

## 2. Parte experimental

### 2.1. Materiais e Métodos

#### Reagentes

Os sais utilizados são de procedência Aldrich.

Os solventes utilizados nas sínteses são de procedência Merk, Vetec e Synth. O  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  utilizado nas medidas de eletroquímica foi submetido à purificação prévia, segundo métodos usuais.

Perclorato de tetrabutilamônio (PTBA), de procedência Fluka, foi utilizado como eletrólito, nas medidas de eletroquímica em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

A solução de hidróxido de potássio (KOH)  $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$  utilizada nas titulações potenciométricas é de procedência Merck.

2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e seus derivados N(4)-metil (H2Am4Me), N(4)-etil (H2Am4Et) e N(4)-fenil (H2Am4Ph) foram cedidos pela professora Heloisa Beraldo do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### Obtenção de atmosfera inerte

As medidas de eletroquímica foram feitas sob atmosfera de Argônio, de procedência AGA ou White Martins, para evitar a presença de oxigênio e umidade. O gás é conduzido por uma coluna com sílica gel e em seguida por uma coluna com catalisador BTS – R – 3 – 11 (Fluka Chemika), aquecida a  $60^\circ\text{C}$  para eliminação de oxigênio.

#### Equipamentos

**Espectroscopia na Região do UV-vis** - Os espectros na região do ultravioleta-visível (na faixa de 200 a 1000 nm) foram obtidos, em temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ), utilizando o espectrofotômetro Lambda 35 UV/Vis Spectrometer da Perkin Elmer. Utilizou-se cubetas de quartzo (capacidade de 4 mL e caminho ótico de 1 cm) em todos os experimentos.

**Análise elementar** - Utilizou-se um Analisador Elementar (CHNS-O), modelo EA 1110, da CE Instruments. As amostras foram pesadas (2 – 2,5 mg) em balança analítica com precisão de  $1,0 \times 10^{-4}$  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 realizadas em duplicata. Em cada análise obtiveram-se os valores percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio presente em cada composto.

**Potenciometria** - As titulações potenciométricas foram efetuadas com uma bureta automática modelo 809 Titrando da METRON à temperatura ambiente. O eletrodo utilizado foi um eletrodo combinado de vidro B375 com solução interna de KCl  $1,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>.

**Espectroscopia na região do Infravermelho** - Utilizou-se um espectrômetro de absorção na região do infravermelho, modelo 2000 Ft-IR da Perkin Elmer, coletando os dados em intervalos de  $0,5$  cm<sup>-1</sup>. Os espectros foram registrados em duas regiões. Na região de frequência entre 4000 e 370 cm<sup>-1</sup>, foram preparadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) com amostra a ser analisada. Na região entre 710 e 30 cm<sup>-1</sup>, foram preparadas pastilhas de polietileno com a amostra a ser analisada.

**Medidas de Condutividade** - As medidas de condutimetria foram efetuadas utilizando-se um aparelho da Tecnopon modelo *mCA-150* à temperatura ambiente. As soluções foram preparadas, nos respectivos solventes, na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>.

**Eletroquímica** - As medidas de eletroquímica, voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, foram realizadas utilizando-se um analisador eletroquímico da Bioanalytical Systems Inc. (BAS), modelo 100BW. Utilizou-se como eletrodos de trabalho e auxiliar o eletrodo de platina (Pt), e como eletrodo de referência Ag/AgCl. Para as medidas dos complexos foi utilizada água deionizada como solvente e cloreto de potássio (KCl) na concentração de  $1,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte. Para as medidas dos ligantes foi utilizado dicloro metano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) como solvente e perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) na concentração de  $1,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte.

**Medidas de Susceptibilidade Magnética** - As medidas de susceptibilidade magnética foram realizadas em uma balança Johnson Matthey MSB/AUT à temperatura ambiente.

**Ressonância Paramagnética Eletrônica** - Os espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) das amostras no estado sólido e em solução congelada de metanol foram realizadas em tubos de quartzo de diâmetro interno de 3 mm, em temperatura de N<sub>2</sub> líquido em um espectrômetro da Bruker ESP300E, com frequência de modulação de 100 KHz operando em 1,1 mT.

**Espectroscopia Mossbauer** - Os espectros foram obtidos em um espectrômetro com fonte de <sup>57</sup>Co disperso em matriz de Rh.

**Ponto de Fusão** - As faixas de fusão de ligantes e complexos foram determinadas utilizando-se o aparelho digital modelo MQAPF- 302.

**Balança** - As pesagens foram feitas em uma balança eletrônica modelo FA-2104N, Bioprecisa.

**Evaporador rotatório** - Para evaporação de solvente utilizou-se o evaporador rotatório Fisotom modelo 550.

## 2.2. Sínteses

### Síntese de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas

2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H<sub>2</sub>Am<sub>4</sub>DH) e seus derivados N(4)-metil (H<sub>2</sub>Am<sub>4</sub>Me), N(4)-etil (H<sub>2</sub>Am<sub>4</sub>Et) e N(4)-fenil (H<sub>2</sub>Am<sub>4</sub>Ph) foram obtidos pela redução da 2-cianopiridina com sódio metálico, em metanol, e posterior adição das tiossemicarbazidas (Figura 2.1). Os produtos formados foram caracterizados através de sua temperatura de fusão (Tabela 2.1), espectroscopia de absorção na região do IV, RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C e DEPT 135.

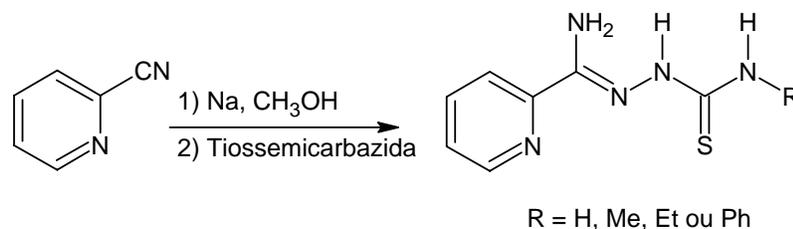


Figura 2.1 - Equação de obtenção de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas

Tabela 2.1 - Cor e temperaturas de fusão (°C) de H2Am4DH, H2Am4Me, H2Am4Et e H2Am4Ph

Composto	Cor	Ponto de fusão (°C)
H2Am4DH	Branco	191 - 192
H2Am4Me	Amarelo claro	174 - 175
H2Am4Et	Amarelo claro	164 - 165
H2Am4Ph	Amarelo claro	227 - 228

### Síntese dos complexos de Fe(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas

Os complexos de Fe(III) foram obtidos através da reação entre a tiossemicarbazona desejada e cloreto de ferro(III), em acetona, na proporção M:L 1:1 ou M:L 1:2 (Figura 2.2). A mistura permaneceu sob agitação contínua por aproximadamente 1 hora. Os sólidos resultantes foram filtrados, lavados com Et<sub>2</sub>O e secados sob vácuo. Quatro novos complexos de Fe(III) foram obtidos: [Fe(2Am4DH)<sub>2</sub>]Cl (1), [Fe(2Am4Me)<sub>2</sub>]Cl (2), [Fe(2Am4Et)<sub>2</sub>]Cl (3) e [Fe(H2Am4DH)Cl<sub>3</sub>] (4). Os complexos foram caracterizados através de seus pontos de fusão (Tabela 2.2), microanálises, medidas de condutividade e de susceptibilidade magnética, espectroscopia na região do infravermelho, ressonância paramagnética eletrônica e Mossbauer.

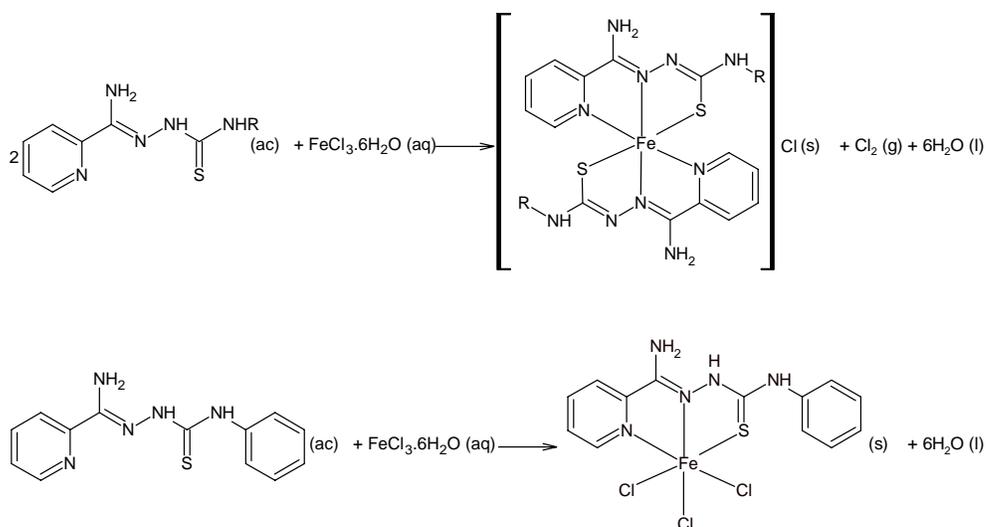


Figura 2.2 - Equação de obtenção de complexos de Fe(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas (R = H, Me ou Et)

Tabela 2.2 - Cor e temperaturas de fusão (°C) para os complexos de Fe(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas

Composto	Cor	Ponto de fusão (°C)
[Fe(2Am4DH) <sub>2</sub> ]Cl	marrom	220 - 221
[Fe(2Am4Me) <sub>2</sub> ]Cl	verde	217 - 218
[Fe(2Am4Et) <sub>2</sub> ]Cl	verde	205 - 206
[Fe(H2Am4Ph)Cl <sub>3</sub> ]	vermelho	262,5 - 263,5

### 2.3. Estudos Potenciométricos

#### Titulação das 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas

100 mL de uma solução de concentração  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de cada tiossemicarbazona (H2Am4DH, H2Am4Me, H2Am4Et ou H2Am4Ph), contendo 1% de DMSO, foi titulada, a temperatura ambiente (~25 °C), com uma solução de KOH  $1,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>, após adição de 1,0 mL de HCl  $1,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup> e de 10,0 mL de KNO<sub>3</sub>  $1,2$  mol L<sup>-1</sup>. HCl foi adicionado para protonar as tiossemicarbazonas no nitrogênio da piridina (ver Figura 2.2) e KNO<sub>3</sub> foi adicionado para manter a força iônica do meio em  $0,1$  mol L<sup>-1</sup>.

#### Titulação das 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e Cu(II)

A 100 mL de solução de H2Am4DH, H2Am4Me, H2Am4Et ou H2Am4Ph, de concentração  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, contendo 1% de DMSO, foi adicionado 10,0 mL de solução de nitrato cúprico, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O,  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>. Desse modo a proporção Cu:L na solução é de 1:1. A mistura foi titulada, a temperatura ambiente (~25 °C), com uma solução de KOH  $1,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>, após adição de 10,0 mL de KNO<sub>3</sub>  $1,2$  mol L<sup>-1</sup>.

#### Titulação das 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e Fe(III)

A 100 mL de solução de H2Am4DH, H2Am4Me, H2Am4Et ou H2Am4Ph, de concentração  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, contendo 1% de DMSO, foi adicionado 5,0 mL de solução de cloreto férrico, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, de concentração  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>. Desse modo a proporção Fe:L na solução é de 1:2. A mistura foi titulada, a temperatura ambiente (~25 °C), com uma solução de KOH,  $1,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>, após adição de 10,0 mL de KNO<sub>3</sub>  $1,2$  mol L<sup>-1</sup>.

### **Programas utilizados para os cálculos das constantes**

Os dados obtidos a partir das curvas de titulação potenciométrica foram tratados utilizando o programa HYPERQUAD [24]. O HYPERQUAD-2000 se baseia no balanço carga e de massa para efetuar o refinamento estatístico das constantes e pode ser usado para todos os sistemas de titulações potenciométricas conhecidas, incluindo titulações de retorno e titulações coulométricas [25]. Quando o modelo proposto estiver satisfatório é feita a validação das curvas experimental e teórica. Essas curvas devem estar praticamente sobrepostas.

Para obter os gráficos de distribuição de espécies (%) em função do pH utiliza-se o programa HYSS [24].

## **2.4.**

### **Testes de toxicidade frente à *Artemia salina***

Os ensaios de toxicidade utilizando *Artemia salina* foram feitos em colaboração com a Profa. Roberta Ziolli do Departamento de Química da PUC-Rio. A metodologia utilizada para os ensaios foi baseada em Meyer e colaboradores [26], em Nascimento e colaboradores [27] e nas normas da CETESB-SP [28].

Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração de cada composto. Além disso, cada droga foi testada, no mínimo, três vezes, totalizando um mínimo de 9 ensaios por concentração de composto.

#### **Incubação**

Em um recipiente retangular de 13,0 x 8,0 x 7,0 cm, com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura, espaçados por 0,5 cm e distribuídos uniformemente, foram adicionados 350 mL de solução de sal marinho sintético (Tropic Marin). O recipiente foi colocado dentro de uma incubadora iluminada por uma lâmpada fluorescente. Em um dos lados desse recipiente, adicionou-se cerca de 46 mg de cistos de *Artemia salina*, tomando-se o cuidado para que os mesmos não ultrapasassem a divisória. A parte do sistema contendo os cistos de *Artemia salina* foi coberta com papel alumínio, para que os organismos, ao nascerem, fossem atraídos pela luz do outro lado do sistema, forçando-os a atravessar a divisória. A incubação foi feita por um período de 48 horas. Durante todo o ensaio a temperatura foi monitorada.

### **Exposição**

Após o período de incubação, os organismos-testes (náuplios de *Artemia*) foram expostos às drogas de interesse por 48 horas, utilizando-se tubos de ensaio graduados, cada um contendo 10 náuplios de *Artemia salina*, previamente selecionados.

Determinou-se a faixa de concentração a ser testada, buscando sempre a maior concentração em que se observasse 0% de mortalidade e a menor concentração em que se deflagra-se 100% de mortalidade. As demais concentrações foram distribuídas dentro desse limite [4], de modo a obter a DL<sub>50</sub> (dose letal para 50% da população) do composto testado.

As soluções dos compostos a serem testadas foram preparadas em 1% de DMSO (dimetilsulfóxido) e avolumadas com solução salina. Os testes para o controle também foram realizados em triplicata, utilizando-se uma solução de DMSO 1% diluído em solução salina. Os controles foram utilizados também para se ter certeza de que a mortalidade observada nos náuplios de *Artemia salina* foi resultante da toxicidade dos compostos.

### **Contagem**

Após 48 horas de exposição, foi feita a contagem de náuplios vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa. Só foram considerados válidos os testes nos quais o controle apresentou uma mortalidade igual ou inferior a 10 % da população.

Os resultados dos testes foram submetidos a tratamento estatístico utilizando PROBIT, que forneceu os valores de DL<sub>50</sub> (dose letal para 50% da população) e os desvios padrão.