HSA) na temperatura de 310 K.	84

Índice de Abreviaturas e Siglas

A. fumigatus = *Aspergillus fumigatus*

A. niger = *Aspergillus niger*

Abs. = absorvância

BC = *Bacillus cereus*

Bipy = 2'2' - bipyridina

BSA = albumina sérica bovina

C. albicans = *Candida albicans*

C. krusei = *Candida krusei*

CF = *Citrobacter freundii*

CHN = análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio

CIM = concentração inibitória mínima

CT-DNA = ácido desoxirribonucléico de timo de bezerro

Cys = cisteína

DEPT = intensificação da distorção por transferência de polarização

DMF = N,N-dimetilformamida

DMSO = dimetilsulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucléico

EC = *Escherichia coli*

EC₅₀ = concentração necessária para matar 50% dos parasitas

EPR = ressonância paramagnética eletrônica

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

ϵ_b = coeficiente de extinção do composto ligado ao DNA;

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

F = a intensidade de fluorescência

F_0 = a intensidade de fluorescência na ausência do agente de extinção

HACaT = queratócitos

HL1 = 2-((5-nitrofurano-2-il)metilamino)fenol

HL2 = 2-(4-nitrobenzilidenoamino)fenol

HSA = albumina sérica humana

HT29 = linhagem de câncer colorretal

IC_{50} = concentração necessária para inibir 50% da atividade

IS = índice de seletividade

IV = infravermelho

K = kelvin

K_a = constante de ligação

K_b = constante de interação composto/droga

k_q = constante de velocidade de supressão bimolecular

K_{SV} = constante de Stern-Volmer

LC_{50} = concentração que diminui em 50% a viabilidade das células saudáveis

LM = *Listeria monocytogenes*

MCF7 = linhagem de câncer de mama

n = número de sítios de ligação

NCI/ADR-RES = linhagem de câncer de ovário resistente

NCI-H460 = linhagem de câncer de pulmão

NOR = norfloxacin

PA = *Pseudomonas aeruginosa*

PC-3 = linhagem de câncer de próstata

phen = 1,10- fenantrolina

Py = piridina

pyc = ácido piridino-2-carboxílico

Q = agente supressor de fluorescência

R^2 = coeficiente de correlação

RMN de ^{13}C = ressonância magnética nuclear de carbono

RMN de ^1H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SA = *Staphylococcus aureus*

SD = desvio padrão

SS = *Salmonella shigella*

ST = *Salmonella typhi*

T. cruzi = *Tripanosoma cruzi*

TG/DTG = análise termogravimétrica / Análise Térmica Diferencial

Trp = triptofano

U251 = linhagem de melanoma

UV-Vis. = ultravioleta-visível

δ = deslocamento químico

λ = comprimento de onda

ν = estiramento

ν_{ass} = estiramento assimétrico

ν_{s} = estiramento simétrico

τ_0 = o tempo de vida

786-0 = linhagem de câncer de rim

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Fluorquinolonas e Bases de Schiff	1
1.2	A doença de Chagas	3
1.3	O Câncer	6
1.4	Bactérias e Fungos	9
1.5	Interação com alvos biológicos	11
2	OBJETIVO	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Reagentes	18
3.2	Equipamentos	18
3.3	Sínteses	20
3.3a	Complexos de Cu(II) de norfloxacin e coligantes nitrogenados	20
3.3b	Sínteses dos complexos de Au(I) e Au(III) de norfloxacin	20
3.3c	Sínteses das bases de Schiff	21
3.3d	Síntese dos complexos de Cu(II) de bases de Schiff	22
3.4	Testes de atividade anti- <i>T. cruzi</i>	23

3.5	Avaliação da atividade antiproliferativa contra células de tumores humanos	24
3.6	Teste de atividade antibacteriana	25
3.7	Avaliação da atividade antifúngica	26
3.8	Estudos de interação com DNA <i>calv-</i> <i>thymus</i> (CT DNA)	27
3.9	Estudos de interação com a Albumina sérica Bovina (BSA) e a albumina sérica Humana (HSA) utilizando fluorescência	28
3.10	Estudos de interação com as albuminas utilizando EPR	28
4	COMPLEXOS DE Cu(II) DE NORFLOXACINA: ATIVIDADE BIOLÓGICA E ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM ALBUMINAS E DNA	29
4.1	Dados de análise elementar e análise térmica para os complexos de Cu(II)	30
4.4	Testes de atividade anti <i>T.cruzi</i> dos complexos de Cu(II) de norfloxacin	31
4.5	Testes de atividade antibacteriana dos complexos de Cu(II) de norfloxacin	32
4.6	Estudo da interação entre os complexos de Cu(II) de norfloxacin e as albuminas bovina e humana utilizando fluorescência	33
4.7	Estudo da interação entre os complexos de Cu(II) de norfloxacin e as albuminas bovina e humana utilizando ressonância paramagnética eletrônica	42
4.8	Interação da norfloxacin e de seus complexos de Cu(II) com o DNA	46
4.9	Conclusão	50

5	COMPLEXOS DE Au(I) E Au(III) DE	51
	NORFLOXACINA: SÍNTESES, ATIVIDADE	
	ANTIMICROBIANA E INTERAÇÃO COM	
	DNA E ALBUMINA HUMANA	
5.1	Dados de microanálise e medidas de	52
	condutividade	
5.2	Espectroscopia na região do infravermelho	52
5.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética	53
	Nuclear (RMN) para os complexos de Au(I)	
	e Au(III) de norfloxacina	
5.4	Testes de atividade antibacteriana para a	55
	NOR e seus complexos de ouro	
5.5	Interação das norfloxacina e de seus	56
	complexos de Au(I) e Au(III) com o DNA	
5.6	Interação das norfloxacina e de seus	58
	complexos com a albumina	
5.7	Conclusão	63
6	COMPLEXOS DE Cu(II) DE BASES DE	64
	SCHIFF: SÍNTESES, ATIVIDADE BIOLÓGICA	
	E INTERAÇÃO COM DNA E ALBUMINAS	
6.1	Caracterização das bases de Schiff livres	65
6.2	Dados de microanálises, condutividade e	67
	análise térmica para os complexos de	
	Cu(II)	
6.3	Espectroscopia na Região do	68
	Infravermelho e no UV-visível dos	
	complexos de Cu(II)	

6.4	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) para os complexos de Cu(II)	70
6.5	Testes de Atividade anti- <i>T.cruzi</i> para as bases de Schiff e seus complexos de Cu(II)	72
6.6	Testes de Atividade antiproliferativa para as bases de Schiff e seus complexos de Cu(II)	74
6.7	Testes de Atividade antifúngica para as bases de Schiff e seus complexos de Cu(II)	79
6.8	1.1 Interação dos complexos das bases de Schiff e seus complexos de Cu(II) com o DNA	80
6.9	1.2 Interação dos complexos de Cu(II) de base de Schiff com as albuminas	81
6.10	1.3 Conclusão	85
7	CONCLUSÕES FINAIS	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1.1 – Fluorquinolonas e Bases de Schiff

As quinolonas são antibióticos que desde a sua descoberta, na década de 1960, despertaram interesse científico e clínico. Isso porque, as quinolonas combinam um amplo espectro de atividade com boa biodisponibilidade oral (Andersson e Macgowan, 2003).

As fluorquinolonas são quinolonas que possuem um átomo de flúor na posição C-6. A primeira fluorquinolona a ser patenteada foi a flumequina (Figura 1.1), em 1973, sugerindo que esta classe poderia ser utilizada no combate a infecções bacterianas (Appelbaum e Hunter, 2000).

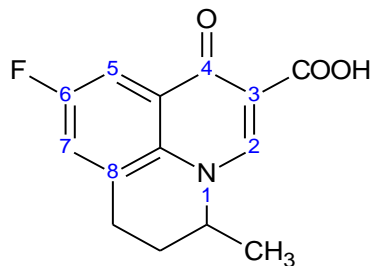


Figura 1.1 – Representação da estrutura da flumequina com indicação de alguns átomos de carbono.

O grande avanço da quimioterapia antibacteriana das fluorquinolonas ocorreu no final da década de 1970, quando foi demonstrado que a introdução de um átomo de flúor na posição C-6 e um grupo piperazina na posição C-7 conferiu um amplo e potente espectro de atividade antimicrobiana. Obteve-se, assim, a norfloxacin (Figura 1.2), patenteada em 1978, sendo a primeira fluorquinolona a apresentar potente atividade antibacteriana (Souza *et al.*, 2004; Appelbaum e Hunter, 2000).

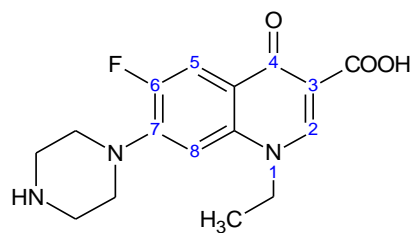


Figura 1.2 - Representação da estrutura da norfloxacin com indicação de alguns átomos de carbono.

Várias substituições têm sido feitas em diferentes posições do anel quinolônico, no entanto, as posições críticas para a atividade biológica são C-6 (contendo um átomo de flúor), C-7 (contendo grupos piperazina 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 antibacteriana como a perfloxacin, feroxacin e a esparfloxacin (Figura 1.3) (Souza *et al.*, 2004).

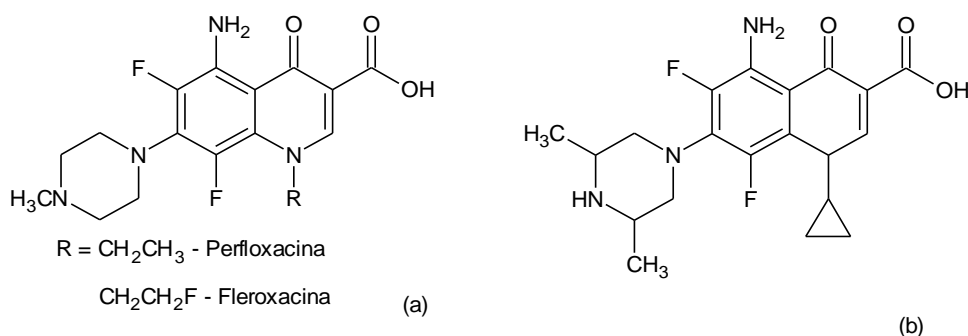


Figura 1.3 - Representações das estruturas das fluorquinolonas (a) perfloxacin e feroxacin e (b) esparfloxacin.

As fluorquinolonas também vêm sendo estudadas devido à sua capacidade quelante e suas aplicações como agentes antituberculose, antiparasitários e antitumorais (Appelbaum e Hunter, 2000; Uivarosi, 2013).

As aldiminas, também conhecidas como bases de Schiff, compreendem uma das mais versáteis classes de substâncias orgânicas. Essas substâncias são caracterizadas pela presença do grupo funcional HC=N (Silva *et al.*, 2011). Em 1864 Hugo Schiff descreveu que a condensação entre um aldeído e uma amina conduzia a uma base de Schiff, como representado na Figura 1.4 (Cozzi, 2004).

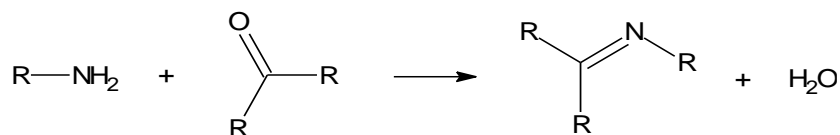


Figura 1.4 - Representação da reação de obtenção das bases de Schiff (R = H, aril ou aquil).

As principais aplicações das bases de Schiff são como pigmentos, corantes, catalisadores, intermediários em sínteses orgânicas e estabilizadores de polímeros. Além destas aplicações as bases de Schiff apresentam um amplo espectro de atividade biológica, incluindo atividade antifúngica, antimalárica, antiproliferativa, anti-inflamatória, antiviral e antipirética (Silva *et al.*, 2011).

As bases de Schiff são capazes de se coordenar aos metais pelo grupo imínico e por um outro grupo. A maioria das bases de Schiff se coordena através de átomos de oxigênio e nitrogênio formando complexos estáveis com diversos metais de transição em vários estados de oxidação (Cozzi, 2004). A Figura 1.5 apresenta as estruturas das bases de Schiff 2-((5nitrofurano-2-il)metilenoamino)fenol (**HL1**) e 2-(4-nitrobenzilidenoamino)fenol (**HL2**).

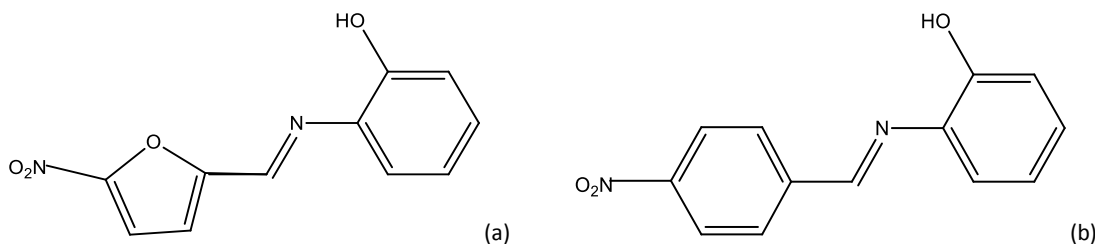


Figura 1.5 – Representações das estruturas das bases de Schiff (a) **HL1** e (b) **HL2**

1.2 - A doença de Chagas

As doenças parasitárias afetam milhares de pessoas. A maioria das mortes devido a doenças parasitárias ocorre no hemisfério Sul, em regiões predominantemente pobres. 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). 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 ser clara 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).

A tripanossomíase americana, ou doença de Chagas, é uma doença zoonótica causada pelo 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). Casos de transmissão alternativos, por transplantes de órgãos ou acidentes laboratoriais, também podem ser identificados (Dias e Dessoy, 2009).

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, 1966). As formas evolutivas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares são as formas relevantes para a infecção humana (Figura 1.6).

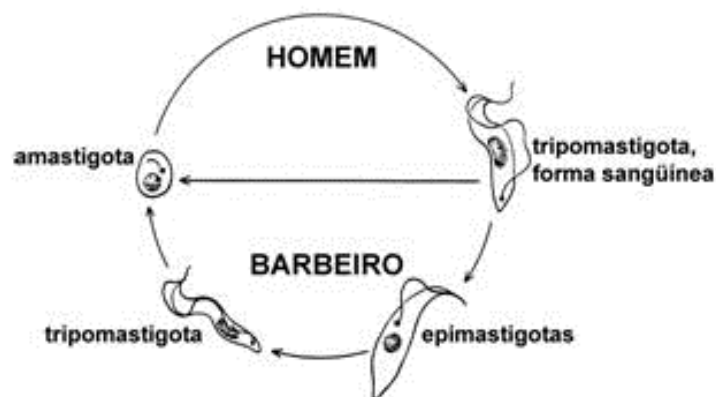


Figura 1.6 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

No final da década de 1960 e início de 1970 dois novos fármacos 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, do Benznidazol, desenvolvido por Richle (Figura 1.7) 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 o Benznidazol, [(N-benzil-2-nitro-1-imidazoleacetamido)], é comercializado com o nome de Rochagan®, no Brasil, e Radanil® na Argentina (Dias e Dessoy, 2009). Esses fármacos contêm um grupo nitro (NO₂) e o mecanismo de ação de ambos envolve a redução desse grupo, com a formação de radicais tóxicos para o parasita (Rodríguez *et al.*, 2009). No entanto, o nifurtimox e o benznidazol causam efeitos colaterais severos, precisam ser utilizados por um longo período e não são eficazes na fase crônica da doença de Chagas (Dias e Dessoy, 2009).

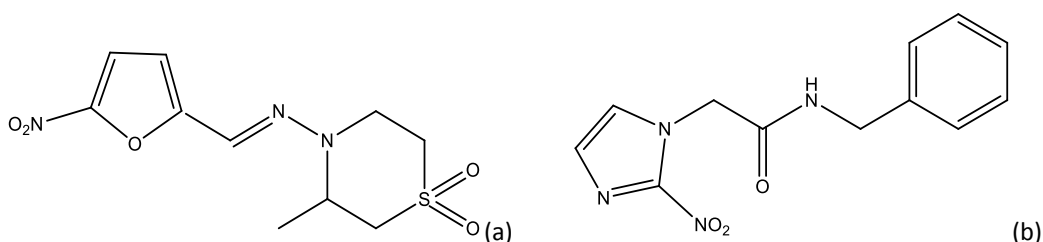


Figura 1.7 – Representações das estruturas: (a) Nifurtimox e (b) Benznidazol

A busca por novos candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas continua na tentativa de obter-se compostos que sejam mais eficazes nos casos agudos e crônicos da doença, que sejam ativos com doses menores, em curto prazo e que não produzam efeitos colaterais importantes.

Uma alternativa na busca de novos fármacos efetivos contra o *T. cruzi* é o estudo de agentes quimioterápicos, já utilizados na clínica ou em estudos pré-clínicos para outros patógenos. Entre estes agentes estão as fluorquinolonas, cuja atividade antiparasitária já foi descrita na literatura contra a *Leishmanian panamensis* (Cortazar, Coombs e Walker, 2007), o *T. brucei*. (Nernortas, Burri e Shapiro, 1999) e o *T. cruzi*, (Gouvea *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2012).

Nosso grupo de pesquisa estudou a atividade anti-*T.cruzi* de complexos de Cu(II), Co(II), Mn(II) e Zn(II) de fluorquinolonas de estruturas variadas e mostrou que a

complexação, na maioria dos casos, aumenta a atividade desses ligantes. Além disso, mostrou que a introdução de coligantes nitrogenados, tais como, 2,2'-bipiridina e 1,10-fenantrolina promove o aumento da atividade biológica. (Batista *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012; Gouvea *et al.*, 2013).

Na literatura são encontrados alguns exemplos de bases de Schiff ativas contra o *Plasmodium falciparum*, protozoário causador da malária. Rathelot e colaboradores (1995) descreveram a síntese de bases de Schiff derivadas de 5-nitroisoquinolinas e investigaram a atividade desses compostos em cepas do *P. falciparum* resistentes a cloroquina, [6-cloro-4-(4-dietil-amino-1-metilbutilamino)-quinolina], fármaco usado no tratamento da malária. Dentre os compostos testados, o derivado mostrado na Figura 1.8 foi o mais ativo com valor de $IC_{50} = 0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ (IC_{50} = concentração de composto necessária para inibir 50% do crescimento do parasito).

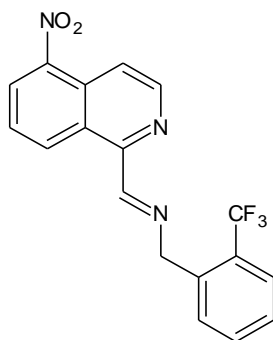


Figura 1.8 – Representação da base de Schiff derivada de 5-nitroisoquinolina com atividade antimalárica.

Arancibia e colaboradores (2013) sintetizaram uma série de novos complexos de bases de Schiff derivadas de 5-nitroheterocíclicos, que foram ativos frente as formas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*. Alguns desses complexos foram mais ativos que o nifurtimox.

1.3 – O Câncer

Câncer é um conjunto de doenças, causadas pela multiplicação descontrolada de células anormais que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se pelo corpo (Fontes, César e Beraldo, 2005). De modo geral, mutações em genes relacionados com o surgimento de tumores, sejam malignos ou benignos, determinam a ativação de suas funções, as quais passam a ocorrer independentemente da existência de estímulos (Reis, 2006).

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Atualmente os principais tipos de tratamento do câncer são a radioterapia, a cirurgia e a quimioterapia. A quimioterapia do câncer utiliza-se tanto de compostos orgânicos, como o taxol e a vimblastina, quanto de complexos metálicos, como o *cis*-diaminodicloroplatina(II), o cisplatina, e a carboplatina (Figura 1.9) (Fontes, César e Beraldo, 2005)

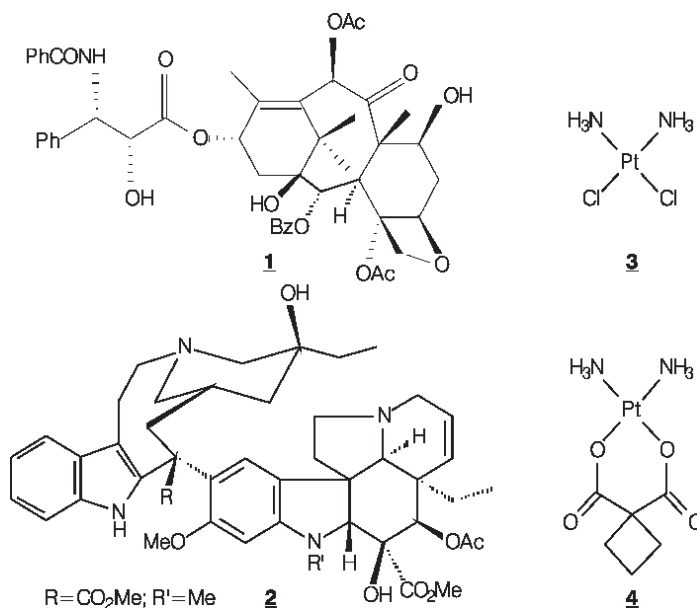


Figura 1.9 – Representações das estruturas química: do taxol (1), vimblastina (2), cisplatina (3), carboplatina (4). (Figura extraída da referência Fontes, César e Beraldo, 2005)

Dentre os compostos orgânicos, as bases de Schiff têm sido estudadas nos últimos anos, como uma possível classe de agentes quimioterápicos.

Kamel e colaboradores (2010) avaliaram a atividade citotóxica de uma série de aldiminas obtidas a partir da condensação entre a 4-amino-N-piridin-2-ilbenzenossulfonamida com diferentes monossacarídeos ou aldeídos aromáticos. As aldiminas apresentaram pronunciado efeito citotóxico frente às linhagens de células tumorais de carcinoma de mama (MCF7) e de colo de útero (HELA). Os melhores resultados foram obtidos para a aldimina N-(p-metoxifenilideno)-imino-4-[(piridin-2-ilamino)sulfonil]benzeno, que apresentou valores de IC₅₀ para as linhagens HELA e MCF7 de 1,88 e 0,74 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Esses valores são similares àqueles obtidos para o fármaco de referência 5-fluorouracil (1,01 e 0,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para MCF7 e HELA) e, significativamente, inferiores àqueles apresentados pela doxorubicina (8,72 e 6,71 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para MCF7 e HELA).

Cheng e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antiproliferativa de oito hidroxialdiminas contra células de hepatoma humano (HepG2) e mostraram que essas hidroxialdiminas são capazes de inibir a proliferação dessa linhagem de células tumorais de forma bastante eficiente. Duas das aldiminas avaliadas apresentaram atividade similar àquela observada para o fármaco de referência etoposídeo (6,8 e 5,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as hidroxialdiminas e 4,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o etoposídeo).

Na literatura são encontrados também exemplos de complexos metálicos de bases de Schiff com atividade citotóxica e/ou antitumoral. Wai-Yin Sun e Chi-Ming Che (2009) mostraram que complexos de Au(III) com bases de Schiff tetradentadas, tais como salicilideniminas e dimetilglioxina (Figura 1.10), possuem atividade citotóxica comparável a do cisplatina.

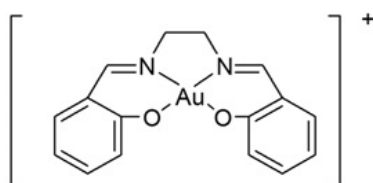


Figura 1.10 – Representação da estrutura de um complexo de Au(III) com uma base Schiff tetradentada. (Figura extraída da referência Wai-Yin Sun e Chi-Ming Che, 2009)

Qiao e colaboradores (2011) sintetizaram complexos de Cu(II) com bases Schiff (Figura 1.11) e mostram que esses complexos inibiram o crescimento de células de carcinoma cervical humano na dose de 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto o ligante livre não foi capaz de inibir o crescimento dessas células, mesmo em doses maiores, 105 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Esses resultados mostraram que a complexação ao Cu(II) é essencial para a atividade desses compostos.

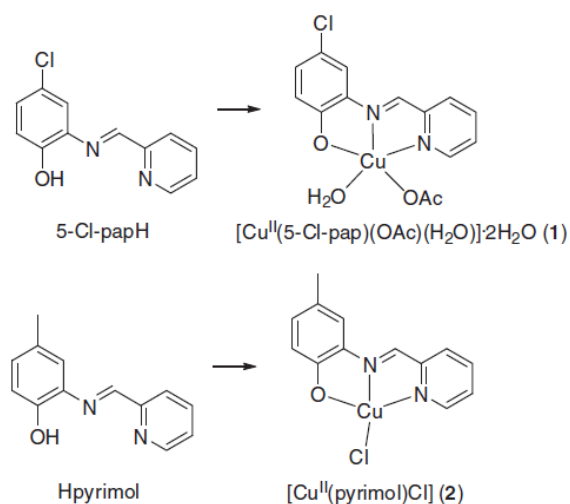


Figura 1.11 – Representação das estruturas das bases de Schiff e seus complexos de Cu(II) (Figura extraída da referência Qiao *et al.*, 2011).

A descoberta de novos compostos com atividade antitumoral tem sido, atualmente, um dos temas principais de pesquisa em química medicinal. As aldíminas e seus complexos metálicos se apresentam como uma importante classe de compostos na busca por novos agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer.

1.4 – Bactérias e Fungos

As bactérias patogênicas causam várias doenças como a tuberculose, a pneumonia, a difteria, a coqueluche e a sífilis. Algumas dessas doenças podem ser transmitidas por gotículas de saliva, outras por contato com alimentos ou objetos contaminados e algumas por contato sexual.

As fluorquinolonas são usadas no tratamento de infecções causadas por bactérias, como 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.

Na literatura, são encontrados numerosos estudos que relatam a complexação de cátions metálicos às fluorquinolonas. Estes estudos, normalmente, estabelecem a estrutura do complexo formado e apontam o efeito dos íons metálicos na atividade antibacteriana (Vieira *et al.*, 2009; Pantel, Joshi e Pantel, 2014).

Do mesmo modo, as infecções fúngicas afetam geralmente organismos debilitados e têm aumentado em todo o mundo devido a uma crescente população de doentes imunossuprimidos. As principais vítimas são doentes com câncer, AIDS, transplante de

células-tronco, de órgão sólido e hematopoiético destinatários, recém-nascidos prematuros e pacientes em recuperação de cirurgia de grande porte. Estas infecções causam várias mortes e são difíceis de prevenir, diagnosticar e tratar (Scorzoni *et al.*, 2013).

Espécies dos gêneros *Candida* e *Aspergillus* compreendem os principais agentes etiológicos associados com essas enfermidades, sendo responsáveis por 80 % de todos os casos de infecções fúngicas em pacientes submetidos a transplantes de órgãos sólidos (Badiee *et al.*, 2009).

O uso massivo de antifúngicos na profilaxia, tais como o fluconazol, facilitou a seleção dos fungos patogênicos resistentes a esses agentes. *Candida krusei* é um patógeno oportunista que apresenta resistência intrínseca ao fluconazol (Figura 1.12). Doenças causadas por *C. krusei* têm alta mortalidade associada (30-60%). Apesar da resistência intrínseca ao fluconazol, *C. krusei* é normalmente susceptível ao antifúngico voriconazol (Scorzoni *et al.*, 2013).

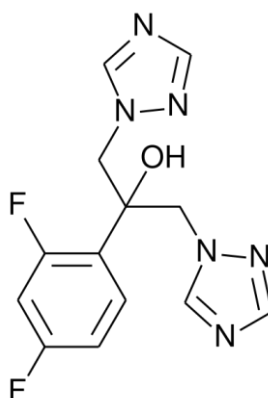


Figura 1.12 – Representação da estrutura do fluconazol.

A aspergilose é a mais comum dentre as infecções fúngicas em pacientes recém-transplantados, com incidência de 1-9 % e mortalidade de 55-92 %. Nesta população de pacientes, a infecção por *Aspergillus* pode resultar em uma variedade de sintomas clínicos, incluindo sinusite, traqueobronquite, pneumonia, celulite necrotizante, abscesso cerebral, dentre outras. O *Aspergillus fumigatus* é a principal causa de aspergilose humana sendo um dos mais comuns e mortais fungos patogênicos oportunistas (Rokas, 2013).

As bases de Schiff aparecem na literatura como alternativa para a obtenção de compostos com atividade antifúngica (Silva *et al.*, 2011). Um exemplo é o composto 2-(benzilidenoamino)fenol (Figura 1.13), que apresentou pronunciada atividade contra dermatofitose (Gasparto *et al.*, 2015).

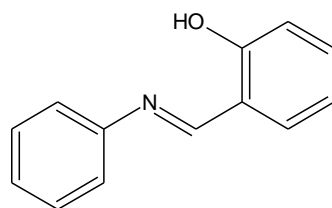


Figura 1.13 - Representação da estrutura química do composto 2-(benzilidenoamino)fenol.

As aldiminas obtidas a partir do núcleo base cumarina também se apresentam como promissores compostos com atividade antifúngica. A aldimina (E)-7-(2-hidroxi-3,5-diidobenzilidenoamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona, assim como seu correspondente complexo de cobre (Figura 1.14), inibem significativamente o crescimento de *C. albicans*, exibindo valores de CIM₅₀ (concentração necessária para inibir 50 % do crescimento fúngico) iguais a 1,2 e 0,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Esses valores são comparáveis àqueles encontrados para o fármaco anfotericina B (CIM₅₀ igual a 0,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$), empregado como controle positivo nos ensaios (Creaven *et al.*, 2009).

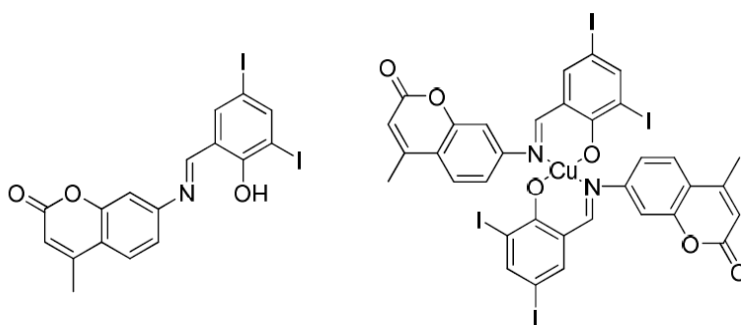


Figura 1.14 – Representação da estrutura química da cumarina (E)-7-(2-hidroxi-3,5-diidobenzilidenoamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona e seu correspondente complexo com cobre. (Figura extraída da referência Creaven *et al.*, 2009).

1.5 - Interação com macromoléculas biológicas

Estudos de interação entre macromoléculas biológicas e fármacos geram importantes informações sobre os sítios de ligação, transporte e metabolismo de moléculas no corpo humano (Guizado, 2008 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 novos fármacos com propriedades farmacológicas significativas.

O principal alvo biológico é o ácido desoxiribonucleico (DNA). O DNA possui uma estrutura de dupla hélice composta por duas fitas de DNA 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 DNA, 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 e cavidade menor. Nessas cavidades, especialmente na maior, as bases estão expostas ao meio ou ao solvente e são quimicamente distinguíveis. A Figura 1.15 mostra a estrutura da dupla-hélice do DNA (Zaha, Ferreira e Passaglia, 2014).

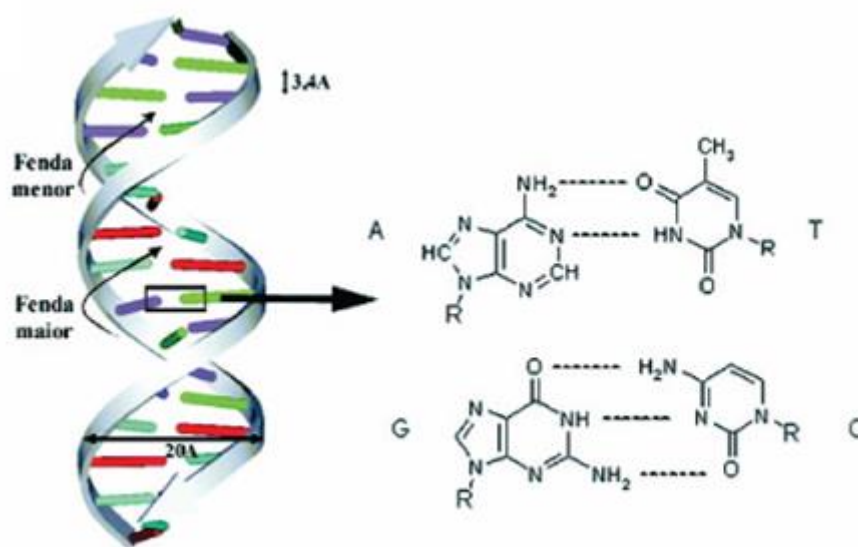


Figura 1.15 - Fita dupla do DNA, mostrando as cavidades menor e maior e as ligações de hidrogênio entre os pares de bases nitrogenadas Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) e Guanina (G) (Almeida *et al.*, 2005).

O DNA pode interagir com os complexos e ligantes de três modos diferentes: interação por intercalação, alquilação e ligação eletrostática externa nas cavidades maior e/ou menor do DNA. A interação eletrostática ocorre devido à interação dipolo-dipolo entre o metal complexado e o esqueleto de açúcar-fosfato do DNA. Na alquilação, há a formação de ligações cruzadas com os filamentos de DNA, impedindo sua replicação. A intercalação ocorre devido a uma forte interação entre o grupo cromóforo aromático e os pares de bases do DNA. Moléculas intercalantes são moléculas cromóforas aromáticas planas, que causam a clivagem do DNA (Silva, Donnici e Lopes, 2012; Almeida *et al.*, 2005; Gouvea, 2013).

O estudo da interação dos ligantes e de seus complexos com o DNA é importante visto que os possíveis alvos de ação dos fármacos anti-*T. cruzi* podem incluir o DNA nuclear do parasito (Dias e Dessoy, 2009). Além disso, o DNA é o principal alvo no tratamento anticâncer.

Os modos de interação com o DNA podem ser avaliados por meio de titulações espectrofotométricas de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), utilizando-se soluções dos compostos a serem estudados e quantidades crescentes de DNA nesta solução (Gouvea, 2013). Mudanças observadas nos espectros de UV-vis dos compostos, tais como, aumento ou diminuição da absorvidade molar, fornecem evidências sobre as interações e da natureza das mesmas. Em geral, o hipercromismo e/ou hipsocromismo indica interação com a parte externa do DNA. O hipocromismo e/ou batocromismo sugere que a ligação do complexo ao DNA pode ser eletrostática ou via intercalação, o que estabiliza a dupla hélice do DNA (Firdaus *et al.*, 2008). As constantes de interação CT DNA/complexo (K_b) são calculadas utilizando-se a equação de Scatchard Equação 1.1.

$$\frac{[DNA]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{[K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)]} \quad (1.1)$$

em que [DNA] é a concentração do par de bases do DNA, ε_a = coeficiente de extinção aparente, que corresponde à razão entre a absorbância medida e a concentração de composto em estudo ($A_{obs}/[composto]$); ε_b = coeficiente de extinção do composto ligado ao DNA; ε_f = coeficiente de extinção do composto livre em solução (na ausência de DNA).

Estudos de interação envolvendo complexos metálicos e o DNA, relatados na literatura, mostram que, na maioria dos casos, os íons metálicos atuam como centro redox e os ligantes são responsáveis pelo reconhecimento do DNA. Os principais modos de reconhecimento são por meio de interações eletrostáticas, intercalação, ligações com as cavidades do DNA e/ou ligações de hidrogênio (Almeida *et al.*, 2005).

O estudo de interação entre pequenas moléculas e proteínas, revela informações sobre o mecanismo de ligação, as constantes de ligação, o modo de ligação e sítios de ligação (Zhang *et al.*, 2010).

A albumina sérica é uma das proteínas mais estudadas e a mais abundante no plasma, representando aproximadamente 60% do plasma sanguíneo (Khan *et al.*, 2012). A albumina tem muitas funções fisiológicas. As propriedades mais importantes dessa

proteína são o depósito e o transporte de muitos compostos (Wang *et al.*, 2007). Ela participa do transporte de uma variedade de ligantes endógenos e exógenos, como os fármacos, metabólitos, ácidos graxos e é responsável principalmente pela manutenção do pH do sangue (Shaikh *et al.*, 2006; Shaikh *et al.*, 2007).

O metabolismo e a eficácia de muitos fármacos no corpo estão correlacionados com as suas afinidades com a albumina. A investigação da interação entre compostos e essa proteína tem se tornado importante, visto que os resultados fornecem informações sobre as características estruturais que influenciam na eficácia terapêutica dos fármacos (Shaikh *et al.*, 2006).

A albumina sérica humana (HSA) é um único polipeptídeo organizado em forma de coração com aproximadamente 67% de α -hélices. Esta proteína globular é estabilizada por 17 ligações de dissulfeto. Ela possui dois sítios principais I e II que são responsáveis pela sua capacidade de se ligar a diferentes compostos (Guizado, 2014).

A albumina bovina (BSA) é extensamente utilizada em estudos de interação com fármacos, graças à sua semelhança estrutural com a albumina humana (HSA). A estrutura da BSA consiste de três domínios (I-III), cada um composto por dois subdomínios (A e B) (Khan *et al.* 2012). A BSA possui dois triptofanos (Trp 134 e Trp 212) e a HSA apenas um, (Trp214). O triptofano 134 está na superfície da molécula de BSA enquanto o Trp 212 reside em um bolso hidrofóbico. O trp 214 da HSA também se localiza em um bolso hidrofóbico (Figura 1.16) (Silva, Cortez e Louro, 2004).

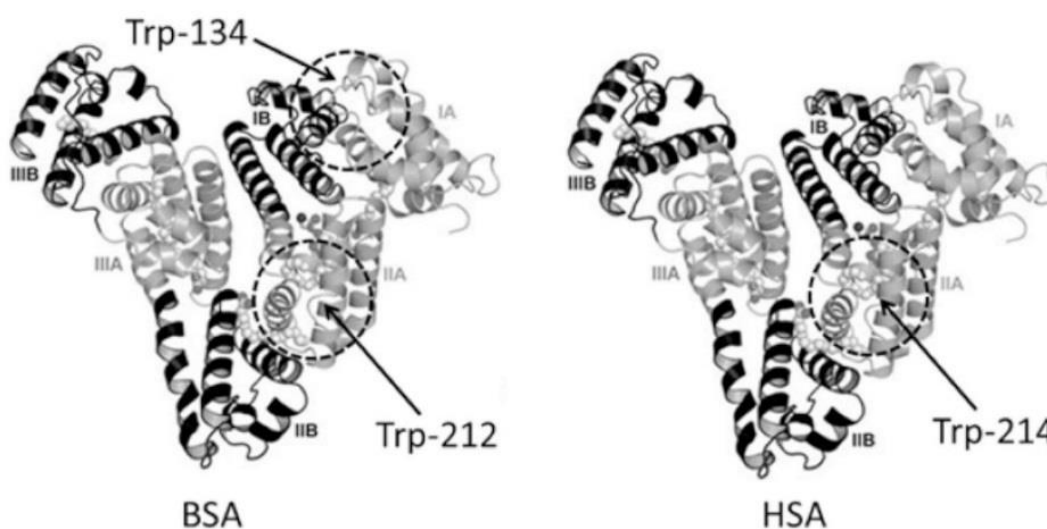


Figura 1.16 – Representações das estruturas secundárias das albuminas séricas bovina (BSA) e humana (HSA). Fonte:<http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v38n2//0100-4042-qn-38-02-0227-gf01.jpg>

Em solução, a BSA apresenta um intenso pico de emissão de fluorescência em aproximadamente 342 nm, enquanto a HSA tem um pico de emissão de fluorescência em aproximadamente 345 nm, devido aos resíduos de triptofano (Khan *et al.*, 2012). Portanto, a fluorescência é a técnica mais utilizada para os estudos de interação albumina-fármaco.

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 ou estática. Em ambos os processos, faz-se necessário a existência de contato entre o fluoróforo e o agente de supressão (Santos, 2007; Silva *et al.*, 2014). No mecanismo estático ocorre a formação de um complexo não fluorescente entre a albumina e o composto no estado fundamental, cuja estabilidade é diminuída com o aumento da temperatura e, conseqüentemente, os valores de K_{sv} diminuem. No mecanismo dinâmico a interação dos compostos com a albumina ocorre durante o tempo de vida do estado excitado da biomolécula. Após a colisão a albumina retorna ao estado fundamental sem a emissão de fluorescência. (Silva *et al.*, 2014; Lakowicz, 2006). O aumento da temperatura promove a diminuição da viscosidade do meio de reação favorecendo a difusão do supressor em direção ao fluoróforo no estado excitado. Dessa forma, para o mecanismo dinâmico, o aumento da temperatura leva a um aumento das colisões e da constante K_{sv} (Silva *et al.*, 2014; Lakowicz, 2006).

Neste trabalho foram estudadas as interações dos compostos sintetizados bem como os ligantes livres com as albuminas humana e bovina utilizando como técnica a fluorescência.

Os valores da constante de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) e da constante de velocidade de supressão bimolecular (k_q) são obtidos por meio da equação de Stern-Volmer e considerando que o tempo de vida (τ_0) de um triptofano na albumina é de, aproximadamente, 10^{-8} s (Skyrianou *et al.*, 2010).

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

em que, 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; τ_0 é o tempo de vida na ausência do agente de extinção e $[Q]$ é a concentração de agente de extinção.

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

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

Capítulo 2

Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é preparar complexos metálicos com ligantes de interesse farmacológico, testar as atividades biológicas dos ligantes e dos complexos e investigar seus mecanismos de ação por meio de estudos de interação com biomoléculas.

Objetivos específicos:

- ✓ Obter novos complexos de Au(I)-dimetilsulfeto e Au(III)-ácido piridino-2-carboxílico com a norfloxacin (NOR).
- ✓ Sintetizar as bases de Schiff 2-((5-nitrofurano-2-il)metilamino)fenol e 2-(4-nitrobenzilidenoamino)fenol e seus novos complexos de Cu(II) contendo a 1,10-fenantrolina como coligante.
- ✓ Caracterizar os ligantes e os novos complexos obtidos por meio de análise elementar, condutividade, espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica, ressonância paramagnética eletrônica, no caso dos complexos de Cu(II) e, ressonância magnética nuclear, no caso dos complexos de Au(I) e Au(III).
- ✓ Testar a atividade antibacteriana dos complexos dos novos Au(I) e Au(III) de norfloxacin e dos complexos de Cu(II) de norfloxacin e coligantes nitrogenados, já descritos na literatura (Martins, 2011).
- ✓ Testar a atividade anti-*T.cruzi*, antifúngica e antiproliferativa das bases de Schiff e de seus complexos de Cu(II)-fenantrolina.
- ✓ Estudar a interação dos ligantes, dos novos complexos e dos complexos de Cu(II) de norfloxacin e coligantes nitrogenados com o DNA, utilizando espectroscopia na região do UV-vis.
- ✓ Estudar a interação dos ligantes, dos novos complexos e dos complexos de Cu(II) de norfloxacin e coligantes nitrogenados com as albuminas bovina e humana, por meio da espectroscopia de fluorescência e/ou ressonância paramagnética eletrônica.

3.1- Reagentes

A norfloxacin, o 4-nitrobenzaldeido, o 5-nitro-2-furaldeido, o 2-aminofenol e os sais de metais utilizados: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$ (phen = 1,10-fenantrolina), $[\text{AuCl}(\text{CH}_3)_2]$ e $[\text{AuCl}_2(\text{pyc})]$ (pyc = ácido piridino-2-carboxílico) são de procedência Sigma-Aldrich. A piridina e a 2,2'-bipiridina são de procedência Vetec. Os solventes utilizados nas sínteses são de procedência Merck, Vetec ou Synth.

O tampão fosfato utilizado foi preparado a partir de fosfato monobásico de potássio (*Synth*) e fosfato dibásico de potássio (*Synth*).

3.2 - Equipamentos

Balança - As medidas de massa 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.

Temperatura de Fusão - As medidas de temperatura de fusão dos ligantes e dos complexos foram feitas em um aparelho digital modelo 430D da Fisatom.

Potenciômetro - 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 - Os espectros na região do infravermelho (IV) das bases de Schiff foram obtidos pela técnica de ATR em espectrofotômetro Spectro One Perkin Elmer (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG). Os demais espectros na região do infravermelho foram obtidos utilizando o aparelho Mattson Instruments Galaxy 3000 (Departamento de Química, UFMG) na região de 4000 a 400 cm^{-1} . As substâncias foram incorporadas em KBr, previamente dessecado e pulverizado. A mistura foi prensada em forma de disco transparente, sob pressão de 700 a 1050 kg m^{-2} , originando uma pastilha de concentração 1 % massa/massa, que foi utilizada para obtenção dos espectros

Espectroscopia na Região do UV-vis - Os espectros na região do ultravioleta-visível foram obtidos, em temperatura ambiente (25°C), utilizando-se o espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta visível Cary 100 Bio (Varian-Agilent). 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 – Os espectros de fluorescência foram obtidos usando um espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian-Agilent).

Medidas de Condutimetria - As medidas de condutimetria foram feitas em um condutímetro de bancada modelo Q405M da Quimis, à temperatura ambiente. As soluções foram preparadas, nos respectivos solventes, na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} ou $5,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} .

Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) - Os espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) foram obtidos no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), em colaboração com a Professora 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 ou na mistura de DMSO e metanol foram medidas utilizando tubos de quartzo de diâmetro interno de 3 mm, à temperatura ambiente (para amostras no pó) e à temperatura de N_2 líquido, 77K (para amostras em solução).

Análise Termogravimétrica – As curvas termogravimétricas foram obtidas em uma Termobalança Shimadzu TGA-5H. Foi utilizada atmosfera de ar com razão de fluxo de 50 mL min⁻¹. A razão de aquecimento foi 10 °C e a temperatura final alcançada foi de 750 °C.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) - Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos a partir dos espectrômetros BRUKER AVANCE DPX/200 e DRX/400 (Departamento de Química, UFMG e do Departamento de Química da UFSCar em colaboração com o professor *Alzir Azevedo Batista*) utilizando como solvente dimetilsulfóxido (DMSO), da marca Sigma-Aldrich com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

3.3 - Sínteses

a. Complexos de Cu(II) de norfloxacin e coligantes nitrogenados

Os complexos [CuCl₂(H₂O)(NOR)].H₂O (**1**), [CuCl₂(py)(NOR)].H₂O (**2**), [CuCl(bipy)(NOR)]Cl.2H₂O (**3**) e [CuCl₂(phen)(NOR)].3H₂O (**4**), onde NOR representa a norfloxacin, py a piridina, bipy a 2,2'-bipiridina e phen a 1,10-fenantrolina, foram obtidos conforme descrito na literatura (Martins, 2011). As sínteses dos complexos **3** e **4** foram repetidas e novas análises elementares e termogravimétrica foram realizadas.

b. Sínteses dos complexos de Au(I) e Au(III) de norfloxacin

Os complexos foram obtidos dissolvendo-se 0,31 mmol do ligante norfloxacin (NOR) em aproximadamente 40 mL de acetona. A esta solução foi adicionada a mesma quantidade de matéria de [AuClS(CH₃)₂] ou [AuCl₂(pyc)] (pyc = ácido piridino-2-carboxílico). A mistura permaneceu sob agitação por aproximadamente 24 horas, a temperatura ambiente (25 °C). Os precipitados formados foram filtrados a vácuo, lavados com éter etílico e secos. As Figuras 3.1 a 3.2 mostram as equações de obtenção dos complexos de Au(I) e Au(III) de NOR, as fórmulas moleculares, as massas molares, os rendimentos para as reações e a faixa de decomposição dos complexos são mostrados na Tabela 3.1.

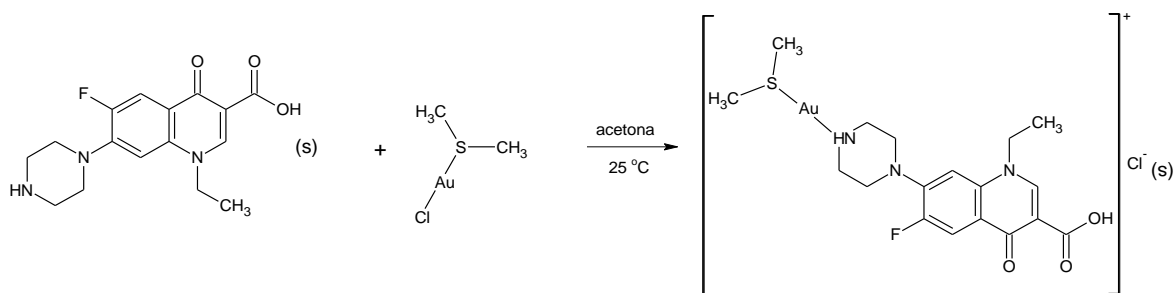


Figura 3.1 - Equação de obtenção do complexo de Au(I) de norfloxacin (NOR) contendo dimetilsulfeto.

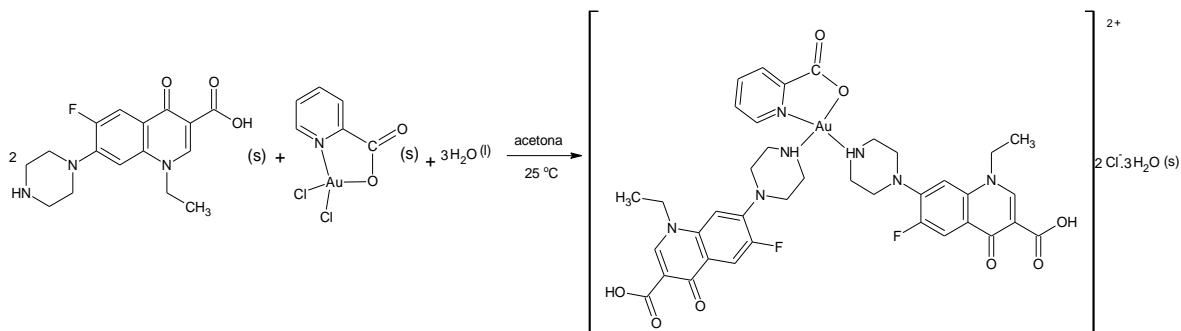


Figura 3.2 - Equação de obtenção do complexo de Au(III) de norfloxacin (NOR) contendo ácido piridino-2-carboxílico.

c. Sínteses das bases de Schiff

As bases de Schiff 2-((5-nitrofurano-2-il)metilamino)fenol (**HL1**) e 2-(4-nitrobenzilidenoamino)fenol (**HL2**) foram obtidas em colaboração com o prof. Ângelo de Fátima do Departamento de Química da UFMG e estão descritas na literatura (Silva, 2013). Soluções etanólicas contendo quantidades equimolares (3 mmol) dos aldeídos (4-nitrobenzaldeído ou 5-nitro-2-furaldeído) e da amina (2-aminofenol), foram irradiadas empregando-se reator DISCOVER CEM[®] por 2 minutos. Os precipitados formados foram filtrados a vácuo e recristalizados. Takebayashi e colaboradores (1983) sintetizaram **HL1** como intermediário de uma reação e não fizeram uma caracterização completa do mesmo. Magalhães e colaboradores (2013) descreveram **HL2** em um artigo cujo o foco era apenas a atividade biológica. A Figura 3.3 mostra as equações de obtenção de **HL1** e **HL2**, as fórmulas moleculares, as massas molares, os rendimentos para as reações e faixa de decomposição dos compostos são apresentados na Tabela 3.1.

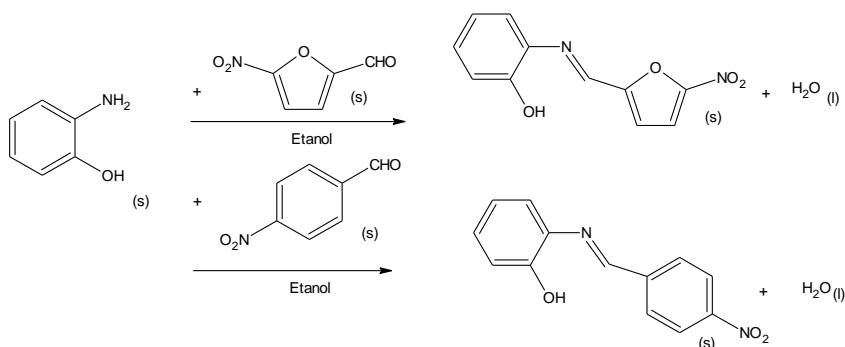


Figura 3.3 – Equações de obtenção de **HL1** e de **HL2**.

d. Sínteses dos complexos de Cu(II) de bases de Schiff

Os complexos $[\text{CuCl}(\text{L1})(\text{phen})] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{CuCl}(\text{L2})(\text{phen})] \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ foram obtidos dissolvendo-se 0,31 mmol do precursor dicloro(1,10-fenantrolina)cobre(II) em aproximadamente 50 mL de metanol com aquecimento brando e agitação. Em seguida, 0,31 mmol de **HL1** ou **HL2** foram adicionados a solução do precursor. A mistura de reação permaneceu sob agitação por 24 horas. O volume de solução foi reduzido utilizando um evaporador rotatório. O precipitado formado foi filtrado à pressão reduzida, lavado com éter e seco. As Figuras 3.4 e 3.5 mostram as equações de obtenção dos complexos. As fórmulas moleculares, as massas molares, os rendimentos para as reações e a faixa de decomposição dos complexos são mostrados na Tabela 3.1.

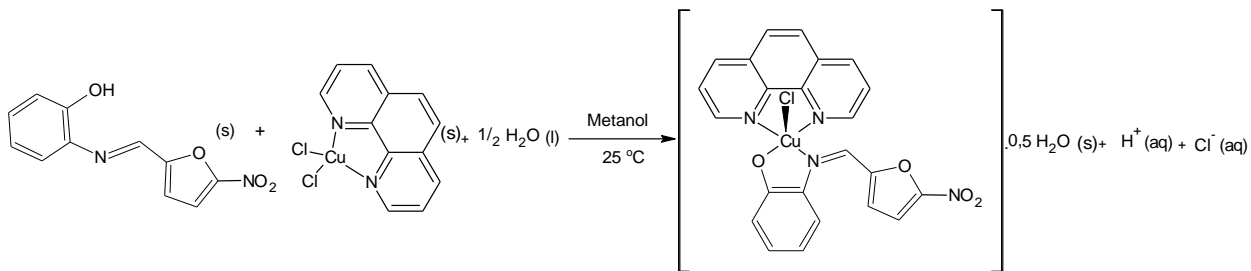


Figura 3.4 - Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de fenantrolina de **HL1**.

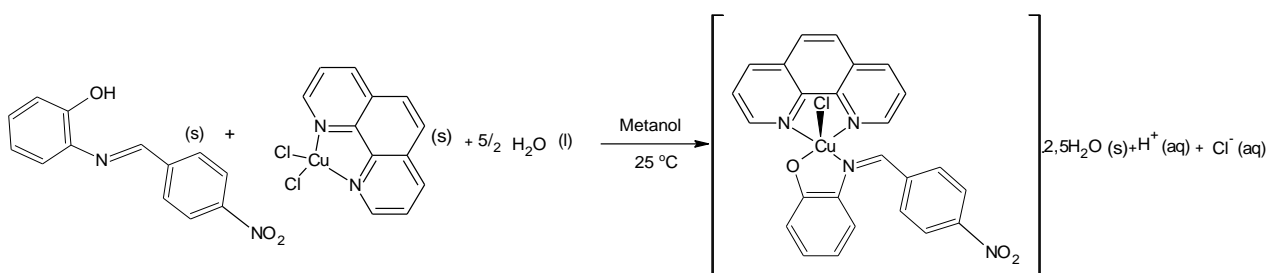


Figura 3.5 - Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de fenantrolina de **HL2**.

Tabela 3.1 - Fórmula molecular, massa molar (g mol^{-1}), Faixa de decomposição ($^{\circ}\text{C}$) e rendimento das reações para obtenção dos complexos de Au(I) e Au(III) de Norfloxacin, das base de Schiff e seus complexos de Cu(II).

Composto	Fórmula molecular	Massa Molar (g mol^{-1})	Faixa de decomposição ($^{\circ}\text{C}$)	Rendimento da reação (%)
[AuS(CH ₃) ₂ (NOR)]Cl (5)	C ₁₈ H ₂₄ AuFN ₃ O ₃ SCl	613,9	>300	65
[Au(pyc)(NOR) ₂]Cl ₂ .3H ₂ O (6)	C ₃₈ H ₄₆ AuF ₂ N ₇ O ₁₁ Cl ₂	1082,7	>300	42
HL1	C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₄	232,2	170	81
HL2	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₃	242,2	159-160 ^f	81
[CuCl(L1)(phen)].0,5H ₂ O (7)	C ₂₃ H ₁₆ ClCuN ₄ O _{4,5}	519,4	260-286	47
[CuCl(L2)(phen)].2,5H ₂ O(8)	C ₂₅ H ₂₂ ClCuN ₄ O _{5,5}	556,5	230-252	59

^ftemperatura de fusão

3.4 - 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 resultados dos testes de atividade anti-*T. cruzi* para a norfloxacin e seus complexos de Cu(II) são rerepresentados para discussão das interações com alvos biológicos (Martins, 2011). Novos testes foram feitos para as bases de Schiff **HL1** e **HL2** e para seus complexos de Cu(II).

Os testes de atividade anti-*T. cruzi* 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 CO₂) durante o pico da parasitemia. A purificação dos parasitos foi feita por centrifugação diferencial (Meirelles, de Araujo e Miranda, 1986).

As soluções dos compostos foram preparadas na concentração de 50 mmol L⁻¹ utilizando DMSO e água como solvente e foram armazenadas à 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ com crescentes doses dos complexos 0-250 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para a determinação da dose mínima de cada composto capaz de matar 50% dos parasitos (EC₅₀). Os parasitos vivos foram quantificados usando o microscópio óptico (por meio de câmara

de Neubauer). Os ensaios foram conduzidos em meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Silva *et al.*; 2012).

Para identificar a dose efetiva dos complexos contra o parasito, mas que não exerce toxicidade para a célula hospedeira *in vitro* (IS_{50}), o método de metil tiazoliltetrazólio foi utilizado, onde a viabilidade das células cardíacas expostas a doses crescentes dos complexos foi averiguada.

3.5 - Avaliação da atividade antiproliferativa contra células de tumores humanos

Os ensaios de atividade antiproliferativa foram feitos no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho.

As bases de Schiff e seus complexos de Cu(II) foram testados frente as linhagens de células U251 (melanoma), MCF7 (tumor de mama), NCI/ADR-RES (tumor de ovário resistente), 786-0 (tumor de rim), NCI-H460 (tumor de pulmão), PC-3 (tumor de próstata), OVCAR-3 (tumor de ovário), HT29 (tumor de colorretal), HACaT (queratinócitos humanos), que foram obtidas junto ao Frederick Cancer Research & Development Center – National Cancer Institute - Frederick, MA, USA, sendo cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB).

Para a determinação da atividade antiproliferativa foram plaqueados 100 μ L das suspensões celulares, em meio RPMI/SFB/gentamicina em suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, em atmosfera de 5 % de CO₂ e 100 % de umidade. Os compostos a serem testados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos no meio RPMI/SBF/gentamicina, 100 μ L das soluções dos compostos nas concentrações de 0,50; 5,0; 50; e 500 μ g mL⁻¹ foram adicionados às placas contendo as suspensões celulares, sendo as mesmas incubadas por 48 horas (Euzébio *et al.* 2010).

Após esse período as placas foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm e fixadas pela adição de 50 μ L de ácido trifluoroacético (50 % para células aderidas e 80 % para células em suspensão). As placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C e após esse período foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a completa remoção do meio de cultura e do excesso de ácido trifluoroacético. Após completa secagem, as placas foram coradas pela adição de 50 mL do corante sulforrodamina B a 0,4

% (massa/volume) dissolvido em ácido acético 1 % e incubadas a 4 °C por 30 minutos. Após esse período as placas foram lavadas por quatro vezes consecutivas com solução de ácido acético 1 %. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com solução Trizma Base na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e pH 10,5 por 5 minutos em ultrassom (Euzébio *et al.* 2010).

A leitura espectrofotométrica da absorvância foi realizada em 540 nm em um leitor de microplacas. Para a análise dos resultados foram calculadas as médias das absorvâncias descontados os seus respectivos brancos e calculadas as porcentagens de inibição de crescimento. A partir dos dados obtidos foram construídos gráficos que relacionam a porcentagem de inibição com a concentração da substância teste. O quimioterápico doxorrubicina foi empregado como controle positivo (Monks *et al.*, 1991).

3.6 - Teste de atividade antibacteriana

A determinação da menor concentração de composto capaz de inibir em 50 por cento o crescimento microbiano (IC_{50}) foi feita utilizando bactérias da coleção do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LABB), Departamento de Química – UFMG em colaboração com a professora Jaqueline Aparecida Takahashi. Os complexos de Cu(II), de Au(I) e de Au(III) de norfloxacin foram testados frente as cepas *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Salmonella Shigella* (SS), *Bacillus cereus* (BC), *Salmonellatyphi* (ST), *Listeria monocytogenes* (LM), *Escherichia coli* (EC), *Citrobacter freundii* (CF).

Primeiramente foi preparado um pré-inóculo, transferindo bactérias com a alça de platina para tubos de ensaios contendo 3,0 mL de meio de cultura BHI. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 24 h. Com o auxílio de uma micropipeta, alíquotas de 500 μL deste pré-inóculo foram transferidas para tubos de ensaio contendo água destilada estéril. As soluções foram diluídas até a concentração em que a transmitância das soluções homogeneizadas fosse entre 74-75% no comprimento de onda de 600 nm, obtendo-se assim, os inóculos utilizados no teste (Ferreira, 2014).

As amostras dos compostos foram pesadas e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) (12,5 mg mL^{-1}). Alíquotas de 40 μL destas soluções foram adicionados a 960 μL do meio de cultura BHI para o preparo das soluções de trabalho.

Os testes foram realizados em placas de 96 micropoços, contendo 100 µL de meio de cultura por poço (exceto no primeiro; ver adiante), em duplicata. No primeiro poço foram adicionados 200 µL da solução de trabalho e, em seguida, foi realizada a diluição desta solução para os poços seguintes, transferindo-se 100 µL da solução do poço 1 para o poço 2. A solução resultante foi homogeneizada e 100 µL desta foi transferida para o poço 3 e assim sucessivamente. No último poço, após homogeneização, 100 µL foram retirados e desprezados, de modo que todos os poços tivessem o mesmo volume. Em seguida, foram adicionados 100 µL do inóculo padronizado em cada poço (Ferreira, 2014).

Quatro controles foram feitos, um para controle de crescimento do micro-organismo (para verificar a viabilidade celular); o branco, em que não se adicionou o inóculo bacteriano (para se eliminar o efeito da coloração da solução da substância teste), um controle positivo (substituindo a solução-trabalho por um antibiótico padrão) e o controle de esterilidade do meio de cultura, contendo 100 µL de meio de cultura e 100 µL de água destilada estéril. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C e após 24 h foi realizada a leitura do teste em leitor tipo Elisa (490 nm) (Ferreira, 2014).

O antibiótico utilizado para o controle de qualidade do ensaio foi a ampicilina. As soluções de trabalho contendo estes padrões foram preparadas conforme descrito anteriormente.

3.7 - Avaliação da atividade antifúngica

Os testes de atividade antifúngica foram feitos no laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG) em colaboração com a Professora Maria Aparecida de Resende-Stoianoff. A concentração inibitória mínima (CIM) que é a menor concentração do composto capaz de inibir completamente o crescimento microbiano após a incubação, foi determinada para as bases de Schiff e seus complexos de Cu(II). O teste de atividade antifúngica foi feito segundo os métodos de microdiluição em caldo preconizados pelo CLSI (Clinicaland Laboratory Standards Institute, anteriormente denominado NCCLS – National Committe for Clinical Laboratory Standards), sendo o documento M27-A2 (NCCLS, 2002a) utilizado como referência nos testes envolvendo leveduras e o documento M38-A (NCCLS, 2002b) utilizado nos testes envolvendo fungos filamentosos.

Os compostos foram inicialmente dissolvidos em 200 μL de dimetilsulfoxido (DMSO). Posteriormente foram adicionados 1800 μL do meio de cultura RPMI1640, de modo a se obter soluções estoque na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estas soluções foram submetidas a diluições seriadas, empregando-se RPMI 1640, resultando em soluções de concentrações 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 e 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os testes de atividade antifúngica foram realizados em placas estéreis com 96 poços. Um volume de 100 μL de cada diluição foi transferido para os respectivos poços das placas de microdiluição. Em seguida adicionou-se a cada poço 100 μL do inóculo do fungo a ser testado, resultando em um volume final de 200 μL . As placas foram incubadas por 48 horas a uma temperatura de aproximadamente 60°C. Nos controles de crescimento e esterilidade foi empregado somente o meio RPMI 1640. A leitura do teste foi feita visualmente. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$ e os experimentos realizados em duplicata.

3.8 - Estudos de interação com DNA

No estudo de interação dos compostos com DNA de timo de vitelo (CT-DNA) utilizou-se a espectroscopia na região do UV-visível. As soluções de CT-DNA foram preparadas em tampão fosfato, as concentrações dessas soluções foram determinadas por meio de espectros na região do UV-visível utilizando a lei de Beer que relaciona a concentração e a absorvidade molar (ϵ). Para o CT-DNA, no comprimento de onda de 260 nm, ϵ é igual a 6600 (Efthimiadou *et al.*, 2008).

As razões entre a absorvância para o CT DNA em 260 e 280 nm foram sempre valores entre 1,8-1,9, indicando que o CT DNA estava suficientemente livre de proteína (Skyrianou *et al.*, 2009).

As soluções dos compostos foram preparadas na concentração 1,0 mmol L⁻¹, em DMSO. Posteriormente as soluções foram diluídas em tampão fosfato até a concentração utilizada nas interações. Todas as soluções utilizadas foram preparadas em pH fisiológico (pH = 7,4).

As soluções dos compostos foram tituladas com a solução do CT DNA. Um volume de 3,00 mL da solução do composto foi titulado com alíquotas da solução de CT-DNA. 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, pág.

14) o que possibilitou o cálculo das constantes de interação (K_b) entre os compostos e o CT-DNA. Os valores de (K_b) foram obtidos pela razão da inclinação com a interseção da reta $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ em função da $[DNA]$ (Skyrianou *et al.*, 2010).

3.9 - Estudos de interação com a albumina sérica bovina (BSA) e a albumina sérica humana (HSA) utilizando fluorescência

O estudo das interações entre os compostos e as albuminas bovina e humana foi feito utilizando a espectroscopia de fluorescência. Inicialmente foram preparadas soluções estoque dos ligantes e dos complexos na concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, as soluções foram diluídas em tampão fosfato até a concentração utilizada na titulação. O pH do tampão foi previamente ajustado para 7,4. As soluções de BSA e de HSA de concentração $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas, diretamente em tampão fosfato, pH 7,4.

Nos experimentos 3mL das soluções de albumina (2 ou $4 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram tituladas, sob agitação magnética, com alíquotas de 0,03 mL das soluções dos compostos em estudo. Após cada adição foi feita leitura na faixa de 315 a 550 nm, com uma excitação de 285 nm para a BSA e em 280 ou 295 nm para a HSA. Foram feitas também leituras na região do UV-Vis de 200 a 800 nm para a correção do efeito de filtro. Após a adição dos compostos em estudo, observa-se uma supressão de fluorescência dos triptofanos, que a proteína possui em sua estrutura. Esta supressão pode ser descrita pela equação de *Stern-Volmer* (Equação 1.2, pág. 16). O gráfico (F_0/F vs [composto]) é representado por uma reta cujo coeficiente angular da reta é a constante de supressão (K_{SV}).

3.10 - Estudos de interação com as albuminas utilizando EPR

Os estudos de interação por EPR foram feitos no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), em colaboração com a Professora Sônia R. Louro, do Departamento de Física da PUC-Rio. No estudo da interação dos compostos CuCl_2 , $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$, $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$, $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) e $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**4**) com as albuminas séricas bovina (BSA) e humana (HSA) foram utilizadas soluções equimolares dos compostos e das albuminas na concentração de $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparadas em tampão fosfato, pH 7,4. Foram obtidos espectros de EPR, de banda X em solução congelada a 77k.

Complexos de Cu(II) de norfloxacinina: atividade biológica e estudos de interação com albuminas e DNA

Os complexos $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) e $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**4**), onde NOR representa a norfloxacinina, py a piridina, bipy a 2,2'-bipiridina e phen a 1,10-fenantrolina, já estão descritos na literatura, assim como os testes de atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Nesse trabalho, a atividade antibacteriana desses complexos foi testada contra oito cepas de bactérias e suas interações com as albuminas bovina e humana e com o DNA foram estudadas, utilizando as técnicas de fluorescência, EPR e UV-vis.

4.1 - Dados de análise elementar e análise térmica para os complexos de Cu(II)

Os complexos $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) e $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**4**), foram obtidos e caracterizados por diversas técnicas (Martins, 2011). No presente trabalho as sínteses para os complexos **3** e **4** foram repetidas e foi possível obter complexos com um maior grau de pureza. Os novos dados de análise elementar são mostrados na Tabela 4.1. As moléculas de água de hidratação foram confirmadas pelas curvas de TG/DTG, também repetidas (Anexo 1, pág. 105). As estruturas sugeridas para os monômeros dos complexos **1-4** são mostradas na Figura 4.1.

Tabela 4.1 - Dados de análise elementar (valores calculados entre parênteses) para os complexos de Cu(II).

Complexos	Análise elementar			%H ₂ O
	% C	% H	% N	
$[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3)	48,2(48,3)	4,5 (4,7)	10,8 (10,8)	10,5 (11,0) ^a
$[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4)	48,9 (48,9)	4,6 (4,7)	10,4 (10,2)	7,0 (7,8)

^aa porcentagem corresponde a saída de duas moléculas de água mais um cloro.

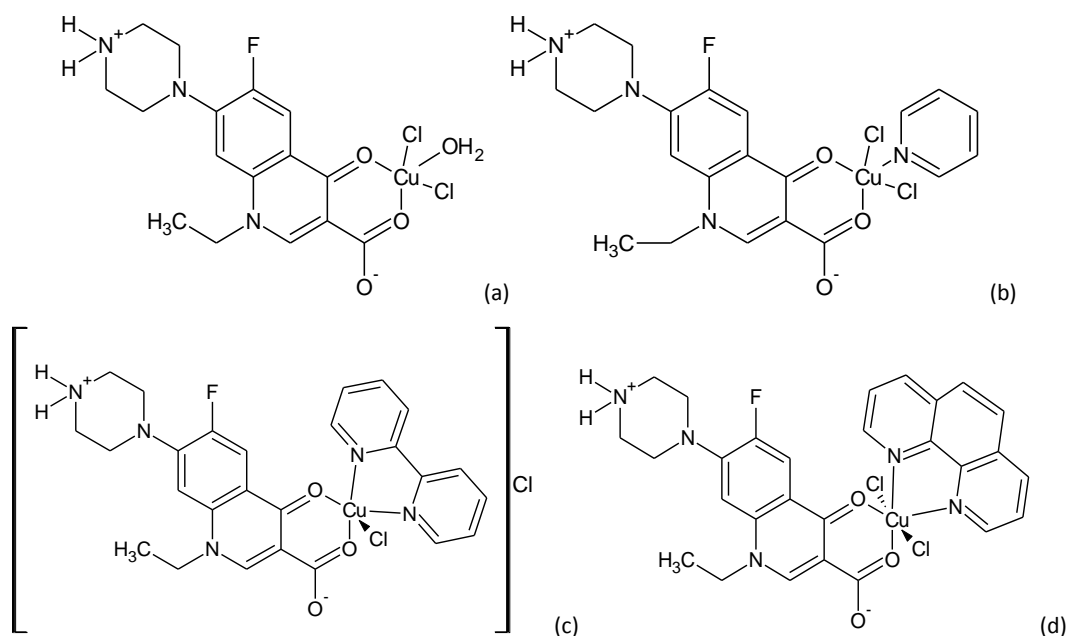


Figura 4.1 - Estruturas propostas para os monômeros dos complexos (a) $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})]$ (**1**), (b) $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})]$ (**2**), (c) $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}$ (**3**) e (d) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]$ (**4**).

4.2 - Testes de atividade anti-*T.cruzi* dos complexos de Cu(II) de norfloxacin

Os testes de atividade anti-*T.cruzi* para os complexos **1-4** foram descritos anteriormente (Martins, 2011), mas os resultados são resumidos aqui para facilitar as interpretações dos estudos de interação.

A atividade anti-*T.cruzi* e o índice de seletividade para a norfloxacin e seus complexos de Cu(II) são mostrados na Tabela 4.2. Para efeito de comparação foram incluídos na Tabela 4.2 os resultados obtidos para os precursores de Cu(II) e para o fármaco de referência Benznidazol.

Tabela 4.2- Atividade (média \pm SD) e índice de seletividade (IS) para os precursores, a norfloxacin 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	EC ₅₀ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Índice de Seletividade (IS)*
Norfloxacin (NOR)	126 \pm 30	>1,3
[CuCl ₂ (H ₂ O)(NOR)].H ₂ O (1)	78 \pm 12	0,8
[CuCl ₂ (py)(NOR)].H ₂ O (2)	87 \pm 41	2,9
[CuCl(bipy)(NOR)]Cl.2H ₂ O (3)	16 \pm 4	4
[CuCl ₂ (phen)(NOR)].3H ₂ O (4)	4,4 \pm 1,4	2,7
CuCl ₂ .2H ₂ O	82 \pm 3	6
[CuCl ₂ (py) ₂]	54 \pm 7	0,6
[CuCl ₂ (bipy)]	14 \pm 7	4,5
[CuCl ₂ (phen)]	7 \pm 5	<4
Benznidazol	13 \pm 2	77

EC₅₀ = menor valor de concentração capaz de matar 50% dos parasitos.

LC₅₀ = concentração da droga que diminui em 50% a viabilidade de células cardíacas não infectadas.

IS = LC₅₀/EC₅₀. *Os dados são expressos como média \pm SD de três experimentos independentes.

A norfloxacin não mostrou atividade significativa contra as formas tripomastigotas do *T. cruzi*. A associação do Cu(II) à fluorquinolona levou a uma atividade igual à de CuCl₂. Embora a introdução da py não tenha sido uma estratégia eficaz para a melhora da atividade. A associação da bipy ao cobre e à fluorquinolona levou a uma diminuição significativa dos valores de EC₅₀ e, porem o próxima a do precursor [CuCl₂(bipy)]. O complexo [CuCl₂(phen)(NOR)].3H₂O (**4**) e o precursor [CuCl₂(phen)] mostraram-se ativos

em baixa concentração e mais ativos que o Benznidazol, que é o fármaco de referência. No entanto, os índices de seletividade dos compostos testados foram menores que o do Benznidazol.

4.3 - Testes de atividade antibacteriana dos complexos de Cu(II) de norfloxacin

A atividade antibacteriana da norfloxacin livre, dos complexos **1-4** e dos precursores [CuCl₂(py)₂], [CuCl₂(bipy)] e [CuCl₂(phen)] foi testada frente às seguintes cepas: *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Salmonella shigella* (SS), *Bacillus cereus* (BC), *Salmonella typhi* (ST), *Listeria monocytogenes* (LM), *Escherichia coli* (EC), *Citrobacter freundii* (CF). A concentração mínima necessária para inibir cinquenta por cento do crescimento das bactérias, IC₅₀, para a NOR e seus complexos são mostrados na Tabela 4.3. A ampicilina, utilizada como antibiótico de referência, apresentou valor de IC₅₀ inferior a 5,58 µmol L⁻¹ para todas as cepas testadas.

Tabela 4.3 - Valores de IC₅₀ (µmol L⁻¹) para a NOR, para os complexos de Cu(II) e para o precursor [CuCl₂(phen)] frente a oito Cepas de bactérias.

Composto	SA	PA	SS	BC	ST	LM	EC	CF
NOR	< 6,1	< 6,1	< 6,1	< 6,1	< 6,1	< 6,1	< 6,1	< 6,1
(1)	24,3	< 4,0	5,9	9,7	12,4	7,29	< 4,0	< 4,0
(2)	< 3,5	7,1	6,3	9,0	9,3	12,6	< 3,5	< 3,5
(3)	23,5	5,8	7,0	11,2	30,2	4,8	< 3,0	< 3,0
(4)	11,7	4,1	6,1	15,8	11,8	5,7	< 2,8	< 2,8
[CuCl ₂ (phen)]	50,0	85,8	58,9	71,7	88,5	44,6	78,8	41,0

IC₅₀: concentração necessária para inibir 50 % do crescimento das bactérias

Os complexos **1-4** apresentaram atividade frente a todas as cepas testadas, mostrando-se menos ativos que a NOR livre, nas cepas BC e ST. Frente as cepas EC e CF tanto a NOR quanto os seus complexos foram ativos nas menores concentrações testadas. Os precursores não apresentaram atividade frente a nenhuma das linhagens, exceto o

precursor [CuCl₂(phen)] que tem seus valores de IC₅₀ dispostos na Tabela 4.3 e é menos ativo que os complexos de Cu(II). Os complexos mostraram-se promissores agentes antibacterianos, mesmo nas cepas em que são menos ativos que a NOR livre, devido ao problema da resistência bacteriana.

Uma vez constatado que alguns dos complexos de Cu(II) estudados no presente trabalho têm potencial para agir como agentes anti-*T.cruzi* e como agentes antibacterianos, foram feitos estudos de interação dos complexos com as proteínas albumina sérica bovina (BSA) e albumina sérica humana (HSA) e com DNA.

4.4 - Estudo da interação entre os complexos de Cu(II) de norfloxacin e as albuminas bovina e humana utilizando fluorescência

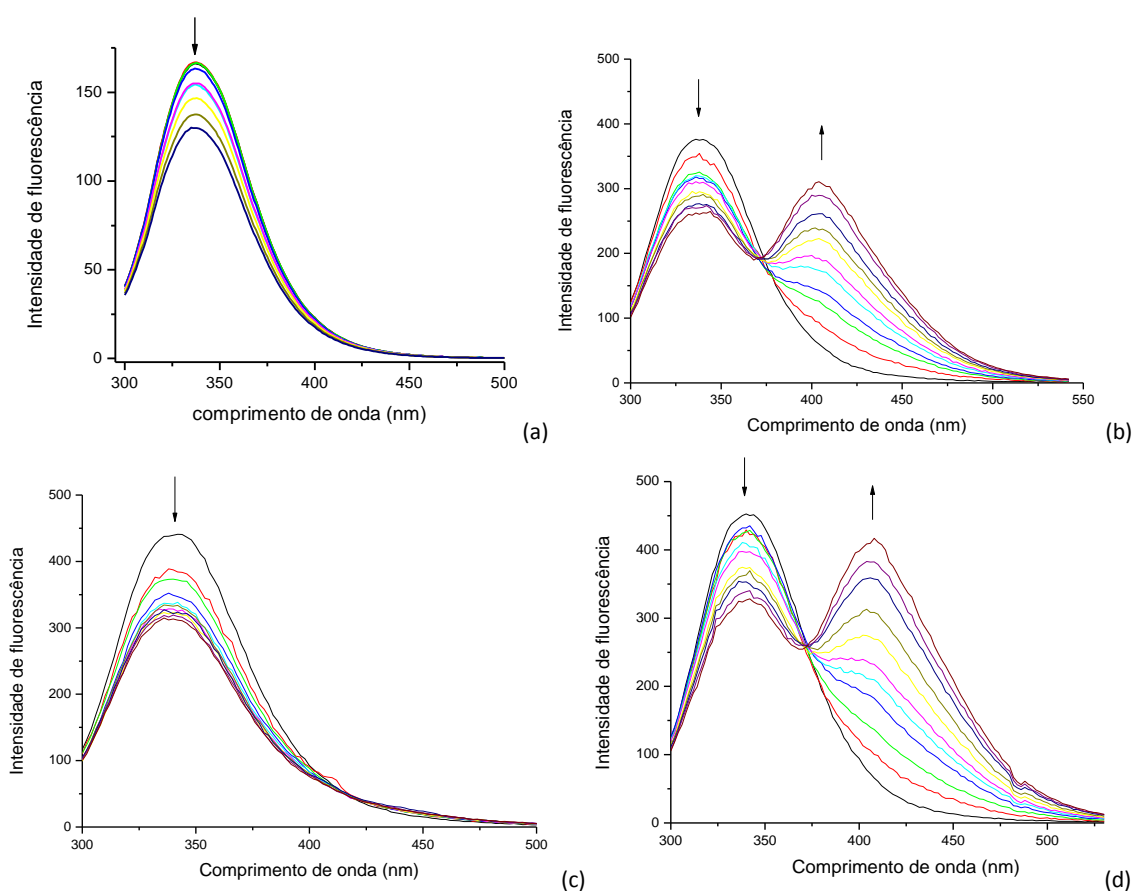
A intensidade da banda de emissão da albumina sérica bovina (BSA) diminuiu após a adição da norfloxacin, de seus complexos de Cu(II) e dos precursores, [CuCl₂(py)₂], [CuCl₂(bipy)] e [CuCl₂(phen)], mostrando que ligante, complexos e precursores suprimem a fluorescência da proteína.

A adição de alíquotas de NOR e de seus complexos proporcionou o surgimento de uma banda de emissão de fluorescência em aproximadamente 404 nm, devido à fluorescência da NOR. Como a diminuição da banda em 336 nm e o aumento daquela em 404 nm, ocorrem simultaneamente, gera-se um ponto de equivalência de emissão, em 373 nm para os sistemas NOR-BSA e complexos-BSA. É importante ter em mente que a NOR associada a Cu(II), ou a seus complexos, não é fluorescente. Portanto, a fluorescência em 404 nm é devida apenas à NOR dissociada.

A norfloxacin e seus complexos absorvem nos comprimentos de onda de excitação e emissão das albuminas. Essas absorções levam a uma atenuação da fluorescência conhecida como efeito de filtro interno primário e secundário e não possuem nenhuma relação com a interação das albuminas com os compostos (Lakowicz, 2006). Para obter constantes de interação entre os complexos e as albuminas é necessário fazer uma correção na intensidade da fluorescência. Essa correção foi feita utilizando a Equação 4.1 e os dados obtidos nos espectros na região do UV-visível (Lakowicz, 2006).

$$F_{corr} = F_{obs} 10^{[(A_{ex} + A_{em})\ell/2]} \quad (4.1)$$

em que F_{corr} e F_{obs} são as intensidades de fluorescência corrigida e observada, respectivamente, A_{ex} e A_{em} são os valores de absorvância nos comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, e l é o caminho ótico em cm. Essa expressão assume que a absorção e a emissão da amostra estão localizadas no centro da cubeta (esta é uma boa aproximação para absorbâncias menores que 0,5). Os espectros de fluorescência não corrigidos e os espectros de absorção encontram-se no Anexo 2 (pág. 127). A Figura 4.2 apresenta os espectros de fluorescência da BSA na ausência e na presença de quantidades crescentes dos compostos em estudo após a correção do efeito de filtro.



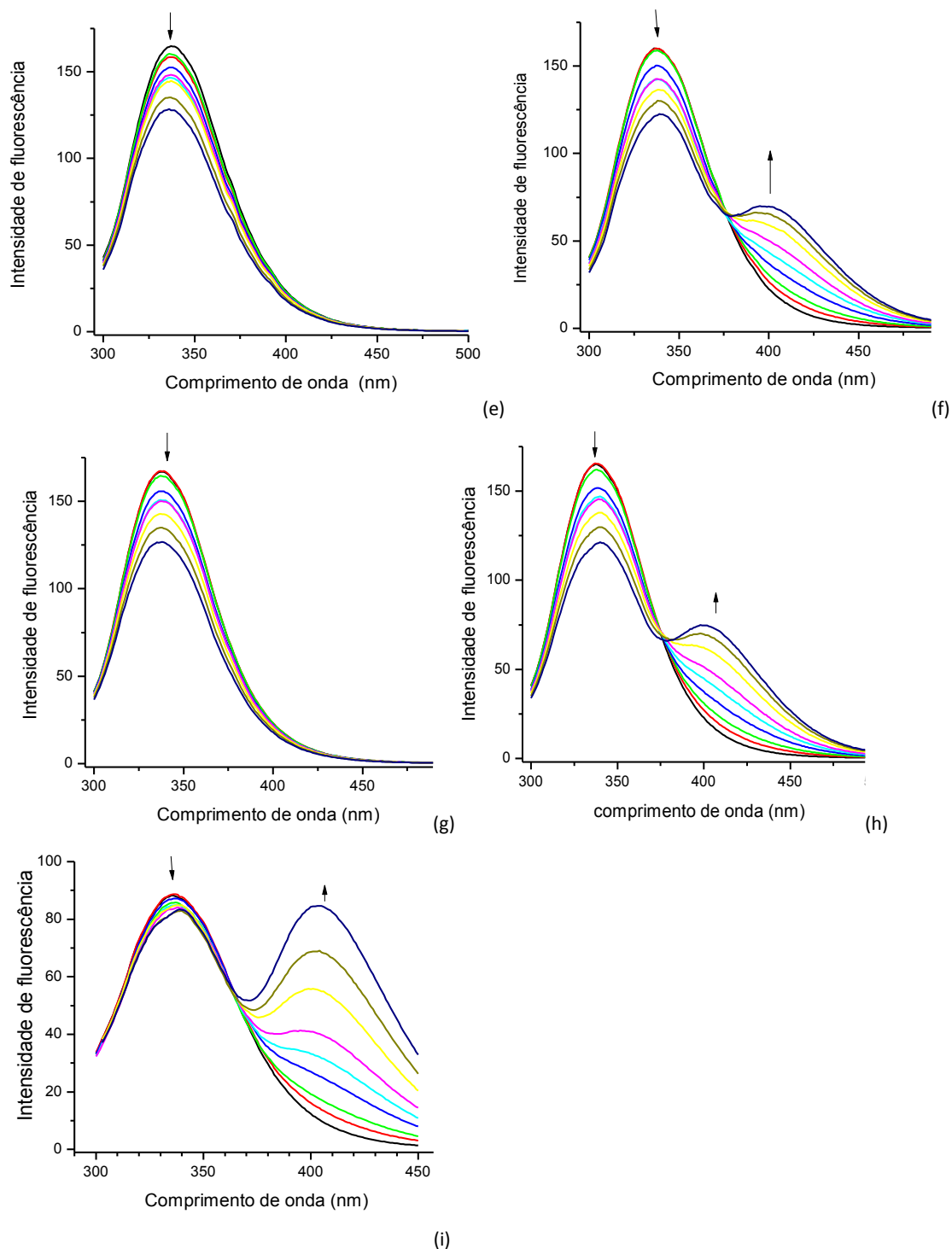
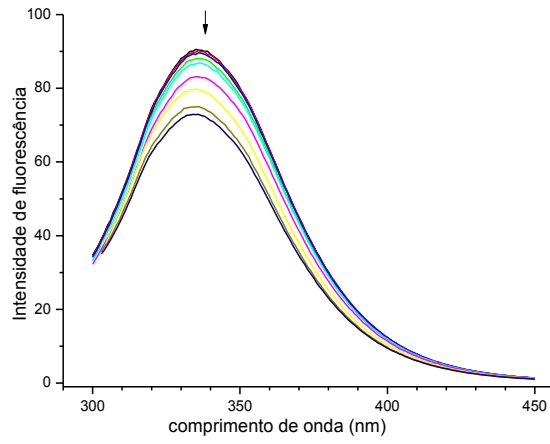


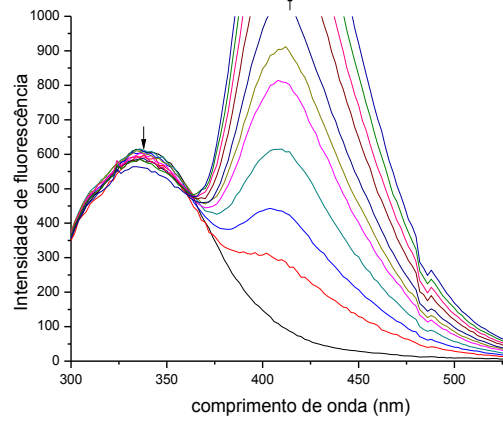
Figura 4.2 - Espectros de fluorescência da BSA na ausência e na presença de quantidades crescentes de (a) CuCl_2 , (b) $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**), (c) $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$, (d) $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**), (e) $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$, (f) $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})] \text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**), (g) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$, (h) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**4**), (i) NOR. A concentração das albuminas foi de $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, temperatura 296 K.

A albumina sérica humana (HSA) também apresenta uma banda de emissão quando excitada em 280 nm, mais fraca que a da BSA por ser devida principalmente a um único resíduo de triptofano, Trp 214. A adição da NOR e seus complexos à HSA também leva à

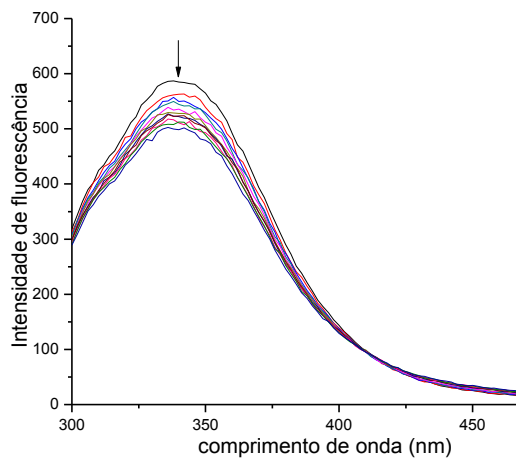
supressão da fluorescência, comportamento muito similar ao da BSA. A Figura 4.3 mostra os espectros de fluorescência da HSA na ausência e na presença de quantidades crescentes dos compostos após a correção do efeito de filtro.



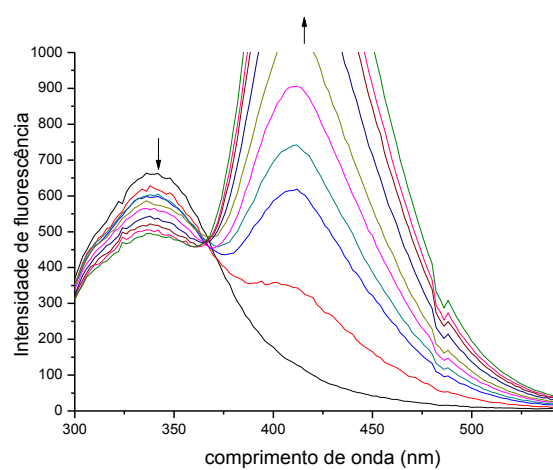
(a)



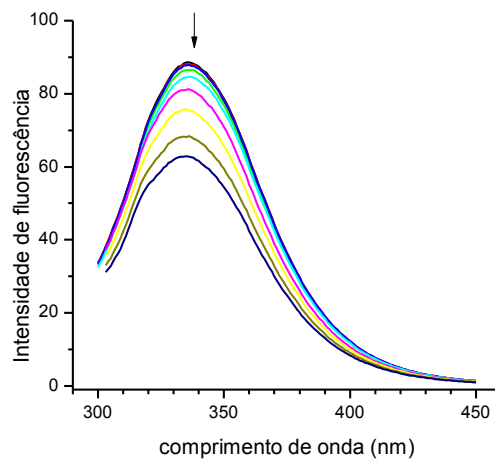
(b)



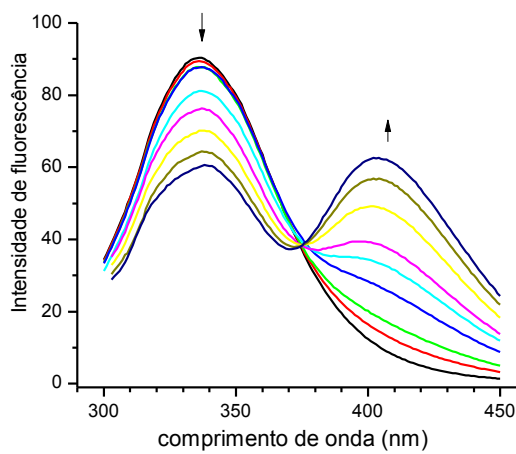
(c)



(d)



(e)



(f)

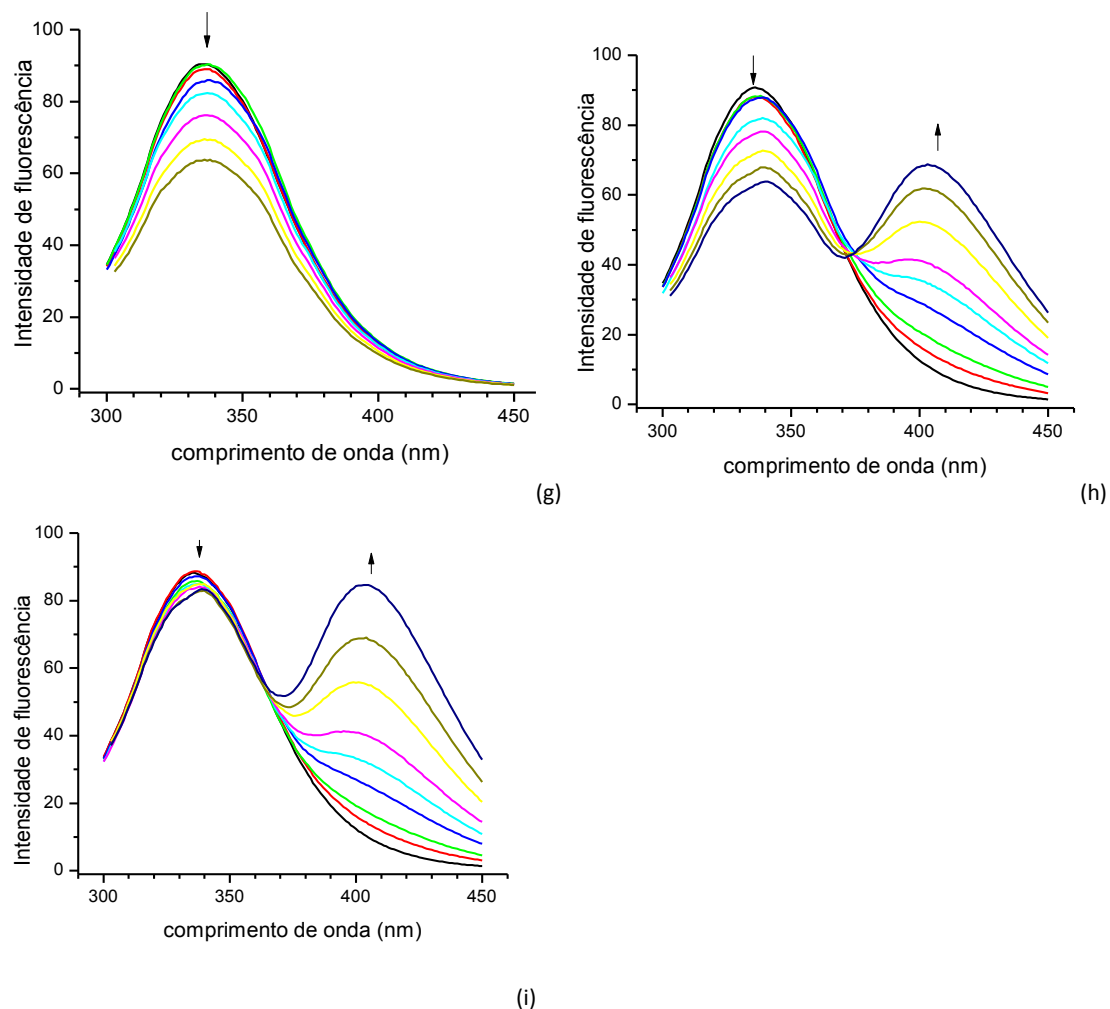
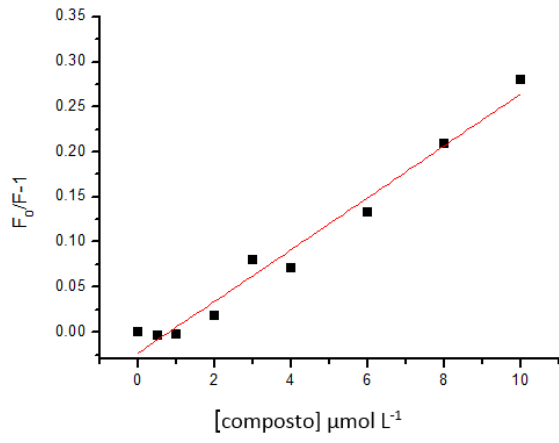
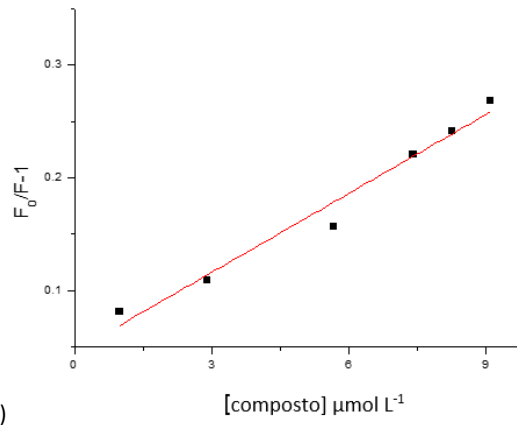


Figura 4.3 - Espectros de fluorescência da HSA na ausência e na presença de quantidades crescentes de (a) CuCl_2 , (b) $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**), (c) $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$, (d) $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**), (e) $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$, (f) $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**), (g) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$, (h) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**4**), (i) NOR. A concentração das albuminas foi de $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, temperatura 296 K.

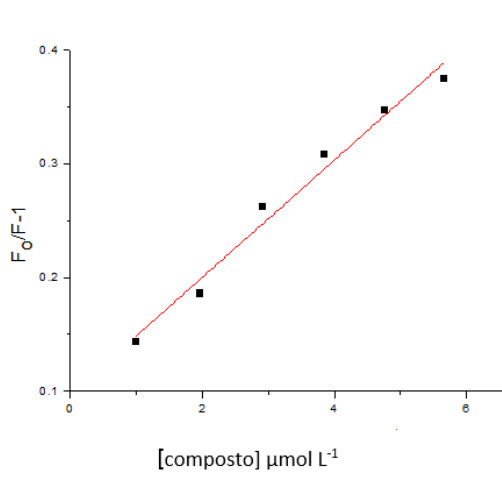
Os resultados obtidos na titulação da BSA e da HSA com a NOR, seus complexos e os precursores foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer (Eq. 1.2, pág. 15). As retas de Stern-Volmer são mostradas nas Figuras 4.4 e 4.5 para a interação com a BSA e com a HSA, respectivamente. A Tabela 4.4 resume os valores obtidos para as constantes de interação albumina-composto (K_{SV}) e os valores do coeficiente de linearidade (R^2).



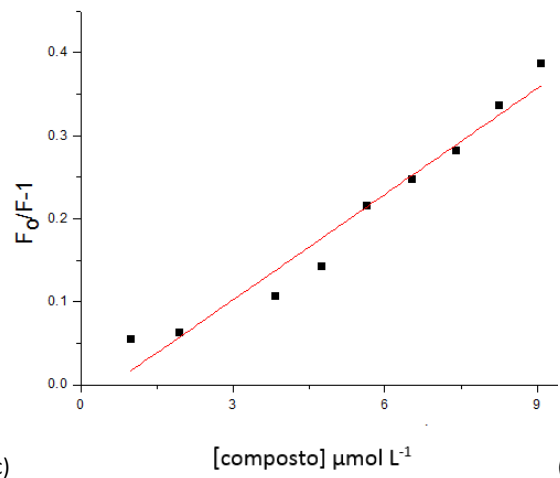
(a)



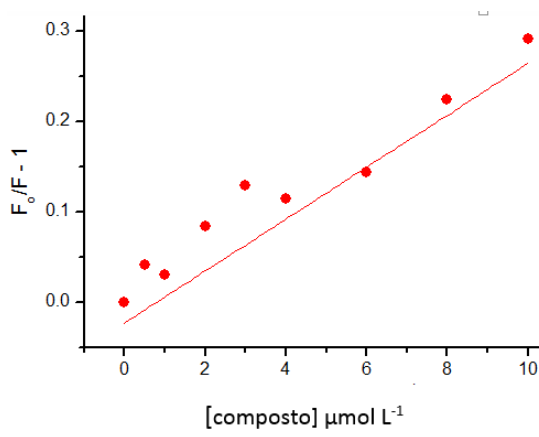
(b)



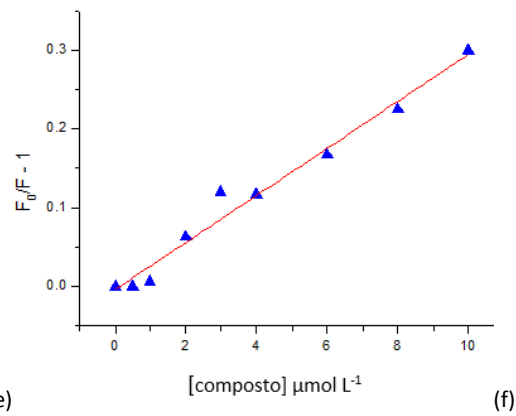
(c)



(d)



(e)



(f)

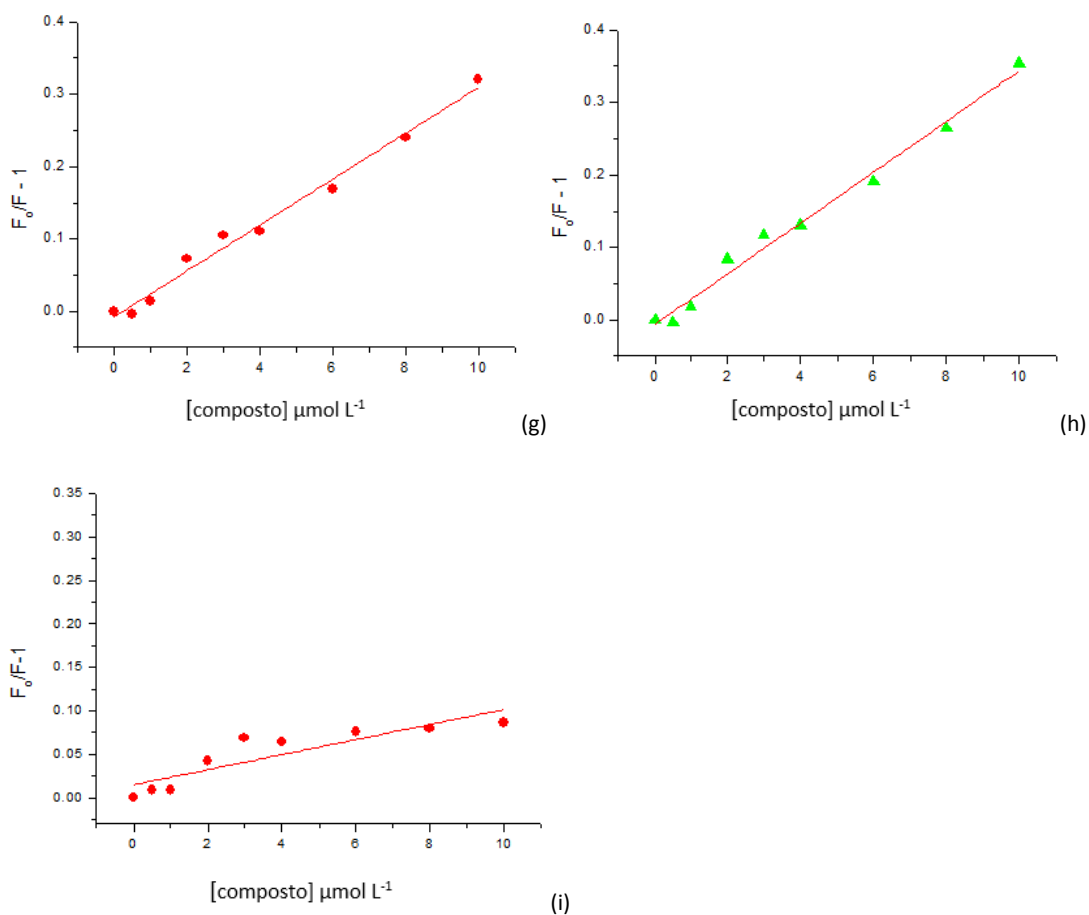
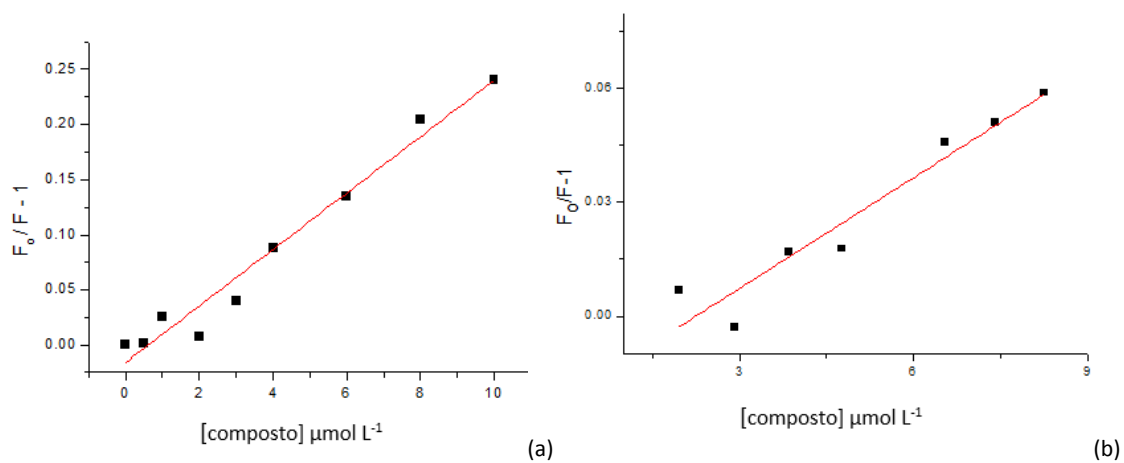
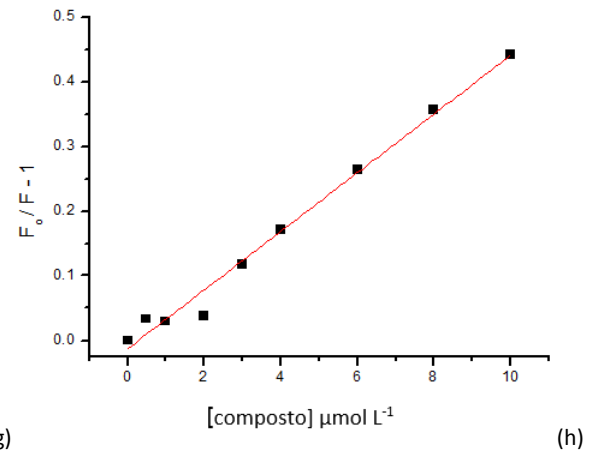
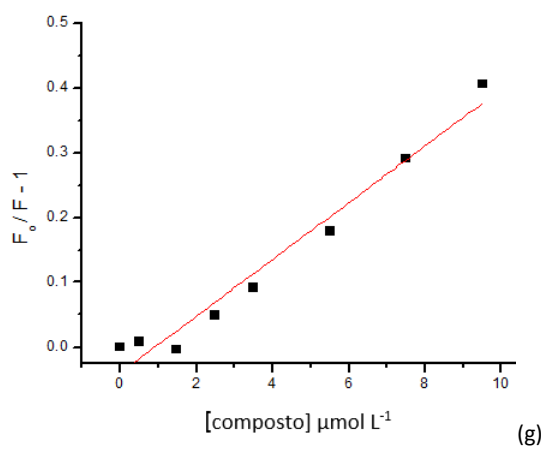
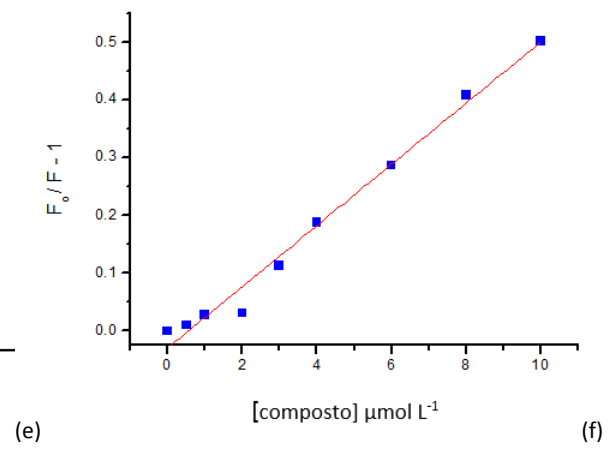
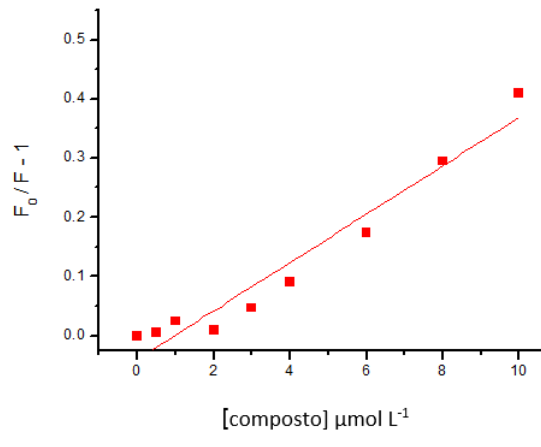
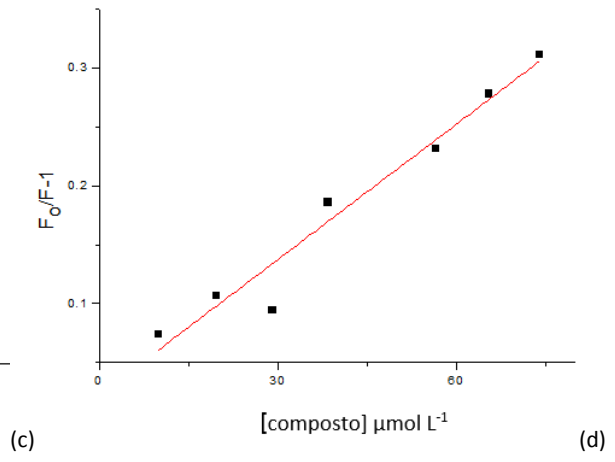
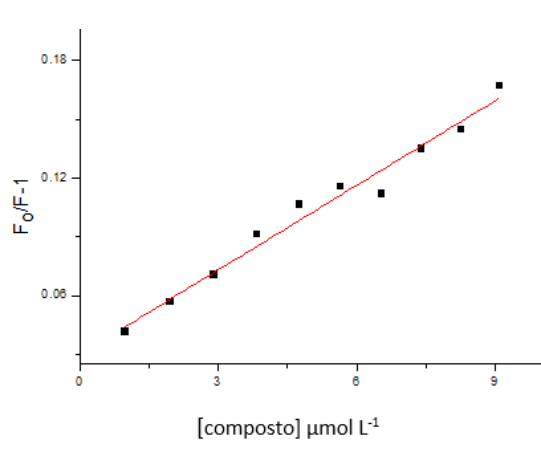
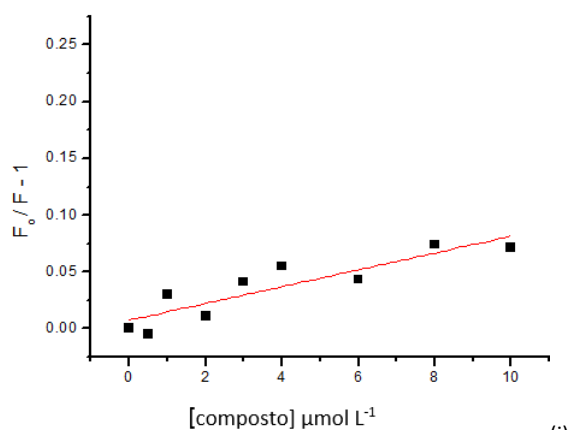


Figura 4.4 - Retas de Stern-Volmer para a interação da BSA com (a) CuCl_2 , (b) $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**), (c) $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$, (d) $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**2**), (e) $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$, (f) $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**), (g) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$, (h) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**4**) e (i) NOR.







(i)

Figura 4.5 - Retas de Stern-Volmer para a interação da HSA com (a) CuCl_2 , (b) $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**), (c) $[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$, (d) $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**), (e) $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$, (f) $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**), (g) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$, (h) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**4**) e (i) NOR.

Tabela 4.4 - Valores das constantes de Stern-Volmer, K_{sv} (L mol^{-1}) e os coeficientes de linearidade, R^2 , para as titulações das albuminas BSA e HSA com os precursores e os complexos de Cu(II) de NOR, a 296 K.

Composto	BSA		HSA	
	$K_{\text{sv}}/10^4$	R^2	$K_{\text{sv}}/10^4$	R^2
CuCl_2	3,5	0,998	2,9	0,998
1	2,3	0,974	0,97	0,928
$[\text{CuCl}_2(\text{py})_2]$	5,2	0,988	1,4	0,976
2	4,2	0,960	3,8	0,959
$[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$	3,1	0,955	5,0	0,955
3	3,0	0,987	5,8	0,987
$[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$	3,5	0,993	5,1	0,993
4	3,7	0,989	4,9	0,989

Os valores de K_{sv} encontrados para os complexos de Cu(II) de NOR e dos precursores com as albuminas foram da ordem de 10^4 indicando que são fortes supressores da fluorescência dos resíduos de triptofano das albuminas. Zivec e colaboradores (2012) sintetizaram complexos de Cu(II) de norfloxacin e fizeram estudos de interação com as

albuminas. Os complexos obtidos foram $[\text{Cu}(\text{nfH})_2]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{nfH})(\text{phen})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, onde nfH representa a norfloxacinã coordenada de forma protonada. As constantes de interaçãõ K_{sv} obtidas nesse estudo foram da ordem de 10^4 e 10^5 , próximas as calculadas no presente trabalho.

Os valores calculados para as constantes k_q foram superiores a 10^{10} indicando que as interações entre estes compostos e as albuminas não ocorrem exclusivamente por meio de mecanismo dinâmico (Lakowicz, 2006; Khan *et al.*, 2012).

4.5 - Estudo da interaçãõ entre os complexos de Cu(II) de norfloxacinã e as albuminas bovina e humana utilizando ressonância paramagnética eletrônica

A interaçãõ entre os complexos **3** e **4** e as albuminas foi estudada também utilizando a ressonância paramagnética eletrônica, o que permite sugerir onde os compostos interagem com as albuminas, visto que as albuminas séricas humana e bovina possuem, pelo menos, dois sítios nos quais os íons Cu(II) podem ligar-se, designados por $\text{Cu}_{(1)}$ e $\text{Cu}_{(2)}$. O sítio $\text{Cu}_{(1)}$ é formado pelo átomo de N da $\alpha\text{-NH}_2$, os átomos de N das duas primeiras ligações peptídicas e o átomo de N3 da His3. Nesse sítio o Cu(II) se liga fortemente aos nitrogênios terminais, em uma geometria quadrada. O sítio $\text{Cu}_{(1)}$ é semelhante nas albuminas humana e bovina (Rakhit *et al.*, 1985; Zgirski e Frieden, 1990). O segundo sítio de ligação das albuminas, $\text{Cu}_{(2)}$, envolve a Cys34. Tanto a albumina bovina (BSA) quanto a humana (HSA) possuem apenas esse resíduo de cisteína livre. Os outros formam 17 pontes dissulfeto ajudando a manter a estrutura terciária das albuminas (Sugio *et al.*, 1999).

A Figura 4.6 mostra os espectros de EPR do sal CuCl_2 na presença de quantidades equimolares de HSA e BSA. Os espectros são característicos de uma superposição dos dois sítios de ligação (linhas hiperfinas identificadas como 1 e 2 da região g_{\parallel}). Na região de g_{\perp} observa-se uma superposição das linhas de ambos os sítios. Os espectros de HSA e BSA são muito semelhantes e os dois sítios de ligação ao Cu(II) estão ocupados mesmo a uma razão molar 1:1, como já foi encontrado por Patel e Pandeya (2000). O espectro de EPR para o Cu(II)-BSA foi simulado (b'), utilizando *EasySpin* (Stoll e Schweiger, 2006) e os parâmetros são mostrados na Tabela 4.5.

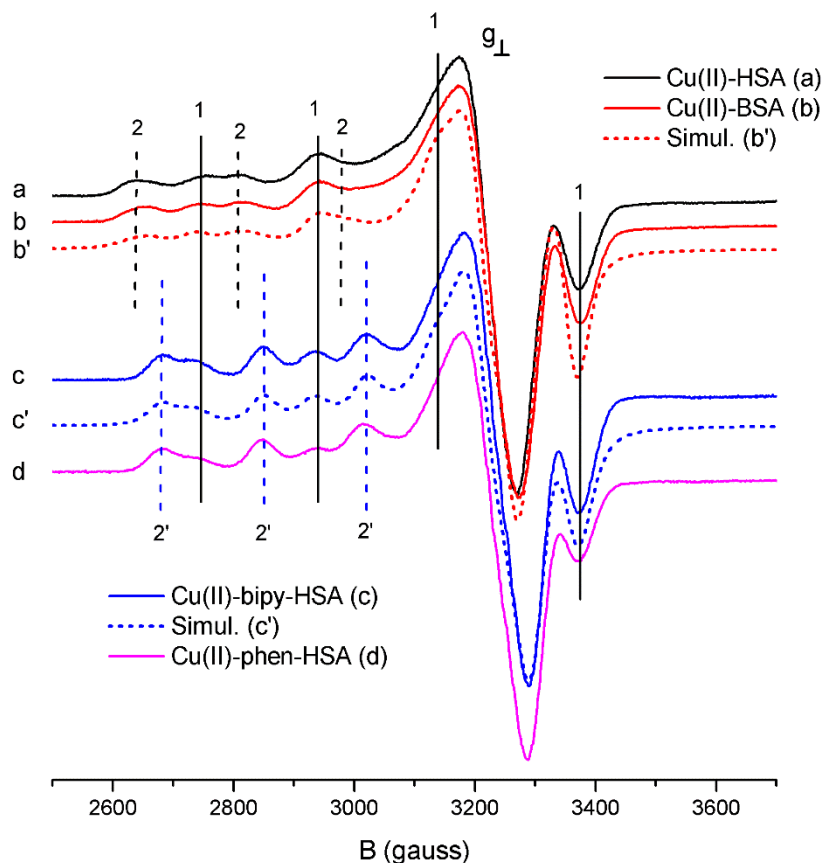


Figura 4.6 - Espectro de EPR, banda X, para Cu(II)-HSA e Cu(II)-BSA (a e b, respectivamente) e para os precursores Cu(II)-bipy e Cu(II)-phen com HSA (c e d, respectivamente). A concentração de Cu, HSA e BSA é de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, 77K. (b') e (c') são os espectros simulados de b e c utilizando o programa *easyspin* (Stoll e Schweiger, 2006). Os parâmetros são mostrados na Tabela 4.5.

A Figura 4.6 também mostra os espectros de EPR dos precursores Cu(II)-bipy e Cu(II)-phen na presença de quantidades equimolares de HSA (c e d). Os espectros de ambos os complexos são muito semelhantes e também mostram uma sobreposição dos dois sítios de ligação. Observa-se que as linhas 1 têm as mesmas posições tanto em c e d como em a e b, sugerindo o mesmo ambiente de ligação. Isto pode ser devido ao deslocamento dos ligantes bipyridina e fenantrolina pela HSA, quando o Cu(II) se liga ao primeiro sítio da HSA. As linhas hiperfinas do segundo sítio (identificada como 2'), no entanto, são deslocadas para valores de campo mais elevados, indicando uma mudança de g_{\parallel} para um valor mais baixo em relação ao Cu(II), no sítio 2. O espectro de EPR de Cu(bipy)(HSA) também foi simulado (c'), utilizando *EasySpin* (Stoll e Schweiger, 2006) e os parâmetros para os dois sítios são mostrados na Tabela 4.5. Esta análise sugere a formação de complexos de ligantes

mistos de [Cu(bipy)(HSA)] e [Cu(phen)(HSA)] neste segundo sítio. Os espectros de c e d também mostram um aumento da população do sítio 2' em relação ao sítio 1, o que indica uma maior afinidade do sítio 2 para os complexos precursores do que para os íons livres de Cu(II). Foram encontrados resultados semelhantes para BSA (Fig. 4.7, d e h).

A Figura 4.7 mostra os espectros de EPR obtidos quando HSA e BSA são adicionadas a soluções dos complexos de cobre numa proporção em quantidade de matéria de 1:1 (a, c, e, g). Pode-se observar que uma fração dos complexos binucleares **3** e **4** (linhas tracejadas 3) dissocia-se e liga-se as albuminas como complexos mononucleares, que apresentam os espectros de EPR característico de uma superposição de dois Cu(II). A Figura 4.7 mostra também os respectivos espectros de EPR de Cu(II)-bipy e Cu(II)-phen com HSA e BSA adicionadas na proporção molar de 1:1 (b, d, f, h). As linhas dos complexos binucleares (tracejada 3) não aparecem na ausência de NOR, mas as linhas para os dois sítios aparecem nas mesmas posições (ver linhas verticais identificadas como 1 e 2') e, portanto, têm parâmetros de EPR semelhantes.

Concluiu-se que as albuminas competem com NOR na interação com os complexos. Provavelmente, complexos mistos de Cu(bipy)(SA) e Cu(phen)(SA) são formados no sítio 2, onde SA são as albuminas séricas. No sítio 1 provavelmente os dois ligantes podem ser deslocados, uma vez que os parâmetros espectrais são os mesmos que para os íons Cu(II).

Comparando os espectros dos dois complexos de Cu(II) de NOR com os seus precursores (Figura 4.7) percebe-se que o sítio 1 é uma componente maior na presença de NOR (a, c, e, g) do que na ausência de NOR (b, d, f, h). A presença de NOR desloca o equilíbrio levando a uma população maior no sítio 1. Uma possível explicação é que as moléculas NOR livres também se ligam a albumina perto do sítio 2 e competem com Cu(II)-bipy e Cu(II)-phen por este sítio.

Uma vez que as albuminas não são capazes de deslocar todas as moléculas de NOR dos complexos com coligantes, conclui-se que as constantes de associação de ambos Cu(II)-bipy e Cu(II)-phen com as albuminas são da mesma ordem de grandeza que a constante de associação com a NOR.

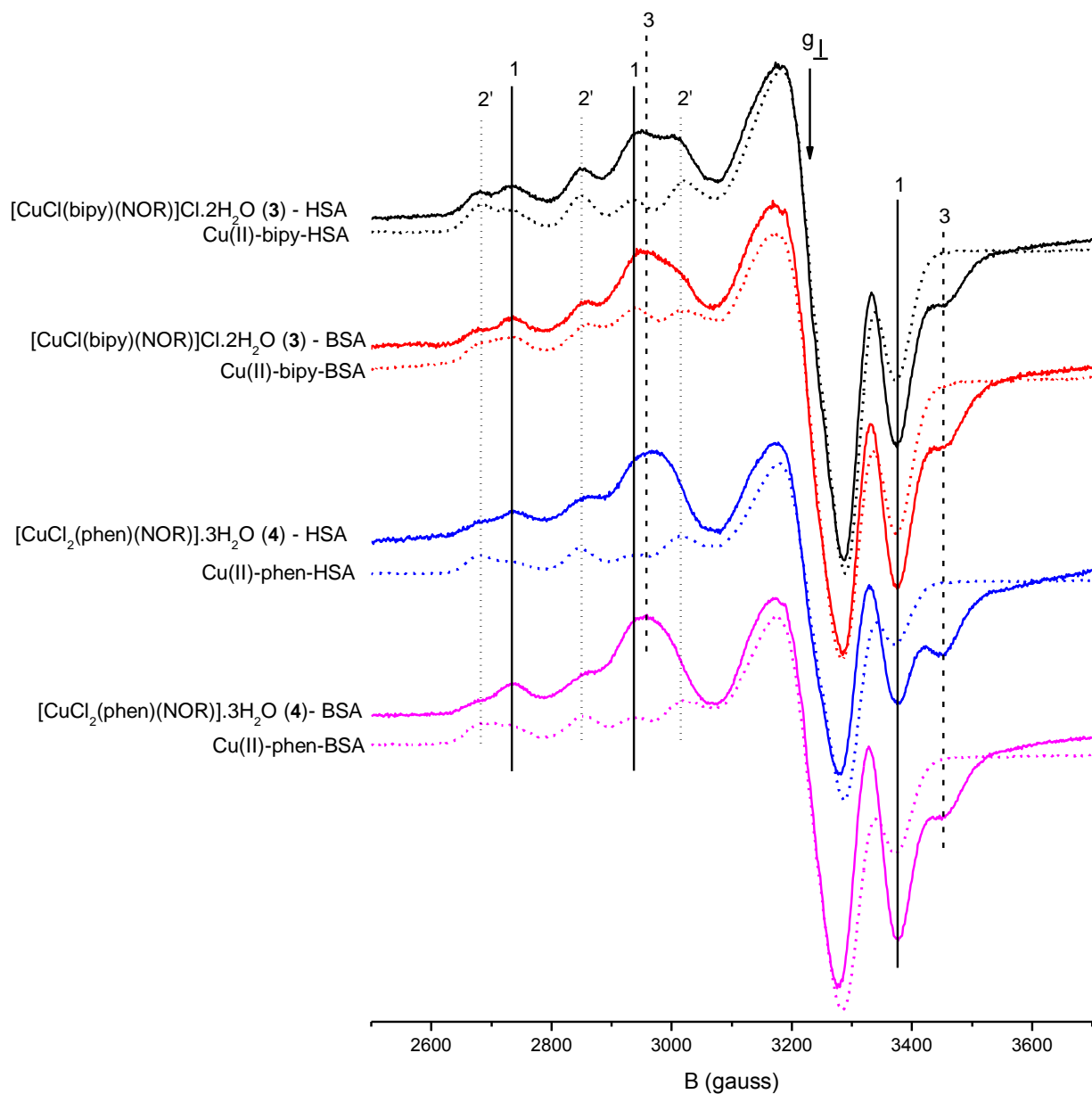


Figura 4.7 - Espectro de EPR, banda X, para o complexo **3**, Cu(II)-bipy, complexo **4** e Cu(II)-phen com quantidades equimolares de HSA ou BSA (concentração $0,5 \text{ mmolL}^{-1}$, pH 7,4, 77K).

Tabela 4.5 - Parâmetros de EPR obtidos simulando a interação dos complexos e precursores de Cu(II) com as albuminas

	Sítio 1		
	g_{\perp}	g_{\parallel}	A_{\parallel} (MHz)
Cu(BSA) e Cu(HSA)*	2,046	2,190	601 (196 G)
Cu(bipy)(HSA) e Cu(phen)(HSA)*	2,052	2,190	603 (197 G)
	Sítio 2 ou 2'		
	g_{\perp}	g_{\parallel}	A_{\parallel} (MHz)
Cu(BSA) e Cu(HSA)*sítio 2	2,070	2,299	505 (157 G)
Cu(bipy)(HSA) e Cu(phen)(HSA)* sítio 2'	2,062	2,265	528 (167 G)
[CuCl ₂ (phen)] sítio único**	2,074	2,292	479 (155 G)

* Parâmetros iguais, mas com diferentes porcentagens de sítio 1 e sítio 2.

** Parâmetros para comparação.

No caso da atividade anti-*T.cruzi*, foram observados resultados semelhantes para os precursores e os complexos de NOR (Tabela 4.2), sugerindo que o Cu(II)-bipy e Cu(II)-phen foram as principais espécies ativas.

4.6- Interação da norfloxacin e de seus complexos de Cu(II) com o DNA

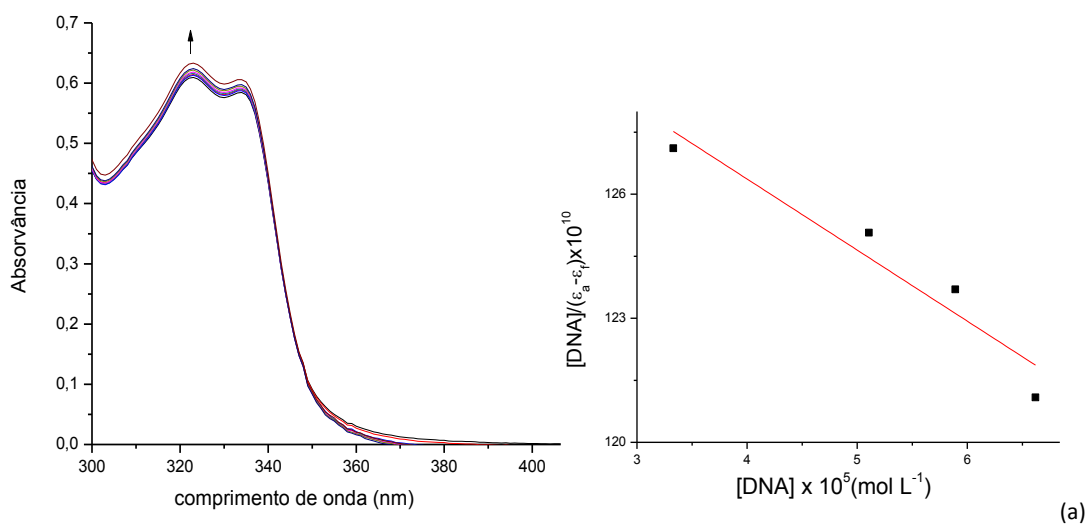
Inicialmente foi calculada a concentração da solução de DNA de timo de vitelo (CT-DNA) utilizando sua absorvância máxima, em 260 nm, e sua absortividade molar ($\epsilon = 6600 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Efthimiadou *et al.*, 2008). A concentração do DNA utilizada neste trabalho foi de $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Calculou-se ainda a razão das absorvâncias em 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), com o objetivo de verificar se as soluções de CT-DNA estavam suficientemente livres de contaminação por proteínas (Skyrianou *et al.*, 2010). O valor obtido foi 1,8, o que indica que o DNA está em bom estado para ser utilizado (Zivec *et al.*, 2012).

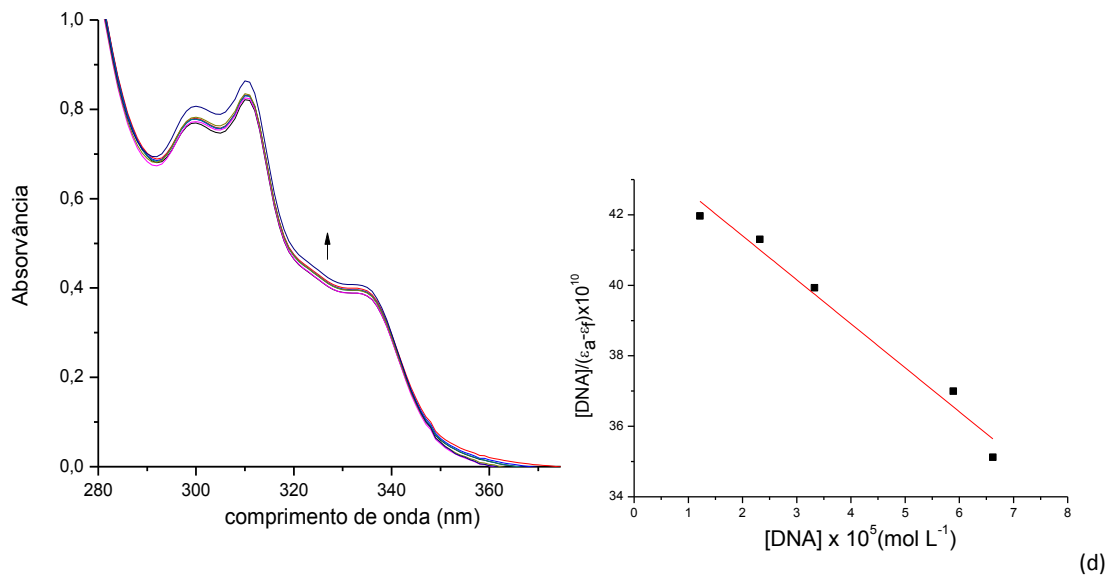
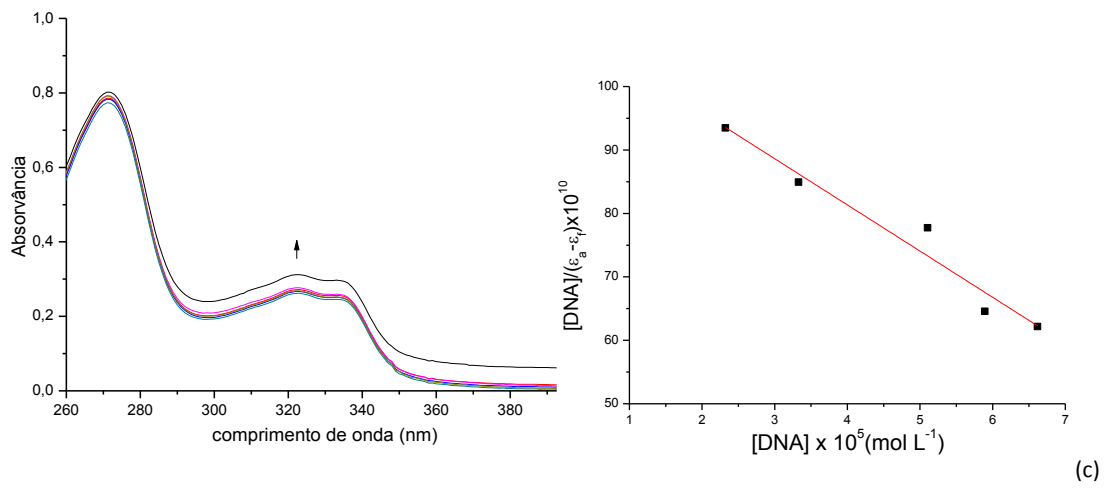
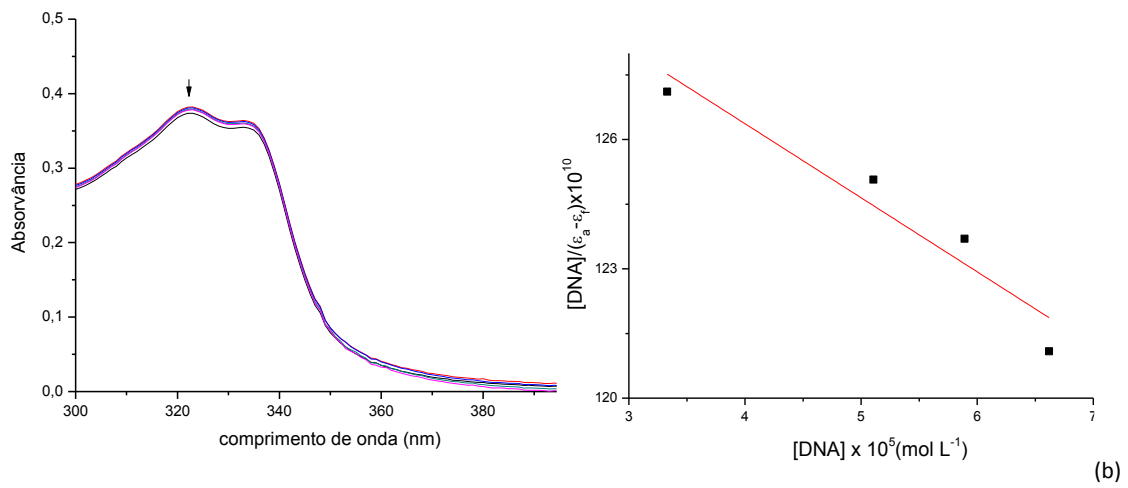
No espectro de absorção da NOR observam-se duas bandas em 272 e 324 nm e um ombro em 334 nm, atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ da norfloxacin. No espectro de **1** e **2** são observadas as bandas da NOR. Nos espectros de **3** e **4**, além das bandas

características da NOR, observa-se uma banda em 311 e 290 nm, respectivamente, características de anéis aromáticos conjugados da bipy e da phen.

Os espectros de UV-vis da norfloxacinina e de seus complexos de Cu(II) na ausência e na presença de quantidades crescentes do DNA são mostrados na Figura 4.8. Observou-se um leve aumento da intensidade da absorvância após a adição de quantidades crescentes de DNA para a norfloxacinina livre e para **2**, **3** e **4**, ou seja, hipercromismo sugerindo que a interação dos compostos pode ocorrer na parte externa do DNA (Zivec *et al.*, 2012). Nos espectros de **1** observou-se hipocromismo, ou seja, uma diminuição da intensidade da absorvância, que sugere que a interação **1**-DNA pode ocorrer por intercalação ou interação eletrostática (Zivec *et al.*, 2012).

A aplicação da equação de Scatchard (Eq. 1.1, pág. 14) permitiu a obtenção de uma reta e a constante de ligação DNA-droga foi obtida por meio da razão entre o coeficiente angular e o coeficiente linear dessa reta (ver Figura 4.8). Na Tabela 4.6 são listados os valores das constantes de associação, K_b , da norfloxacinina livre e de seus complexos de Cu(II) com o DNA, em pH 7,4. Os valores de absorvância utilizados no cálculo de K_b foram tomados nos seguintes comprimentos de onda: 323 nm para a NOR livre e 322 nm para complexos.





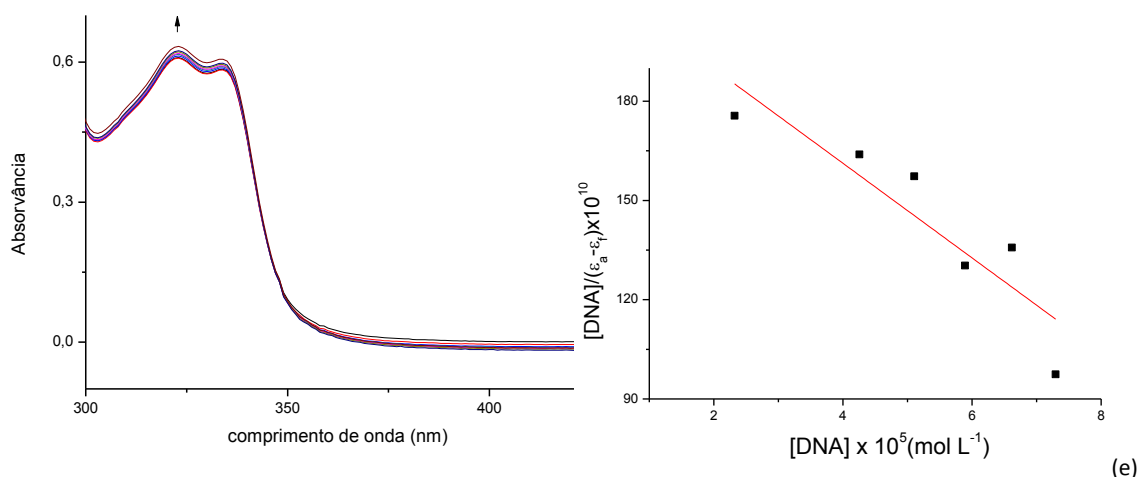


Figura 4.8 - Espectros de absorção de (a) norfloxacina, (b) $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**), (c) $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**), (d) $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) e (e) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**4**) na ausência e na presença de concentrações crescentes de DNA (período de incubação = 30 minutos). Reta inserida – plotagem de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}] \text{ mol L}^{-1}$. $[\text{DNA}] = 1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{composto}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a temperatura ambiente.

Tabela 4.6 - Constantes de ligação (K_b) para a interação do DNA com a norfloxacina e seus complexos de Cu(II)

Composto	$K_b \times 10^3 (\text{L mol}^{-1})$	R^2
norfloxacina	4,55	0,970
$[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1)	1,29	0,923
$[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2)	6,66	0,957
$[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3)	2,84	0,977
$\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4)	4,54	0,944

Os valores de K_b calculados para a interação da norfloxacina e seus complexos de Cu(II) com o DNA são da ordem de 10^3 L mol^{-1} , indicando que os complexos interagem menos com o DNA que os intercaladores clássicos, que possuem valores de K_b de 10^5 (Pantel, Pamar e Gandhi, 2010).

4.7 - Conclusão

Os complexos $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})].\text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})].\text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}.2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) e $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})].3\text{H}_2\text{O}$ (**4**), onde NOR representa a norfloxacina, py a piridina, bipy a 2,2'-bipiridina e phen a 1,10-fenantrolina, ativos contra o *Trypanosoma cruzi*, também mostraram-se promissores como agentes antibacterianos. O estudo de interação com as albuminas por fluorescência demonstrou que os complexos interagem moderadamente com a BSA e com a HSA por um mecanismo predominantemente estático. O estudo de interação por EPR permitiu concluir que os dois sítios de interação da albumina com o Cu(II) são utilizados na interação dos complexos com a albumina, sendo que no primeiro sítio é observada a presença do íon Cu(II) e no segundo sítio a presença das espécies Cu(II)-bipy ou Cu(II)-phen. A albumina pode ser um dos alvos que participam de mecanismo de ação dos complexos tanto na atividade anti-*T.cruzi* como na atividade antibacteriana. O estudo de interação dos compostos com DNA mostrou que os valores das constantes de interação foram da ordem de 10^3 L mol^{-1} , indicando que os complexos interagem moderadamente com o DNA e este não deve ser o principal alvo do mecanismo de ação dos complexos de Cu(II) de NOR.

Complexos de Au(I) e Au(III) de norfloxacin: síntese, atividade antimicrobiana e interação com DNA e albumina humana

Os complexos $[\text{AuS}(\text{CH}_3)_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (**5**) e $[\text{Au}(\text{pyc})(\text{NOR})_2]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**6**), onde pyc é o ácido piridino-2-carboxílico e NOR é a norfloxacin, foram obtidos e caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade, termogravimetria, espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear. A atividade antibacteriana do ligante e dos complexos foi testada e suas interações com o DNA e a albumina humana foram estudadas utilizando espectroscopia na região do UV-vis e fluorescência, respectivamente.

5.1 - Dados de análise elementar e de medidas de condutividade

Os dados de análise elementar para o complexo **5** sugerem uma proporção Au:S(CH₃)₂:NOR de 1:1:1 e um cloreto. Para o complexo **6**, os dados sugerem uma proporção de Au:pyc:NOR de 1:1:2, dois cloretos e a presença de três moléculas de água de hidratação, que foram confirmadas pelas curvas TG/DTG do complexo.

As curvas TG/DTG do complexo **6** mostram uma perda de massa de, aproximadamente, 11 %, entre 298 e 415 K. O valor calculado para a saída dos dois cloros mais as três moléculas de água foi de 11,5 %.

As medidas de condutividade, em N,N-dimetilformamida (DMF), sugerem que o complexo **5** é eletrólito 1:1 e que **6** é eletrólito 1:2 (Geary, 1971). As seguintes fórmulas foram propostas para os complexos de Au(I) e Au(III): [AuS(CH₃)₂(NOR)]Cl (**5**) e [Au(pyc)(NOR)₂]Cl₂.3H₂O (**6**). A Tabela 5.1 resume os dados de análise elementar e condutividade para os complexos.

Tabela 5.1 - Dados de análise elementar e condutividade para os complexos de Au(I) e Au(III) de NOR.

Complexos	Análise elementar			Λ ($\mu\text{S cm}^{-1}$) ^a
	% C	% H	% N	
[AuS(CH ₃) ₂ (NOR)]Cl (5)	35,1 (35,2)	3,1 (3,9)	6,9 (6,8)	72
[Au(pyc)(NOR) ₂]Cl ₂ .3H ₂ O (6)	42,2 (42,2)	4,2 (4,3)	8,9 (9,1)	124

^aValores obtidos em solução de DMF correspondentes a concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

5.2 - Espectroscopia na Região do Infravermelho

O modo de coordenação mais comum das fluorquinolonas (FQ) é por meio das carbonilas carboxílica e cetônica (Turel, 2002), no entanto, as FQ's também podem se coordenar por meio dos nitrogênios do anel piperazina (Gouvea *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2009).

No espectro da NOR livre observa-se a banda atribuída ao estiramento da carbonila do ácido carboxílico, $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{carb}}$, em 1730 cm^{-1} . Essa banda está ausente quando essa carbonila participa da coordenação (Martins *et al.*, 2012; Zivec *et al.*, 2012). Nos espectros dos complexos **5** e **6** essa banda é observada em 1722 e 1718 cm^{-1} , respectivamente, o que sugere que a coordenação não envolve o ácido carboxílico. A banda atribuída ao

estiramento da carbonila cetônica, $\nu(\text{C}=\text{O})_p$, aparece no espectro da NOR em 1616 cm^{-1} , deslocando-se pouco nos espectros dos complexos **5** e **6**, 10 e 12 cm^{-1} , respectivamente. Quando essa carbonila participa da coordenação, os deslocamentos observados são superiores a 25 cm^{-1} (Gouvea *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2012; Dorofeev, 2004). Logo, os pequenos deslocamentos observados sugerem que a carbonila cetônica não participa da coordenação. Conclui-se assim que a coordenação da NOR ao ouro deve ter ocorrido através do nitrogênio do grupo piperazina (Gouvea *et al.*, 2012). Os espectros na região do infravermelho para a NOR e para **5** e **6** encontram-se no Anexo 1 (pág. 100-102).

5.3 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para os complexos de Au(I) e Au(III) de norfloxacin

A Tabela 5.2 lista as atribuições dos principais sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da NOR e de seus complexos de Au(I) e Au(III). Os espectros encontram-se no Anexo 1 (pág. 108-110). A Figura 5.1 mostra a estrutura da norfloxacin.

Nos espectros de RMN de ^1H observa-se que os valores dos deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios da NOR são semelhantes aos observados para os complexos **5** e **6**, exceto para os hidrogênios ligados ao anel piperazina. Nos espectros de **5** e **6**, o sinal referente aos hidrogênios H_5 e H_3 deslocam-se para a região em que aparece o sinal dos hidrogênios da água e, por isso, não puderam ser observados separadamente. Os sinais referentes a H_2 e H_6 deslocam-se aproximadamente $0,3\text{ ppm}$ nos espectros de **5** e **6**, indicando que norfloxacin está coordenada ao ouro por meio do anel piperazina (Vieira *et al.*, 2009; Gouvea *et al.*, 2012). Não foi possível observar o sinal do coligante dimetilsulfito no espectro do complexo **5**, pois o solvente utilizado na obtenção do espectro gera um sinal intenso no mesmo valor de deslocamento químico do sinal do coligante ($\sim 2,5\text{ ppm}$). Os valores das integrais dos sinais de hidrogênio confirmam que a razão NOR:pyc é de 2:1 no complexo **6**.

Nos espectros de RMN de ^{13}C da NOR e de seus complexos de Au(I) e Au(III) observa-se que os sinais atribuídos aos carbonos das carbonilas cetônica e carboxila, C_{11} e C_{19} , permanecem praticamente inalterados, indicando que esses grupos não participam da coordenação (Vieira *et al.*, 2009; Gouvea *et al.*, 2012), assim como os sinais atribuídos aos carbonos C_{21} e C_{22} , próximos ao N_{14} , demonstrando que o N_{14} não participa da coordenação. Os sinais atribuídos aos carbonos C_3 e C_5 do anel piperazina deslocaram, aproximadamente,

3 ppm, sugerindo o envolvimento do nitrogênio da piperazina na coordenação ao ouro (Gouvea *et al.*, 2012).

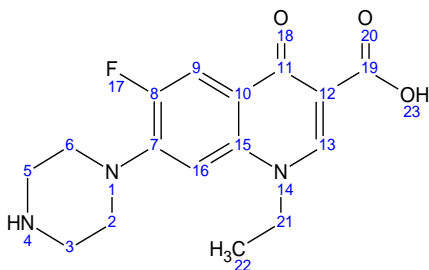


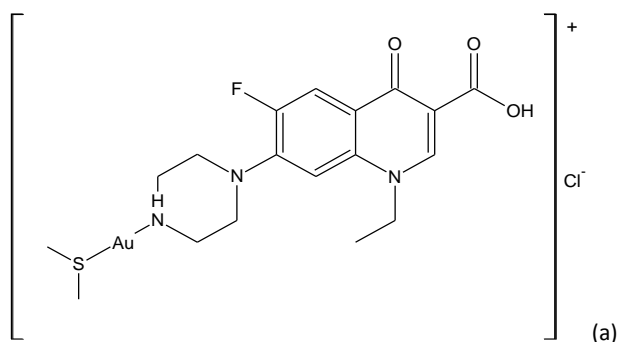
Figura 5.1 - Representação da estrutura da norfloxacina.

Tabela 5.2 - Principais deslocamentos químicos (δ /ppm) dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para a NOR e seus complexos de Au(I) e Au(III), em DMSO- d_6 , 400 MHz.

Composto	H ₃ , H ₅	H ₂ , H ₆	C ₃ , C ₅	C ₂ , C ₆	C ₁₁	C ₁₉	C ₂₁	C ₂₂
NOR	2,87 (m)	3,23 (m)	45,42	50,84/50,80	176,18	166,23	49,10	14,36
(5)	^a	3,57	48,06/44,02	50,77/49,88	176,15	166,05	49,06	14,42
(6)	^a	3,59	42,45	46,42	176,17	166,04	49,13	14,47

^asobreposto pelo sinal da água

Com base nos dados de análise elementar, infravermelho e RMN foram propostas estruturas para os complexos de Au(I) e Au(III) de NOR, nas quais o complexo **5** tem geometria linear e o complexo **6** tem geometria quadrado planar (Figura 5.2).



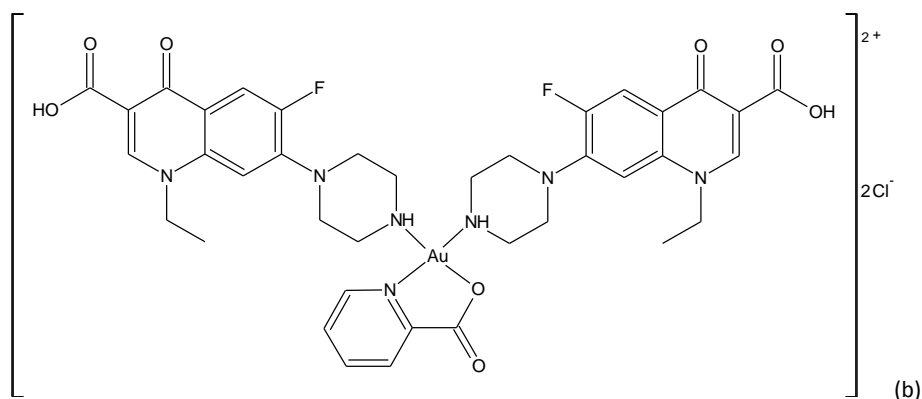


Figura 5.2 - Representação das estruturas propostas para os complexos (a) $[\text{AuS}(\text{CH}_3)_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (**5**) e (b) $[\text{Au}(\text{pyc})(\text{NOR})_2]\text{Cl}_2$ (**6**).

5.4 – Testes de atividade antibacteriana para a NOR e seus complexos de ouro

Os testes de atividade antibacteriana dos precursores, da NOR e de seus complexos de ouro foram feitos frente às cepas *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Citrobacter freundii* (CF) e *Listeria monocytogenes* (LM). Os valores da concentração mínima necessária para inibir cinquenta por cento do crescimento das bactérias (IC_{50}), para os complexos de NOR são mostrados na Tabela 5.3.

A ampicilina, utilizada como antibiótico de referência, e a NOR apresentaram IC_{50} inferior a $6,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ frente a todas as bactérias testadas. Os sais de ouro não foram ativos. Os complexos **5** e **6** apresentaram valores de IC_{50} entre $3,80\text{--}12,47 \mu\text{mol L}^{-1}$ para as cepas testadas, com exceção de *Staphylococcus aureus*, cujos valores foram mais elevados (ver Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) para os complexos de Au(I) e Au(III) de norfloxacin frente a quatro cepas de bactérias.

Composto	SA	PA	CF	LM
$[\text{AuS}(\text{CH}_3)_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (5)	47,6	8,42	10,6	9,17
$[\text{Au}(\text{pyc})(\text{NOR})]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (6)	64,4	9,51	3,80	12,47

Embora a complexação ao ouro não tenha contribuído para o aumento da atividade antibacteriana da norfloxacin, ela pode vir a ser interessante em cepas resistentes, uma vez que os complexos foram ativos em concentrações da ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$.

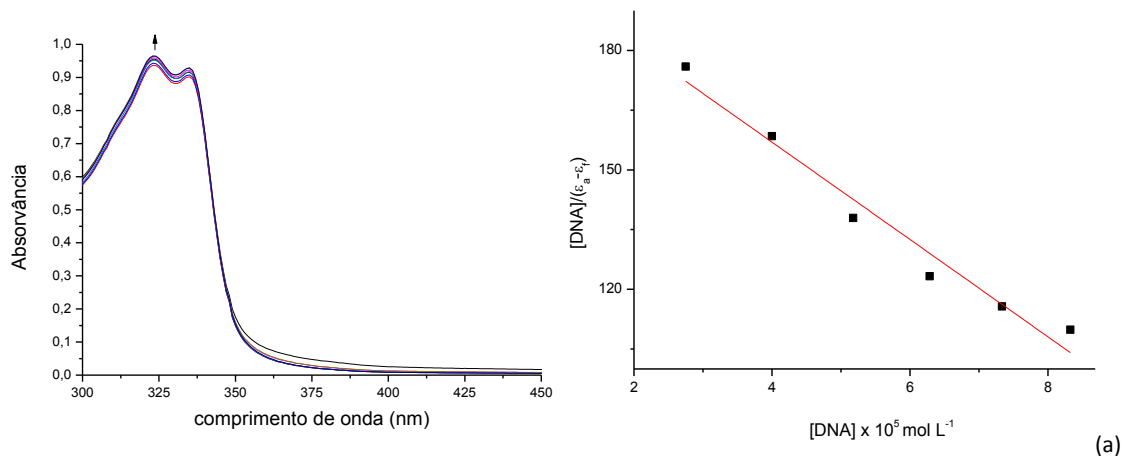
5.5 - Interação da norfloxacin e de seus complexos de Au(I) e Au(III) com o DNA

A interação entre a norfloxacina e seus complexos de Au(I) e Au(III) com o DNA foi estudada, utilizando-se DNA de timo de vitelo (CT-DNA).

Na Figura 5.3a, o espectro inicial, em preto, refere-se à norfloxacina livre, na ausência de CT-DNA. Nesse espectro foram observadas duas bandas em 272 e 324 nm e um ombro em 334 nm, atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ da fluorquinolona (Skyrianou *et al.*, 2010). As mesmas bandas são observadas nos espectros dos complexos, com pequenos deslocamentos.

Os espectros da NOR e dos complexos obtidos durante a titulação com CT-DNA, são mostradas na Figura 5.3. Os valores das constantes de ligação DNA-composto (K_b) foram obtidos pelo monitoramento das mudanças ocorridas na absorvância em 324 nm para a NOR e, em 322 nm, para os complexos e são listados na Tabela 5.4, em pH 7,4. Observa-se que todos os complexos possuem valores de K_b semelhantes, da ordem 10^3 L mol^{-1} e, portanto, interagem moderadamente com o DNA.

A intensidade das bandas de absorção da norfloxacina e de seus complexos aumenta, após a adição de alíquotas sucessivas de CT-DNA, resultando em hipercromismo, indicando que a interação da NOR e dos seus complexos de ouro com DNA pode ocorrer na parte externa do CT-DNA (Zivec *et al.*, 2012).



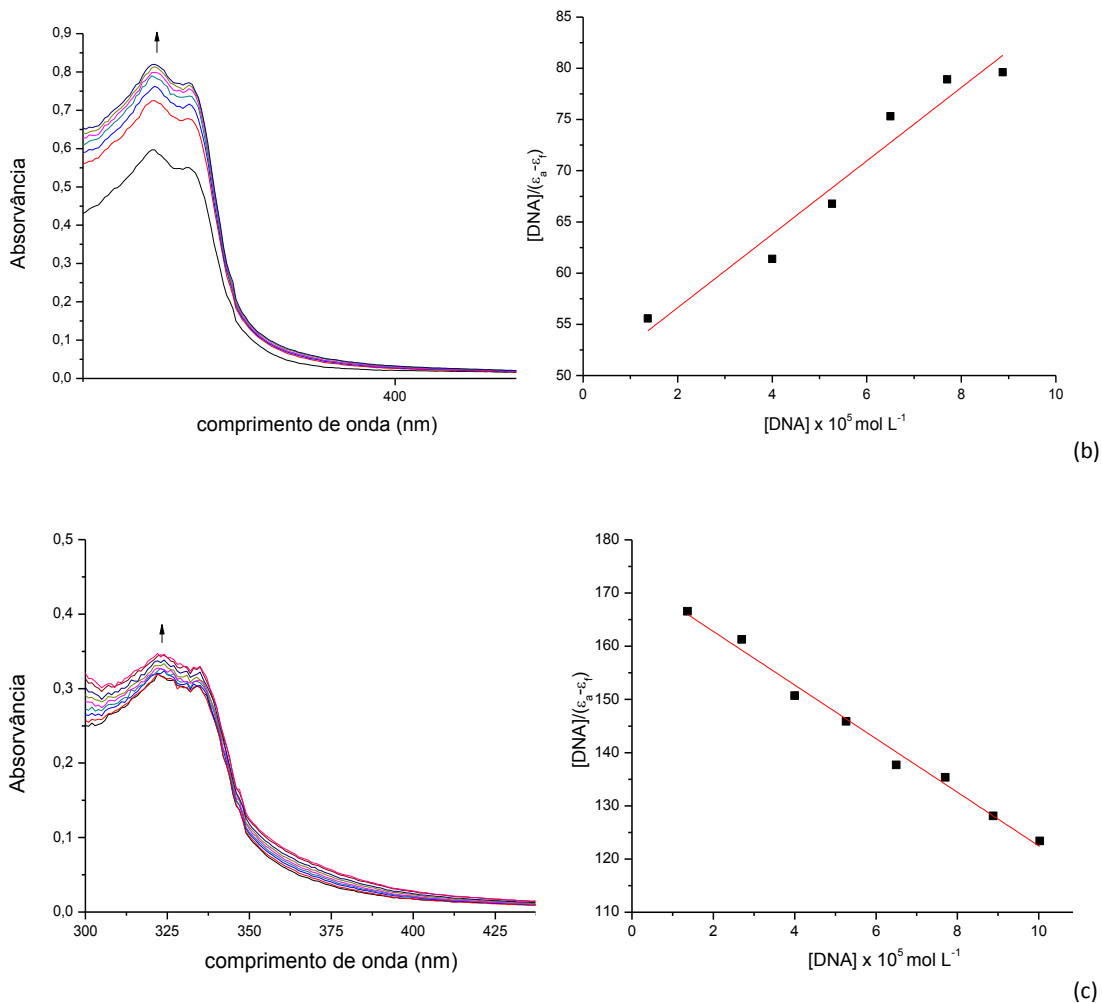


Figura 5.3 - Espectros de absorção de (a) norfloxacin, (b) complexo **5** e (c) complexo **6** na ausência e na presença de concentrações crescentes de DNA (período de incubação = 30 minutos). Retas inseridas – plotagem de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA]$ mol L⁻¹. $[composto] = 3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, a temperatura ambiente.

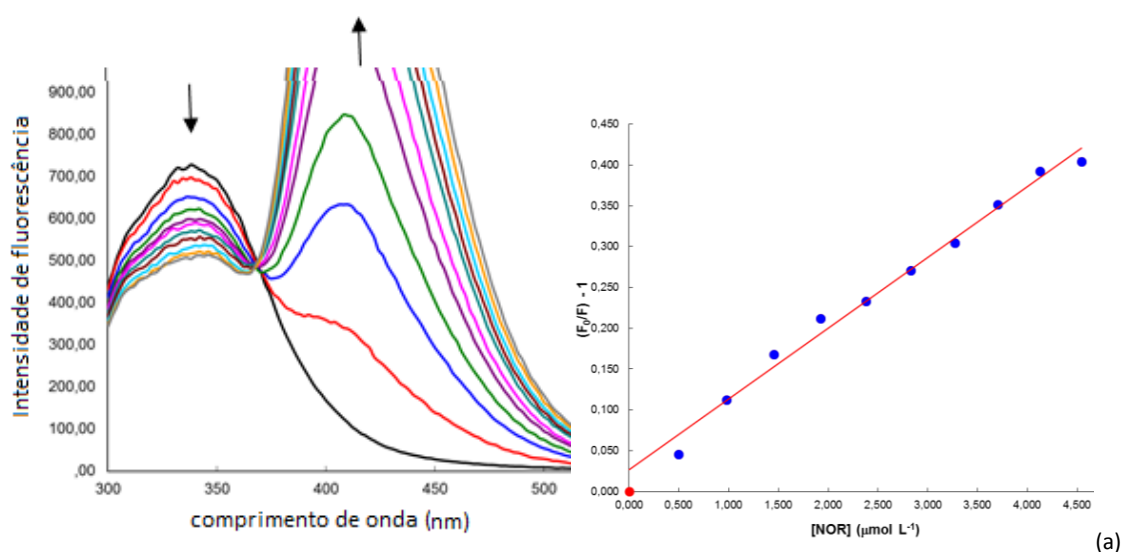
Tabela 5.4 - Constantes de ligação (K_b) e coeficientes de linearidade (R^2) para a interação da norfloxacin e dos complexos de Au(I) e Au(III) com o DNA.

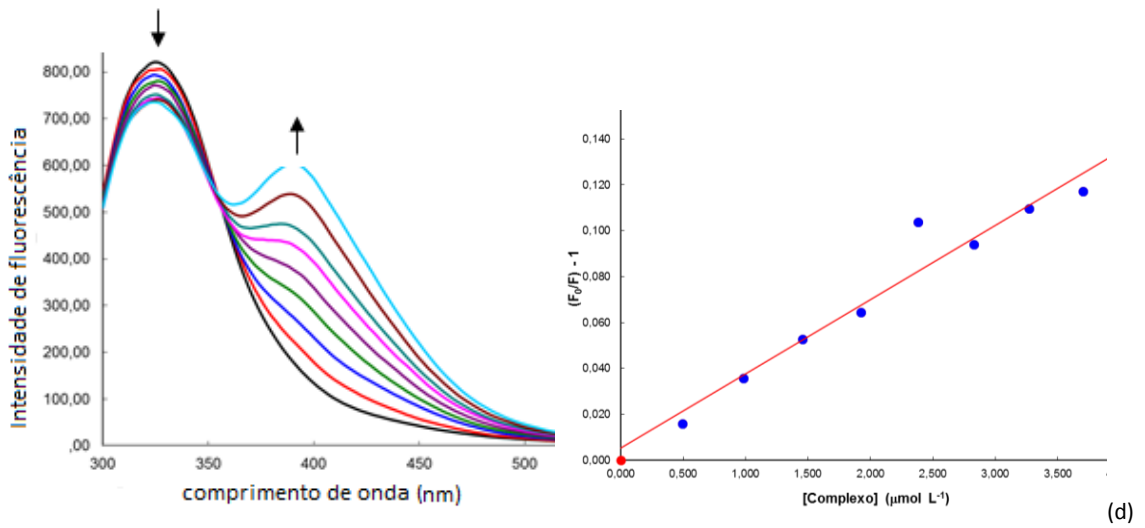
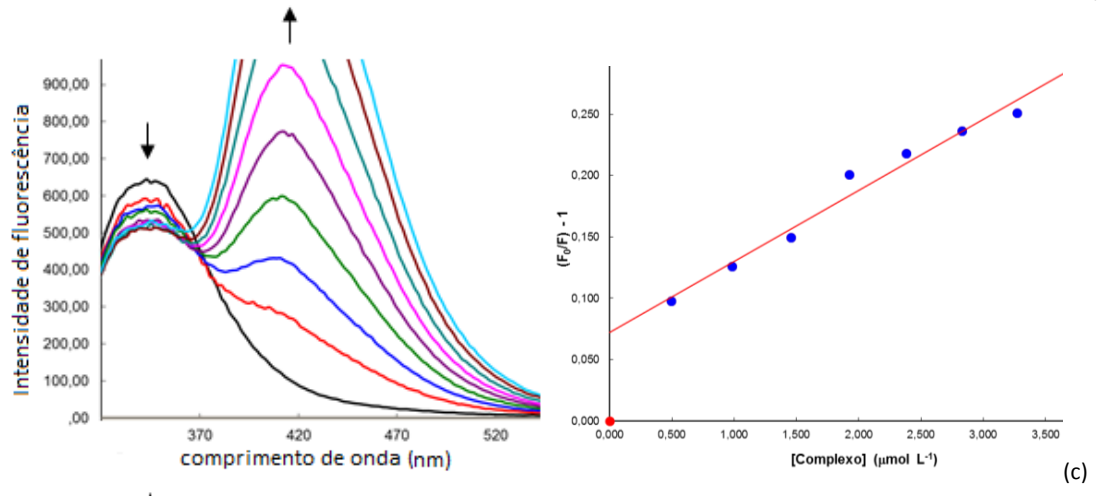
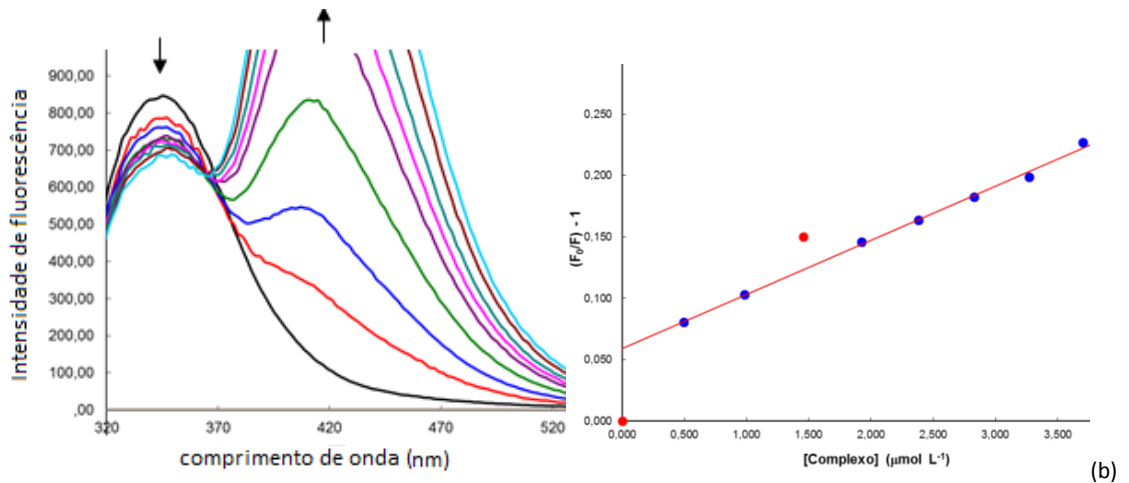
Composto	$K_b/10^3$	R^2
Norfloxacin	5,94	0,969
$[AuS(CH_3)_2(NOR)].Cl$ (5)	7,24	0,954
$[Au(pyc)(NOR)_2]Cl_2 \cdot 3H_2O$ (6)	2,97	0,989

5.6 - Interação da norfloxacina e de seus complexos com a albumina

A HSA, quando excitada em 295 nm, mostra uma intensa banda de emissão em 345 nm. A intensidade de fluorescência da HSA decresce na presença da NOR e de seus complexos de ouro, indicando interação com a HSA (Lakowicz, 2006). Os resultados obtidos na titulação da HSA com a NOR e seus complexos foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer (ver Introdução Eq. 1.2, pág. 16), da qual foram obtidos os valores da constante de supressão, K_{SV} .

A interação dos complexos de Au(I) e Au(III) de NOR com a HSA foi feita em duas temperaturas 298 K e 310 K, visto que a supressão da fluorescência da albumina pode ocorrer através de dois mecanismos: dinâmico e estático. Esses mecanismos podem ser sugeridos por meio da dependência dos valores de K_{SV} com a temperatura, mas o que distingue mesmo é o tempo de vida, que não muda na supressão estática e decresce na supressão colisional. A Tabela 5.5 resume os valores obtidos para as constantes de interação albumina-composto (K_{SV}) e o coeficiente de linearidade (R^2) e a Figura 5.4 mostra os espectros de fluorescência e as retas obtidas utilizando a equação de Stern-Volmer.





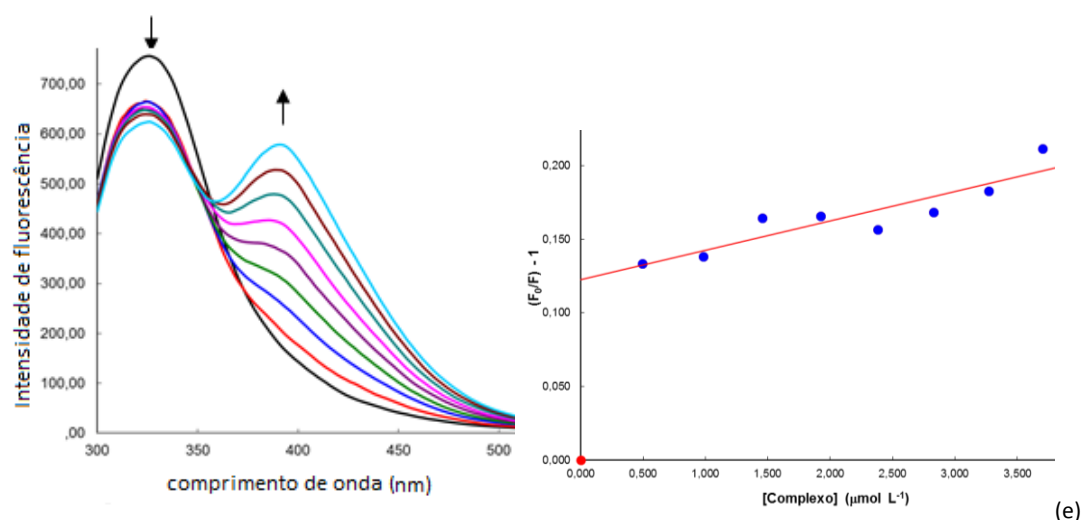


Figura 5.4 - Espectros de fluorescência da HSA na ausência e na presença de quantidades crescentes de (a) norfloxacina a 25 °C, (b) complexo **5** a 298 K, (c) complexo **5** a 310 K, (d) complexo **6** a 298 K e (e) complexo **6** a 310 K. A concentração das albuminas foi de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 5.5 - Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV} , L mol^{-1}) e dos coeficientes de linearidade, R^2 , para as titulações da HSA com a norfloxacina e seus complexos de ouro, a 298 e 310 K.

Temperatura	298 K		310 K	
Composto	$K_{SV}/10^4$	R^2	$K_{SV}/10^4$	R^2
NOR	8,67	0,988	-	-
5	4,41	0,997	5,80	0,990
6	4,31	0,995	2,79	0,951

A norfloxacina e os complexos **5** e **6** interagem com a HSA com constantes da ordem de 10^4 e são fortes supressores da fluorescência dos resíduos de triptofano da HSA (Tabela 5.5).

Observa-se que para o complexo **5** o valor de K_{SV} aumenta com a temperatura, o que indica que a interação deve ocorrer pelo menos em parte por meio do mecanismo dinâmico. O valor calculado para as constantes de velocidade de supressão bimolecular, k_q ($\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), para a interação entre **5**-HSA foi da ordem de 10^{12} , indicando o processo de interação não é exclusivamente dinâmico. Para o complexo **6** o valor de K_{SV} diminui com o aumento da temperatura e o valor de k_q é da ordem de 10^{12} , indicando que o processo de interação foi, predominantemente, estático (Silva *et al.*, 2014).

A equação de Stern-Volmer modificada (Meng *et al.*, 2015)

$$\text{Log}[(F_0-F)/F] = \text{log}K_a + n \text{log}[Q]$$

em que F_0 é a intensidade de fluorescência inicial, F é intensidade de fluorescência, K_a é a constante de ligação, n é número de sítios de ligação e Q é o supressor, foi utilizada para determinar os valores de K_a e de n . Os valores são mostrados na Tabela 5.6. As retas obtidas utilizando a equação de Stern-Volmer modificada são mostradas na Figura 5.5.

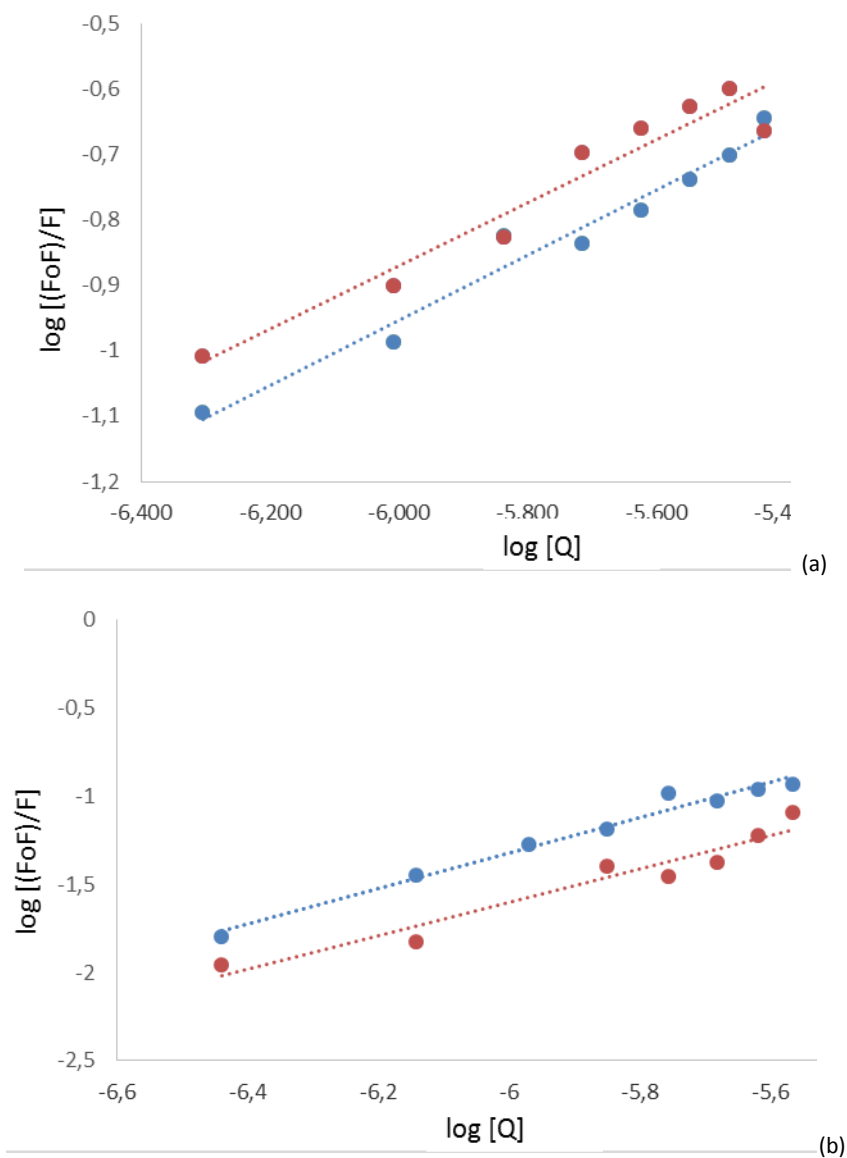


Figura 5.5 - Gráfico de $\log\{(F_0-F)/F\}$ versus [Complexo] em duas temperaturas: 298 K (linha azul) e 310 K (linha vermelha) para (a) complexo 5 e (b) complexo 6.

Por meio dos valores dos coeficientes angular e linear das retas, foram determinados os valores da constante de associação (K_a) e o número de sítios ligantes (n). Os valores de n obtidos ($n \leq 1$) indicam que a interação acontece em apenas um sítio da

HSA. Para o complexo **5** os valores de n , próximos de 0,5, indicam que o complexo se ligou parcialmente a albumina (Xie *et al.*, 2011).

Tabela 5.6 - Valores das constantes de ligação (K_a), número de sítios ligantes (n) e coeficientes de linearidade (R^2) em 298 e 310 K.

Complexo	298 K			310 K		
	$K_a / 10^3$ (mol L ⁻¹)	n	R^2	$K_a / 10^3$ (mol L ⁻¹)	n	R^2
5	0,10	0,50	0,967	0,12	0,48	0,935
6	51,6	1,00	0,977	12,8	0,95	0,934

Os valores da variação da entalpia (ΔH) e da variação da entropia (ΔS) envolvidos na ligação entre a HSA e cada complexo em estudo foram calculados utilizando a Equação de Van't Hoff, $\ln K_a = -(\Delta H/RT) + (\Delta S/R)$, e a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) foi calculada utilizando a equação, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, sendo K_a a constante de ligação, $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ e T a temperatura em Kelvin (Tabela 5.7).

A partir desses parâmetros, além da espontaneidade do processo, é possível inferir sobre a natureza das interações entre a HSA e os complexos. A comparação entre as magnitudes de variação de entalpia e entropia definirá se a contribuição hidrofóbica ou eletrostática desempenhará um papel importante na estabilização dos complexos. De acordo com a literatura valores positivos de variação de entalpia e de entropia ($\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$) indicam que a interação é constituída por forças hidrofóbicas, valores negativos ($\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$) mostram que a interação ocorre através de ligações de hidrogênio e $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ são indicativos que a ligação tem caráter eletrostático (Silva *et al.*, 2014).

Os valores negativos da variação da energia livre de Gibbs para as interações complexo-HSA, indicam que as interações são espontâneas. Os parâmetros termodinâmicos calculados para a interação **5**-HSA, $\Delta S > 0$ e $\Delta H > 0$, são típicos de interações hidrofóbicas. Os valores negativos calculados para as variações de entropia e entalpia indicam que as ligações de hidrogênio são as forças mais relevantes na interação **6**-HSA (Xie *et al.*, 2011).

Tabela 5.7- Parâmetros termodinâmicos associados à interação dos complexos de ouro de NOR com HSA em diferentes temperaturas.

	T (K)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
Complexo 5	298	65	7,9	-11,5
	310			-12,2
Complexo 6	298	-208	-89,2	-27,1
	310			-24,7

5.7 – Conclusão

Dois novos complexos de Au(I) e Au(III) de norfloxacin foram obtidos e caracterizados: $[\text{AuS}(\text{CH}_3)_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (**5**) e $[\text{Au}(\text{pyc})(\text{NOR})_2]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**6**), onde pyc é o ácido piridino-2-carboxílico. Nestes complexos, a NOR liga-se ao metal na forma neutra e de modo monodentado por meio do nitrogênio do anel piperazina. Os complexos apresentaram atividade antibacteriana significativa, embora tenham sido menos ativos que a norfloxacin livre. Nos estudos de interação da NOR e dos complexos com o DNA foi observado um hipercromismo, indicando que os complexos não são intercaladores e os valores das constantes de associação calculadas foram da ordem de 10^3 , mostrando que os compostos interagem moderadamente com o DNA. Nos estudos de interação com a albumina sérica humana (HSA), os valores de K_{sv} encontrados foram da ordem de 10^4 , indicando interação moderada com a HSA. Para o complexo **5** o valor de K_{sv} aumentou com a elevação da temperatura, sugerindo que a interação, pelo menos em parte, ocorreu por meio de um mecanismo dinâmico. Ao contrario, para o complexo **6**, o valor K_{sv} diminuiu com o aumento da temperatura, indicando que a interação ocorreu, predominantemente, por meio do mecanismo estático. Os valores de ΔG encontrados para a interação composto-HSA são negativos, mostrando que o processo é espontâneo, em todos os casos.

Complexos de Cu(II) de bases de Schiff: síntese, atividade biológica e interação com DNA e albuminas

As bases de Schiff 2-((5-nitrofurano-2-il)metilamino)fenol (**HL1**) e 2-(4-nitrobenzilidenoamino)fenol (**HL2**) e seus complexos [CuCl(L1)(phen)].0,5H₂O (**7**) e [CuCl(L2)(phen)].2,5H₂O (**8**) foram obtidos e caracterizados por diversas técnicas. Suas atividades anti-*T.cruzi*, antiproliferativa e antifúngica foram testadas. Foram feitos ainda estudos de interação de ligantes e complexos com as albuminas bovina e humana, utilizando a técnica de fluorescência, e com o DNA, utilizando a técnica de UV-vis.

6.1 –Caracterização das bases de Schiff livres

As bases de Schiff 2-((5-nitrofurano-2-il)metilamino)fenol (**HL1**) e 2-(4-nitrobenzilidenoamino)fenol (**HL2**) foram caracterizadas por análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear. A Figura 6.1 mostra as estruturas das bases de Schiff e a Tabela 6.1 apresenta os dados de temperatura de fusão ou decomposição e de análise elementar.

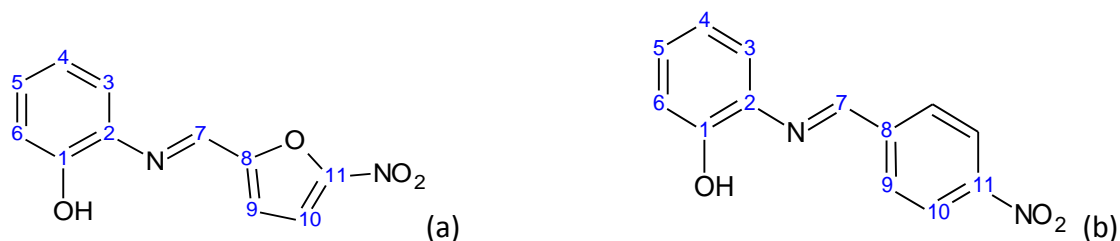


Figura 6.1 – Representações das estruturas das bases de Schiff (a) **HL1**e (b) **HL2**.

Tabela 6.1 – Temperatura de fusão ou decomposição e dados de análise elementar (valores calculados entre parênteses).

Complexos	T _f (°C)	% C	% H	% N
HL1	170 ^d	56,9 (56,9)	3,6 (3,5)	12,1 (12,1)
HL2	159-160	64,4 (64,5)	4,2 (4,1)	11,6 (11,6)

^d temperatura de decomposição

HL1 decompõe-se na temperatura de 170 °C e **HL2** funde-se com variação de temperatura de apenas um grau, o que indica a pureza do composto. Os dados de análise elementar indicam que a condensação entre o aldeído e a amina ocorreu de forma completa durante a síntese das bases de Schiff.

Nos espectros na região do infravermelho de **HL1** e **HL2** foi observada uma banda de absorção em 3357 e 3321 cm⁻¹, respectivamente, atribuída ao estiramento da ligação O-H do anel fenólico. A banda atribuída ao estiramento da ligação C-O do anel fenólico foi observada em 1242 e 1231 cm⁻¹, nos espectros de **HL1** e **HL2**, respectivamente. A banda atribuída ao estiramento da ligação C=N, foi observada em 1618 e 1625 cm⁻¹, respectivamente, nos espectros de **HL1** e **HL2**. Observam-se ainda duas bandas fortes, uma em 1527 e 1514 cm⁻¹, para **HL1** e **HL2** respectivamente, atribuída ao estiramento assimétrico do NO₂ e, outra em 1351 e 1341 cm⁻¹, atribuída ao estiramento simétrico do

grupo NO₂, para **HL1** e **HL2** respectivamente (Barbosa, 2008). Os espectros podem ser vistos no Anexo 1 (pág. 102-103).

Os espectros de RMN de ¹H de **HL1** e **HL2** apresentam um tripleto em δ 6,84 e 6,85 ppm, respectivamente, atribuído ao hidrogênio H₄. Um duplete é observado em δ 6,94 atribuído ao hidrogênio H₆. O sinal atribuído ao H₅ é um tripleto em δ 7,14 ppm. O duplete em δ 7,28 e 7,29 ppm é atribuído ao H₃ de **HL1** e **HL2**, respectivamente. No espectro de RMN de **HL1** são observados os sinais referentes a H₉ e a H₁₀ em δ 7,49 e 7,81 ppm, respectivamente, devido ao forte efeito retirador de elétrons do NO₂. São observados ainda dois singletos em δ 8,74 e 9,50 ppm, atribuídos aos hidrogênios do grupamento HC=N (H₇) e do OH.

Nos espectros de RMN de ¹³C de **HL1** e **HL2** são observados 11 sinais de carbono referentes aos 11 átomos de carbono de **HL1** e aos 13 átomos de carbono de **HL2**, o que pode ser explicado pela simetria dos carbonos do anel aromático (Figura 6.1). Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C de **HL1** são mostrados nas Figuras 6.2 e 6.3, respectivamente e os de **HL2** encontram-se no Anexo 1 (pág. 111). Os principais deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C para as bases se Schiff são apresentados na Tabela 6.2.

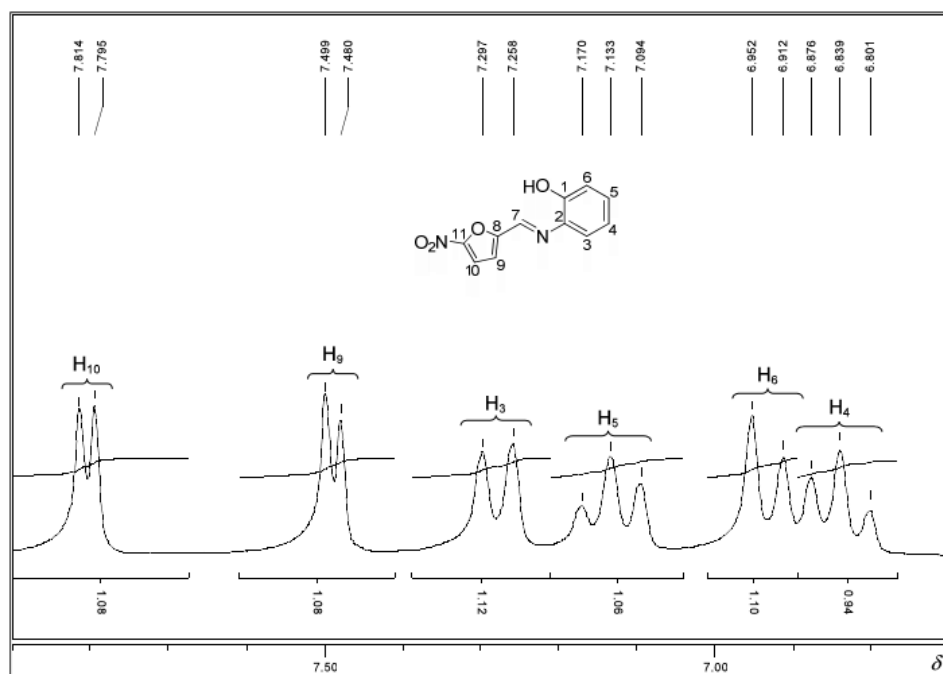


Figura 6.2- Espectro de RMN de ¹H para **HL1** Expansão da região entre 6,7 e 7,9 ppm (200MHz, DMSO-d₆).

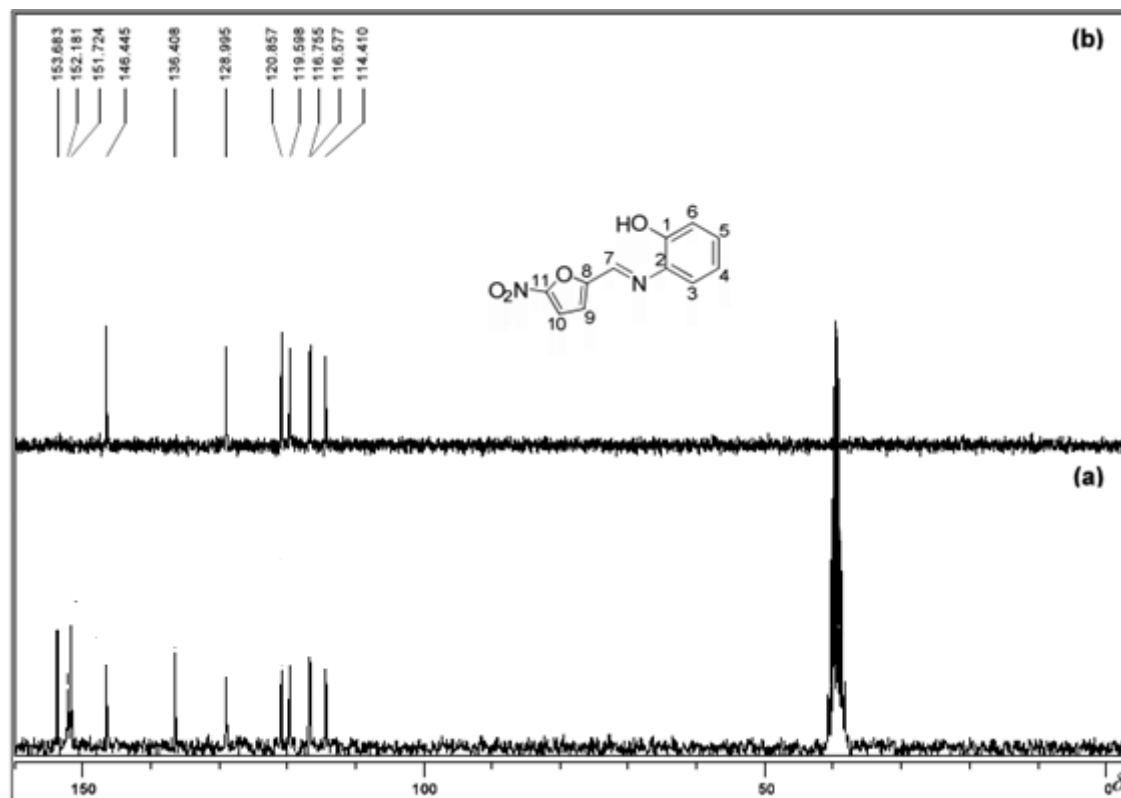


Figura 6.3 – Espectro de RMN de (a) ^{13}C e (b) subespectro DEPT 135 de HL1 (200 MHz, DMSO- d_6).

Tabela 6.2 - Principais deslocamentos químicos (δ /ppm) dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para as bases de Schiff, em DMSO- d_6 , 200 MHz.

HL1				HL2			
H ₄	6,84	C ₃ , C ₉ , C ₁₀	114,4; 116,6; 116,8	H ₄	6,85	C ₃	116,4
H ₆	6,94	C ₄ , C ₆	119,6; 120,9	H ₆	6,94	C ₄ , C ₆	119,3; 119,5
H ₅	7,14	C ₅	129,0	H ₅	7,14	C ₁₀	123,8
H ₃	7,28	C ₂	136,4	H ₃	7,29	C ₅	128,6
H ₉	7,49	C ₇	146,4	H ₉		C ₉	129,8
H ₁₀	7,81	C ₁ , C ₈ , C ₁₁	151,7; 152,2; 153,7		8,41	C ₂ , C ₈	136,9; 142,0
H ₇	8,74			H ₇	8,88	C ₁ , C ₁₁	148,6; 151,9
OH	9,50			OH	9,26	C ₇	156,9

6.2 -Dados de microanálises, condutividade e análise térmica para os complexos de Cu(II)

A Tabela 6.3 mostra os dados de análise elementar e os valores de condutividade para os complexos de Cu(II) de bases de Schiff. Os dados de microanálises mostram que a relação metal:ligante:phen é de 1:1:1 e que os complexos possuem um cloreto como ligante. As medidas de condutividade sugerem que os complexos são neutros. As moléculas de água de hidratação puderam ser confirmadas pelas curvas TG dos complexos. A curva TG do complexo **7** mostra uma perda de massa de 1,5 %, entre 298 e 393 K, que corresponde a saída de 0,5 molécula de água (calculado 1,7 %). A curva TG do complexo **8** mostra uma perda de massa de aproximadamente 7,56 %, entre 298 e 533 K, que corresponde à saída de duas e meia moléculas de água (calculado 7,96%). As curvas TG/DTG encontram-se no Anexo 1 (pág. 106-107).

Tabela 6.3- Dados de análise elementar (valores calculados entre parênteses) e condutividade para os complexos de Cu(II).

Complexos	% C	% H	% N	Λ^* , $\mu\text{S cm}^{-1}$
[CuCl(L1)(phen)].0,5H ₂ O(7)	52,6 (53,0)	3,1 (3,3)	10,7 (10,8)	47
[CuCl(L2)(phen)].2,5H ₂ O(8)	54,2 (53,1)	3,8 (3,9)	9,5 (9,9)	35

*valores obtidos em solução de DMF na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

6.3 – Espectroscopia na Região do Infravermelho e na UV-visível dos complexos de Cu(II)

A banda de absorção observada na região de 3357 e 3321 cm^{-1} nos espectros de infravermelho dos ligantes livres **HL1** e **HL2**, respectivamente, atribuída ao estiramento da ligação O-H do anel fenólico, desaparece nos espectros dos complexos de Cu(II), indicando que as bases de Schiff se ligam ao Cu(II) na forma desprotonada. Os espectros de **HL1** e **HL2** apresentam ainda uma banda atribuída ao estiramento da ligação C=N em 1618 e 1624 cm^{-1} , respectivamente, que se desloca para 1582 cm^{-1} no espectro do complexo **7** e para 1598 cm^{-1} no espectro do complexo **8**, indicando o envolvimento do nitrogênio na coordenação (Wang, Yang e Chen, 2008). A banda atribuída ao estiramento da ligação C-O foi observada em 1224 e 1240 cm^{-1} nos espectros de **7** e **8**, respectivamente (Barbosa, 2008). Observam-se ainda duas bandas, atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo NO₂, em 1516 e 1520 cm^{-1} e 1348 e 1346 cm^{-1} nos espectros de **7** e **8**, respectivamente, (Barbosa, 2008). A Tabela 6.4 resume as principais bandas observadas nos espectros na região do

infravermelho médio para as bases de Schiff e seus complexos de Cu(II) e os espectros encontram-se no Anexo 1 (pág. 103-104)

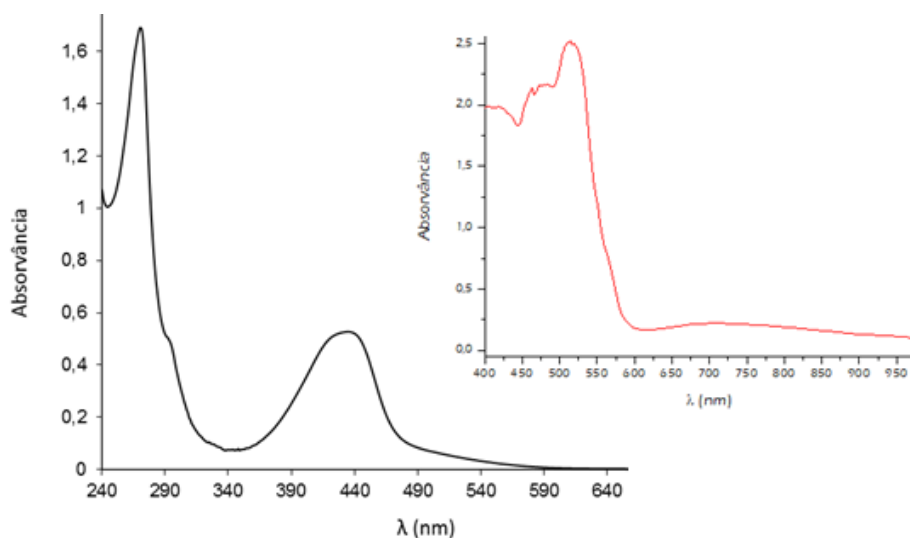
No espectro da 1,10-fenantrolina livre observa-se uma banda intensa em 854 cm^{-1} essa banda foi observada nos espectros de **7** e **8** em 856 cm^{-1} , confirmando a presença da fenantrolina na estrutura dos complexos. As bandas de intensidade média a forte na região de 900 a 650 cm^{-1} ocorrem devido às deformações angulares fora do plano de ligações =C-H e as vibrações de deformação angular fora do plano próprio do anel (Barbosa, 2008).

Tabela 6.4 - Principais números de ondas (cm^{-1}) e atribuições de bandas na região do infravermelho para as bases de Schiff livres e seus complexos de Cu(II).

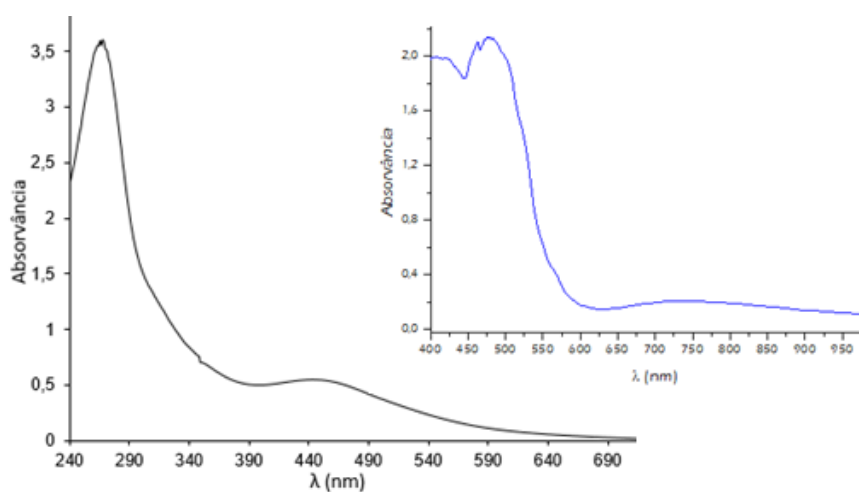
Compostos	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{CO})$	$\nu_{\text{ass}}(\text{NO}_2)$	$\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$
HL1	3357	1618	1242	1527	1351
[CuCl(L1)(phen)].0,5H ₂ O(7)	-	1582	1224	1516	1348
HL2	3321	1625	1231	1514	1341
[CuCl(L2)(phen)].2,5H ₂ O(8)	-	1598	1240	1520	1346

Foram obtidos espectros de UV-Vis para os ligantes e seus complexos de Cu(II) em uma mistura DMSO/tampão fosfato. Nos espectros na região do UV-visível foi observada uma banda, atribuída a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo carbonil, em 290, 269 e 273 nm, para **HL1**, **HL2** e **7**, respectivamente (Pavia et al., 2012). Uma segunda banda atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$ do grupo C=N foi observada em 440, 430, 423 e 435 nm, para **HL1**, **HL2**, **7** e **8**, respectivamente. Em água, as bandas de absorção da phen livre aparecem em 227 e 265 nm. Nos complexos **7** e **8** não foi possível observá-las porque o tampão fosfato absorve até 250 nm e, a banda em 265 nm, coincide com a banda do grupo carbonil da base de Schiff.

Nos espectros dos complexos são observadas duas outras bandas, uma banda de baixa intensidade em 714 e 741 nm, atribuída a transição d-d para **7** e **8**, respectivamente, e a banda atribuída a transferência de carga em 514 e 476 nm nos espectros de **7** e **8**, respectivamente. A Figura 6.4 apresenta os espectros na região do UV-visível para os complexos de Cu(II) de base de Schiff.



(a)



(b)

Figura 6.4 – Espectros de absorção na região do UV-visível para os complexos (a) **7** e (b) **8** na mistura DMSO/tampão fosfato e concentração de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Inseridos espectros em DMSO na concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

6.4 - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) para os complexos de Cu(II)

Os espectros de EPR dos complexos **7** e **8** foram obtidos em uma mistura de MeOH e DMSO para garantir o mesmo solvente para os dois complexos, já que **7** é mais solúvel em MeOH e **8** em DMSO (Figura 6.5). As medidas foram feitas a 77 K.

Os complexos **7** e **8** apresentam espectros característicos de complexos com simetria axial, sem qualquer indício de complexo binuclear. Em solução congelada, observa-se que os dois complexos apresentam os mesmos parâmetros g_{\perp} , mas a região de g_{\parallel} demonstra claramente a presença de duas espécies com simetria axial, com diferentes

valores de g_{\parallel} e com valores de A_{\parallel} bastante semelhantes. Estas espécies, 1 e 2, estão identificadas na Figura 6.5 pela posição dos dois conjuntos de quatro linhas hiperfinas.

Comparando os parâmetros na Tabela 6.5, observa-se também que uma das espécies que aparece em **7** e **8** tem os mesmos parâmetros que o precursor $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$, sugerindo que em solução o complexo está se dissociando formando uma mistura de Cu-phen e Cu-base de Schiff ou Cu-phen-base de Schiff.

A inserção na Figura 6.5 apresenta o espectro de segunda derivada na região de g_{\perp} , onde a estrutura superhiperfina de interação com núcleos de nitrogênio aparece mais destacada. Observam-se cinco linhas, com constante de desdobramento superhiperfino, A_N , igual a 13 G. As cinco linhas caracterizam interação com dois átomos de nitrogênio equivalentes ($l=1$, $2n_l+1$ linhas). Uma vez que o espectro do precursor não apresenta uma estrutura superhiperfina resolvida, essa estrutura pode ser atribuída ao segundo sítio, que corresponde aos complexos com as bases de Schiff.

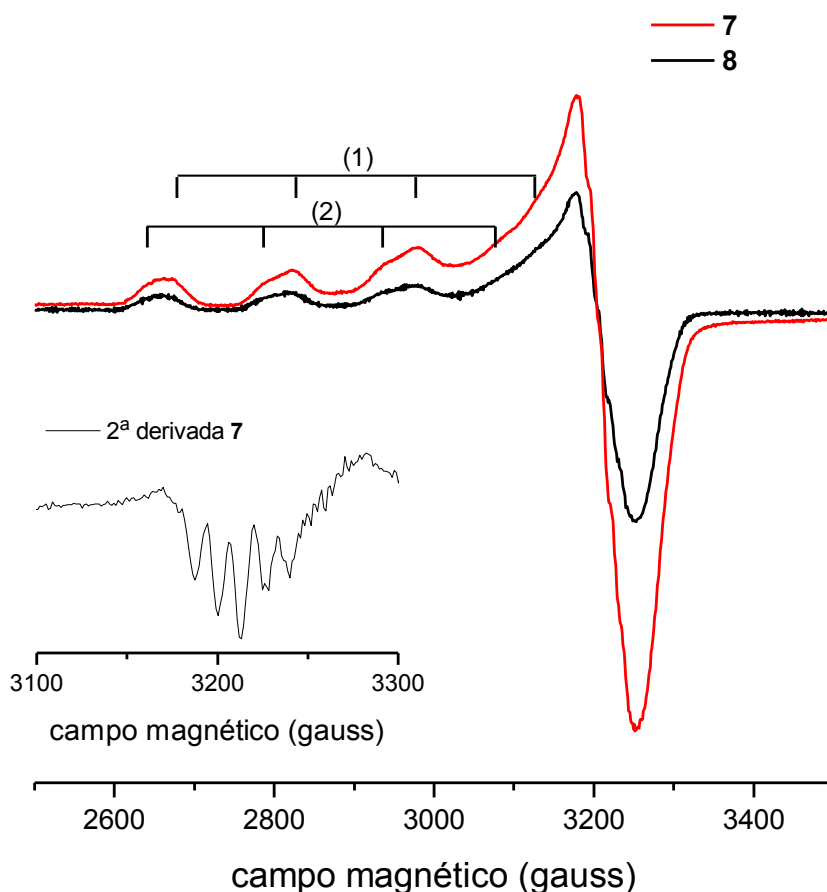


Figura 6.5 - Espectros de EPR, banda X, para **7** e **8** (em MeOH:DMSO 1:1, temperatura 77 K)

Tabela 6.5 - Parâmetros de EPR dos complexos de Cu(II) em solução a 77K.

	g_{\perp}	$g_{\parallel 1}$	$A_{\parallel 1}(\text{gauss})$	$g_{\parallel 2}$	$A_{\parallel 2}(\text{gauss})$	$A_N(\text{gauss})$
[CuCl ₂ (phen)]	2,074	2,292	155	-	-	-
7 e 8	2,070	2,291	154	2,324	148	13

Com base nos dados de análise elementar, infravermelho e EPR as seguintes estruturas foram propostas para os complexos de Cu(II) (Figura 6.6). O Cu(II) tem número de coordenação cinco e os complexos têm geometria pirâmide de base quadrada ou bipirâmide trigonal.

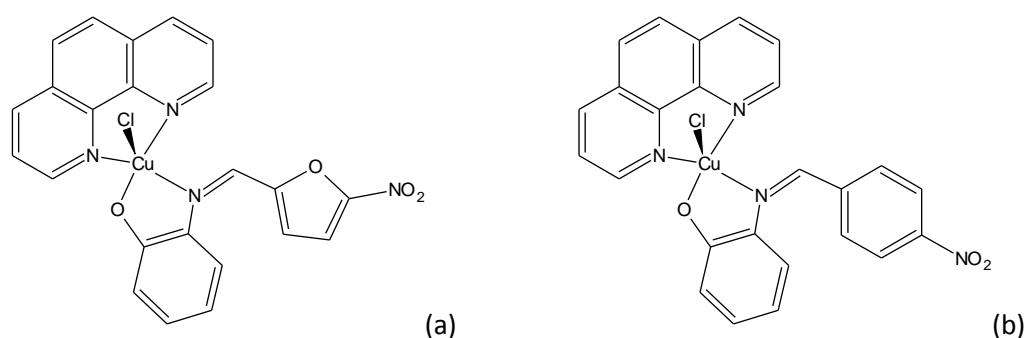


Figura 6.6 - Estruturas propostas para (a)[CuCl(L1)(phen)] (**7**) e (b) [CuCl(L2)(phen)] (**8**).

6.5 - Testes de Atividade anti-*T.cruzi* para as bases de Schiff e seus complexos de Cu(II)

Nesse trabalho, estamos interessados na atividade anti-*T.cruzi* do ligante **HL1** e de seu complexos de Cu(II). **HL1** é um derivado de nitrofurano, assim como o nifurtimox. Para efeito de comparação, preparamos também **HL2**, um derivado de nitrobenzeno, e seu complexo de Cu(II).

A atividade anti-*T.cruzi* das bases de Schiff e da phen livres, dos complexos de Cu(II), do precursor [CuCl₂(phen)], do sal de Cu(II) e da droga de referência para a doença de Chagas, o Benznidazol, foi testada contra as formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. Foram utilizados, como parâmetros de análise, a concentração inibitória mínima (EC₅₀), ou seja, o menor valor de concentração capaz de matar 50% do parasito, e o índice de seletividade (IS), que identifica a dose efetiva dos compostos contra o parasito, mas que não exerça toxicidade para a célula hospedeira. O IS é calculado fazendo a razão entre LC₅₀/EC₅₀, onde LC₅₀ é concentração da droga que diminui em 50% a viabilidade de células cardíacas não infectadas.

Os valores de EC₅₀ e o IS para as bases de Schiff livres, seus complexos de Cu(II), o sal de Cu(II), [CuCl₂(phen)] e para o benznidazol são apresentados na Tabela 6.6.

Tabela 6.6 – Atividade (media ± SD) e índice de seletividade (IS) para o sal de Cu(II), o precursor [CuCl₂(phen)], as bases de Schiff 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	EC ₅₀ (µmol L ⁻¹)	Índice de Seletividade (IS)*
HL1	14 ± 5	0,7
HL2	40 ± 22	2,4
[CuCl(L1)(phen)].0,5H ₂ O (7)	0,94 ± 0,17	3,7
[CuCl(L2)(phen)].2,5H ₂ O (8)	>96	0,03
[CuCl ₂ (phen)]	7 ± 5	<4
CuCl ₂ .2H ₂ O	82 ± 3	6
Benznidazol	13 ± 2	77

IS = LC₅₀/EC₅₀. *Os dados são expressos como média ± SD de três experimentos independentes.

HL1 e **HL2** têm atividade moderada sob as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, exibindo valores de EC₅₀ de, aproximadamente, 14 e 40 µmol L⁻¹, respectivamente. O precursor [CuCl₂(phen)] é ativo na concentração de 7 µmol L⁻¹ e o sal de Cu(II) na concentração de 82 µmol L⁻¹. A associação de **HL1** ao Cu(II) e a phen levou a um aumento da atividade, sendo o complexo **7**, aproximadamente, 15 vezes mais ativo que **HL1**, 13 vezes mais potente que o Benznidazol e, 7 vezes mais ativo que o precursor. No entanto, a associação de **HL2** ao Cu(II) e a phen não levou a resultados satisfatórios, já que o complexo **8** praticamente não tem atividade sobre o *T. cruzi*.

Embora o complexo **7** tenha se mostrado mais ativo que o Benznidazol, seu índice de seletividade é bem menor. No entanto, os resultados indicam que a união de um derivado nitrofurano com o Cu(II)-phen pode ser uma estratégia interessante na busca de novos compostos ativos contra o *T. cruzi*.

6.6 - Testes de Atividade antiproliferativa para as bases de Schiff e seus complexos de Cu(II)

Além da atividade anti-*T.cruzi*, testamos também as atividades antiproliferativa dos complexos de Cu(II), uma vez que a literatura relata exemplos de compostos com atividade anti-*T.cruzi* que apresentam também atividade antitumoral. O nifurtimox, por exemplo, exibiu promissor efeito antitumoral frente a uma linhagem de neuroblastoma (Boiani *et al.*, 2010).

A atividade antiproliferativa das bases de Schiff livres, dos complexos de Cu(II), e do fármaco de referência doxorrubicina, foi avaliada frente a sete linhagens de células tumorais: U251 (melanoma), MCF7 (câncer de mama), NCI/ADR-RES (câncer de ovário resistente), 786-0 (câncer de rim), NCI-H460 (câncer de pulmão), PC-3 (câncer de próstata), HT29 (câncer colorretal). Para controle foi utilizada a linhagem HACaT (queratócitos).

A proliferação celular foi determinada, por quantificação espectrofotométrica do conteúdo de proteína celular, empregando-se o método da sulforrodamina B (Formagio *et al.*, 2008). A porcentagem de inibição de crescimento foi calculada empregando-se a seguinte equação:

$$100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$$

em que T é a média da absorvância das células tratadas, C é a média da absorvância do controle e T_0 , é a média da absorvância do controle no tempo T_0 (antes do tratamento). Os valores obtidos a partir dessa equação foram subtraídos de 100 %, obtendo-se assim a porcentagem de inibição do crescimento. Os resultados referentes à atividade antiproliferativa da doxorrubicina encontram-se dispostos na forma de curvas de concentração *versus* porcentagem de crescimento (Figura 6.7).

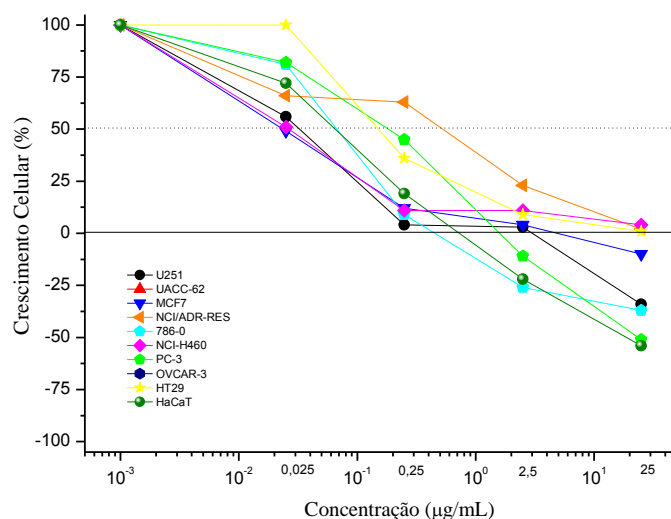
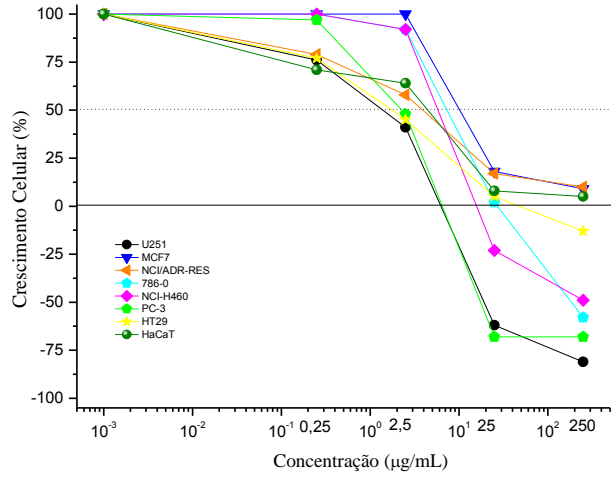


Figura 6.7 - Porcentagens de crescimentos de diferentes linhagens de células de tumores humanos após 48 horas de incubação, na presença de diferentes concentrações da doxorrubina.

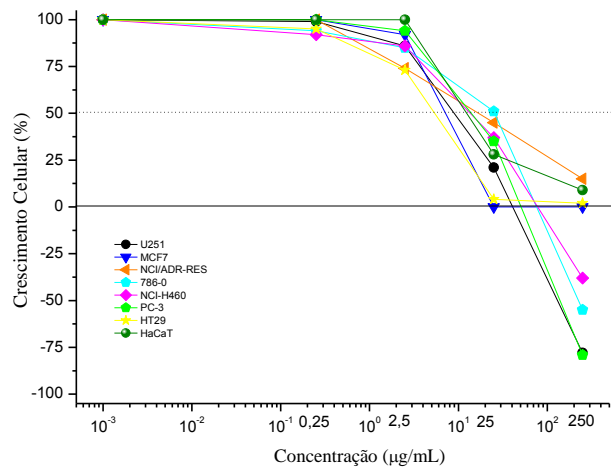
A Figura 6.7 apresenta as curvas de atividade antiproliferativa para a doxorrubina. As curvas que relacionam o crescimento celular (eixo Y) com a concentração do composto (eixo X) apresentam pontos tanto com valores positivos como com valores negativos de Y. Os pontos nas curvas que apresentam valores positivos no eixo Y correspondem às concentrações em que a doxorrubina exibe atividade citostática, ou seja, inibe o crescimento celular, mas não provoca a diminuição do número inicial de células observadas no tempo T_0 . Já os pontos nas curvas que apresentam valores negativos no eixo y, indicam que nestas concentrações a doxorrubina apresenta atividade citotóxica, ou seja, inibe o crescimento celular e provoca uma redução do número inicial de células cancerígenas (Silva, 2013).

Na Figura 6.7 pode-se ainda extrair os valores da concentração inibitória mínima (CI_{50}), ou seja, a concentração do composto necessária para inibir em 50 % o crescimento celular. O CI_{50} é a concentração em que a curva de *crescimento celular x concentração* da doxorrubina cruza a linha pontilhada em 50 % do crescimento celular (Silva, 2013).

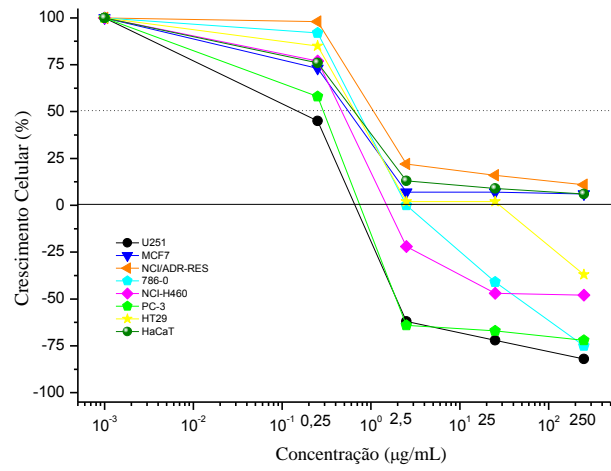
A interpretação dos gráficos de inibição de crescimento celular *versus* concentração para os compostos testados deve ser feita da mesma forma que para a doxorrubina. Os gráficos são mostrados na Figura 6.8 e os valores de CI_{50} e os índices de seletividade (IS) determinados estão listados na Tabela 6.7. Os índices de seletividade foram obtidos por meio da razão entre os valores CI_{50} frente à linhagem de controle HACaT e os valores de CI_{50} frente a linhagens de células tumorais.



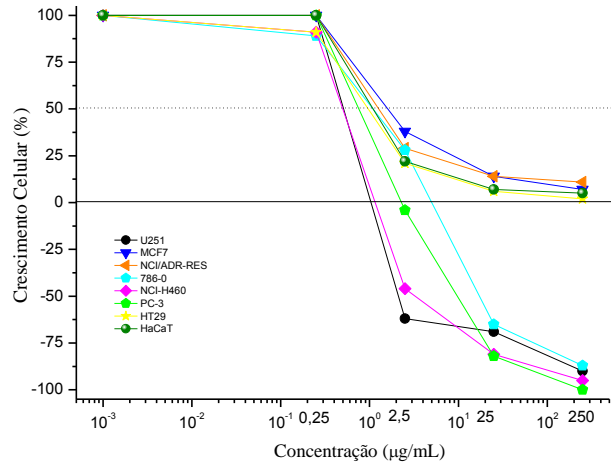
(a)



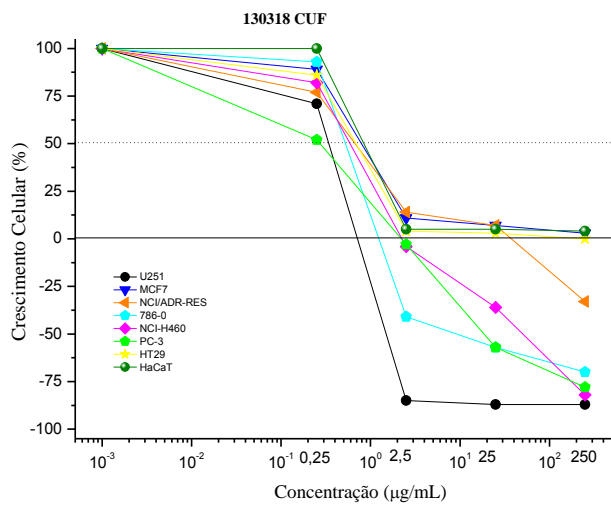
(b)



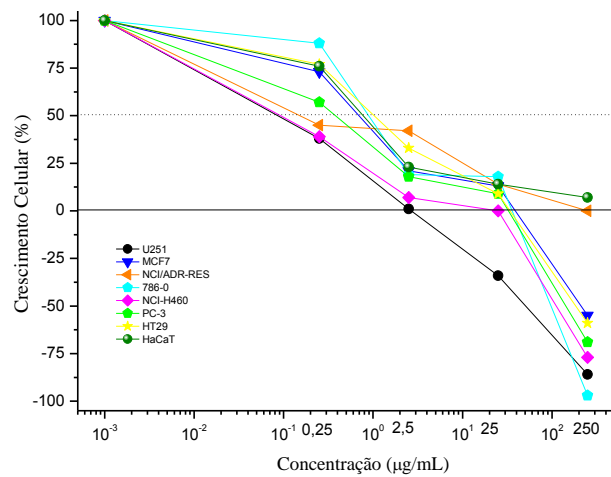
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 6.8 - Porcentagens de crescimentos de diferentes linhagens de células de tumores humanos após 48 horas de incubação, na presença de: (a) **HL1**, (b) **HL2**, (c) **7**, (d) **8**, (e) $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$ e (f) 1,10-fenantrolina.

Tabela 6.7 - Valores de Cl_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) obtidos para, o $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$, a fenantrolina, as bases de Schiff, seus complexos de Cu(II) e o fármaco de referência, doxorubicina, frente a diferentes linhagens tumorais (os índices de seletividade são mostrados entre parênteses).

Composto	U251	MCF7	NCI/ ADR-RES	786-0	NCI-H460	PC-3	HT29	HACaT
HL1	10,3 (1,1)	12,9 (0,9)	13,4 (0,8)	87,5(0,1)	14,2 (0,8)	10,8 (1,0)	6,5 (1,7)	11,2
HL2	38,0 (1,8)	12,8 (5,3)	70,6 (1,0)	103,2 (0,7)	68,9 (1,0)	99,5 (0,7)	18,2 (3,8)	68,1
7	0,96 (3,1)	0,96 (1,2)	2,5 (0,5)	3,1 (0,4)	0,55 (2,1)	0,50 (2,3)	0,96 (1,2)	1,2
8	0,88 (3,2)	3,4 (0,8)	2,8 (1,0)	2,7 (1,1)	0,53 (5,3)	-	1,8 (1,6)	2,8
$[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$	0,95 (0,2)	2,5 (0,6)	1,9 (0,4)	0,95 (0,2)	3,2 (0,8)	1,9 (0,4)	4,4 (1,0)	4,4
phen	1,1 (0,2)	3,8 (0,8)	1,5 (0,3)	5,5 (1,1)	0,93 (0,2)	2,0 (0,4)	5,5 (1,2)	4,5
doxorubicina	0,05 (2,0)	0,04 (2,4)	0,5 (0,2)	0,1 (1,0)	0,05 (2,3)	0,3 (0,3)	0,3 (0,3)	0,1

Cl_{50} : concentração necessária para inibir 50 % do crescimento celular. IS= LC_{50}/Cl_{50} .

Os valores de Cl_{50} apresentados na Tabela 6.7 mostram que as bases de Schiff livres **HL1** e **HL2** apresentaram atividade citostática sobre todas as linhagens testadas e, sobre algumas linhagens, mostraram também atividade citotóxica (Figura 6.8). A complexação das bases de Schiff ao Cu(II)-phen levou a um aumento significativo da atividade frente a todas as linhagens de células tumorais. O precursor e a fenantrolina livre foram ativos sobre todas as linhagens em concentrações entre 0,93 e 5,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mas apresentaram seletividade inferior ou igual a das bases de Schiff e dos complexos. Além disso, sabe-se que a fenantrolina livre é muito tóxica (Kobeticova *et al.*, 2008).

Os melhores valores de Cl_{50} dos complexos de Cu(II) foram obtidos para as linhagens U251 (melanoma), NCI-H460 (câncer de pulmão), PC-3 (câncer de próstata) e HT29 (câncer colorretal). Os complexos **7** e **8** foram 10,7 e 43 vezes mais ativos frente a linhagem U251, que suas respectivas bases de Schiff livres com índices de seletividade superior ao da doxorubicina. O complexo **7** foi ativo frente a linhagem PC-3 com valor de Cl_{50} próximo ao da doxorubicina e 7,6 vezes mais seletivo que o fármaco de referência. Os complexos **7** e **8** mostraram-se 4 e 5 vezes mais seletivos que a doxorubicina, respectivamente, frente a linhagem HT29.

As bases de Schiff e seus complexos de Cu(II) foram ativos em concentrações maiores que a droga de referência sobre todas as linhagens estudadas, no entanto, os complexos mostraram-se ativos em baixas concentrações, inferiores a 3,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sobre

todas as linhagens. As bases de Schiff e seus complexos mostraram maior índice de seletividade que o precursor, que a fenantrolina e que a doxirrubicina na maioria dos casos. Como o tratamento deve combater preferencialmente as células cancerosas, a maior seletividade das bases de Schiff e de seus complexos de Cu(II) é muito relevante na busca por novos agentes contra o câncer.

6.7 - Testes de Atividade antifúngica para as bases de Schiff e seus complexos de Cu(II)

A atividade antifúngica das bases de Schiff livres e de seus complexos de Cu(II) foi testada frente às seguintes cepas de fungos de importância clínica: *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 20298 e dois isolados clínicos *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*, pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG.

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração dos compostos capaz de inibir completamente o crescimento microbiano após a incubação, foram calculados e são mostrados na Tabela 6.8.

Tabela 6.8 - Concentração inibitória mínima (CIM) para as bases de Schiff, seus complexos de Cu(II) e a droga de referência fluconazol frente aos fungos *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*.

Compostos	CIM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niger</i>
HL1	>551	>551	551	551
HL2	264	132	528	264
[CuCl(L1)(phen)].0,5H ₂ O(7)	31	15	246	62
[CuCl(L2)(phen)].2,5H ₂ O(8)	>226	113	>226	>226
Fluconazol	6,5	104	>209	>209

HL1 não mostrou atividade significativa em nenhuma das cepas testadas, mas sua complexação ao Cu(II)-phen levou a uma melhora da atividade frente a três cepas. O complexo **7** é pelo menos 18; 37 e 9 vezes mais ativo que **HL1** frente a *C. albicans*, *C. krusei* e *A. niger*, respectivamente. Além disso, **7** mostrou-se mais ativo que o fluconazol contra *C. krusei* e *A. niger*, indicando que a união da base de Schiff ao Cu-phen pode ser uma

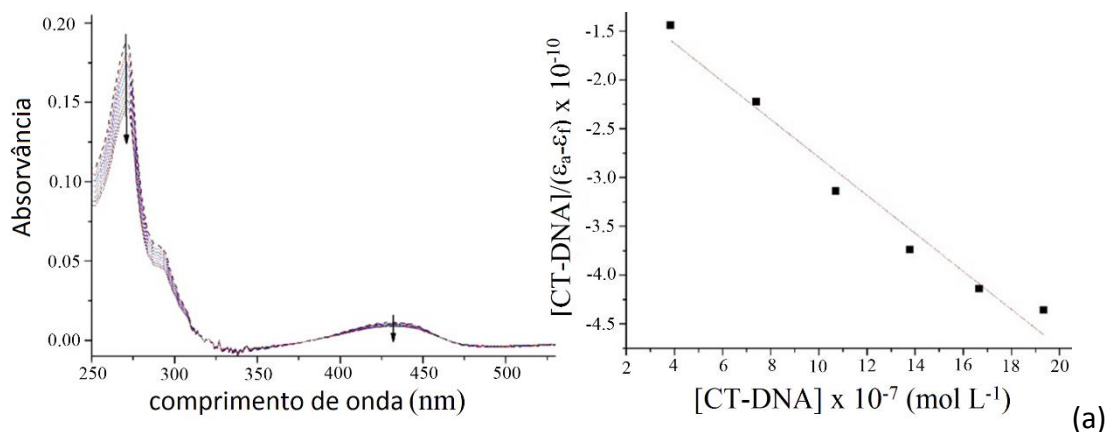
estratégia interessante na busca de novos agentes antifúngicos. **HL2** inibiu o crescimento dos fungos na concentração de 132-528 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nesse caso, a complexação não foi interessante, pois o complexo **8** só mostrou atividade frente a *C. krusei* e em dose superior a do ligante livre.

6.8 - Interação dos complexos de Cu(II) com o DNA

Os espectros de absorção das bases de Schiff e de seus complexos na ausência e na presença de quantidades crescentes de DNA são mostrados na Figura 6.9. A intensidade das bandas de absorção de **HL1**, de **HL2** e de seus complexos de Cu(II) diminuiu após a adição de alíquotas sucessivas de CT-DNA, sugerindo que a interação dos compostos com DNA pode ser eletrostática ou via intercalação (Firdaus *et al.*, 2008).

Na Tabela 6.8 são listados os valores das constantes de associação das bases de Schiff livres e de seus complexos de Cu(II) com a DNA, em pH 7,4, obtidos utilizando a equação de Scatchard (Equação 1.1, pág. 13). As retas obtidas são mostradas na Figura 6.9.

As constantes de interação entre os compostos e o DNA foram calculadas utilizando valores de absorvância dos espectros dos compostos na ausência e na presença de quantidades crescentes de DNA utilizando os comprimentos de onda nos quais ocorreu a maior intensidade de absorção.



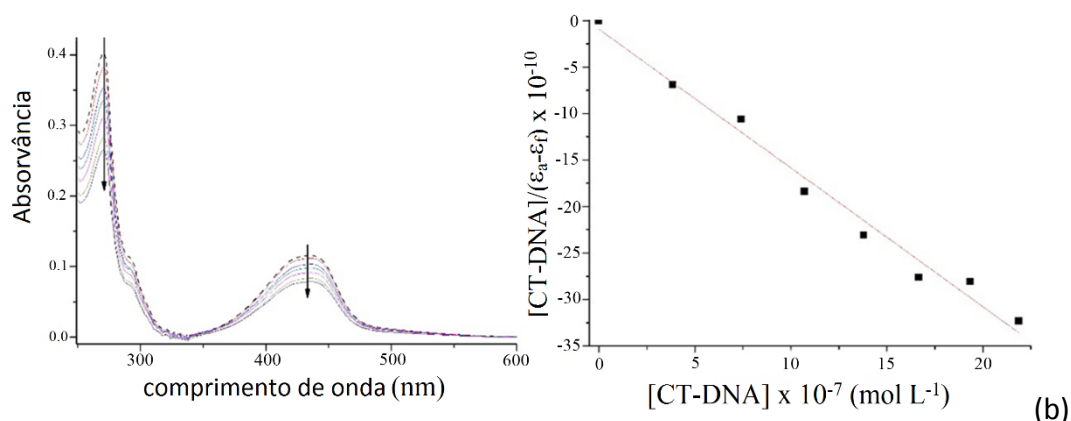


Figura 6.9 - Espectros de absorção de (a) **HL2** e (b) $[\text{CuCl}(\text{L2})(\text{phen})].2,5\text{H}_2\text{O}$ na ausência e na presença de concentrações crescentes de DNA (período de incubação = 30 minutos). Retra inserida – plotagem de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}] \times 10^7 \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 6.9 - Valores das constantes de associação (K_b) das bases de Schiff livres e de seus complexos de Cu(II) com a DNA, em pH 7,4 e o coeficiente de linearidade das retas (R^2).

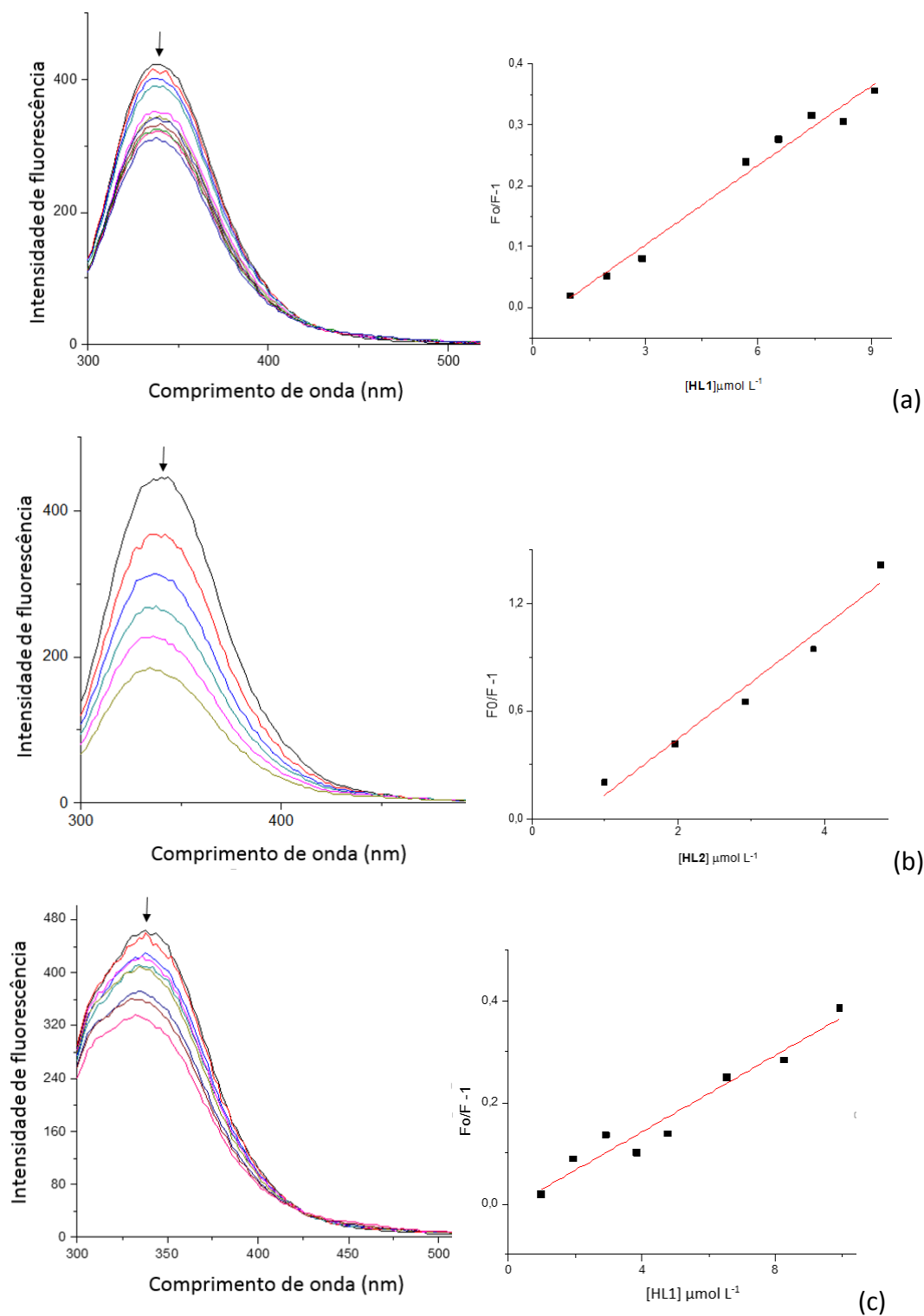
Composto	$K_b \times 10^4 \text{ (L mol}^{-1}\text{)}$	R^2
HL1	0,79	0,999
$[\text{CuCl}(\text{L1})(\text{phen})].0,5\text{H}_2\text{O}$ (7)	1,84	0,999
HL2	0,17	0,993
$[\text{CuCl}(\text{L2})(\text{phen})].2,5\text{H}_2\text{O}$ (8)	0,89	0,999

Os complexos de Cu(II) interagem mais fortemente com o CT-DNA que as bases de Schiff livres. Os valores das constantes indicam que **HL1**, **HL2** e seus complexos interagem moderadamente com o DNA. O complexo **7** apresentou o maior valor de K_b e também maior atividade anti-*T.cruzi*, sugerindo que o DNA pode ser um alvo importante no mecanismo de ação deste complexo.

6.9 - Interação dos complexos de Cu(II) de base de Schiff com as albuminas

A intensidade de fluorescência da BSA e HSA decresce na presença das bases de Schiff livres e seus complexos, indicando que as bases de Schiff e seus complexos de Cu(II) de fenantrolina suprimem a fluorescência do triptofano das albuminas (Lakowicz, 2006). As Figuras 6.10 e 6.11 mostram a supressão da intensidade de fluorescência na presença das bases de Schiff e de seus complexos de Cu(II).

Os resultados obtidos na titulação da BSA e da HSA com as bases de Schiff e seus complexos foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer (ver Introdução Eq. 1.2 pág. 15). As retas obtidas são mostradas nas Figuras 6.10 e 6.11. A Tabela 6.9 resume os valores obtidos para as constantes de interação albumina-composto (K_{SV}) e o coeficiente de linearidade (R^2).



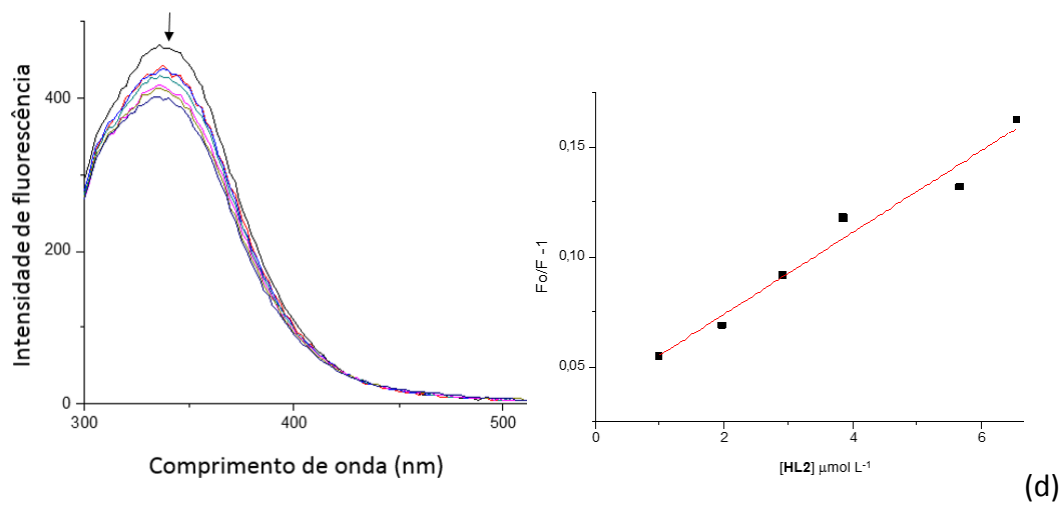
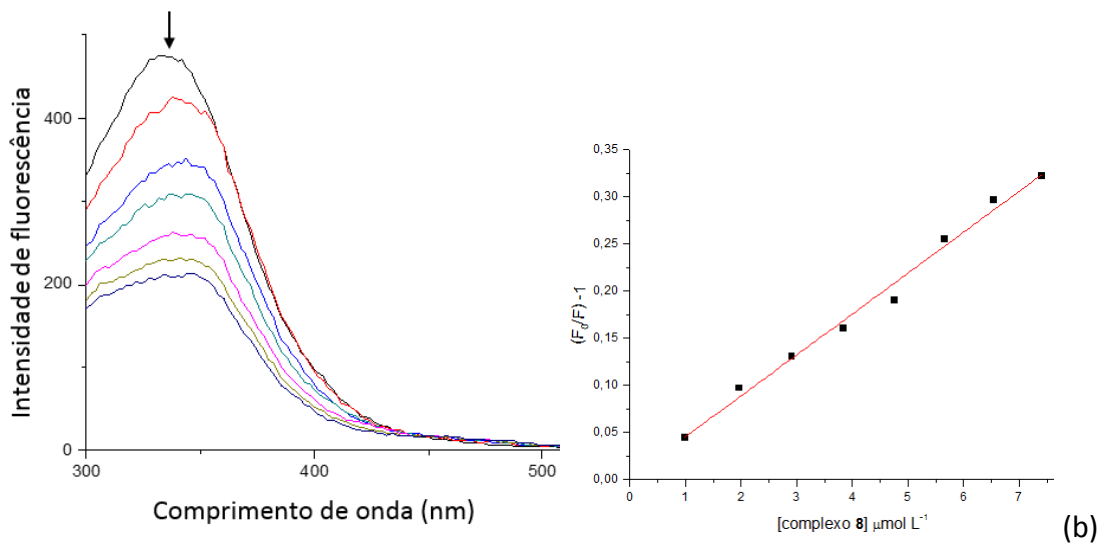
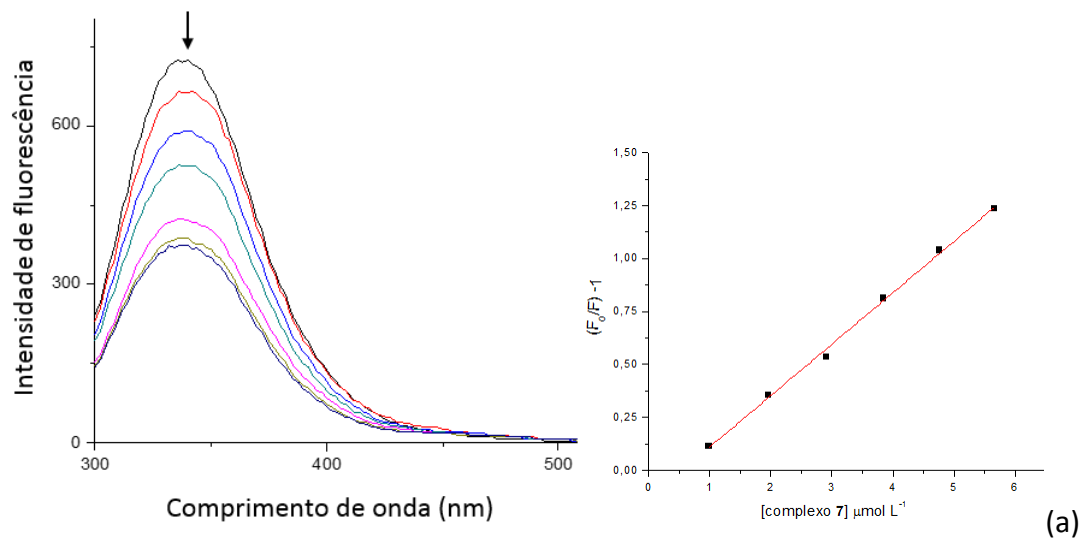


Figura 6.10 - Espectros de fluorescência das albuminas na ausência e na presença de quantidades crescentes das bases de Schiff e as retas de Stern-Volmer. (a) BSA – HL1, (b) BSA – HL2, (c) HSA – HL1 e (d) HSA – HL2, a 310 K.



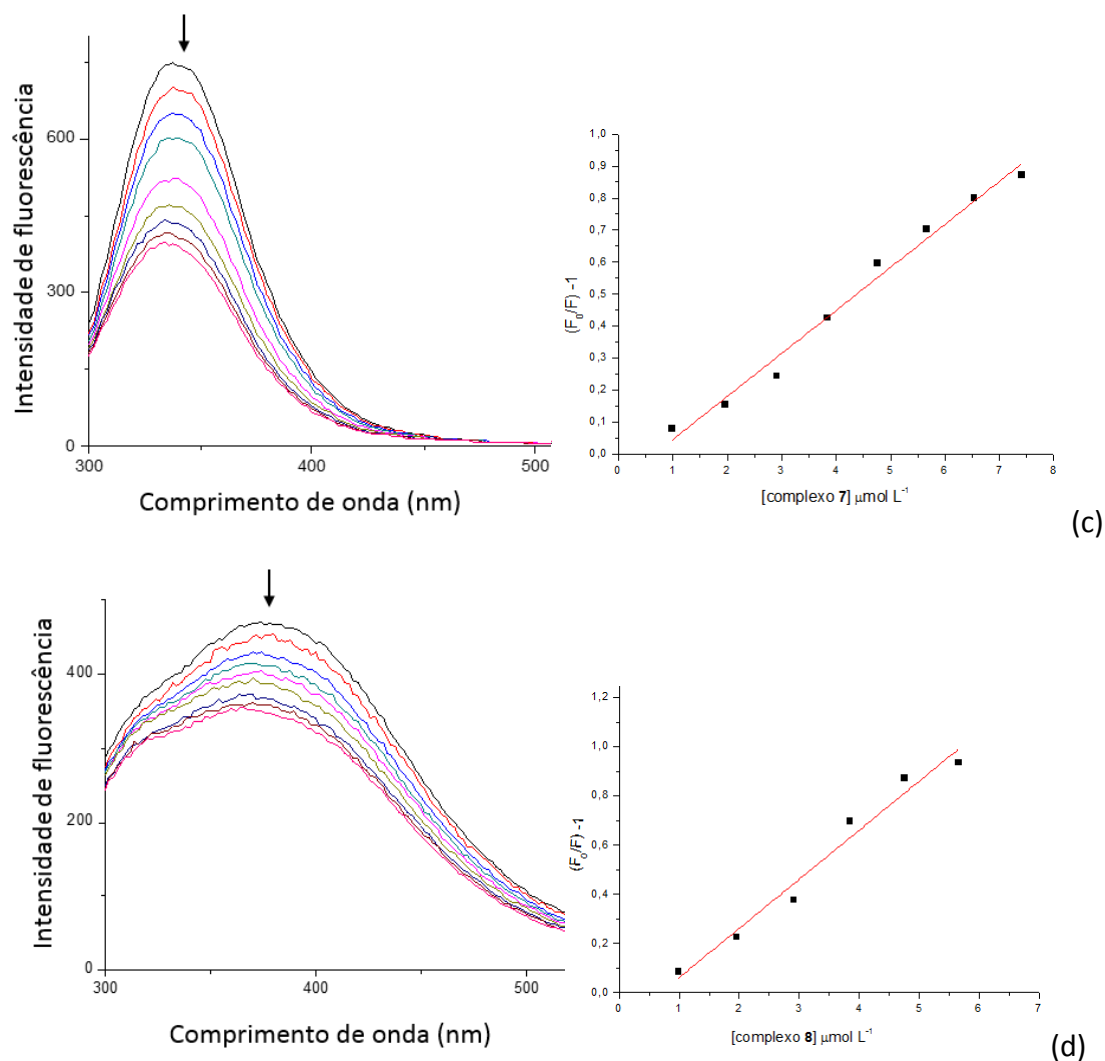


Figura 6.11 - Espectros de fluorescência das albuminas na ausência e na presença de quantidades crescentes dos complexos de Cu(II) de base de Schiff e as retas de Stern-Volmer. (a) BSA - complexo **7**, (b) BSA – complexo **8**, (c) HSA – complexo **7** e (d) HSA – complexo **8**, a 310 K.

Tabela 6.10 - Valores das constantes K_{SV} ($L mol^{-1}$) para a interação entre as bases de Schiff livres, seus complexos e Cu(II) e as albuminas (BSA e HSA) na temperatura de 310 K.

Composto	BSA		HSA	
	$K_{SV}/10^5$	R^2	$K_{SV}/10^5$	R^2
HL1	0,411	0,980	0,377	0,949
7	1,99	0,973	2,43	0,998
HL2	3,14	0,968	0,147	0,971
8	1,35	0,986	0,434	0,990

Os valores das constantes de interação K_{sv} entre as bases de Schiff, seus complexos de Cu(II)-phen e as albuminas foram das ordens de grandeza de 10^4 e de 10^5 L mol⁻¹, indicando que estes compostos são fortes supressores da fluorescência dos resíduos de triptofano das albuminas. A complexação do ligante **HL1** com o Cu(II) levou a aumento dos valores da constante K_{sv} bem como nas atividades biológicas estudadas, indicando que a albumina pode influenciar os mecanismos de ação destes compostos.

Os valores calculados para a constante bimolecular de supressão k_q muito superiores ao limite de 10^{10} L mol⁻¹ s⁻¹ para supressão colisional controlada por difusão, indicam que a presença de algum tipo de ligação entre estes compostos e as albuminas (Lakowicz, 2006). Nesses casos, a constante de Stern-Volmer pode ser considerada a constante de associação.

Os valores das constantes encontradas neste trabalho são próximos aos valores presentes na literatura para compostos semelhantes. Fani e colaboradores (2013) estudaram a interação entre duas bases de Schiff e a albumina humana (HSA), os valores de K_{sv} determinados foram de $2,367 \times 10^5$ e $0,217 \times 10^5$ L mol⁻¹. Jin-Qi Xie e colaboradores (2014) estudaram a interação de complexos de Cu(II) de bases de Schiff com BSA e encontraram constantes de interação K_{sv} das mesmas ordens de grandeza que as encontradas neste trabalho 10^4 - 10^5 L mol⁻¹.

6.10 – Conclusão

As bases de Schiff 2-((5-Nitrofurano-2-il)metilamino)fenol (**HL1**) e 2-(4-Nitrobenzilidenoamino)fenol (**HL2**) e os seus complexos [CuCl(L1)(phen)].0,5H₂O (**7**) [CuCl(L2)(phen)].2,5H₂O (**8**) foram obtidos e caracterizados. O complexo **7** mostrou atividade anti-*T.cruzi* e antifúngica. Quanto à atividade antiproliferativa, os complexos **7** e **8** apresentaram valores de CI_{50} menores que $3,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ para todas as linhagens testadas e índice de seletividade superior ao fármaco de referência na maioria dos casos.

As bases de Schiff e seus complexos de Cu(II) interagem com o DNA com constantes da ordem de 10^3 - 10^4 L mol⁻¹, o que sugerem uma interação moderada. O complexo **7** foi o mais ativo frente a forma tripomastigota do *T.cruzi* e sobre as linhagens de fungos testadas e o que mais interagiu com o DNA, sugerindo que o DNA deve ser um dos alvos envolvidos no mecanismo de ação anti-*T.cruzi* e antifúngico do composto. Sabendo que compostos derivados de nitrofurano, como **HL1** e **7**, são reduzidos mais facilmente que os derivados

de nitrobenzeno, como **HL2** e **8**, o mecanismo de ação desses compostos pode envolver a redução do grupo nitro, como ocorre nos fármacos nifurtimox e benznidazol (Rodríguez *et al.*, 2009). As bases de Schiff e seus complexos de Cu(II)-phen suprimiram a fluorescência do triptofano das albuminas séricas bovina e humana constantes da ordem de 10^4 - 10^5 L mol⁻¹, indicando que a albumina pode influenciar o mecanismo de ação dos compostos.

As fluorquinolonas vêm sendo estudadas devido à sua capacidade quelante e suas aplicações como agentes antimicrobianos, antituberculose e antitumorais (Appelbaum e Hunter, 2000; Wang *et al.*, 2008). Neste trabalho foram estudados complexos de Cu(II), Au(I) e Au(III) de norfloxacin (NOR), uma fluorquinolona de segunda geração. Após as caracterizações físico-químicas e espectroscópicas as seguintes estruturas foram propostas: $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**), $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**4**), $[\text{AuS}(\text{CH}_3)_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (**5**) e $[\text{Au}(\text{pyc})(\text{NOR})_2]\text{Cl}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**6**), onde NOR representa a norfloxacin, py a piridina, bipy a 2,2'-bipiridina, phen a 1,10-fenantrolina e pyc é o ácido piridino-2-carboxílico. Nos complexos de Cu(II) a NOR está coordenada na forma zwitteriônica e de modo bidentado por meio do átomo de oxigênio das carbonila cetônica e carboxílica. Já nos complexos de Au(I) e Au(III), a NOR está coordenada na forma neutra e de modo monodentado por meio do nitrogênio do anel piperazina.

Os complexos **1-6** mostraram ser ativos contra linhagens de bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas, embora não tenham aumentado a atividade da NOR livre. Os complexos **3** e **4** apresentam também significativa atividade anti-*T. cruzi*, sendo tão ou mais ativos que a droga de referência, Benznidazol. Para tentar compreender o mecanismo de ação dos complexos foram feitos estudos de interação com o DNA e com as albuminas séricas bovina (BSA) e humana (HSA). Os complexos **1-6** interagiram moderadamente com o DNA, sendo que a interação **1**-DNA pode ser eletrostática ou via intercalação, e a interação de **2-6** com o DNA ocorreu com rompimento da estrutura secundária do DNA. Os complexos suprimem a fluorescência das albuminas, pelo menos em parte, por meio de um mecanismo estático.

Outro grupo de compostos que tem sido largamente estudado como ligantes na busca por novos fármacos são as bases Schiff (Silva *et al.*, 2011). Nessa etapa do trabalho

foram obtidos dois complexos de Cu(II) de bases de Schiff, [CuCl(L1)(phen)].0,5H₂O (**7**) e [CuCl(L2)(phen)].2,5H₂O(**8**), onde phen é a 1,10-fenantrolina e L1 e L2 representam as bases de Schiff 2-((5-nitrofurano-2-il)metilamino)fenol e 2-(4-nitrobenzilidenoamino)fenol, respectivamente, desprotonadas e coordenadas ao Cu(II) de modo bidentado por meio do oxigênio e do nitrogênio. O complexo **7** foi muito ativo frente a forma tripomastigota do *T. cruzi*, sendo mais ativo que **HL1** livre e que o Benznidazol, que é a droga de referência. O complexo **7** também mostrou boa atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Aspergillus niger*. As bases de Schiff livres foram ativas frente a sete linhagens de células tumorais e a complexação ao Cu(II) aumentou a atividade antiproliferativa, sendo **7** e **8** ativos em baixas concentrações e mais seletivos que o fármaco de referência, a doxirrubicina. Logo a complexação pareceu ser uma estratégia interessante na busca de compostos mais ativos contra células tumorais.

Posteriormente estudou-se a interação das bases de Schiff e dos complexos **7** e **8** com as biomoléculas DNA, BSA e HSA. A interação dos complexos com o DNA pode ser considerada moderada, bem como a interação com a BSA e a HSA, indicando que esses alvos podem ter papel importante no mecanismo de ação desses compostos. As bases de Schiff livres e seus complexos interagiram com o DNA, provavelmente, por intercalação ou interação eletrostática, já a interação com as albuminas não ocorreu, exclusivamente, por processo dinâmico.

Portanto, esperamos que esse trabalho possa contribuir para um melhor entendimento das propriedades estruturais e farmacológicas da norfloxacin, das bases de Schiff **HL1** e **HL2** e de seus complexos metálicos.

Até o momento, esse trabalho deu origem a dois artigos: o primeiro com os resultados obtidos para os complexos de Cu(II) de norfloxacin, que foi publicado no *Bioinorganic Chemistry and Applications* (DOI 10.1155/2016/5027404) e, o segundo, com os resultados obtidos para os complexos de Cu(II) de bases de Schiff, que foi publicado no *Journal of the Brazilian Chemical Society* (DOI 10.5935/0103-5053.20160150). Um terceiro artigo com os resultados obtidos para os complexos de ouro de norfloxacin será escrito e enviado para uma revista especializada.

Referências bibliográficas

Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.; Del C.B.; Montanari, C.A.; Donnici, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, 28 (2005) 118-129.

Andersson, M.I.; Macgowan, A.P. Development of the quinolones. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 51 (2003) 1-11.

Appelbaum P.C.; Hunter P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 16 (2000) 5-15.

Arancibia, R.; Klahn, A.H.; Buono-core, G.E.; Conteras, D.; Barriga, G.; Olea-Azar, C.; Lapier, M. Maya, J.D.; Ibanez, A.; Garland, M.T. Organometallic Schiff base derived from nitrothiophene and nitrofurane: Synthesis, crystallographic, electrochemical, ESR anti *trypanosoma cruzi* studies. **Journal of Organometallic Chemistry**, 743 (2013) 49- 54.

Badiee, P.; Kordbacheh, P.; Alborzi, A.; Malekhoseini, S.; Ramzi, M.; Mirhendi, H.; Mahmoodi, M.; Shakiba, E. Study on invasive fungal infections in immune compromised patients to present a suitable early diagnostic procedure. **International Journal of Infectious Diseases**, 13 (2009) 97-102.

Barbosa, L.C.A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008.

Batista, D.G.J. ; Da Silva, P.B.; Stivanin, L.; Lachter, D.R. ; Silva, R.S.; Felcman, J.; Louro, S.R.W. ; Teixeira, L.R.; Soeiro, M.N. Co(II), Mn(II) and Cu(II) complexes of fluoroquinolones: Synthesis, spectroscopical studies and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. **Polyhedron**, 30 (2011) 1718-1725.

Boiani, M.; Piacenza, L.; Hernández, P.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; González, M.; Denicola, A. Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? **Biochemical Pharmacology**, 79 (2010) 1736–1745.

Burton, G.R.W.; Engelkirk P.G., **Microbiologia para as ciências da saúde**, Editora Guanabara Koogan, 7ª Edição, 2005.

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

Chen, C.Y; Chen, Q.Z; Wang, X.F.; Liu, M.S; Chen Y.F. Synthesis, characterization, DNA binding properties, and biological activities of a mixed ligand copper(II) complex of ofloxacin. **Transition Metal Chemistry**, 34 (2009) 757-763.

Cheng, L.X.; Tang, J.J.; Luo, H.; Jin, X.L.; Dai, F.; Yang, J.; Qian, Y.P.; Li, X.Z.; Zhou, B. Antioxidant and antiproliferative activities of hydroxyl-substituted Schiff bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 20 (2010) 2417-2420.

Cortazar, T.M.; Coombs, G.H.; 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, J.R.; Borges-Pereira, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta tropica**, 15 (2010) 5-13.

Cozzi, P.G. Metal-salen Schiff base complexes in catalysis: practical aspects. **Chemical Society Reviews**, 33 (2004) 410.

Creaven, B.S.; Devereux, M.; Karcz, D.; Kellett, A.; Mccann, M.; Noble, A.; Walsh, M. Copper(II) complexes of coumarin-derived Schiff bases and their anti-Candida activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 103 (2009) 1196-1203.

Dias, L.C.; Dessoay, M.A. Quimioterapia da doença de chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, 32 (2009) 2444-2457.

Dorofeev, V.L. Infrared spectra and the structure of drugs of the fluoroquinilone group. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, 38 (2004) 693-697.

Efthimiadou, E.K.; Katsarou, M.E.; 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.

Euzébio, F.P.G.; dos santos, F.J.L.; Piló-Veloso, D.; Alcântara, A.F.C.; Ruiz, A.L.T.G., de Carvalho, J.E.; Flogio, M.A., Ferreira-Alves, D.L.; Fátima, Â. Synthesis, antiproliferative activity in cancer cells and theoretical studies of novel 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid Mannich base derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 18 (2010) 8172-8177.

Fani, N.; Bordbar, A.K.; Ghayeb, Y. Spectroscopic, docking and molecular dynamics simulation studies on the interaction of two Schiff base complexes with human serum albumin. *Journal of Luminescence*, 141 (2013) 166-167

Ferreira, R.M. Estigmasterol - Alterações estruturais nos anéis A e B e estudo de atividade biológica. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2014.

Firdaus, F.; Fatma, K.; Azam, M.; Khan S.N.; Khan, A.U.; Shakir, M. Template synthesis and physicochemical studies of 14-membered hexaazamacrocyclic complexes with Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II): a comparative spectroscopic approach on DNA binding with Cu(II) and Ni(II) complexes. **Transition Metal Chemistry**, 3 (2008) 467-473.

Fontes, A.P.S.; César, E.T.; Beraldo, H., A química inorgânica na terapia do câncer, **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, (2005) 13-18.

Formagio, A.S.N.; Tonin, L.T.D. ; Foglio, M.A. ; Madjarof, C. ; De Carvalho, J.E.; Da Costa, W.F.; Cardoso, F.P.; Sarragiotto, M.H. Synthesis and antitumoral activity of novel 3-(2-substituted-1,3,4-oxadiazol-5-yl) and 3-(5-substituted-1,2,4-triazol-3-yl) β -carboline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16 (2008) 9660-9667.

Gasparto, A.K.; Baltazar, L.M.; Gouveia, L.F.; da Silva C.M.; Byrro, R.M.D.; Rachid, M.A.; Cunha Júnior, A.S.; Resende-Stoianoff M.A.; Fátima, A.; Santos, D.A. 2-(Benzylideneamino)phenol: A promising hydroxyaldimine with potent activity against dermatophytoses. **Mycopathologia**, 179 (2015) 243–251.

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

Góes Filho, L.S. Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio: espectroscopia de absorção e fluorescência.

Dissertação (Mestrado em Física) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

Gouvea, L.R. Complexos Metálicos de Fluorquinolonas: Síntese, Atividade Biológica e Estudos do Mecanismo de Ação. Tese (Doutorado em química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil, 2013.

Gouvea, L.R.; Garcia, L.S., Lachter, D.R.; Nunes, P.R.; Pereira F.C.; Silveira-Lacerda E.P.; Louro S.R.W.; Barbeira P.J.S.; Teixeira L.R. Atypical fluoroquinolone gold(III) chelates as potential anticancer agents: Relevance of DNA and protein interactions for their mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 55 (2012) 67-73.

Gouvea, L.R.; Martins, D.A.; Batista, D.G. J.; Soeiro, M. N.C.; Louro, S.R.W.; Barbeira, P. J. S.; Teixeira L.R. Norfloxacin Zn(II)-based complexes: acid base ionization constant determination, DNA and albumin binding properties and the biological effect against *Trypanosoma cruzi*, **Biometals**, 26 (2013) 813–825.

Guizado T. Analysis of the structure and dynamics of human serum albumin, **Journal of Molecular Modeling** 20:2450 (2014) 1-13.

Guizado, T.R.C. Estudos computacionais da interação de porfirinas e seus complexos de ferro com albumina sérica humana. Dissertação (Mestrado em Física) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.

Hoare, C.A.; Wallace, F.G. Developmental stages of trypanosomadit flagellates - A new terminology. **Nature**, 212 (1966) 1385-1386.

Kamel, M.M.; Ali, H.I.; Anwar, M.M.; Mohamed, N.A.; Soliman, A.M. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 45 (2010) 572-580.

Kettler, H.E.; Marjanovic, S. Engaging biotechnology companies in the development of innovative solutions for diseases of poverty. **Nature Reviews**, 3 (2004) 171-176.

Khan, A.B; Khan, J.M; Ali M.S.; Khan, R. H.; Kabir-Ud-Din Interaction of amphiphilic drugs with human and bovine serum albumins. **Spetrochimica acta Part A and Biomolecular Spectroscopy**, 97 (2012) 119-124.

Kobeticova, K.; , Bezchlebova, J.; Lana, J.; Sochova , I.; Hofman, J. Toxicity of four nitrogen-heterocyclic polyaromatic hydrocarbons (NPAHs) to soil organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 71 (2008) 650–660.

Lakowicz, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**, 3rd ed, Springer, 2006.

Magalhães, T.F.F.; da Silva, C.M.; de Fátima, A.; da Silva, D.L.; Modolo, L.V.; Martins, C.V.B.; Alves, R.B.; Ruiz, A.L.T.G.; Longato, G.B.; de Carvalho; J.E.; de Resende-Stoianoff, M.A. Hydroxyaldimines as potent in vitro anticryptococcal agentes. **Letters in Applied Microbiology**, 57 (2013) 137-143.

Martins, D.A.; Complexos de Cu(II) de algumas fluorquinolonas: sínteses, atividade anti-*t.cruzi* e investigação do mecanismo de ação. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2011.

Martins, D.A; Gouvea, L.R.; Batista, D. G. J.; Silva, P.B.; Louro,S.R.W.; Soeiro, M.N.; Teixeira, L.R. Copper(II)-fluoroquinolone complexes with anti-*Trypanosomo cruzi* activity and DNA binding ability. **Biometals**, 25 (2012) 951-960.

Meirelles, M. N. L.; De Araujo J., T. C.; Miranda, C. F. 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.

Meng, Z.; Kang, J.; Wen, T.; Lei, B.; Hyde, K.D.; Cordycepin and N⁶-(2-Hydroxyethyl)Adenosine from *Cordyceps pruinosa* and Their Interaction with Human Serum Albumin. **PLOS ONE** DOI:10.1371/journal.pone.0121669

Monks, A.; Scudeiro, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd M. Feasibility of a highflux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *Journal of the National Cancer Institute*183 (1991) 757-766.

Nernortas, E.; Burri, C.; Shapiro, T.A. Antitrypanosomal activity of fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43 (1999) 2066-2068.

(NCCLS, 2002a) Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 2nd ed. NCCLS document M27-A2. Villanova: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002a.

(NCCLS, 2002b) Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd Ed. NCCLS document M27-A2. Villanova: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002b.

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

Pantel, M.N.; Joshi H.N.; Pantel C.R. Cytotoxic, DNA binding, DNA cleavage and antibacterial studies of ruthenium–fluoroquinolone complexes. **Journal Chemistry Scienci**, 126 (2014) 739–749.

Pantel, M.N.; Parmar, P.A.; Gandhi, D.S. Square pyramidal copper(II) complexes with fourth generation fluoroquinolone and neutral bidentate ligand: Structure, antibacterial, SOD mimic and DNA-interaction studies. **Bioinorganic & Medicinal Chemistry**, 18 (2010) 1227-1235.

Patel, R.N.; Pandeya, K.B. X-band electron paramagnetic resonance spectra of pig serum albumin-copper(II) and pig serum albumin-copper(II)-amino acid system. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, 37 (2000) 251-255.

Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S.; Vyvian, J.R. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2012.

Qiao X., Zhong-Ying Ma, Cheng-Zhi Xie, Fei Xue, Yan-Wen Zhang, Jing-Yuan Xu, Zhao-Yan Qiang, Jian-Shi Lou, Gong-Jun Chen, Shi-Ping Yan. Study on potential antitumor mechanism of a novel Schiff base copper(II) complex: Synthesis, crystal structure, DNA binding, cytotoxicity and apoptosis induction activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 105 (2011) 728-737.

Rakhit, G.; Antholine, W.E.; Froncisz, W.; Hyde, J.S.; Pilbrow, J.R.; Sinclair, G.R.; Sarker, B.; Direct evidence of nitrogen coupling in the copper(II) complex of bovine serum albumin by S-band electron spin resonance technique, **Journal of Inorganic Biochemistry**, 25 (1985) 217-224.

Rathelot, P.; Vanelle, P.; Gasquet, M.; Delmas, F.; Crozet, M.P.; Timon-David, P.; Maldonadol, P. Synthesis of novel functionalized 5-nitroisoquinolines and evaluation of *in vitro* antimalarial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 30 (1995) 503-508.

Reis, M. Farmacogenética aplicada ao câncer. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 39 (2006) 577-586.

Rodríguez, J.; Aran, V. J.; Boiani, L.; Olea-Azar, Lavaggi, L.; Gonzalez, M.; Cereceto, H.; Maya, J.D.; Carrasco-Pozo, C.; Cosoy, H.S. New potente 5-nitroindazole derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Synthesis, biological evaluation, and mechanism of action studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17 (2009) 8186–8196

Rokas, A. Aspergillus. **Current Biology**, 23 (2013) 187-188.

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

Scorzoni, L.; De Lucas, M.P.; Mesa-Arango, A.N.; Fusco-Almeida, A.M.; Lozano, E.; Cuenca-Estrella, M.; Mendes-Giannini, M.J.; Zaragoza, O. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **Plos One**, 8 (2013) 60047.

Shaikh, S.M.T.; Seetharamappa, J.; Kandagal, P.B.; Ashoka, S. Binding of the bioactive component isothipendyl hydrochloride with bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, 786 (2006) 46-52.

Shaikh, S.M.T.; Seetharamappa, J.; Kandagal, P.B.; Manjunatha, D.H.; Ashoka, S. Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin. **Dyes and Pigments**, 74 (2007) 665-671.

Silva, C.M.; Da Silva, D.L.; Modolo, L.V.; Alves, R.B.; Martins, C.V.B.; De Resende, M.A.; De Fátima, A. Schiff bases: a short review of their biological activities. **Journal of Advanced Research**, 2 (2011) 1-8.

Silva, C.M.; Síntese de aldiminas e calix[4]aldiminas mediada por radiação de micro-ondas e avaliação de suas atividades antifúngica e citotóxica. Tese (Doutorado em química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil, 2013.

Silva, D.; Cortez, C.M.; Louro, S.R.W. Chlorpromazine interactions to sera albumins. A study by the quenching o fluorescence. **Spectrochimica Acta Part A**, 60 (2004) 1215-1223.

Silva, L.L.; Donnici; C.L.; Lopes J.C.D. Investigação eletroquímica e calorimétrica da interação de novos agentes antitumorais biscatiônicos com DNA. **Química Nova**, 35 (2012) 1318-1324.

Silva, R.E.; Toledo, K.C. F. ; Jorge, H.B. ; Neto, B.M. ; Souza V.R. ; Nakatani, H.S. Interação de complexo de rutênio com albumina de soro bovino para detecção amperométrica de ácido ascórbico. **Química Nova**, 37 (2014) 1633-1638.

Silva, C.F.; Batista, D.G.J; Oliveira, G.M.; Oliveira, de Souza, E.M.; Hammer, E.R.; Silva, P.B.; Daliry, A.; Araujo, J.S.; Britto, C.; Rodrigues, A.C.M.; Zongying Liu; Farahat, A.A.; Kumar, A.; Boykin, D.W.; Soeiro, M.N.C In Vitro and In Vivo Investigation of the Efficacy of Arylimid amide DB1831 and Its Mesylated Salt Form - DB1965 - against *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS ONE** 7 (2012) 1-8.

Skyrianou, K.C.; Raptopoulou, CP ; Psycharis, V ; Kessissoglou, Dp ; Psomas, G Structure, cyclic voltammetry and DNA-binding properties of the bis(pyridine)bis(sparfloxacinato)nickel(II) complex. *Polyhedron*, 28 (2009) 3265 -3271.

Skyrianou, K.C.; Perdih, F.; Turel, I; Kessissoglou, D.P; Psomas, G. Nickel–quinolones interaction. Part 3 - Nickel(II) complexes of the antibacterial drug flumequine. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 104 (2010) 740-479.

Souza, M.V.N.; Almeida. V.; Silva, A.D.; Couri, M.R.C. Ciprofloxacina, uma importante fluorquinolona no combate ao antraz. **Revista Brasileira de Farmácia**, 85 (2004) 13-18.

Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. **Journal of Magnetic Resonance**, 178 (2006) 42-55.

Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K.; Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Engineering Design & Selection**, 12 (1999) 439-446.

Takebayashi, T.; Iwasawa, N.; Mukaiama, T. Synthetic control by internal interaction. The intramolecular Diels Alder Reactions of furan derivatives and α,β - unsaturated amides. *The Bulletin of the Chemical Society of Japan* 56 (1983) 1107-1112.

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

Uivarosi, V. Metal Complexes of Quinolone Antibiotics and Their Applications: An Update. **Molecules**, 18 (2013) 11153-11197.

Vieira, L.M.M.; Almeida M.V.; Lourenço, M.C.S.; Bezerra, F.A.F.M.; Fontes A.P.S. Platinum (II) complexes with fluoroquinolones: Synthesis and characterization of unusual metal piperazine chelates. **Inorganic Chimica Acta**, 369 (2009) 2060-2064.

Wai-Yin Sun, R.; Chi-Ming Che The anti-cancer properties of gold(III) compounds with dianionic porphyrin and tetradentate ligands. **Coordination Chemistry Reviews**, 253 (2009) 1682- 1691.

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**, 69 (2008) 956-963.

Wang, Y.; Yang, Zheng-Yin; Chen, Zhong-Ning Synthesis, characterization and DNA-binding properties of four Zn(II) complexes with bis(pyrrol-2-yl-methyl)amine ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 18 (2008) 298-303.

Wang, Y.Q.; Zhang, H.M.; Zhang, G.C.; Tao W.H.; Tang, S.H. Interaction of the flavonoid hesperin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. **Journal of Luminescence**, 126 (2007) 211-218.

Xie, Jin-Qi ; Li, Chuan-Hua ; Dong, Jia-Xin ; Qu, Wei ; Pan, Lan ; Peng, Meng-La ; Xie, Ming-An ; Tao, Xu ; Yu, Cheng-Mao ; Zhu, Yi ; Zhang, Ping-Hua ; Tang, Chun-Guang ; Li, Qiang-Guo The standard molar enthalpy of formation of a new copper(II) Schiff-base complex and its interaction with bovine serum albumin. **Thermochimica Acta**, 598 (2014) 7-15.

Xie, X.; Wang, Z.; Zhou, X.; Wang, X.; Che X. Study on the interaction of phthalate esters to human serum albumin by steady-state and time-resolved fluorescence and circular dichroism spectroscopy. **Journal of Hazardous Materials**, 192 (2011) 1291– 1298.

Zaha, A.; Ferreira, H.B.; Passaglia, L.M.P. **Biologia Molecular Básica**. Artmed 5ª edição, Ano 2014.

Zgirski, A.; Frieden, E. Binding of Cu(II) to non-prosthetic sites in ceruloplasmin and bovine serum albumin. **Journal of Inorganic Biochemistry** 39 (1990) 137-148.

Zhang, G.; Zhao, N.; Hu, X.; Tian, J. Interaction of alpinetin with bovine serum albumin: Probing of the mechanism and binding site by spectroscopic methods. **Spectrochimica Acta Part A**, 76 (2010) 410-417.

Živec, P.; Perdih, F.; Turel, I.; Giester, G.; Psomas, G. Different types of copper complexes with the quinolone antimicrobial drugs ofloxacin and norfloxacin: Structure, DNA- and albumin-binding. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 117 (2012) 35–47.

Anexo 1

Anexo 1 – Espectros na região do infravermelho

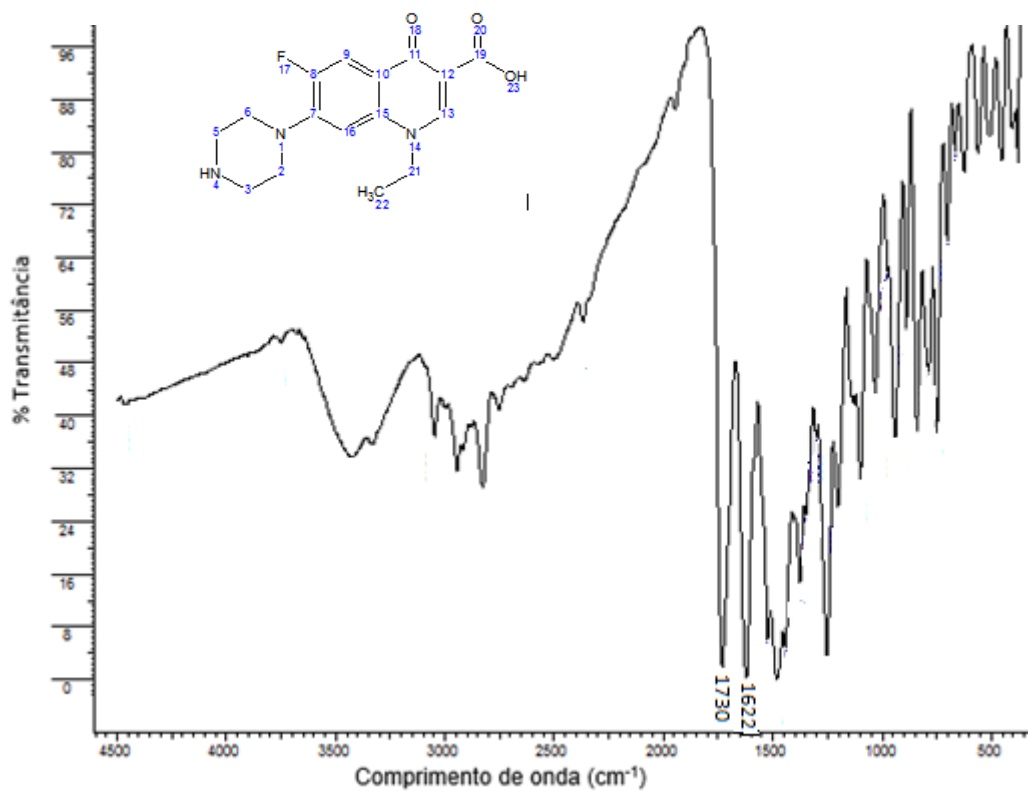


Figura A1 – Espectro de infravermelho da Norfloxacin (KBr).

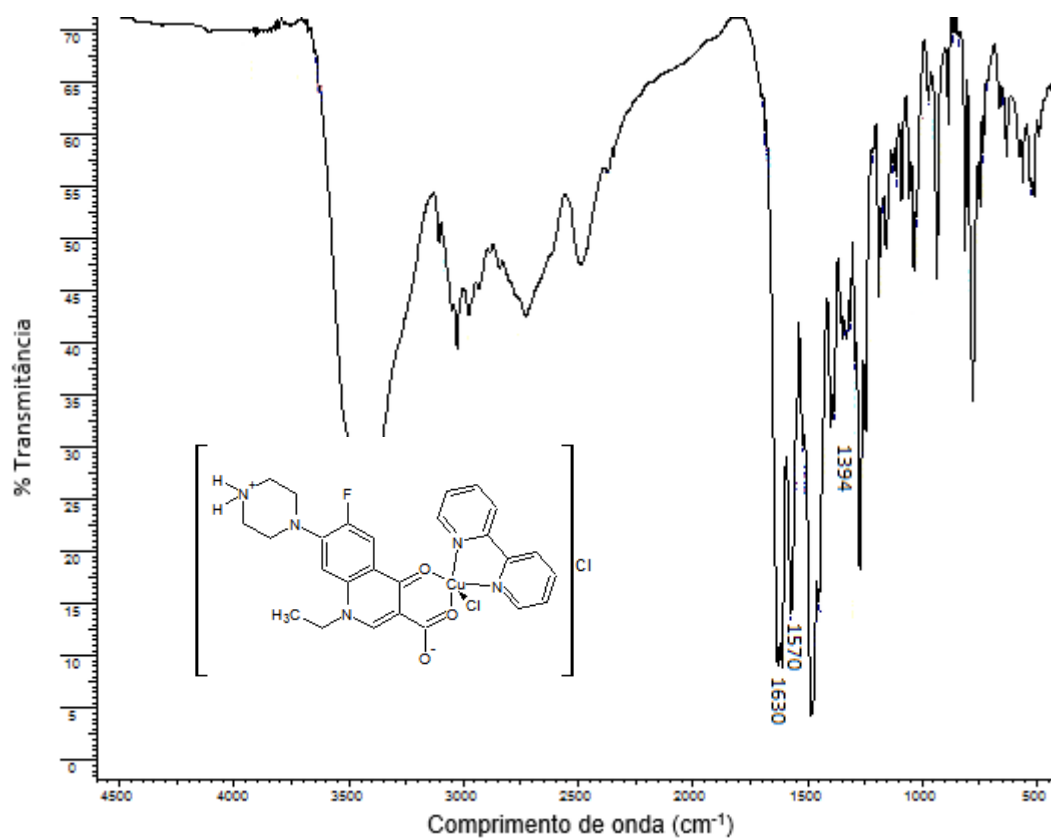


Figura A2 – Espectros de infravermelho do complexo $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) (KBr).

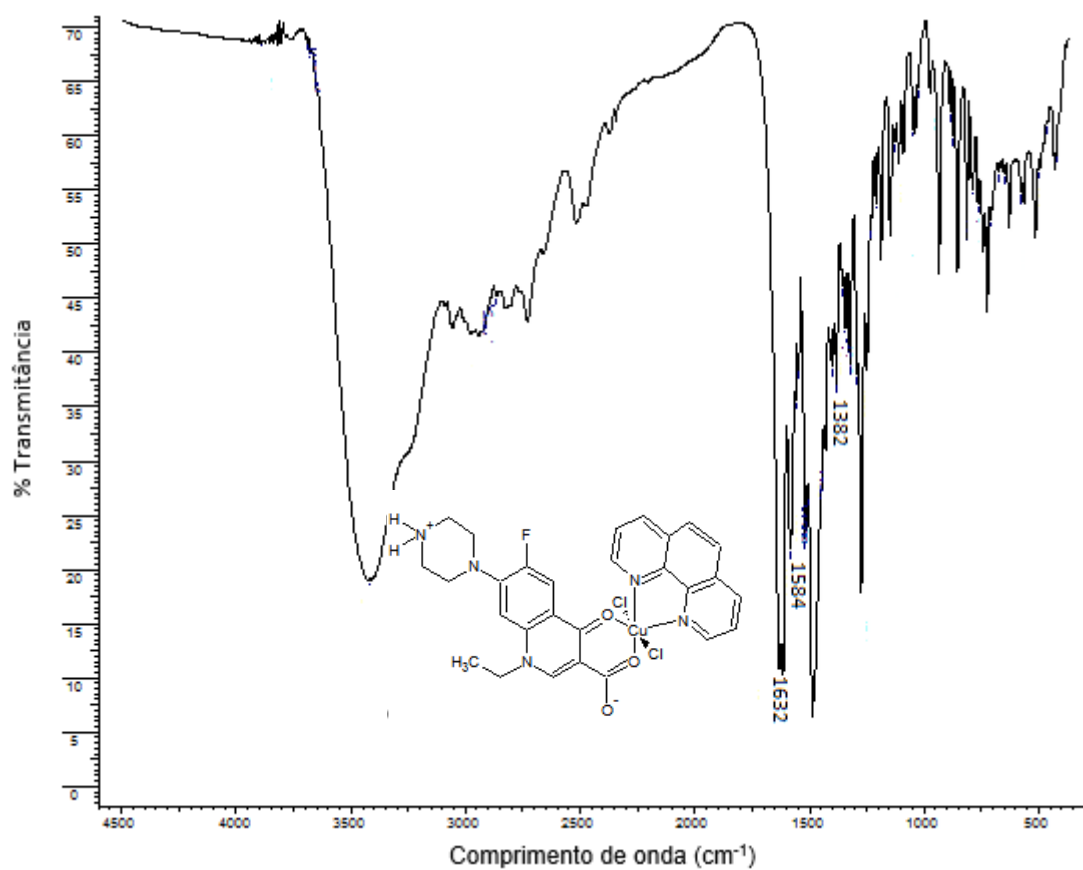


Figura A3 – Espectro de infravermelho do complexo $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**4**) (KBr).

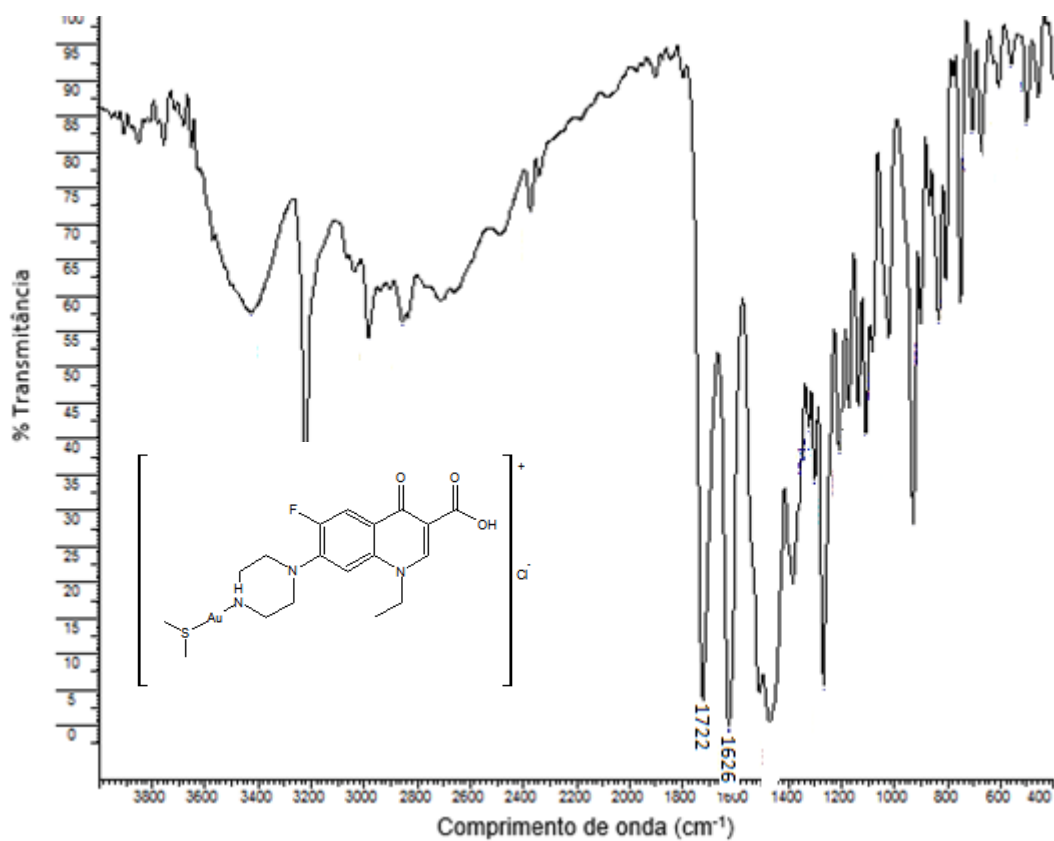


Figura A4 – Espectros de infravermelho do complexo $[\text{Au}(\text{S}(\text{CH}_3)(\text{NOR}))\text{Cl}]$ (**5**) (KBr)

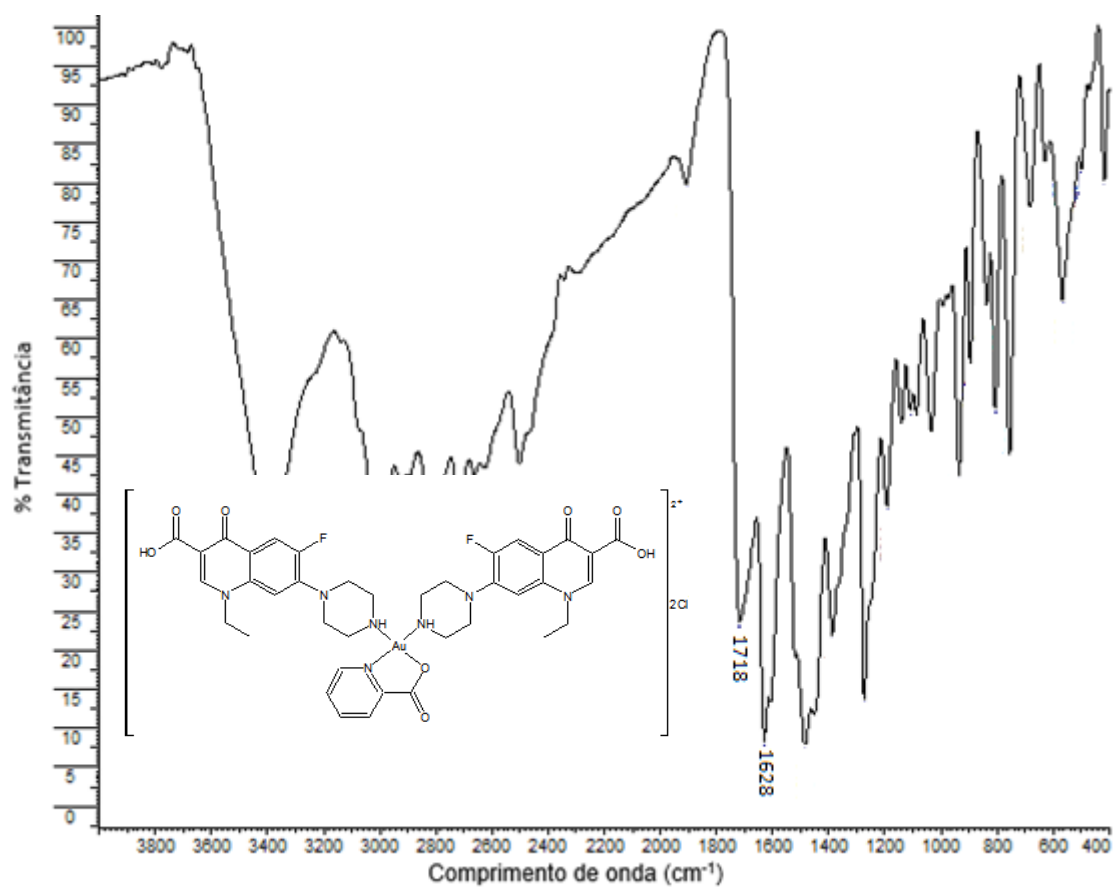


Figura A5 – Espectro de infravermelho do complexo $[\text{Au}(\text{pyc})(\text{NOR})_2]\text{Cl}_2$ (**6**) (KBr)

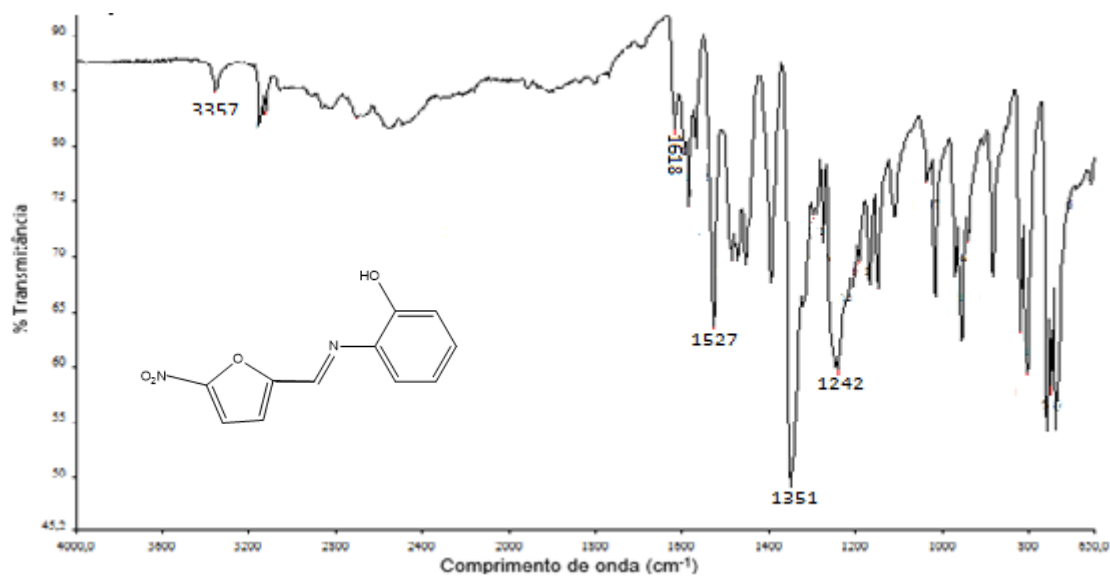


Figura A6 – Espectro de infravermelho de **HL1** (neat)

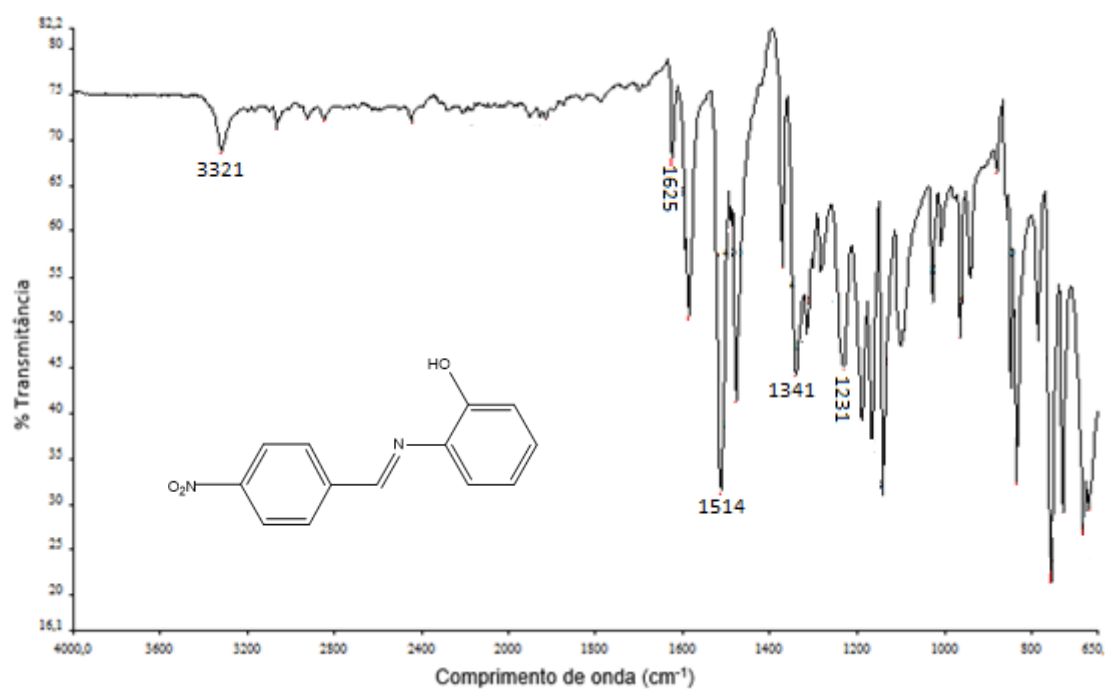


Figura A7 – Espectro de infravermelho de **HL2** (ATR)

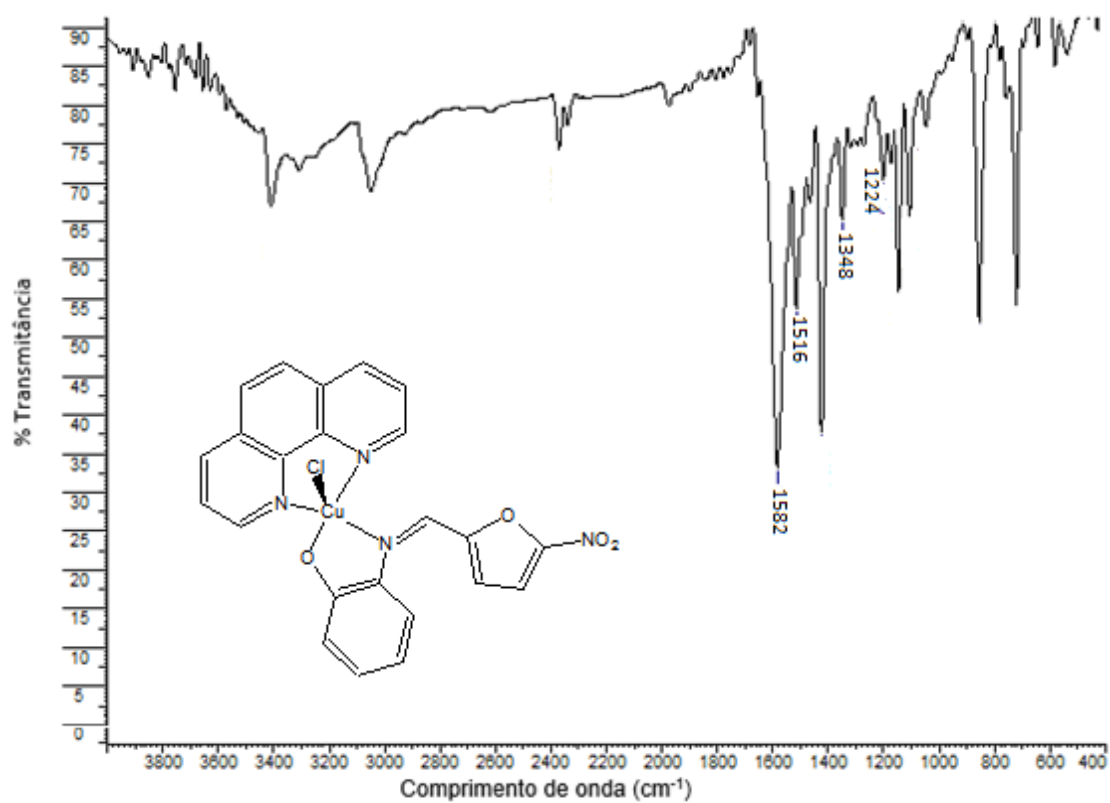


Figura A8 – Espectro de infravermelho do complexo [CuCl(L1)(phen)].0,5H₂O(7) (KBr)

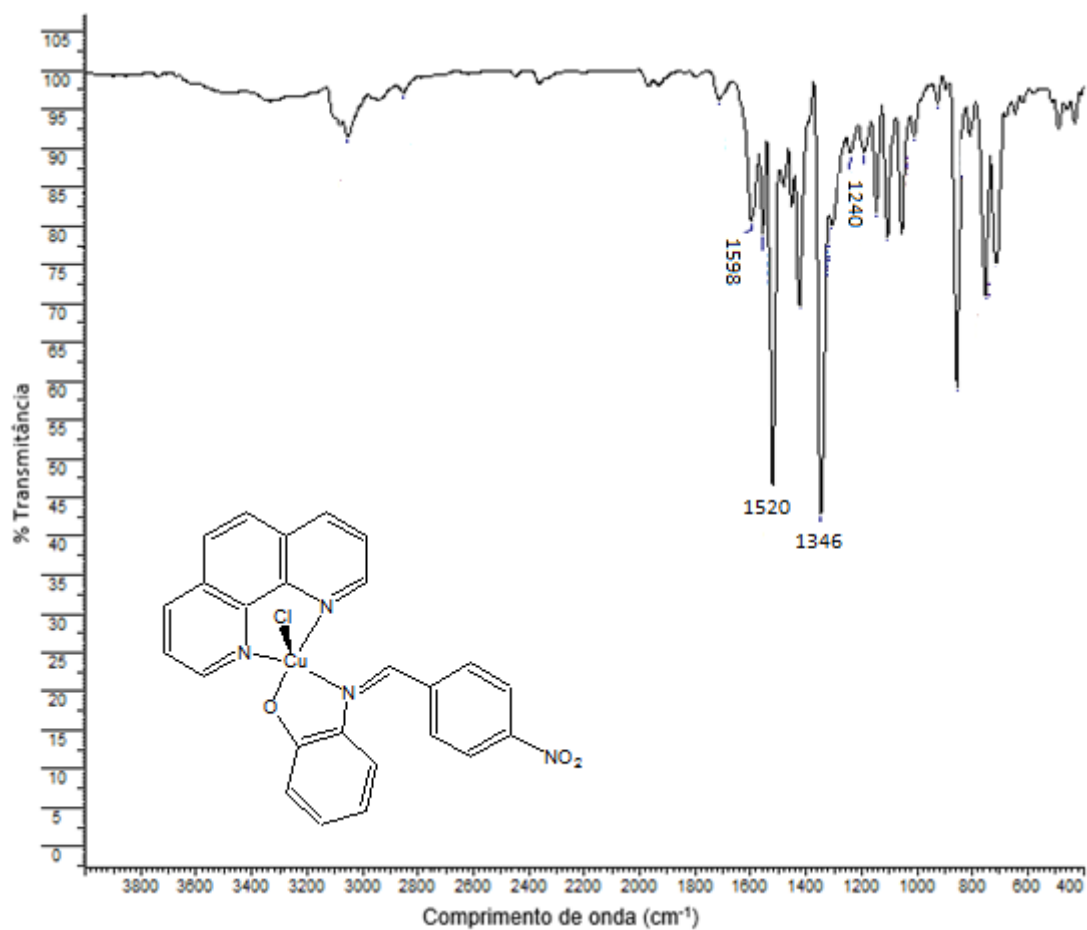


Figura A9 – Espectro de infravermelho do complexo $[\text{CuCl}(\text{L2})(\text{phen})]$ (**8**) (KBr)

Anexo I – Curvas de TG/DTG

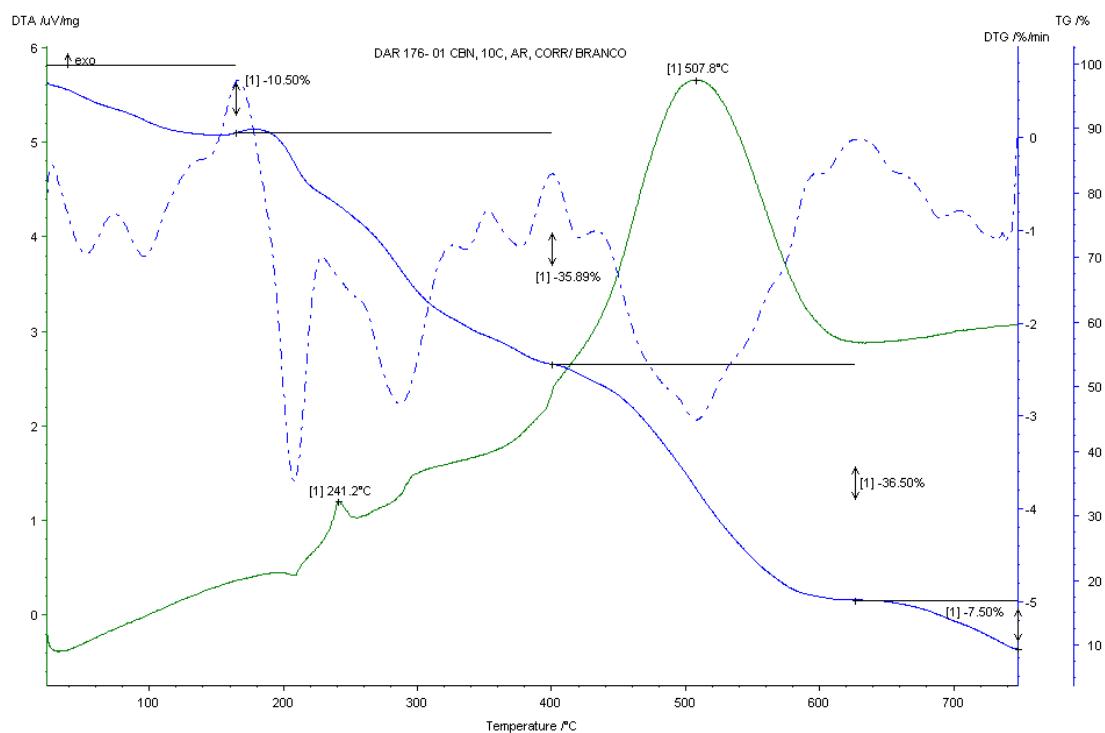


Figura A10 – Curvas TG/DTG do complexo $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3)

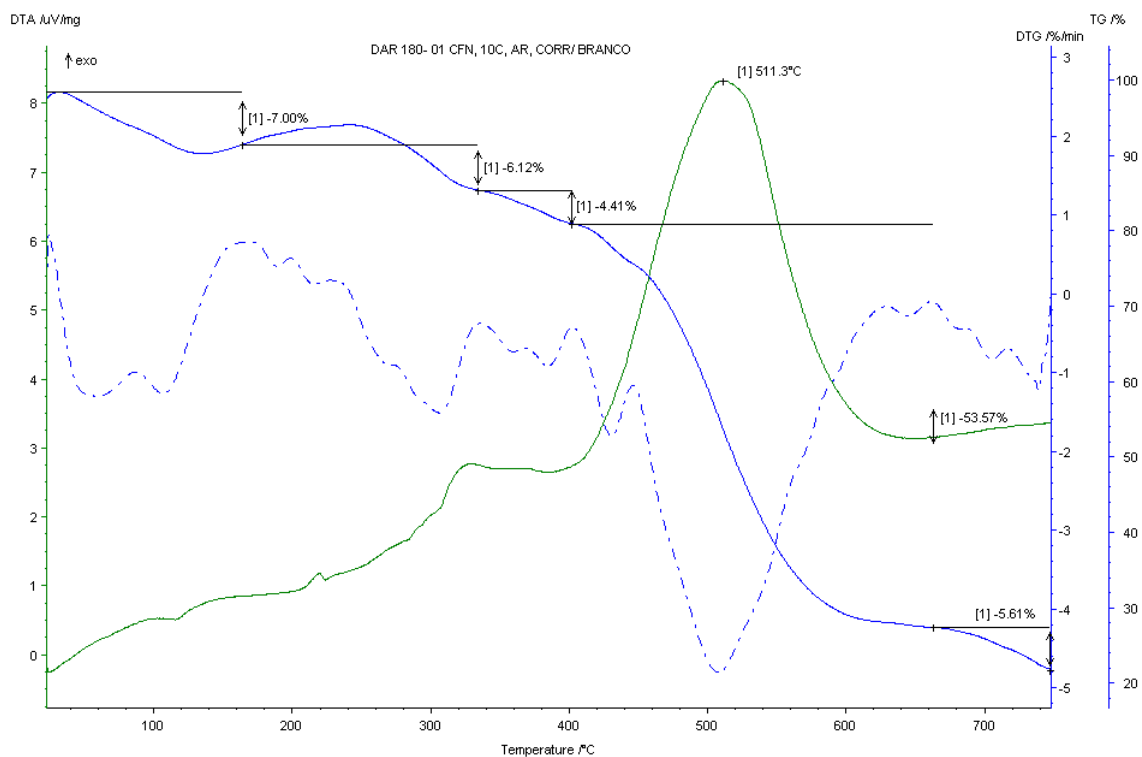


Figura A11 – Curvas TG/DTG do complexo $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4)

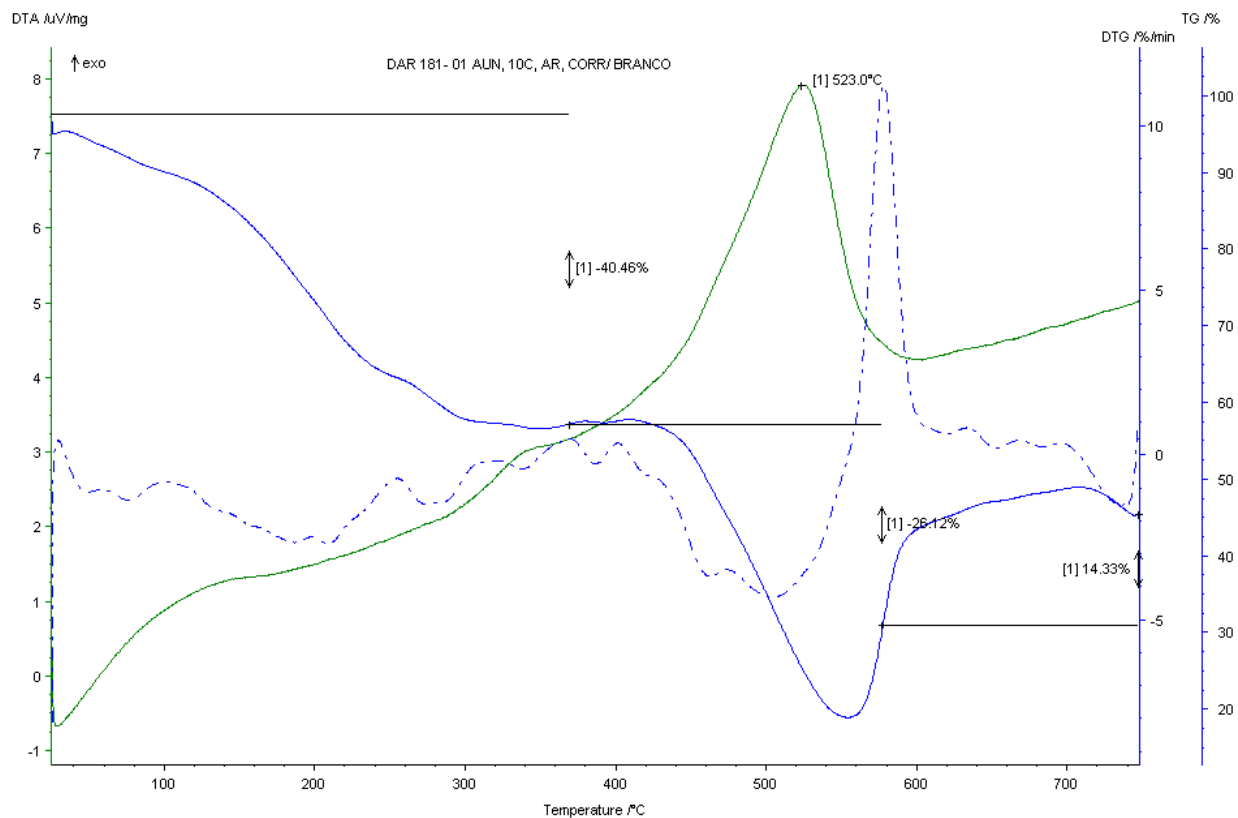


Figura A12 – Curvas TG/DTG do complexo $[\text{Au}(\text{pyc})(\text{NOR})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (6)

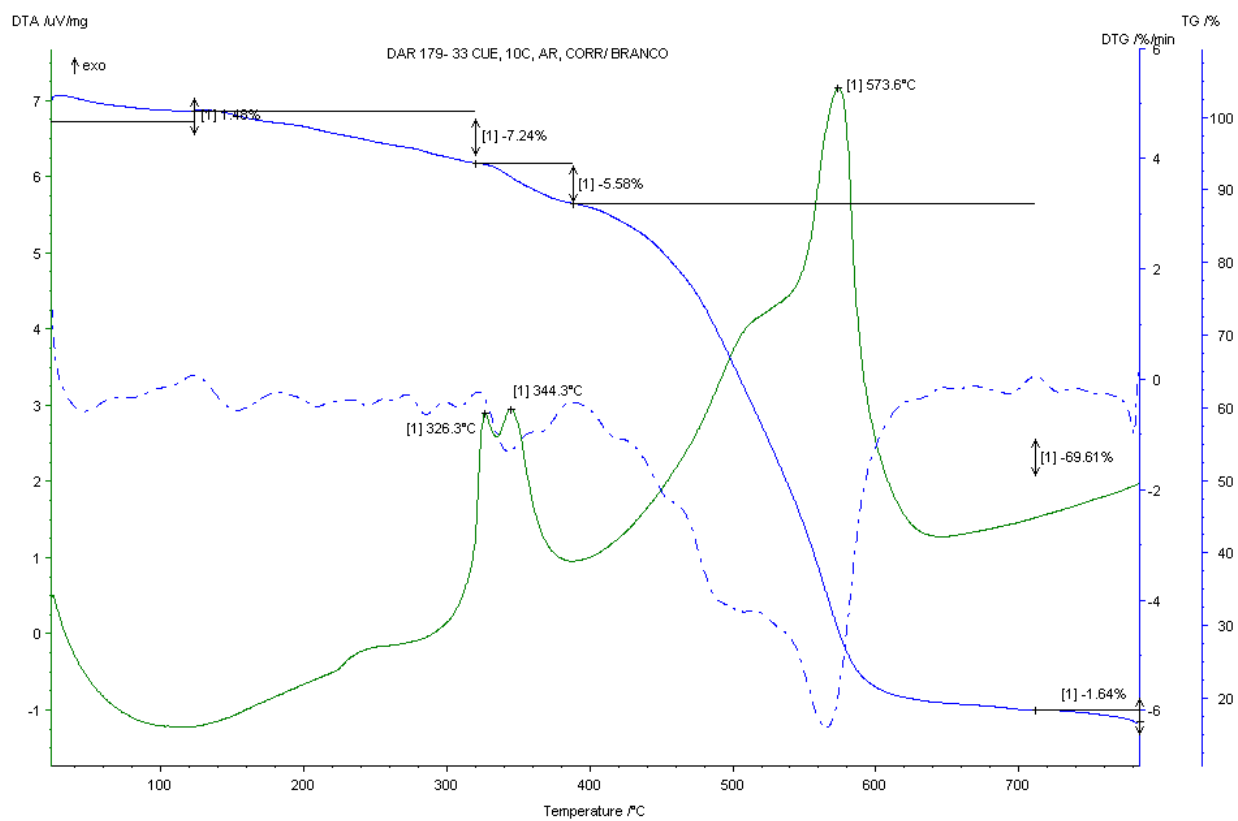


Figura A13 – curvas de TG/DTG do complexo $[\text{CuCl}(\text{L1})(\text{phen})] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (7)

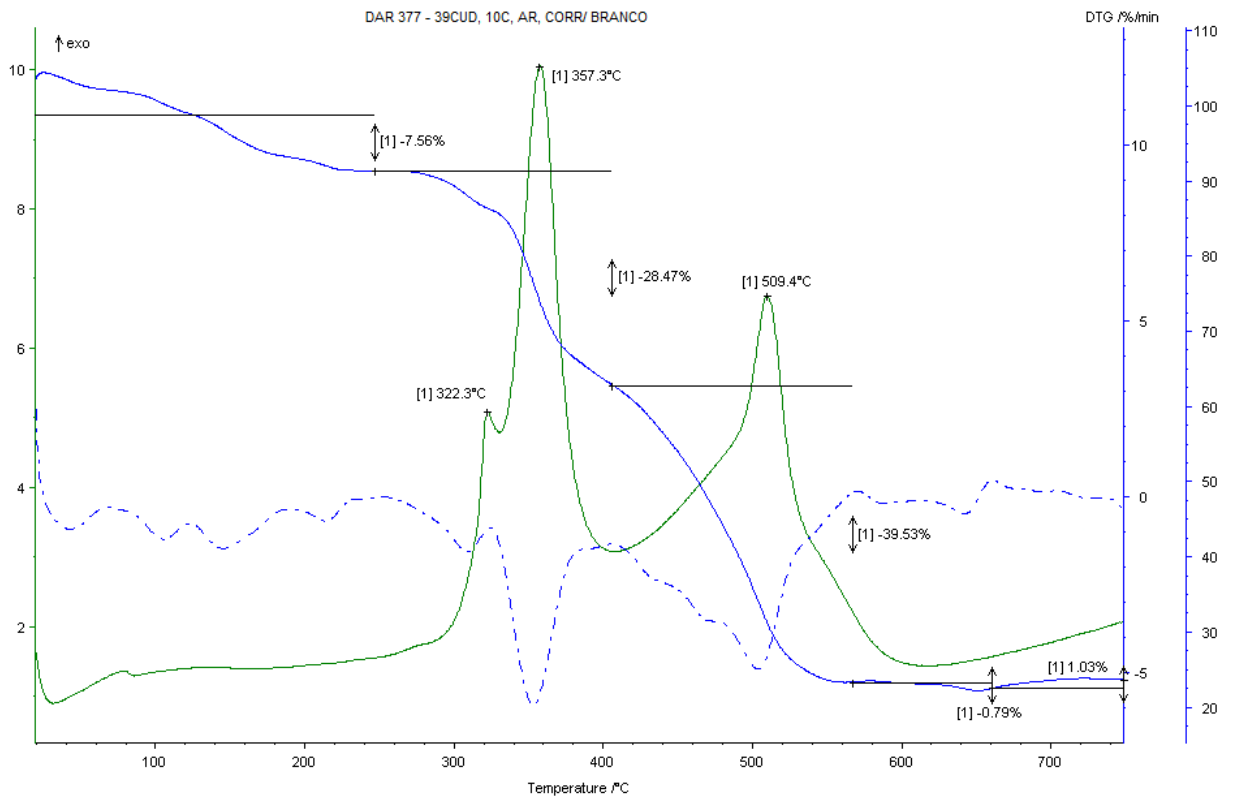


Figura A14 – Curvas TG/DTG do complexo $[\text{CuCl}(\text{L2})(\text{phen})] \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (**8**)

Anexo I – Espectros de RMN

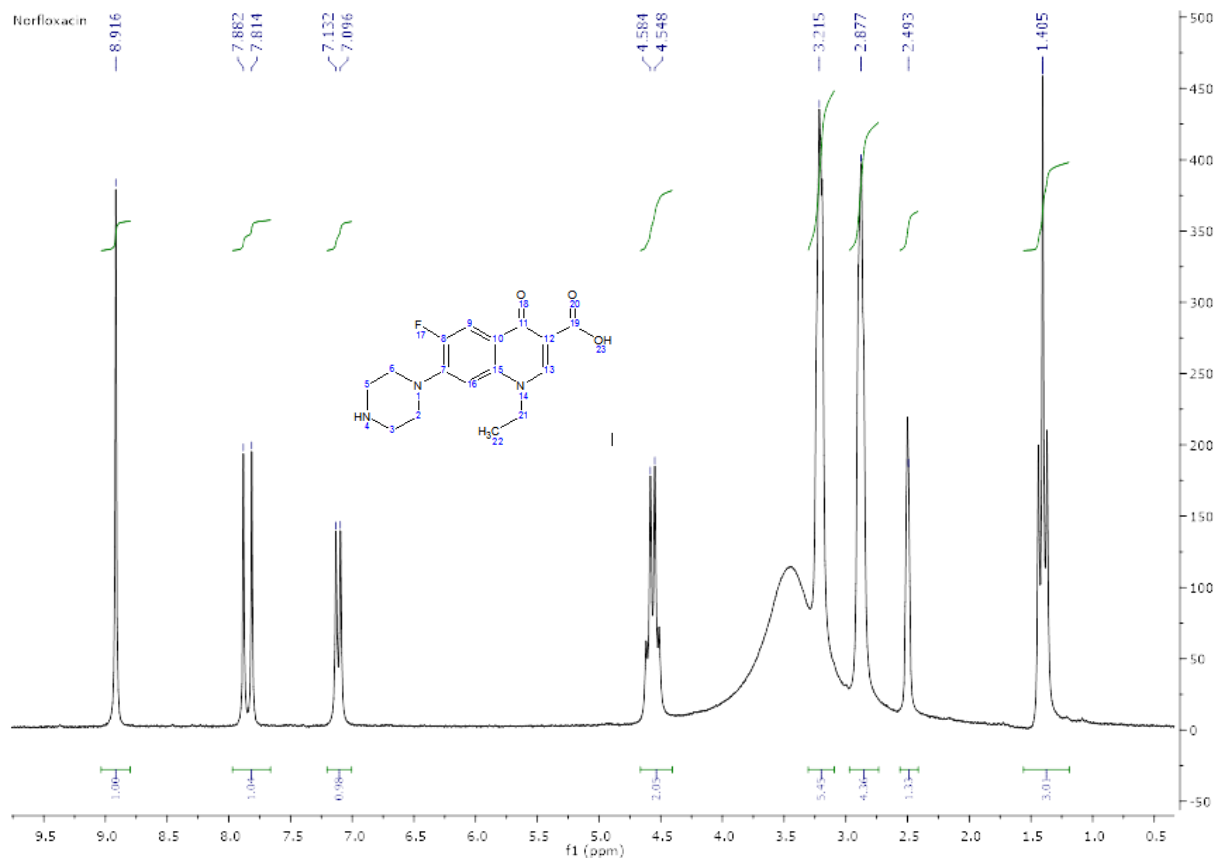


Figura A15 - Espectro de RMN de ^1H da Norfloxacin (400MHz, DMSO- d_6 , 20°C)

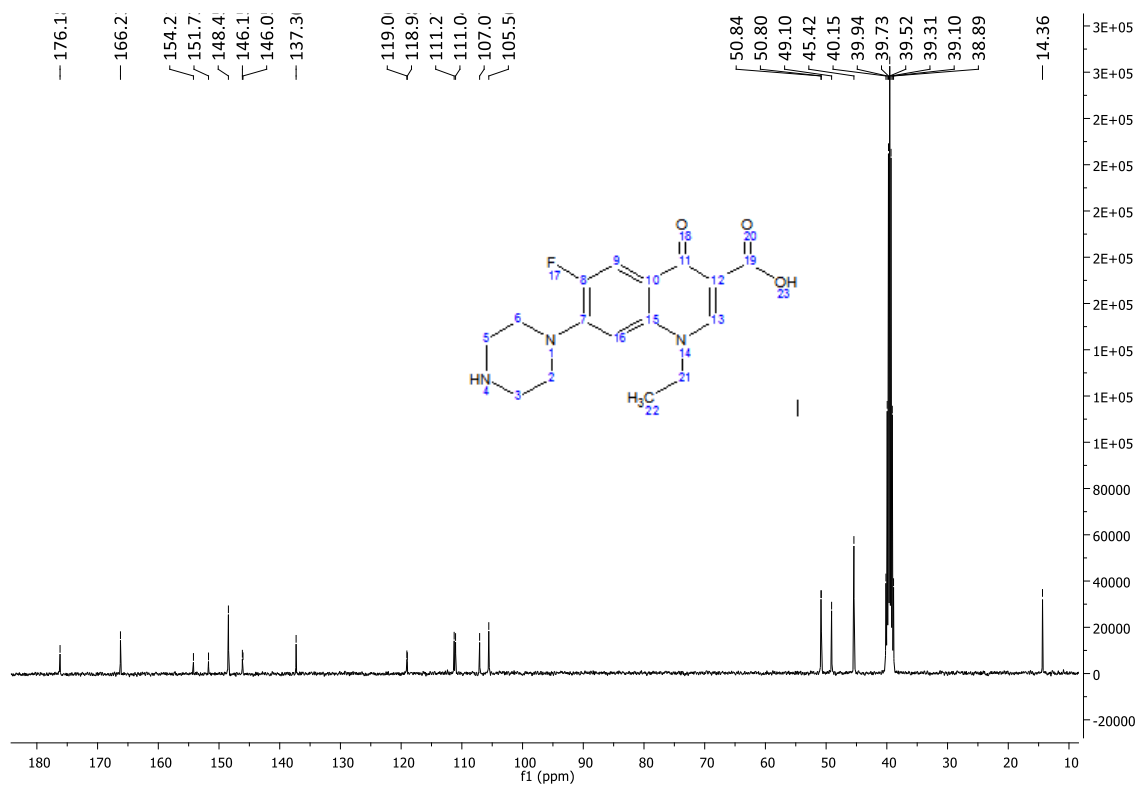


Figura A16 - Espectro de RMN de ^{13}C da Norfloxacin (400MHz, DMSO- d_6 , 20°C)

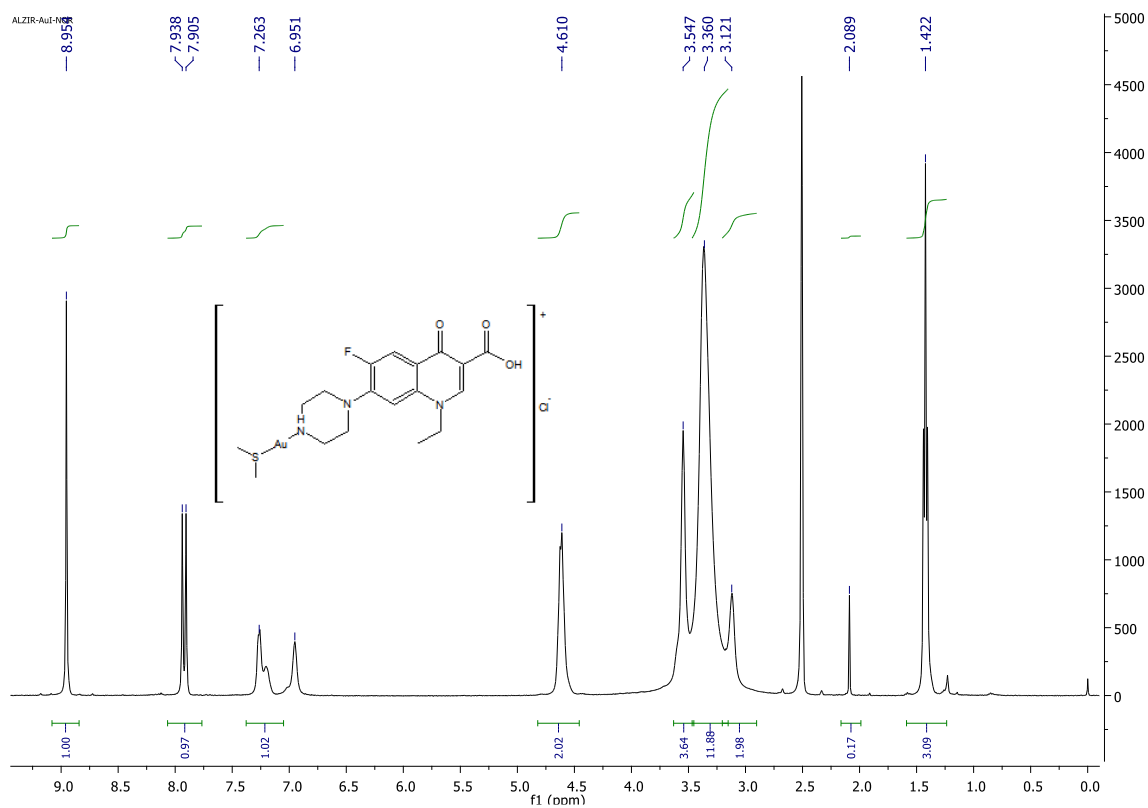


Figura A17 - Espectro de RMN de ^1H de $[\text{Au}(\text{S}(\text{CH}_3)_2)(\text{NOR})]\text{Cl}$ (400MHz, DMSO-d_6 , 20°C)

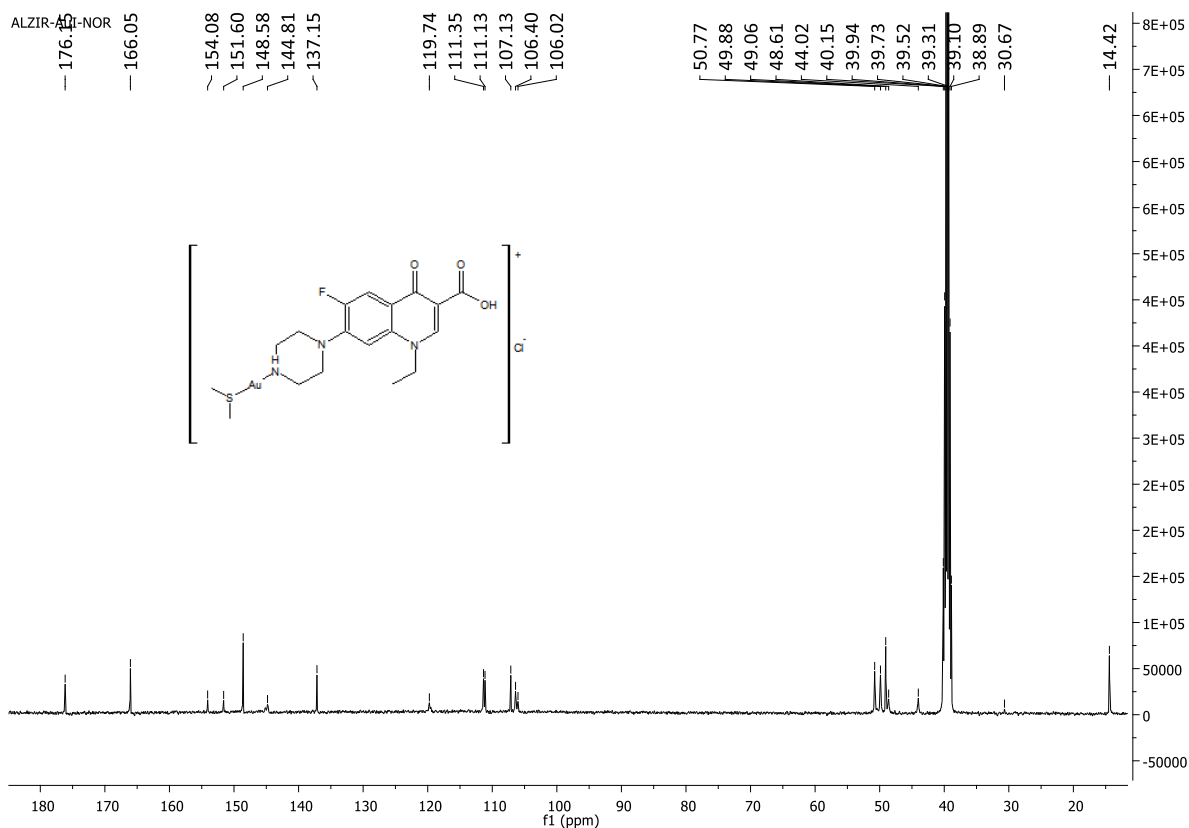


Figura A18 - Espectro de RMN de ^{13}C de $[\text{Au}(\text{S}(\text{CH}_3)_2)(\text{NOR})]\text{Cl}$ (400MHz, DMSO-d_6 , 20°C)

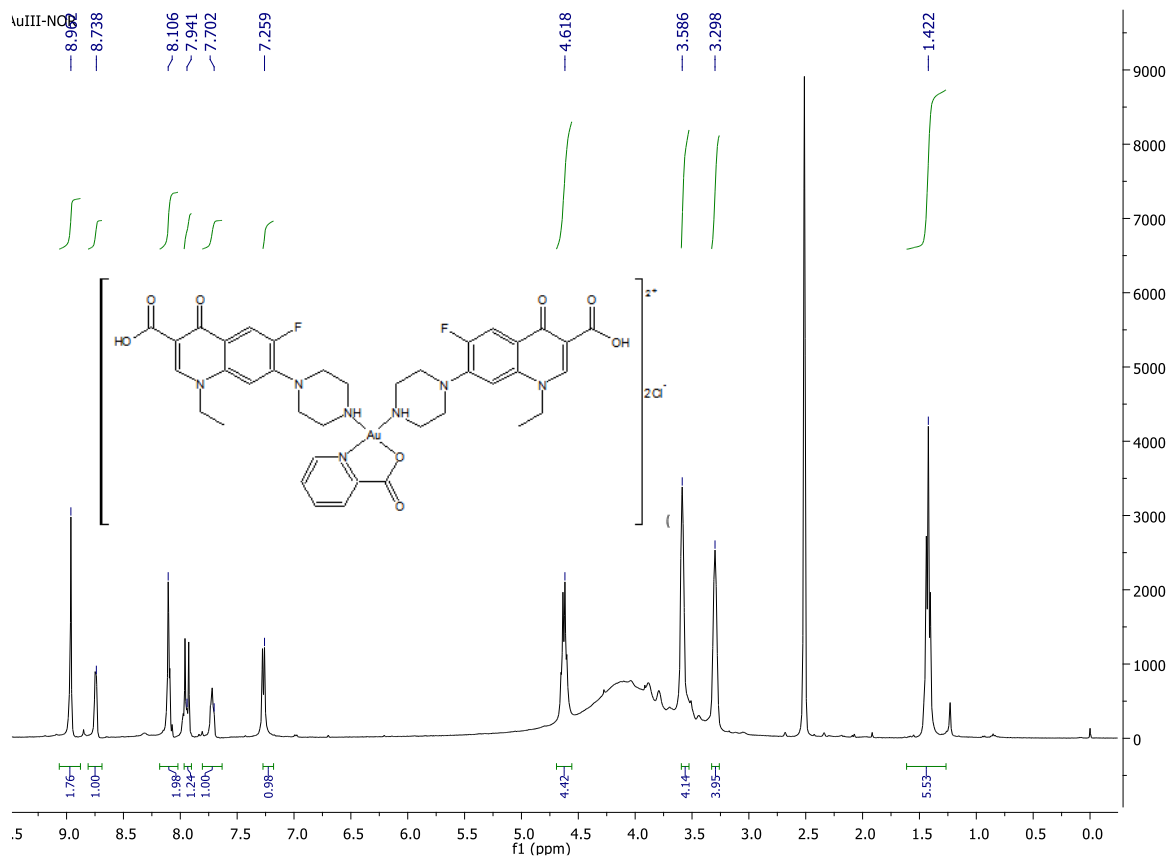


Figura A19 - Espectro de RMN de ^1H de $[\text{Au}(\text{pyc})(\text{NOR})_2]\text{Cl}_2$ (400MHz, DMSO- d_6 , 20°C)

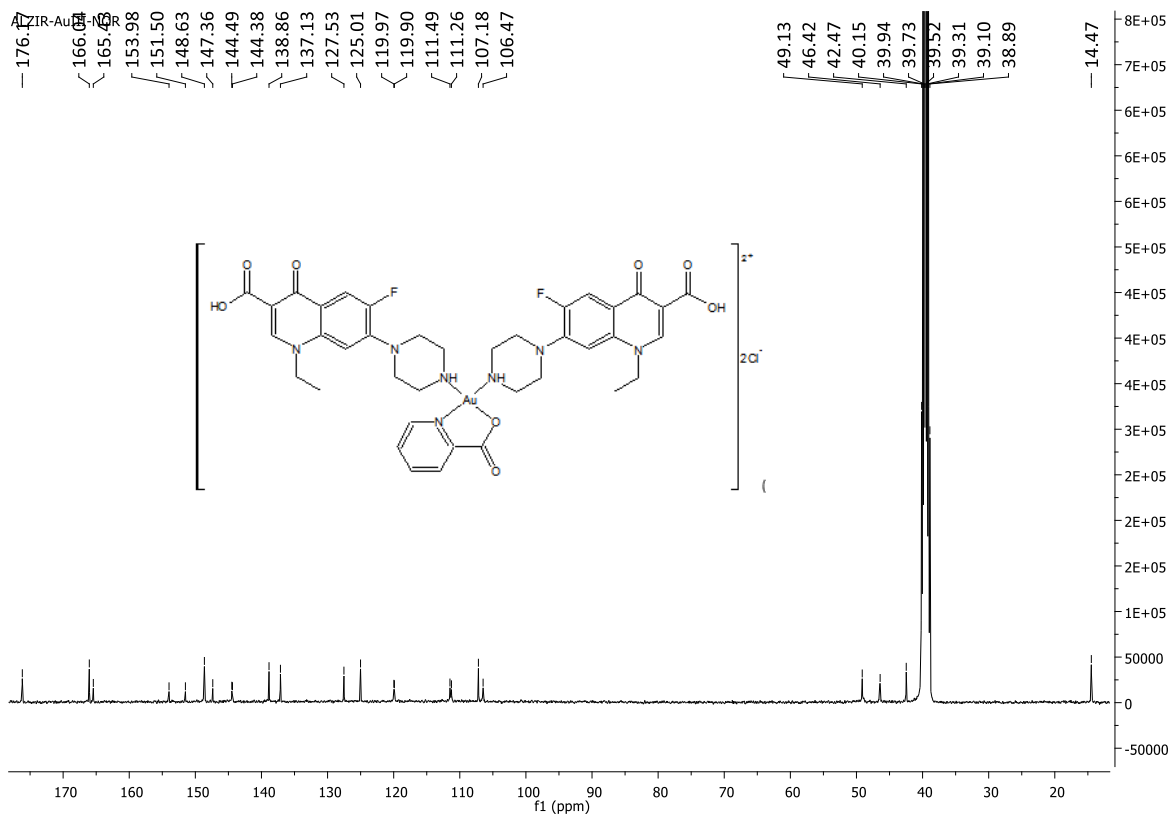


Figura A20 - Espectro de RMN de ^{13}C de $[\text{Au}(\text{pyc})(\text{NOR})_2]\text{Cl}_2$ (400MHz, DMSO- d_6 , 20°C)

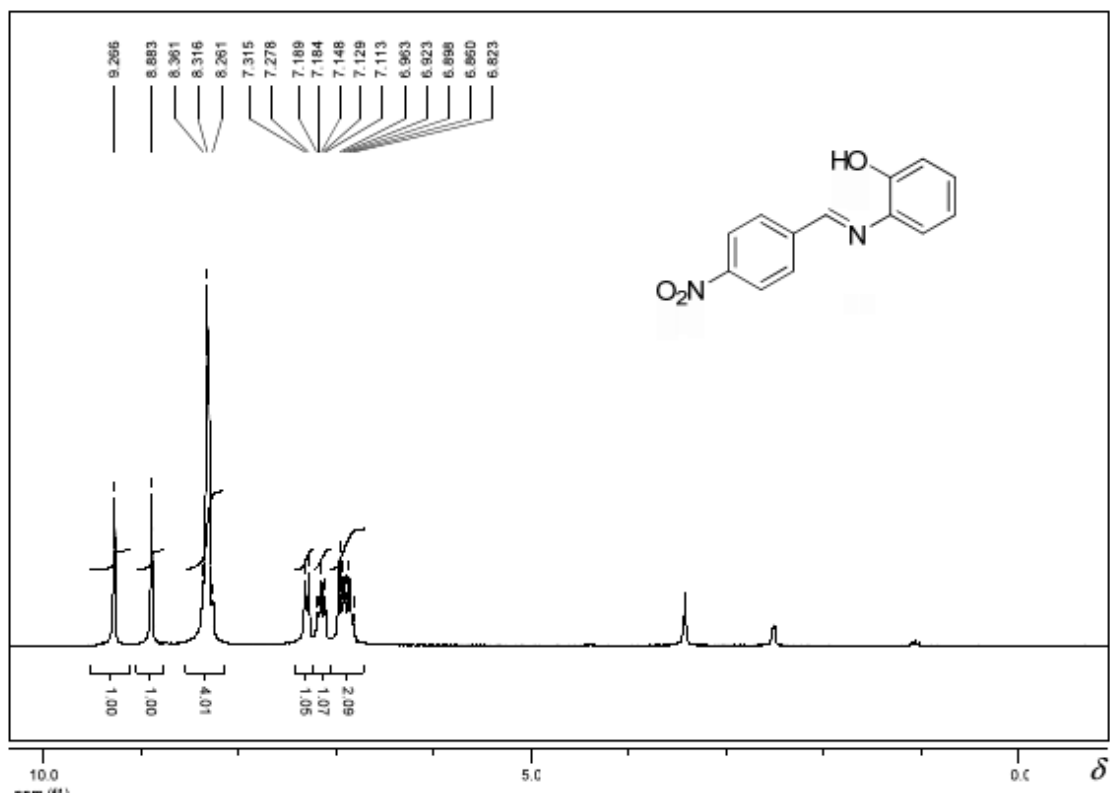


Figura A21 - Espectro de RMN de ^1H do composto **HL2** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 20°C).

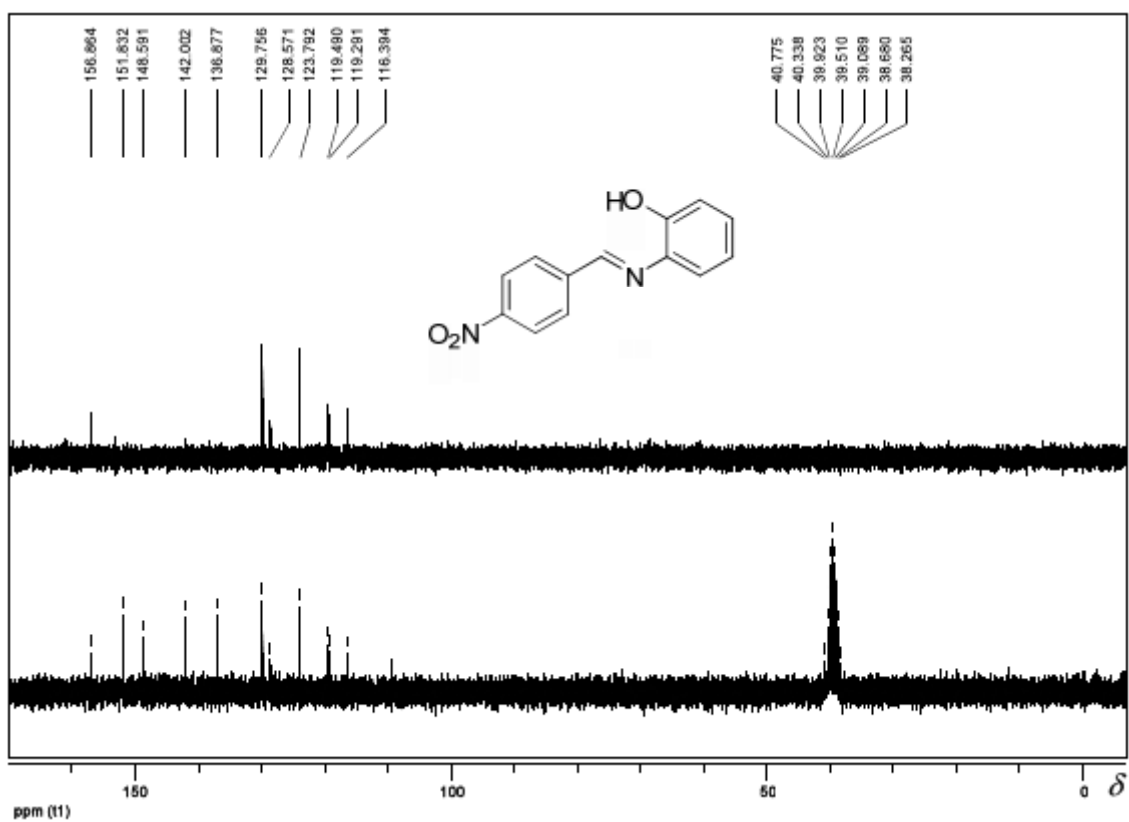
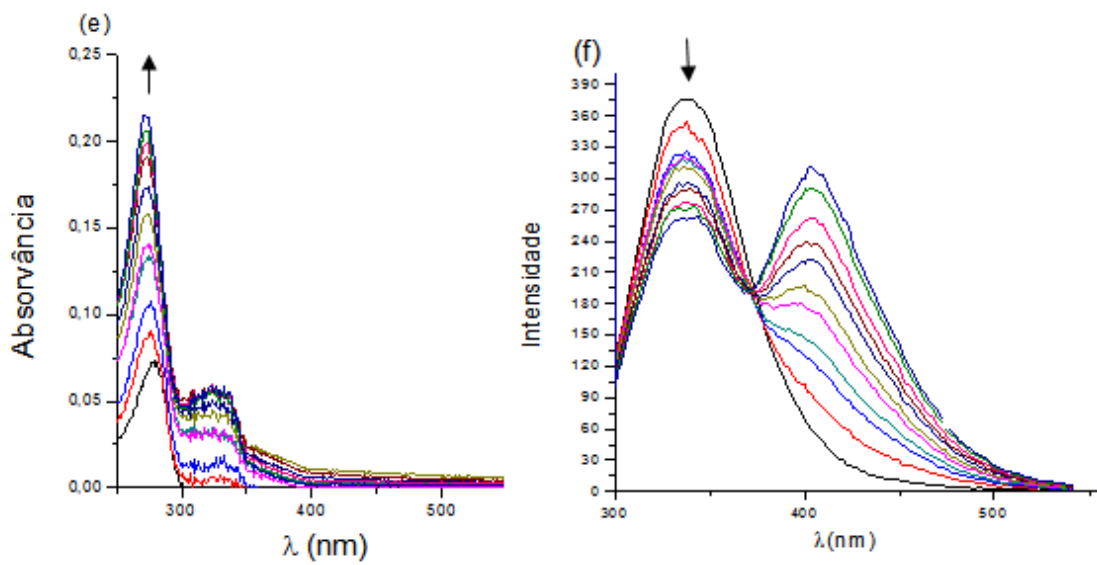
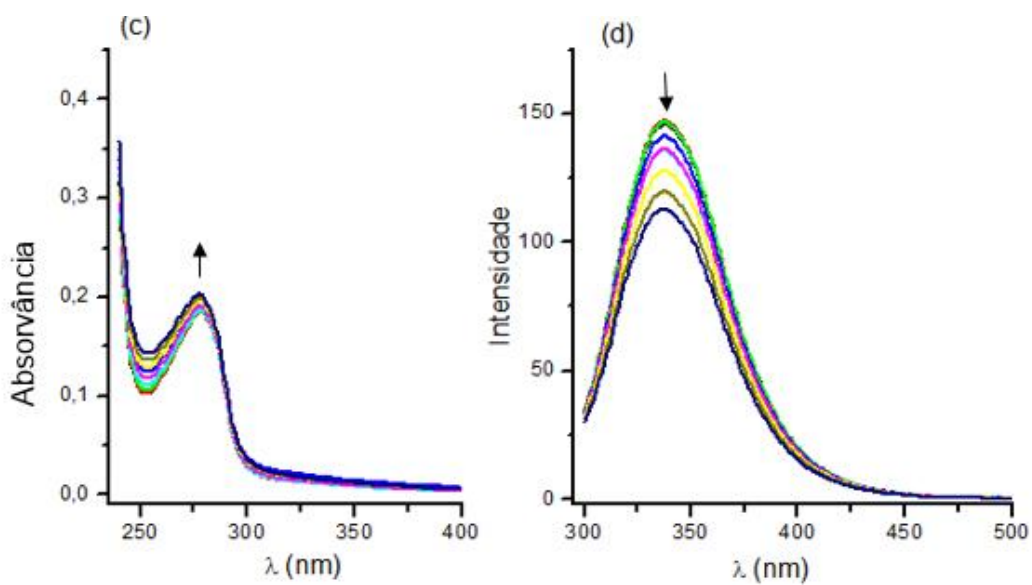
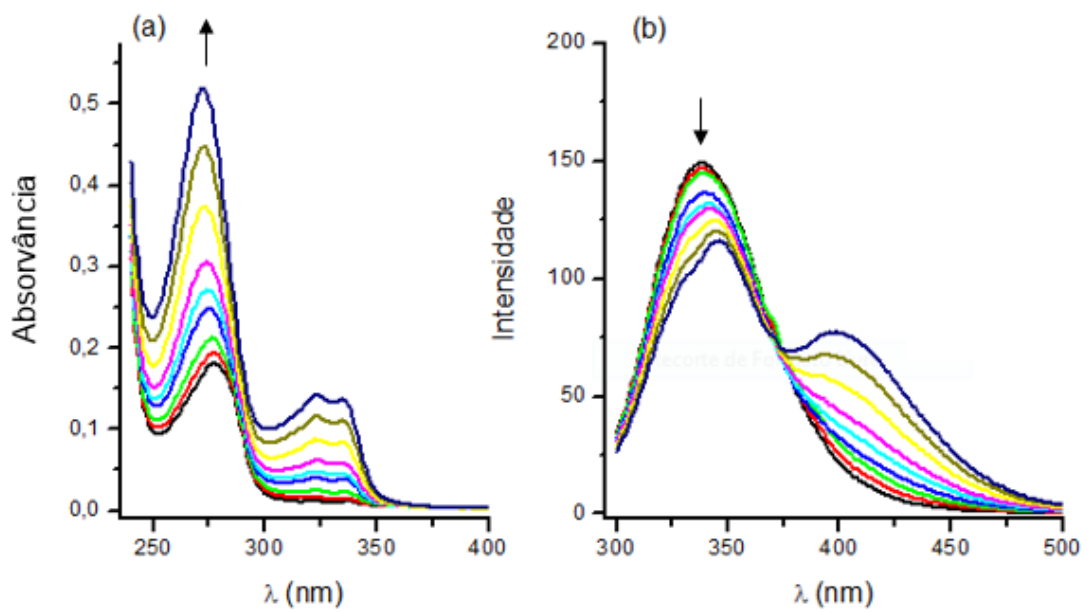
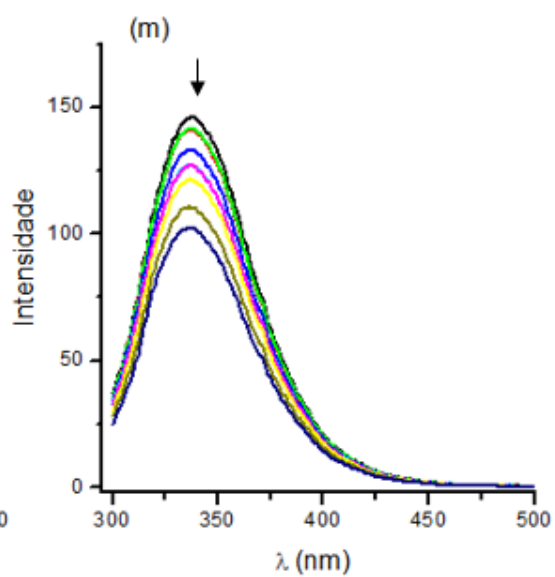
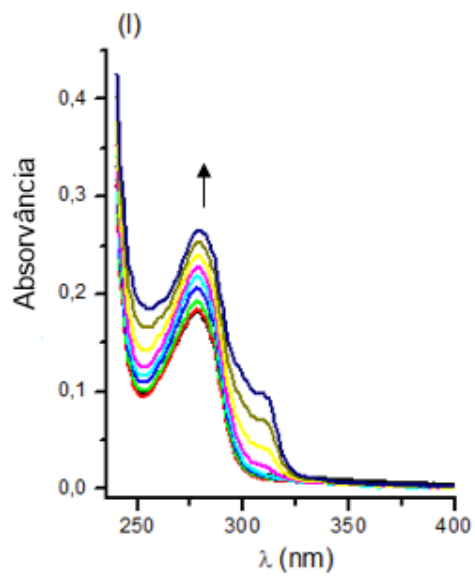
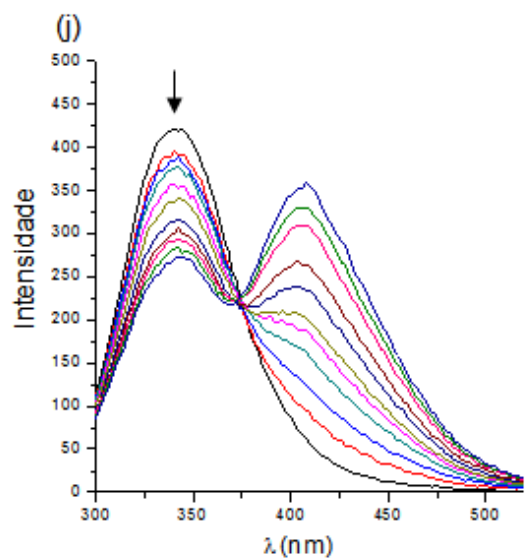
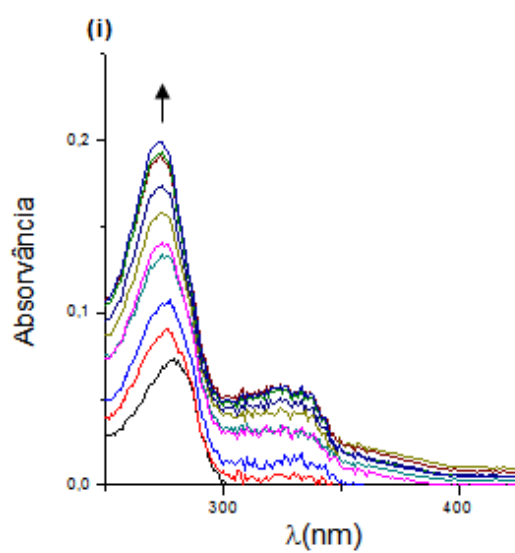
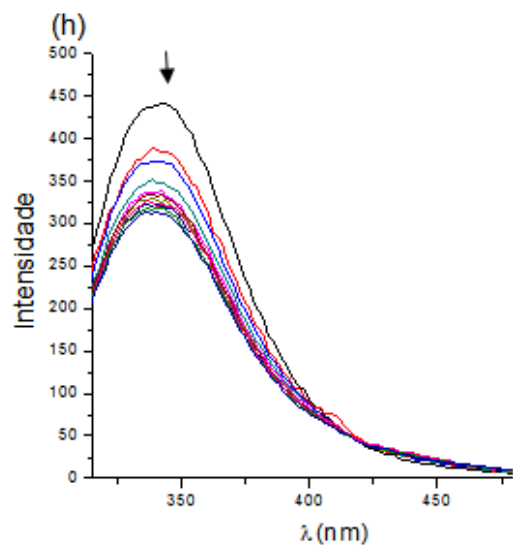
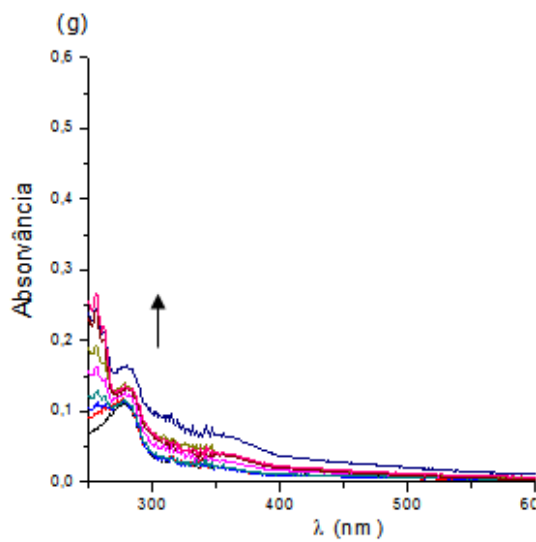


Figura A22 - Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **HL2** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 20°C).

Anexo 2





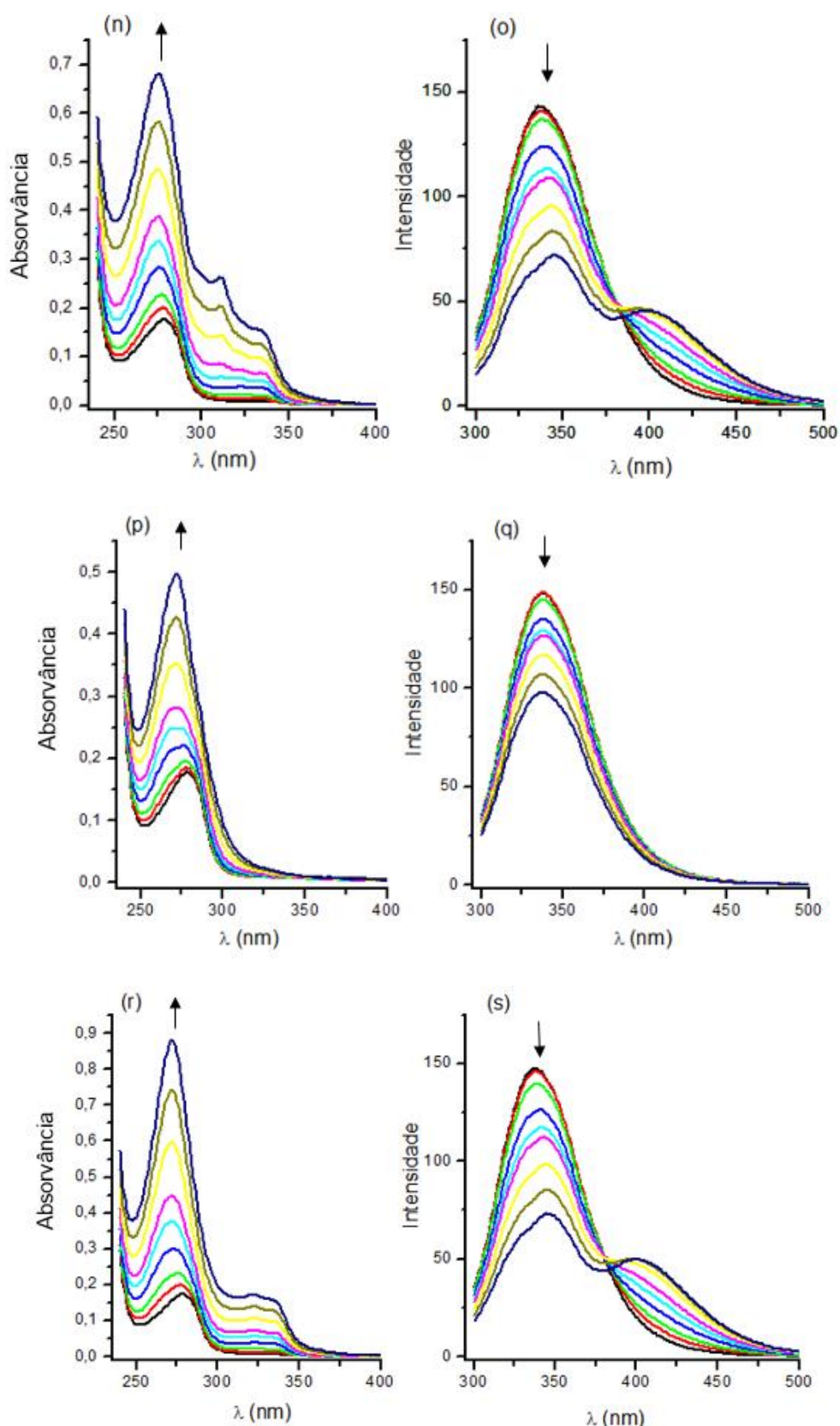
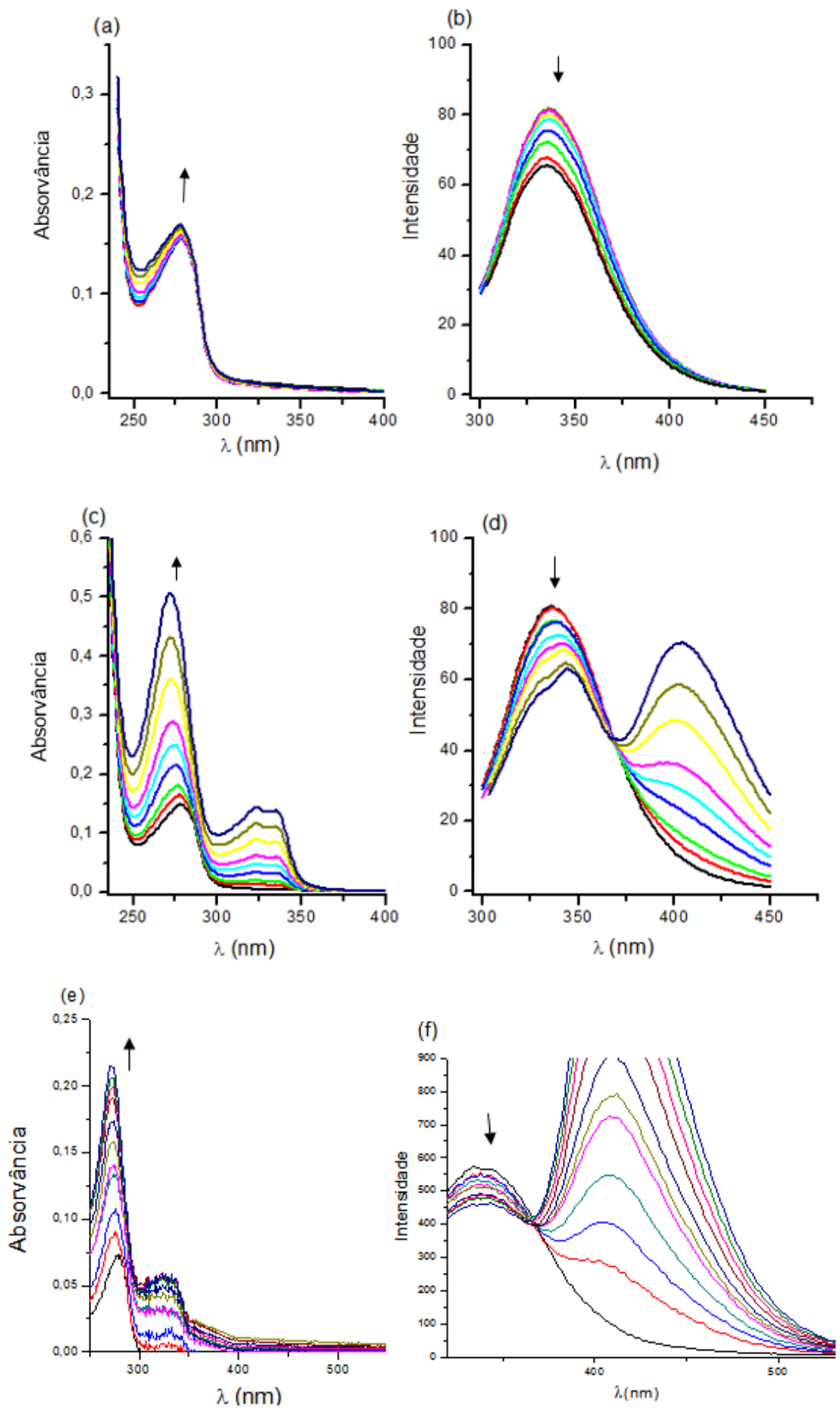
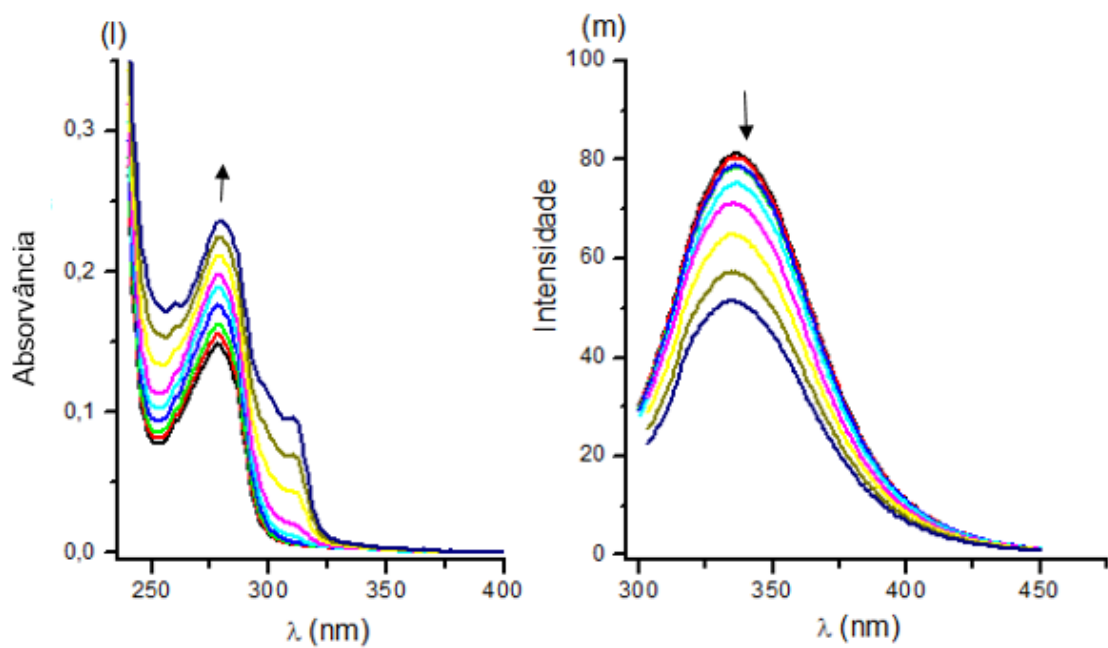
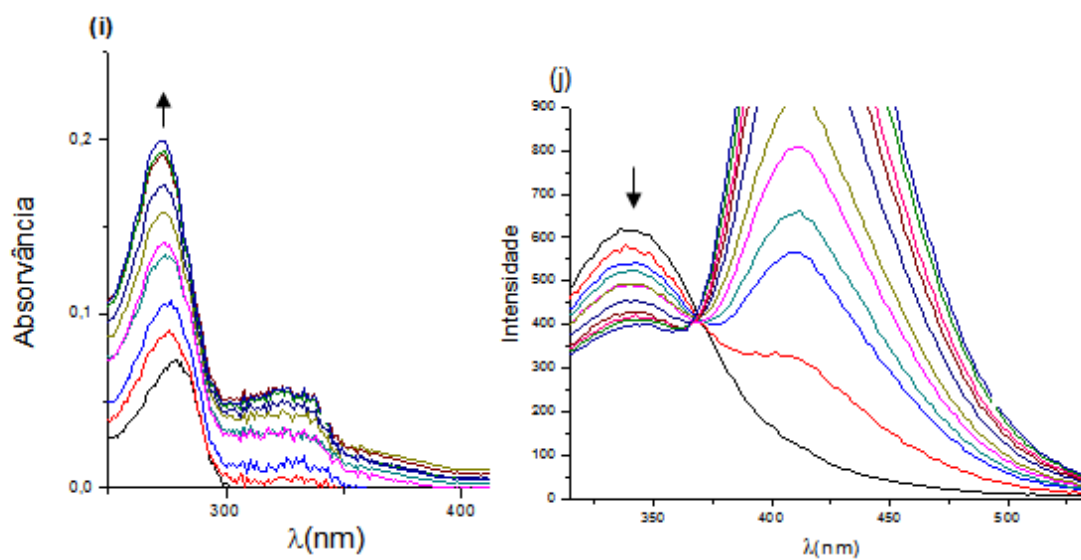
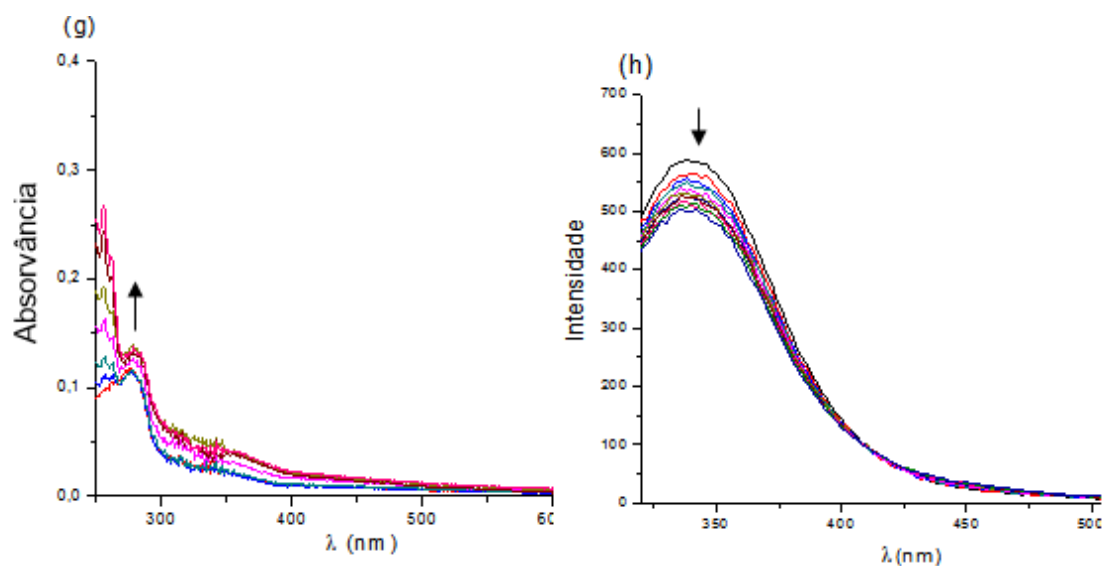


Figura A23 – Espectro de absorção UV-vís (a, c, e, g, i, l, n, p, r) e espectros de fluorescência de emissão (b, d, f, h, j, m, o, q, s). Espectros da BSA com adição de alíquotas do sal de Cu(II), da NOR e dos complexos de Cu(II). (a, b) norfloxacin; (c, d) Cu(II); (e, f) complexo (1); (g, h) Cu(py); (i, j) complexo (2); (l, m) Cu(bipy); (n, o) complexo (3); (p, q) Cu(phen); (r, s) complexo (4).





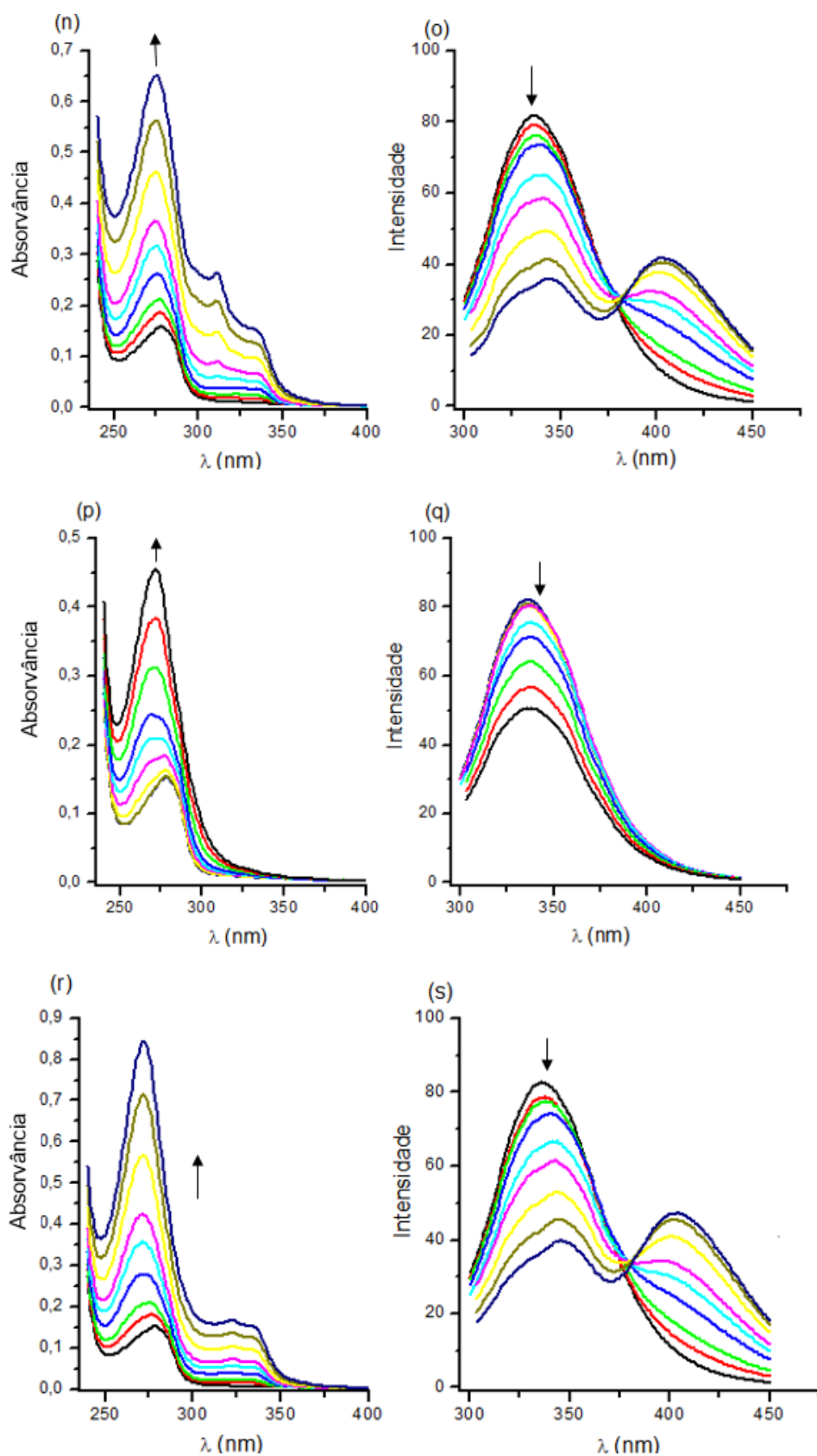


Figura A24– Espectro de absorção UV-vís (a, c, e, g, i, l, n, p, r) e espectros de fluorescência de emissão (b, d, f, h, j, m, o, q, s). Espectros da BSA com adição de alíquotas do sal de Cu(II), da NOR e dos complexos de Cu(II). (a, b) norfloxacina; (c, d) Cu(II); (e, f) complexo (1); (g, h) Cu(py); (i, j) complexo (2); (l, m) Cu(bipy); (n, o) complexo (3); (p, q) Cu(phen); (r, s) complexo (4).