

2 Parte experimental

2.1. Materiais e Métodos

Reagentes

A N(4)-metil tiossemicarbazida é de procedência Merck. 4-nitrobenzaldeído, 4-nitroacetofenona e 4-nitrobenzofenona são de procedência Aldrich. As fluorquinolonas, norfloxacin e esparfloxacin, são de procedência Sigma. Os sais dos metais utilizados são de procedência Aldrich.

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

Perclorato de tetrabutilamônio (PTBA), de procedência Fluka, foi utilizado como eletrólito suporte, nas medidas de eletroquímica em solventes orgânicos.

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°C para eliminação de oxigênio.

Equipamentos

Balança - As pesagens foram realizadas em uma balança eletrônica modelo FA-2104N da Bioprecisa.

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

Ponto de Fusão - Para a determinação das faixas de fusão de ligantes e complexos foi utilizado um aparelho digital de ponto de fusão modelo MQAPF-302.

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 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 presentes em cada composto.

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 $0,5\text{ cm}^{-1}$. Os espectros foram registrados em duas regiões. Na região de frequência entre 4000 e 370 cm^{-1} , foram preparadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) com amostra a ser analisada. Na região entre 710 e 30 cm^{-1} , foram preparadas pastilhas de polietileno e a amostra a ser analisada.

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°C), utilizando-se 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.

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 $1,0 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$.

Medidas de 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 das N(4)-metil tiossemicarbazonas derivadas de 4-nitrobenzaldeído (H4NO₂Fo4M), 4-nitroacetofenona (H4NO₂Ac4M) e 4-nitrobenzofenona (H4NO₂Bz4M) e de seus complexos de Mn(II) e Co(II) foi utilizado diclorometano (CH₂Cl₂) como solvente e perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) na concentração de $1,0 \times 10^{-1}\text{ mol L}^{-1}$

como eletrólito suporte. Para as medidas dos complexos de Mn(II) e Co(II) das fluorquinolonas foi utilizada água deionizada como solvente e cloreto de potássio (KCl) na concentração de $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte.

Medidas de Susceptibilidade magnética - As medidas de susceptibilidade magnética foram realizadas no Departamento de Química da UFMG, utilizando-se uma balança Johnson Matthey MSB/AUT à temperatura ambiente.

Ressonância Paramagnética Eletrônica - Os espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foram obtidos no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) em colaboração com a **Profa. Sônia R. Louro** do Departamento de Física da PUC-Rio. Utilizou-se um espectrômetro da Bruker ESP300E, com frequência de modulação de 100 KHz operando em 1,1 mT. As amostras, no estado sólido e em solução congelada de metanol, foram medidas utilizando-se tubos de quartzo de diâmetro interno de 3 mm, em temperatura de N₂ líquido(77K).

Ressonância Magnética Nuclear - Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C foram obtidos no Departamento de Química da UFMG, utilizando-se um espectrômetro Bruker DPX-200 (200 MHz) e Bruker DRX-400 Avance (400 MHz) e trimetilsilano (TMS $\delta = 0$) como referência interna.

Análise Termogravimétrica – As curvas TG foram obtidas utilizando-se uma termobalança Mettler TA-4000, com um analisador TG50. As análises foram feitas em atmosfera de ar, com uma razão de aquecimento de 10 °C/min, numa faixa de 25-750 °C.

Luminescência – Os estudos de luminescência foram realizados no Laboratório de Espectrometria e Eletroquímica Aplicada (LEEA) do Departamento de Química da PUC-Rio, em colaboração com o **Prof. Ricardo Q. Aucelio**.

As medidas foram feitas em um espectrômetro de luminescência comercial da Perkin Elmer modelo LS 55 (Perkin Elmer, EUA). O equipamento tem como fonte de excitação uma lâmpada pulsátil do tipo descarga de xenônio de 20 kW com 8 μ s de duração de pulso. O detector é um tubo fotomultiplicador R928 com resposta modificada S5 sensível para detectar radiação até em torno de 900 nm.

Monocromadores do tipo Monk-Gillieson cobrem as faixas espectrais de 200-800 nm para excitação e 200-900 nm para emissão.

Os espectros de fluorescência no estado sólido foram obtidos por leitura direta do composto sólido utilizando o aparato de medição em superfície sólida que é acoplado no compartimento de amostra do espectrômetro de luminescência. Em solução, os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm.

Para as medidas de fosforescência foi utilizado o mesmo aparato de medição descrito acima. Os sinais foram obtidos diretamente do substrato de celulose. As medidas foram feitas em atmosfera inerte, obtida através da passagem de gás nitrogênio seco. As soluções dos ligantes e dos complexos metálicos foram depositadas no centro do substrato de celulose. Esses substratos foram previamente tratados com metais pesados para induzir a fosforescência. Os metais usados foram Tl(I), Hg(II), Pb(II), Cd(II), Ag(I). As medidas foram feitas após a secagem dos substratos, sob vácuo, por 2 horas.

Para reduzir o sinal de fundo dos substratos de celulose foi necessário submetê-los a um procedimento de redução de sinal de fundo que consiste primeiramente em uma etapa de lavagem com água em extrator Soxhlet (duração de duas horas). Após secagem sob lâmpada infravermelha (30 min), os papéis foram cortados em círculos de 18 mm de diâmetro, os quais foram expostos à radiação ultravioleta em um reator fotoquímico por duas horas. Esse procedimento foi adaptado da referência⁶³.

Para a medição da fosforescência, volumes de 5 μ L de solução foram depositados na superfície do substrato sólido, com o auxílio de micropipeta, necessariamente nesta ordem: solução de surfactante (quando necessário), solução de sal de metal pesado e solução de amostra ou branco. Uma planilha demarcada para indicação de posição de amostra foi usada para auxiliar esse procedimento (Figura 16).

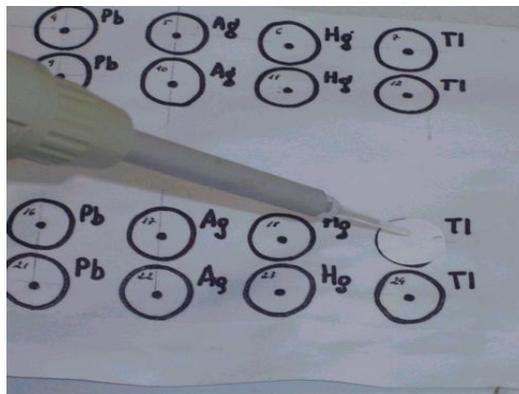


Figura 16. Aplicação das soluções no substrato sólido com auxílio de planilha demarcada para indicação de posição de amostra.

Os substratos sólidos onde foram depositadas as soluções foram então deixados para secar sob vácuo em dessecador (coberto com papel alumínio para evitar possíveis efeitos de degradação do analito pela luz ambiente) por um período de duas horas. No momento da medição de sinal, cada substrato foi colocado em um suporte, o qual foi acoplado ao aparato de medição em superfície sólida que fica no compartimento de amostra do espectrômetro de luminescência. O substrato foi purgado, por um período de três minutos, com um fluxo de nitrogênio seco direcionado na posição onde as soluções foram depositadas. Após este intervalo de tempo, e ainda sob o fluxo de nitrogênio, foram feitas as varreduras de espectro e medições das intensidades dos sinais fosforescentes.

Difração de Raios-X – A estrutura cristalina e molecular de N(4)-metil 4-nitrobenzaldeído tiossemicarbazona (H₄NO₂Fo₄M) foi determinada em colaboração com o **Dr. Lorenzo de Canto Vicentin**, do Instituto de Química da UFRJ. Os cristais selecionados foram montados em fibra de vidro e os dados foram coletados em um difratômetro *Enraf-Nonius Kappa-CCD*, a 273 K, no modo ω -2 θ , usando monocromador de grafito com radiação Mo K α (λ (Å)= 0,71073). Maiores detalhes estão descritos no **Capítulo 3**.

2.2. Sínteses

2.2.1. Síntese das N(4)-metil tiossemicarbazonas derivadas de 4-nitrobenzaldeído (H4NO₂Fo4M), 4-nitroacetofenona (H4NO₂Ac4M) e 4-nitrobenzofenona (H4NO₂Bz4M)

As N(4)-metil tiossemicarbazonas foram obtidas por método já descrito na literatura^{64, 65}. Dissolveu-se 0,0033 mol do correspondente composto nitro e 0,0033 mol da N(4)-metil tiossemicarbazida, em aproximadamente 40,0 mL de etanol absoluto. Adicionou-se 2 a 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado para catalisar a reação. A mistura permaneceu sob refluxo e agitação por aproximadamente 24 horas com temperatura em torno de 70 °C. Os sólidos obtidos foram filtrados, lavados com etanol e éter e caracterizados através de seus pontos de fusão, espectros de absorção na região de infravermelho, análise elementar e RMN de ¹H e ¹³C. A Tabela 1 apresenta cor, fórmula molecular, massa molar, ponto de fusão e o rendimento obtido para as N(4)-metil tiossemicarbazonas derivadas de 4 - nitrobenzaldeído (H4NO₂Fo4M), 4-nitroacetofenona (H4NO₂Ac4M) e 4 - nitrobenzofenona (H4NO₂Bz4M) e a Figura 17 mostra a equação de obtenção desses compostos.

Tabela 1. Cor, fórmula molecular mínima, massa molar, faixa de fusão e rendimento para as N(4)-metil tiossemicarbazonas derivadas de 4-nitrobenzaldeído (H4NO₂Fo4M), 4-nitroacetofenona (H4NO₂Ac4M) e 4-nitrobenzofenona (H4NO₂Bz4M)

Composto	Cor	Fórmula mínima	Massa molar (g mol ⁻¹)	Faixa de fusão (°C)	Rendimento (%)
H4NO ₂ Fo4M	Amarelo	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	238,4	224 - 226	76,4
H4NO ₂ Ac4M	Amarelo	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	252,3	216 - 218	84,2
H4NO ₂ Bz4M	Amarelo claro	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	314,4	210 - 211	77,8

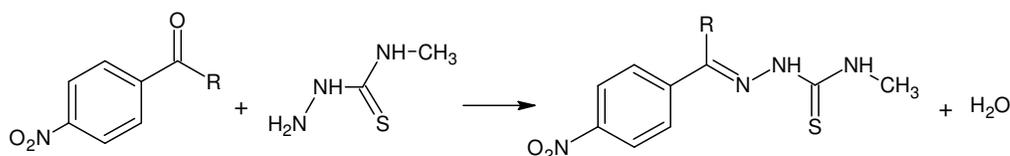


Figura 17. Equação de obtenção das N(4)-metil tiossemicarbazonas derivadas de 4-nitrobenzaldeído (R = H, H4NO₂Fo4M), 4-nitroacetofenona (R = CH₃, H4NO₂Ac4M) e 4-nitrobenzofenona (R = C₆H₅, H4NO₂Bz4M).

2.2.2. Síntese dos complexos de Mn(II) e Co(II) de N(4)-metil tiossemicarbazonas derivadas de 4-nitrobenzaldeído (H4NO₂Fo4M), 4-nitroacetofenona (H4NO₂Ac4M) e 4-nitrobenzofenona (H4NO₂Bz4M)

Os complexos de Mn(II) e Co(II) foram obtidos dissolvendo-se 0,40 mmol dos ligantes H4NO₂Fo4M, H4NO₂Ac4M e H4NO₂Bz4M H2Am4DH, em aproximadamente 20 mL de etanol, a quente, sob agitação e posterior adição de 0,20 mmol de MnCl₂.4H₂O ou CoCl₂.4H₂O. Os precipitados formados foram filtrados a vácuo, lavados com éter etílico e secos. Seis novos complexos foram obtidos, três de Mn(II) e três de Co(II): [Mn(H4NO₂Fo4M)₂Cl₂] (1), [Mn(H4NO₂Ac4M)₂Cl₂] (2), [Mn(H4NO₂Bz4M)₂Cl₂] (3), [Co(H4NO₂Fo4M)₂Cl₂] (4), [Co(H4NO₂Ac4M)₂Cl₂] (5), [Co(H4NO₂Bz4M)₂Cl₂] (6). Os complexos foram caracterizados por seus pontos de fusão (Tabela 2), medidas de condutividade, análise elementar, espectros na região do infravermelho, ressonância paramagnética eletrônica (RPE), no caso dos complexos de Mn(II). A Figura 18 mostra a equação de obtenção dos complexos.

Tabela 2. Cor e faixa de fusão (°C) ou decomposição (*) para os complexos de Mn(II) e Co(II) de H4NO₂Fo4M, H4NO₂Ac4M e H4NO₂Bz4M

Composto	Cor	Faixa de fusão (°C)
[Mn(H4NO ₂ Fo4M) ₂ Cl ₂] (1)	Laranja claro	> 350*
[Mn(H4NO ₂ Ac4M) ₂ Cl ₂] (2)	Amarelo	> 350*
[Mn(H4NO ₂ Bz4M) ₂ Cl ₂] (3)	Laranja escuro	182-184
[Co(H4NO ₂ Fo4M) ₂ Cl ₂] (4)	Verde	217*
[Co(H4NO ₂ Ac4M) ₂ Cl ₂] (5)	Azul	> 350*
[Co(H4NO ₂ Bz4M) ₂ Cl ₂] (6)	Marrom	> 350*

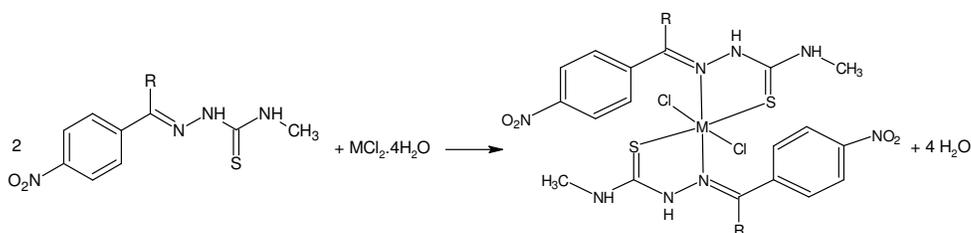


Figura 18. Equação de obtenção dos complexos de Mn(II) e Co(II) de N(4)-metil tiossemicarbazonas derivadas de 4-nitrobenzaldeído (R = H, H4NO₂Fo4M),

4-nitroacetofenona (R = CH₃, H₄NO₂Ac₄M) e 4-nitrobenzofenona (R = C₆H₅, H₄NO₂Bz₄M).

2.2.3. Síntese dos complexos de Mn(II) e Co(II) de Norfloxacin e Esparfloxacin

Os complexos de Mn(II) e Co(II) foram obtidos dissolvendo-se 0,25 mmol dos ligantes norfloxacin (NOR) e esparfloxacin (ESPAR), em aproximadamente 40 mL de acetona e diclorometano, respectivamente. Após a dissolução dos ligantes 0,25 mmol de MnCl₂.4H₂O ou CoCl₂.4H₂O foram adicionados. A mistura permaneceu sob refluxo e agitação por aproximadamente 24 horas com temperatura em torno de 70 °C. Os precipitados formados foram filtrados a vácuo, lavados com éter etílico e secos. Quatro novos complexos foram obtidos, dois de Mn(II) e dois de Co(II): [Mn(NOR)Cl₂] (**1**), [Mn(ESPAR)Cl₂] (**2**), [Co(NOR)Cl₂] (**3**), [Co(ESPAR)Cl₂] (**4**). Os complexos foram caracterizados por seus pontos de fusão, medidas de condutividade, análise elementar, espectros na região do infravermelho, ressonância paramagnética eletrônica (RPE), no caso dos complexos de Mn(II). A Tabela 3 apresenta cor e faixa de fusão (°C) para os complexos de Mn(II) e Co(II) de Norfloxacin e Esparfloxacin. As Figura 19 e Figura 20 mostram as equações de obtenção dos complexos.

Tabela 3. Cor e faixa de decomposição (°C) para os complexos de Mn(II) e Co(II) de Norfloxacin e Esparfloxacin

Composto	Cor	Faixa de decomposição (°C)
[Mn(NOR)Cl ₂] (1)	Amarelo claro	293
[Mn(ESPAR)Cl ₂] (2)	Amarelo	278
[Co(NOR)Cl ₂] (3)	Azul	269
[Co(ESPAR)Cl ₂] (4)	Verde	295

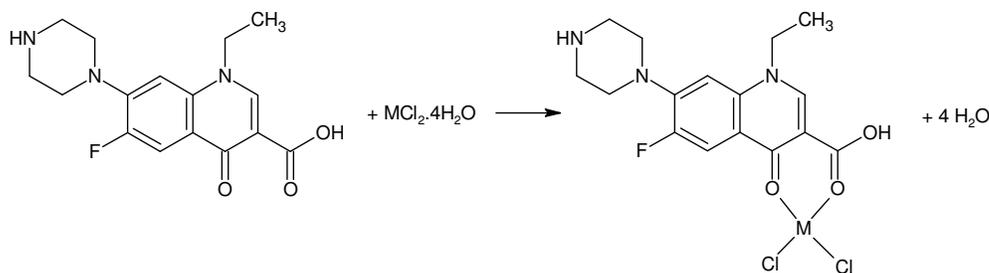


Figura 19. Equação de obtenção dos complexos de Mn(II) e Co(II) de norfloxacina (NOR).

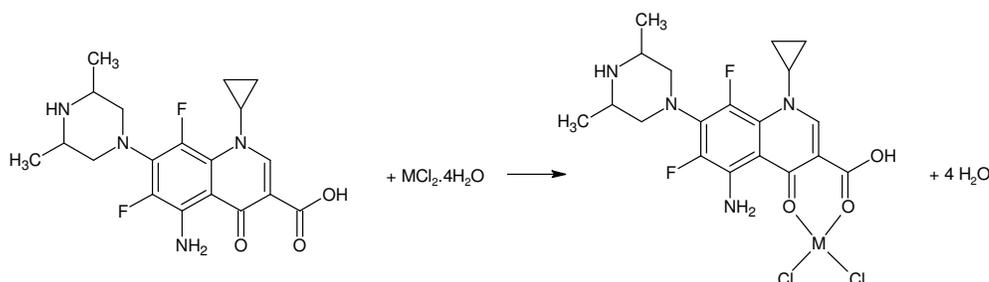


Figura 20. Equação de obtenção dos complexos de Mn(II) e Co(II) de esparfloxacina (ESPAR).

2.3. Toxicidade frente à *Artemia sp.*

Os testes de toxicidade frente à *Artemia sp.* foram realizados no Laboratório de Estudos Ambientais (LEA) do Departamento de Química da PUC-Rio, em colaboração com a **Profa. Roberta L. Zioli**. Foram testadas as N(4)-metil tiossemicarbazonas derivadas de 4-nitrobenzaldeído (H4NO₂Fo4M), 4-nitroacetofenona (H4NO₂Ac4M) e 4-nitrobenzofenona (H4NO₂Bz4M) e seus complexos de Mn(II) e Co(II). Esse teste apresenta uma boa correlação com a atividade citotóxica⁶⁶.

A metodologia utilizada para os ensaios de toxicidade utilizando *Artemia sp.* foi baseada em Meyer e colaboradores⁶⁷, Nascimento e colaboradores⁶⁸ e nas normas da CETESB-SP⁶⁹.

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 sp.*, tomando-se o cuidado para que os mesmos não ultrapassassem a divisória. A parte do sistema contendo os cistos de *Artemia sp.* 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 permanecendo em torno de 20 a 22 °C.

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 sp.*, previamente selecionados. 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 do composto.

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 deflagrasse 100% de mortalidade. As demais concentrações foram distribuídas dentro desse limite, de modo a obter a DL₅₀ (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 sp.* 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 o programa computacional PROBIT, que forneceu os valores de DL_{50} (dose letal para 50% da população) e os desvios padrão.

2.4. Atividade antibacteriana

Foram realizados testes de atividade de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à Norfloxacin, *in vitro*, para a norfloxacin, a esparfloxacin e seus complexos de Mn(II) e Co(II). Os testes foram realizados no Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia da UFRJ, em colaboração com a **Profa. Maria do Carmo de Freire Bastos**. Os testes foram feitos de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS⁷⁰.

Pesou-se a massa apropriada de cada composto, a qual foi dissolvida em 1,0 mL de água estéril. A partir desta solução foram obtidas soluções de concentração entre 100 mg L^{-1} a 10000 mg L^{-1} , mediante diluição com água estéril a um volume final de 1,0 mL de solução. As soluções dos compostos foram testadas, em duplicata.

Previamente, os microorganismos foram cultivados em tubos de ensaio contendo o meio apropriado para o seu crescimento (Caldo Tioglicolato), por um período de 24 horas, a uma temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, foram semeados $155 \text{ }\mu\text{L}$ da suspensão em cada placa de petri, contendo ágar apropriado (Ágar Infuso Cérebro Coração-BHI).

Seguidamente, discos de papel (Plank) foram embebidos nas diferentes soluções de cada composto e nos controles e colocados nas placas, que foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em ambiente de microaerofilia por um período de 24 horas. Verificou-se a inibição do crescimento das colônias dos microorganismos pelo aparecimento de halos ao redor dos discos de papel. A inibição foi então medida através do diâmetro do halo formado e comparada aos halos da norfloxacin e da esparfloxacin que foram usadas como controles.