



**Luciene Stivanin Garcia**

**Complexos de Au(III), Cu(II) e Bi(III) de fluorquinolonas:  
sínteses, caracterização físico-química e atividade  
biológica**

**Tese de Doutorado**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Química da PUC-Rio como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Nicolás Adrián Rey  
Co-orientadores: Judith Felcman  
Letícia R. S. Teixeira  
Sônia R. W. Louro

Rio de Janeiro  
Abril de 2012

**Luciene Stivanin Garcia**

**Complexos de Au(III), Cu(II) e Bi(III) de fluorquinolonas:  
sínteses, caracterização físico-química e atividade  
biológica**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-  
Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela  
Comissão Examinadora abaixo assinada.

**Prof. Nicolás Adrián Rey**

Orientador

Departamento de Química – PUC-Rio

**Profa. Sônia Renaux W. Louro**

Coorientadora

Departamento de Física – PUC-Rio

**Profa. Letícia Regina de Souza Teixeira**

Coorientadora

UFMG

**Profa. Jussara Lopes de Miranda**

UFRJ

**Profa. Annelise Casellato**

UFRJ

**Profa. Maria de Nazaré Correia Soeiro**

FIOcruz

**Profa. Roberta Lourenço Ziolli**

UNIRio

**Profa. Tatiana Dillenburg Saint’Pierre**

Departamento de Química – PUC-Rio

**Prof. José Eugenio Leal**

Coordenador Setorial de Pós-Graduação do

Centro Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 19 de abril de 2012

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

### **Luciene Stivanin Garcia**

Graduou-se em Química Industrial, em dezembro de 2005, na Universidade Severino Sombra, na cidade de Vassouras, RJ. Titulou-se Mestre em Química Inorgânica, em abril de 2008, na Pontifícia Universidade Católica, na cidade do Rio de Janeiro. Atualmente trabalha no Instituto Estadual do Ambiente – INEA.

#### Ficha Catalográfica

Garcia, Luciene Stivanin

Complexos de Au(III), Cu(II) e Bi(III) de fluorquinolonas: sínteses, caracterização físico-química e atividade biológica / Luciene Stivanin Garcia ; orientador: Nicolás Adrián Rey ; co-orientadores: Judith Felcman, Letícia R. S. Teira, Sônia R. W. Louro. – 2012.

122 f. : il. (color.) ; 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2012.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Fluorquinolonas. 3. Complexos metálicos. 4. Atividade biológica. 5. Estudos por fluorescência estacionária. 6. Estudos por fluorescência resolvida no tempo. I. Rey, Nicolás Adrián. II. Felcman, Judith. III Teixeira, Letícia R. S. IV. Louro, Sônia R. W. V. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. VI. Título.

CDD: 540

Para meus pais, Luci e Hugo (*in memoriam*), por todo apoio, confiança, carinho,  
dedicação, ensinamentos, amor, por sempre acreditarem em mim e nos meus  
sonhos, me ajudando a realizar cada um deles.

## Agradecimentos

Ao CNPq e à PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Aos meus orientadores Nicolas A. Rey, Judith Felcman (*in memoriam*), Sônia Louro e Letícia R. S. Teixeira, por todo apoio, orientação, confiança, conhecimento, carinho, amor e amizade compartilhados durante todo nosso trabalho. Foi um privilégio trabalhar com profissionais como vocês. Levarei isso por toda minha vida. Vocês são exemplos pra mim.

À Professora Rosane San Gil, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, pela importante contribuição nas interpretações de análises de Ressonância Magnética Nuclear nos complexos de ouro (III).

À Professora Eliane Wajnberg, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas - CBPF, pela importante contribuição na realização das análises de Ressonância Paramagnética Eletrônica nos complexos de cobre (II).

À Professora Roberta Ziolli, UNIRio, e as suas alunas de iniciação científica Josie e Mariana, PUC-Rio, pelos ensaios de toxicidade com *Artemias sp*, nos complexos de cobre (II).

À Professora Elisângela Silveira Lacerda e aos seus alunos, Universidade Federal de Goiás - UFG, pela importante colaboração com os ensaios antitumorais dos complexos de ouro (III).

À Professora Maria de Nazaré Soeiro e às suas alunas de pós-graduação, Fundação Osvaldo Cruz – FIOCRUZ, pela importante colaboração com os ensaios anti-*T.cruzi*.

Aos funcionários da PUC-Rio, pelos dias maravilhosos de convivência e por nossa amizade.

Aos meus queridos amigos, que são minha segunda família. Obrigada por todo carinho e momentos inesquecíveis.

Aos queridos mestres da Universidade Severino Sombra, Vassouras - RJ.

Aos amigos do Instituto Estadual do Ambiente – INEA. Em especial, Epifanio Ferreira, Jorge A. Caetano, Nadja Carvalho, Gisela T. H. Pinto Lopes e Sheila Simabuguro, por todo apoio e carinho durante a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, pela paciência, compreensão pelas horas de ausência, por todo amor e colo sempre. Espero um dia ser capaz de retribuir tanta dedicação, carinho e este lindo amor que vocês têm por mim. Tenho muito orgulho de tê-los como meus pais.

A todos que participaram e dividiram estes momentos comigo, meus sinceros agradecimentos!

A Deus, autor da minha fé e esperança em todos os momentos.

## Resumo

Garcia, Luciene Stivanin; Rey, Nicolás Adrián. **Complexos de Au(III), Cu(II) e Bi(III) de fluorquinolonas: sínteses, caracterização físico-química e atividade biológica.** Rio de Janeiro, 2012. 122 p. Tese de Doutorado - Departamento de Química - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

As fluorquinolonas constituem uma importante classe de agentes antimicrobianos sintéticos utilizados clinicamente por mais de 30 anos. Além da atividade antibacteriana, algumas fluorquinolonas, assim como seus complexos metálicos, mostraram ter atividade citotóxica, sendo, portanto, promissores como agentes antitumorais. Neste trabalho, obtivemos complexos de Au(III), Cu(II) e Bi(III) com as seguintes fluorquinolonas: norfloxacin, levofloxacin e esparfloxacin. Esses novos complexos foram caracterizados por diversas técnicas, tais como: análise elementar, condutimetria, espectroscopia na região do infravermelho, ressonância paramagnética eletrônica (RPE), ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , espectroscopia UV-Vis, fluorescência estacionária e resolvida no tempo. Atividades biológicas foram realizadas para todos os complexos. Usualmente, as fluorquinolonas coordenam-se aos íons metálicos de modo bidentado, através da carbonila do ácido carboxílico e da carbonila cetônica. Esta coordenação foi confirmada para os complexos de Cu(II), entretanto, para os complexos de Au(III) e Bi(III), os resultados de infravermelho e do RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  mostraram que a coordenação foi feita através dos nitrogênios do anel piperazina, uma coordenação não encontrada usualmente para as fluorquinolonas. Os complexos de Au(III) mostraram ser ativos frente às linhagens tumorais A20 (Linfoma murino), B16-F10 (Melanoma murino) e K562 (Leucemia mielóide humana). Os complexos de Cu(II) mostraram significativa atividade antiparasitária, enquanto os complexos de Bi(III), mostraram atividade antibacteriana.

## Palavras-chave

Fluorquinolonas; complexos metálicos; atividade biológica; estudos por fluorescência estacionária; estudos por fluorescência resolvida no tempo.

## Abstract

Garcia, Luciene Stivanin; Rey, Nicolás Adrian. **Au(III), Cu(II) and Bi(III) complexes of fluoroquinolones: syntheses, characterization and biological activity.** Rio de Janeiro, 2012. 122 p. DSc. Thesis - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The fluoroquinolones are an important class of synthetic antimicrobial agents clinically used for over 30 years. In addition to antibacterial activity, some fluoroquinolones, as well as their metal complexes, presented cytotoxic activity and are therefore promising as antitumor agents. In order to obtain new complexes of Au (III) and other metal ions that have biological activity, this work had the objective to synthesize new complexes using ligands of the group of fluoroquinolones. These new complexes were characterized by various techniques such as elemental analysis, conductometry, infrared spectroscopy, electron paramagnetic resonance (EPR), nuclear magnetic resonance (NMR) of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, UV-Vis, steady state and time-resolved fluorimetry studies. Biological activities were analyzed for all complexes. Usually, the fluoroquinolones coordinate to the metal ions as bidentate through the carbonyl and carboxylic acid ketonic carbonyl group. This was confirmed Cu(II) complex, however, for Au(III) and Bi (III) complexes, the results of IR and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR showed that the coordination was through the nitrogen using the piperazine ring, a coordination not usually found for fluoroquinolones. The complexes of Au(III) shown to be active against the A20 tumor cell lines (murine lymphoma), B16-F10 (murine melanoma) and K562 (human myeloid leukemia). Complexes of Cu(II) showed significant antiparasitic activity, whereas complexes of Bi(III) have shown antibacterial activity.

## Keywords

Fluoroquinolones; metallic complexes; biological activity; steady state and time-resolved fluorimetry studies.



## Sumário

1 Introdução	20
2 Fluorquinolonas	23
2.1. Histórico	23
2.2. Classificação das Fluorquinolonas	25
2.3. Mecanismo de Ação	26
2.4. Mecanismo de Resistência	28
3 Complexação de fluorquinolonas a metais	29
3.1. Ouro(III)	29
3.2. Cobre(II)	31
3.3. Bismuto(III)	31
4 Sínteses dos Complexos	33
4.1. Sínteses dos Complexos de Au(III) de Levofloxacin, Norfloxacin e Esparfloxacin	33
4.2. Síntese de complexos de Cu(II) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin contendo 1,10-fenantrolina	35
4.3. Síntese dos complexos de Bi(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin	37
5 Caracterizações físico-químicas dos complexos	40
5.1. Análise elementar	40
5.2. Espectroscopia na região do Infravermelho	40
5.3. Espectroscopia Raman	41
5.4. Medidas de Condutividade	41
5.5. Ressonância Paramagnética Eletrônica	41
5.6. Ressonância Magnética Nuclear	41
5.7. Espectroscopia de absorção UV-Vis, fluorescência estacionária e resolvida no tempo	42
6 Testes de Atividade dos Complexos	44
6.1. Toxicidade frente à <i>Artemia sp.</i>	44

6.2. Atividade antibacteriana	44
6.3. Testes de atividade anti- <i>T.cruzi</i>	45
6.4. Toxicidade frente a algumas linhagens tumorais	46
 7 Complexos de Au(III) de antibióticos da classe das fluorquinolonas: sínteses, estudos espectroscópicos e testes de atividade citotóxica	 47
7.1. Dados de microanálises e condutividade	47
7.2. Espectroscopia na região do infravermelho	48
7.3. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ )	52
7.4. Titulação da Norfloxacin com Au(III)	58
7.4.1. Absorção UV-vis da Titulação da Norfloxacin com Au(III)	59
7.4.2. Fluorescência Estacionária da Titulação da Norfloxacin com Au(III)	61
7.4.3. Fluorescência resolvida no tempo da titulação da norfloxacin com Au(III)	65
7.5. Toxicidade dos complexos de Au(III) frente a algumas linhagens antitumorais	68
 8 Complexos de Cu(II) contendo um antibiótico da classe das fluorquinolonas e fenantrolina como co-ligante: sínteses e ensaios de toxicidade frente a <i>Artemia sp</i> e o <i>Trypanossoma cruzi</i>	 73
8.1. Dados de microanálises e condutividade	73
8.2. Espectroscopia na região do infravermelho	74
8.3. Ressonância Paramagnética Eletrônica	76
8.3.1. Espectros de RPE de amostras sólidas dos complexos de Cu(II) a temperatura ambiente	76
8.3.2. Espectros de RPE dos complexos de Cu(II) em solução aquosa e DMSO	77
8.4. Associação de $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$ e norfloxacin determinada por supressão de fluorescência	82
8.5. Toxicidade das fluorquinolonas e de seus complexos de Cu(II) frente a <i>Artemia sp</i> .	84
8.6. Testes de atividade anti- <i>T.cruzi</i> para as fluorquinolonas e seus complexos de Cu(II)	85

9 Complexos de Bi(III) contendo fluorquinolonas: sínteses, estudos espectroscópicos e testes de atividade antibacteriana	92
9.1. Dados de microanálises e condutividade	92
9.2. Espectroscopia na região do infravermelho	93
9.3. Espectroscopia Raman	97
9.4. Testes de Atividade Antimicrobiana para as fluorquinolonas e seus complexos de Bi(III)	102
10 Conclusões	107
11 Produções Acadêmicas	110
12 Referências Bibliográficas	112

## Lista de figuras

Figura 1. Estrutura do ácido nalidíxico. ....	23
Figura 2. Estrutura da flumequina. ....	23
Figura 3. Estrutura da norfloxacin. ....	24
Figura 4. Relação estrutura-atividade para as quinolonas (extraído da referência 1).....	24
Figura 5. Fluorquinolonas com atividade antibacteriana (extraído da referência 1).....	25
Figura 6. Ilustração do modo de ligação da FQ à DNA-girase. (a) Representação de quatro moléculas de fluorquinolonas (retângulos) numa cavidade do DNA anexado à DNA-girase. (b) Representação da ligação de quatro moléculas de fluorquinolonas através de ligações de hidrogênio à parte interna do DNA.....	27
Figura 7. Estrutura do complexo $[Au(NOR)_2(H_2O)_2]Cl_3^{29}$ . ....	30
Figura 8. Equação de obtenção do complexo de Au(III) de levofloxacin (LEVO). ....	34
Figura 9. Equação de obtenção do complexo de Au(III) de norfloxacin (NOR). ....	34
Figura 10. Equação de obtenção do complexo de Au(III) de esparfloxacin (ESPAR). ....	34
Figura 11. Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de levofloxacin (LEVO) contendo 1,10-fenantrolina. ....	36
Figura 12. Equação de obtenção do complexo de Cobre (II) de norfloxacin (NOR) contendo 1,10-fenantrolina. ....	36
Figura 13. Equação de obtenção do complexo de Cobre (II)	

de esparfloxacina (ESPAR) contendo 1,10-fenantrolina. ....	36
Figura 14. Equação de obtenção do complexo de Bi(III) de levofloxacina (LEVO). ....	38
Figura 15. Equação de obtenção do complexo de Bi(III) de norfloxacina (NOR). ....	38
Figura 16. Equação de obtenção do complexo de Bi(III) de esparfloxacina (ESPAR). ....	39
Figura 17. Espectros de IV (a) da levofloxacina e (b) de seu complexo de Au(III). Os círculos vermelhos destacam o estiramento $\nu(\text{COOH})$ . ....	49
Figura 18. Espectros de IV (a) da norfloxacina e (b) de seu complexo de Au(III). ....	50
Figura 19. Espectros de IV (a) da esparfloxacina e (b) de seu complexo de Au(III). ....	51
Figura 20. Espectros de IV da norfloxacina (—) e do complexo $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (—). O círculo vermelho destaca o estiramento $\nu(\text{COOH})$ em $1732 \text{ cm}^{-1}$ . ....	52
Figura 21. Espectros de absorção da norfloxacina ( $10 \mu\text{M}$ ) titulada com $\text{HAuCl}_4$ em (A) pH 7,5, (B) pH 4,0 e (C) pH 10,6. O espectro do $\text{HAuCl}_4$ aparece nas três figuras como linhas pontilhadas ( $20 \mu\text{M}$ em A e B; $60 \mu\text{M}$ em C). ....	60
Figura 22. Espectro de Fluorescência da norfloxacina ( $10 \mu\text{M}$ ), em pH 7,5 titulado com $\text{HAuCl}_4$ . A seta representa o aumento das concentrações de ouro. Inserção: fluorescência desloca de 407 nm em função da concentração de Au(III), e um sítio de ligação ajusta com $K_b = 1,7 (\pm 0.2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . ....	61
Figura 23. Espectros de fluorescência da norfloxacina ( $10 \mu\text{M}$ ) em pH 4,0 titulada com $\text{HAuCl}_4$ . A seta indica aumento na	

concentração de Au. Inserção: Gráfico de Stern-Volmer para a fluorescência em 442 nm, e ajuste linear com a constante de Stern-Volmer $K_{SV} = 2,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .	62
Figura 24. Espectros de Fluorescência da NOR em pH 10,6 e com diferentes concentrações de $\text{HAuCl}_4$ : (A) 0 - 13 $\mu\text{M}$ ; (B) 13 - 47 $\mu\text{M}$ ; (C) 47 - 90 $\mu\text{M}$ . As setas indicam o aumento da concentração de Au(III). (D) é um gráfico da intensidade da fluorescência, em 420 nm x concentração de Au(III).	63
Figura 25. Mudança na fluorescência da NOR, 420 nm em pH 10,6, após titulação com $\text{HAuCl}_4$ . A linha representa o ajuste da expressão de ligação a um único sítio, usando a Eq. (1) com $K_b = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ e $[\text{NOR}] = 12,4 \mu\text{M}$ .	64
Figura 26. Decaimento da intensidade da norfloxacin, em pH 7,5, 4,0, e 10,6 (dados TCSPC). Excitação em 330 nm. Emissão em 407 nm (pH 7,5 e 10,6), e 440 nm (pH 4,0).	65
Figura 27. Decaimento da fluorescência: Au(III)NOR, em pH 10,6 (símbolo vazado, vermelho) comparado com o decaimento da NOR pura em pH 7,5 e 4,0. Concentração $[\text{Au(III)}]/[\text{NOR}] = 1,3$ . Excitação em 330 nm; emissão em 420 nm (pH 10,6), 407 nm (pH 7,5), e 440 nm (pH 4,0).	68
Figura 28. Análise da cinética celular da célula B16-F10 frente ao tratamento com o complexo $[\text{AuCl}_2(\text{ESPAR})]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 30, 45 e 100 $\mu\text{M}$ .	71
Figura 29. Eletroforese em gel de agarose de ADN de células B16-F10 tratadas com o complexo $[\text{AuCl}_2(\text{ESPAR})]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ em comparação com o controle negativo. $2 \times 10^6$ células foram cultivadas em diferentes concentrações: (1) Lader, (2) Controle negativo, (3) $[\text{AuCl}_2(\text{ESPAR})]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 30 $\mu\text{M}$ , (4) $[\text{AuCl}_2(\text{ESPAR})]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 45 $\mu\text{M}$ e	

(5) $[\text{AuCl}_2(\text{ESPAR})]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100 $\mu\text{M}$ .....	71
Figura 30. Espectros de IV da esparfloxacina (—) e do complexo $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{ESPAR})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (—). O círculo vermelho destaca o estiramento $\nu(\text{COOH})$ em 1719 $\text{cm}^{-1}$ . ....	75
Figura 31. Espectros de RPE (banda X) das amostras em pó de $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ e dos complexos 4, 5 e 6 a temperatura ambiente. ....	77
Figura 32. Espectros EPR de $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ e dos complexos 4, 5 e 6 em solução aquosa congelada a 77 K. Concentração 1 $\text{mmol L}^{-1}$ .....	78
Figura 33. Espectro de RPE, banda X, para $\text{Cu}(\text{II})\text{fen}$ e para os complexos (4), (5) e (6), em DMSO, a 77K. Concentração 1 $\text{mmol L}^{-1}$ . A seta indica $g \perp$ de cobre mononuclear.....	79
Figura 34. Estruturas propostas para os complexos (4), (5) e (6).....	81
Figura 35. Espectro de fluorescência da NOR em solução aquosa (tampão fosfato pH 7,4) e o efeito da titulação com $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ . Concentração da NOR: 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; Concentrações de $\text{Cu}(\text{fen}) = n \times 3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com $n = 0, 1, \dots, 7$ . Excitação em 330 nm. A inserção é o gráfico de supressão de Stern-Volmer.....	82
Figura 36. Curvas de decaimento de Fluorescência da NOR em solução aquosa (tampão fosfato pH 7,4) pura e com $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ adicionado. Concentração da NOR: 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; concentrações do sal de $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ : 0, 10 e 23 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Excitação em 330 nm. ....	83
Figura 37. Fluorescência da NOR em 407 nm em função do total de $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ adicionado. Concentração total da NOR, $c_{\text{NOR}} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ .....	84
Figura 38. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	
Figura 39. Atividade dos complexos (4) e (6) sob as formas amastigotas intracelulares do <i>T. cruzi</i> (cepa Y).....	90

Figura 40. Espectros de IV (a) da levofloxacin e (b) de seu complexo de Bi(III).....	94
Figura 41. Espectros de infravermelho da norfloxacin (a) e de seu complexo de Bi(III) (b).....	95
Figura 42. Espectros de infravermelho da esparfloxacin (a) e do complexo de Bi(III) (b).....	96
Figura 43. Estruturas propostas para os complexos de Bi(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin (N - N = NOR, LEVO ou ESPAR).....	97
Figura 44. Espectros Raman da levofloxacin (a) e de seu complexo de Bi(III) (b).....	99
Figura 45. Espectros Raman da norfloxacin (a) e do complexo de Bi(III) (b).....	100
Figura 46. Espectros Raman da esparfloxacin (a) e do complexo de Bi(III) (b).....	101



## Lista de tabelas

Tabela 1. Principais fluorquinolonas de cada geração e cada indicação clínica. ....	26
Tabela 2. Cor e rendimento da reação para os complexos de Au(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin. ....	33
Tabela 3. Cor e rendimento da reação para os complexos de Cu(II) - fenantrolina de LEVO, NOR e ESPAR. ....	35
Tabela 4. Cor e rendimento da reação para os complexos de Bi(III) de LEVO, NOR e ESPAR. ....	37
Tabela 5. Dados de microanálises (valores calculados entre parênteses), condutividade ( $\Lambda$ , $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) e faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ ) para os complexos de Au(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin. ....	47
Tabela 6. Principais bandas do espectro de infravermelho das fluorquinolonas e de seus complexos de Au(III). ....	48
Tabela 7. Sinais dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a levofloxacin e seu complexo de Au(III) ( $\text{DMSO-d}^6$ ). ....	53
Tabela 8. Sinais dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a norfloxacin e seu complexo de Au(III) ( $\text{DMSO-d}^6$ ). ....	55
Tabela 9. Sinais dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a esparfloxacin e seu complexo de Au(III) ( $\text{DMSO-d}^6$ ). ....	57
Tabela 10. Tempo de vida $\tau_1$ e $\tau_2$ da fluorescência da norfloxacin. Fatores $f_1$ e $f_2$ são contribuições fracionárias no comprimento de onda de emissão. ....	66
Tabela 11. Tempos de vida da fluorescência da norfloxacin titulada com Au(III) no pH 7,5 obtidos por análise global. $\tau = 1,15 \text{ ns}$ fixo; $\tau_2 = 2,53 \text{ ns}$ . $\alpha_1$ and $\alpha_2$ são os fatores pré exponenciais; $f_1$ e $f_2$ são as contribuições fracionárias no comprimento de onda de emissão. ....	67

Tabela 12. Tempos de vida da fluorescência da norfloxacin titulada com Au(III) no pH 4,0 obtidos por análise global. $\tau_1 = 1,58$ ns fixado; $\tau_2 = 0,55$ ns fixado, $\tau_3 = 6,07$ ns. $\alpha_i$ são os fatores pré exponenciais; $f_i$ são as contribuições fracionárias no comprimento de onda de emissão, com $i = 1, 2, 3$ e $f_i = \alpha_i \cdot \tau_i$ ..... 67	67
Tabela 13. Concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) dos complexos de Au(III) frente a linhagens tumorais e sadia. .... 69	69
Tabela 14. Dados de microanálises (valores calculados entre parênteses), condutividade ( $\Lambda$ , $\mu S\ cm^{-1}$ ) e faixa de decomposição ( $^{\circ}C$ ) para os complexos de Cu(II). .... 74	74
Tabela 15. Principais bandas do espectro de infravermelho dos complexos de Cu(II) das fluorquinolonas LEVO, NOR e ESPAR. .... 74	74
Tabela 16 - Parâmetros de RPE do precursor $[CuCl_2(fen)]$ e dos complexos de Cu(II) binucleares 4, 5 e 6 , em DMSO, a 77K. .... 80	80
Tabela 17. Atividade (média $\pm$ SD) e índice de seletividade (IS) para as fluorquinolonas e seus complexos de Cu(II) sob as formas tripomastigotas sanguíneas do <i>T. cruzi</i> (cepa Y), <i>in vitro</i> (24 h de incubação a 37 $^{\circ}C$ ). .... 87	87
Tabela 18. Resultados de atividade anti- <i>T. cruzi</i> para complexos de Cu(II) análogos. .... 88	88
Tabela 19. Atividade (media $\pm$ SD) e índice de seletividade (IS) para a NOR, ESPAR e seus complexos de Cu(II) sob as formas amastigotas intracelulares do <i>T. cruzi</i> (cepa Y) <i>in vitro</i> . .... 89	89
Tabela 20. Dados de microanálises (valores calculados entre parênteses), condutividade ( $\Lambda$ , $\mu S\ cm^{-1}$ ) e faixa de decomposição ( $^{\circ}C$ ) para os complexos de Bi(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin. .... 93	93
Tabela 21. Principais bandas do espectro de infravermelho dos complexos de Bi(III) das fluorquinolonas LEVO, NOR e ESPAR. .... 93	93
Tabela 22. Principais bandas do espectro Raman dos complexos de Bi(III) das fluorquinolonas LEVO, NOR e ESPAR. .... 98	98
Tabela 23. Valores da série de diluição das concentrações do	

teste de atividade antimicrobiana frente a <i>P. aeruginosa</i> para as fluorquinolonas e seus complexos de Bi(III). Os valores em negrito representam as CIM. ....	103
Tabela 24. Resultados dos cálculos das concentrações inibitórias mínimas, contra <i>P. aeruginosa</i> , em $\mu\text{mol L}^{-1}$ das drogas livres e de seus complexos com Bi(III). ....	104
Tabela 25. Valores da série de diluição das concentrações do teste de atividade antimicrobiana frente a <i>S. aureus</i> para as fluorquinolonas e seus complexos de Bi(III). Os valores em negrito representam as CIM. ....	105
Tabela 26. Resultados dos cálculos das concentrações inibitórias mínimas, contra <i>P. aeruginosa</i> , em $\mu\text{Mol L}^{-1}$ das drogas livres e de seus complexos com Bi(III). ....	106

## Introdução

A descoberta dos antibióticos representou o maior avanço na farmacoterapia nos últimos 50 anos, já que possibilitou o controle efetivo de muitos micróbios patogênicos que causam incapacitação prolongada ou a morte de seres humanos. A era da quimioterapia antimicrobiana inicia-se em 1936 com a introdução, na clínica, das sulfonamidas. Em 1941, a introdução da penicilina tornou-se um marco histórico na medicina por revolucionar os princípios terapêuticos até então usados nas doenças infecciosas. São conhecidos, atualmente, centenas de antibióticos e todos os anos esta lista aumenta.<sup>1</sup>

Os fármacos da família das quinolonas são classificados em gerações. A primeira geração, por exemplo, ácido nalidíxico, ácido piromídico, cinoxacina, e rosoxacina, possui ação sobre as enterobactérias, sem atividade antipseudomonas ou Gram-positivos, com uso limitado ao trato urinário. A segunda geração, *norfloxacina* e ácido pipemídico, amplia o campo de ação contra *Pseudomonas*, com atividade limitada para trato urinário e intestinal. A terceira geração, *levofloxacina*, *ciprofloxacina*, *pefloxacina*, *ofloxacina*, *lomefloxacina*, *floxacin*, *enoxacina* e *difloxacina*, atua contra Gram-negativos – incluindo *Pseudomonas* e *Estafilococos*, estendendo sua aplicação para tratamentos sistêmicos. Com a descoberta das quinolonas da quarta geração, *esparfloxacina*, *temafloxacina*, *tosufloxacina* e *clinafloxacina*, o campo de ação compreende *Streptococos hemolíticos*, *Pneumococos* e *anaeróbios*.

Como pode ser observado, a cada nova geração de quinolonas, uma maior ação antimicrobiana, maior potência bactericida e maior número de propriedades farmacológicas é encontrada. As quinolonas possuem excelente distribuição nos vários tecidos e fluidos corporais. A atividade bactericida das quinolonas inibe a ação das subunidades A da DNA-girase, enzima responsável pela divisão da dupla cadeia do DNA cromossômico. Estes antibióticos são comumente utilizados no tratamento clínico de várias infecções, tais como infecções urinárias, infecções do tecido liso, infecções respiratórias, infecções de junta óssea, infecções recorrentes ou crônicas por *Pseudomonas* na fibrose cística, otite média, meningite, prostatite, sinusite e outras. Além disso, também são aplicados no tratamento e prevenção de doenças veterinárias e produção de alimentos para animais.<sup>2</sup>

Fluorquinolonas são membros da terceira geração dos antibióticos com a presença de flúor. O comportamento *in vivo* destes fármacos é fortemente afetado por suas propriedades físico-químicas, em particular suas propriedades ácido-base e sua capacidade para formar complexos com íons metálicos.<sup>3</sup> De fato, é bem conhecido que as fluoroquinolonas são capazes de formar complexos com certos cátions multicarregados, e muitos autores têm pesquisado a interação entre quinolonas e cátions, tais como Al(III), Mg(II), Fe(III), Ca(II) e Cu(II). O principal objetivo destes estudos é o de compreender o mecanismo de ação destes complexos. Esta presença de centros carregados em muitos fármacos pode ser essencial para a sua atividade biológica e sua passagem através de membranas celulares.<sup>4</sup>

Elementos metálicos estão presentes em todos os organismos e suas funções farmacológicas nos processos biológicos não podem ser negligenciadas.<sup>5</sup> Os metais desenvolvem um papel muito importante em processos como divisão celular, síntese de proteínas e atividade de enzimas. Neste sentido, o estudo de complexos de elementos metálicos com fármacos e da interação destes complexos com albumina e com membranas se apresenta como uma necessidade fundamental na prevenção e tratamento de doenças.<sup>6</sup>

Além da atividade antimicrobiana, as quinolonas são conhecidas por atividades antitumorais. Então, como identificação e um pré-*screening* destes novos complexos candidatos a novos fármacos, se faz necessária uma avaliação *in vitro* das fluorquinolonas livres e seus respectivos complexos em alguns testes de atividade biológica, não somente para entender a influência dos metais e seus mecanismos de ação, mas principalmente, aumentar a atividade biológica, diminuindo o tempo de administração do fármaco e, dessa forma, reduzindo possíveis efeitos colaterais durante o tratamento.

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a influência da associação metal-fluorquinolona para a atividade biológica. Este objetivo foi alcançado através dos seguintes objetivos específicos:

1. Síntese de novos complexos, utilizando Au(III), Cu(II) e Bi(III) e os ligantes Norfloxacin (NOR), Levofloxacin (LEVO) e Esparfloxacin (ESPAR), do grupo das fluorquinolonas;
2. Caracterização dos compostos obtidos através de diversas técnicas analíticas, tais como: análise elementar, condutimetria, espectroscopia na região média do infravermelho, ressonância paramagnética eletrônica (RPE), ressonância magnética nuclear

(RMN) de hidrogênio e carbono ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), fluorescência estacionária e resolvida no tempo;

3. Teste de atividade biológica dos novos complexos de Cu(II) e dos seus respectivos ligantes, contendo fenantrolina como co-ligante, frente à *Artemia sp.* como um pré-screening para a atividade antitumoral e teste de atividade sobre o *Trypanosoma cruzi*, pela análise do efeito direto sobre as formas tripomastigotas e amastigotas do parasito;
4. Teste de atividade biológica com os complexos de Bi(III) e seus respectivos ligantes sobre cepas sensíveis de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*;
5. Avaliação da citotoxicidade dos complexos de ouro frente às linhagens tumorais estabelecidas A20 (Linfoma murino), B16-F10 (Melanoma murino) e K562 (Leucemia mielóide humana).

Com este trabalho, esperamos poder contribuir para uma melhor compreensão da química, das propriedades estruturais e farmacológicas destas importantes classes de compostos.

## 2

### Fluorquinolonas

#### 2.1.

##### Histórico

A origem das fluorquinolonas está intrinsecamente relacionada com a das quinolonas. O ácido nalidíxico (Figura 1) foi a primeira quinolona a apresentar atividade antibacteriana, tendo sido sintetizada e patenteada por Lescher e colaboradores em 1962.<sup>7</sup>

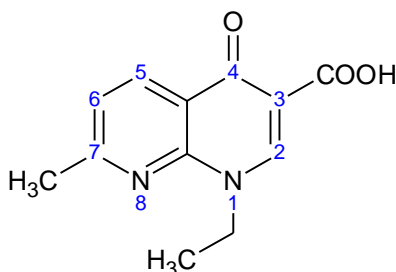


Figura 1. Estrutura do ácido nalidíxico.

O primeiro composto com um átomo de flúor em posição C-6 foi a flumequina, (Figura 2) patenteada em 1973, a qual apresentou importantes indicações de que esta classe poderia ser utilizada no combate a infecções bacterianas<sup>8</sup>.

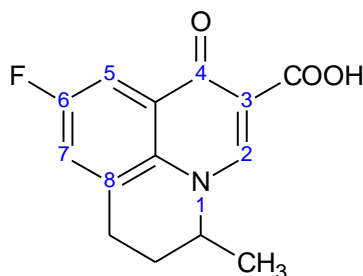


Figura 2. Estrutura da flumequina.

No entanto, o grande avanço da quimioterapia antibacteriana das fluorquinolonas ocorreu no final da década de 1970, quando a introdução de um

átomo de flúor em posição C-6 e um grupo piperazina em posição C-7, conferiu um amplo e potente espectro de atividade antimicrobiana, obtendo-se, assim, a norfloxacin (Figura 3), patenteada em 1978, sendo a primeira fluorquinolona a apresentar potente atividade bacteriana.<sup>1, 8</sup>

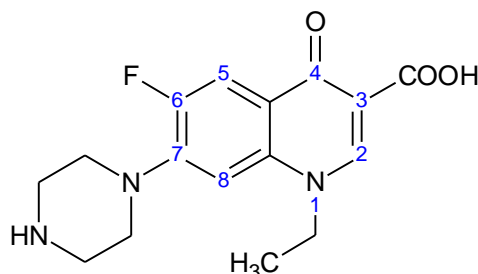


Figura 3. Estrutura da norfloxacin.

Após a descoberta da atividade antibacteriana da norfloxacin, inúmeros análogos foram sintetizados, identificando-se, assim, posições e grupos farmacofóricos e toxicofóricos (Figura 4).

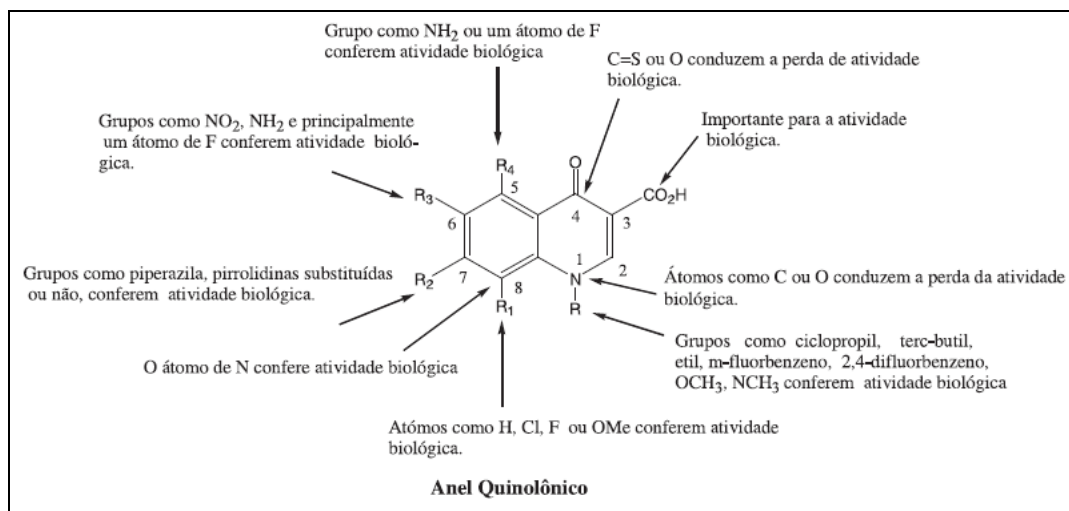


Figura 4. Relação estrutura-atividade para as quinolonas (extraído da referência 1).

Várias substituições têm sido realizadas em diferentes posições do anel quinolônico, no entanto, as posições críticas para a atividade biológica são a C-6 (contendo um átomo de flúor), C-7 (contendo grupos 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 bactericida como, por exemplo, BMY-40062,8



perfloxacin, fleroxacin e esparfloxacin<sup>1</sup> (Figura 5).

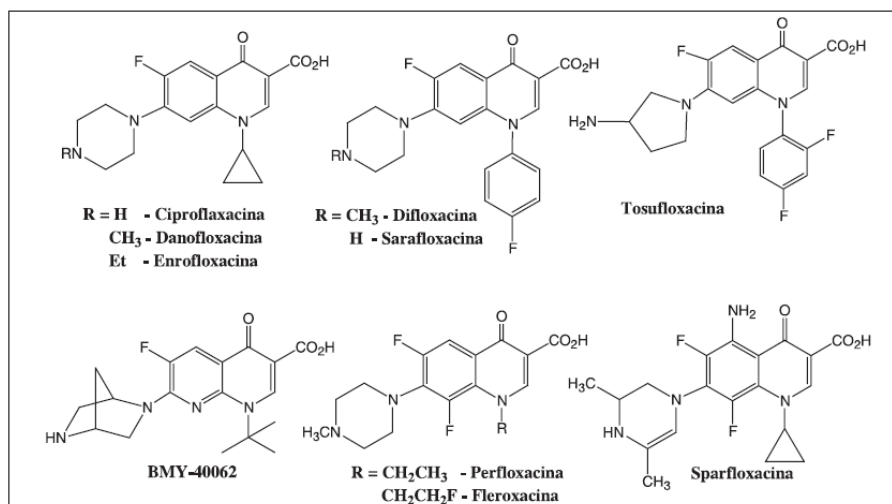


Figura 5. Fluorquinolonas com atividade antibacteriana (extraído da referência 1).

## 2.2.

### Classificação das Fluorquinolonas

Um grande número de fluorquinolonas já foi sintetizado, sendo essas classificadas em grupos ou gerações seguindo, normalmente, a ordem cronológica das sínteses, pois o grau de eficácia e o espectro de atividade foram sendo aprimorados e ampliados com o passar dos anos.

A classificação apresenta algumas variações entre autores, sendo apresentada na Tabela 1 as principais fluorquinolonas de cada geração e as respectivas indicações clínicas.<sup>9</sup>

Tabela 1. Principais fluorquinolonas de cada geração e cada indicação clínica.

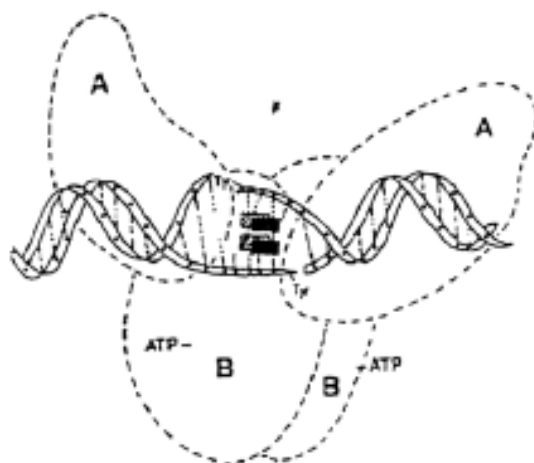
Geração	Fluorquinolona	Indicações clínicas
Primeira	Ácido nalidíxico Cinoxacina	Infecções no trato urinário
Segunda	Norfloxacin Ciprofloxacina Ofloxacina Levofloxacina Pefloxacina	Infecções no trato urinário, infecções respiratórias, infecções gastro-intestinais, inflamação nos rins, infecções ginecológicas, doenças sexualmente transmissíveis, prostatites, infecções oculares e na pele
Terceira	Esparfloxacina Gatifloxacina	Pneumonia e bronquite crônica
Quarta	Moxifloxacina Trovafloxacina	Todas as indicações anteriores

### 2.3.

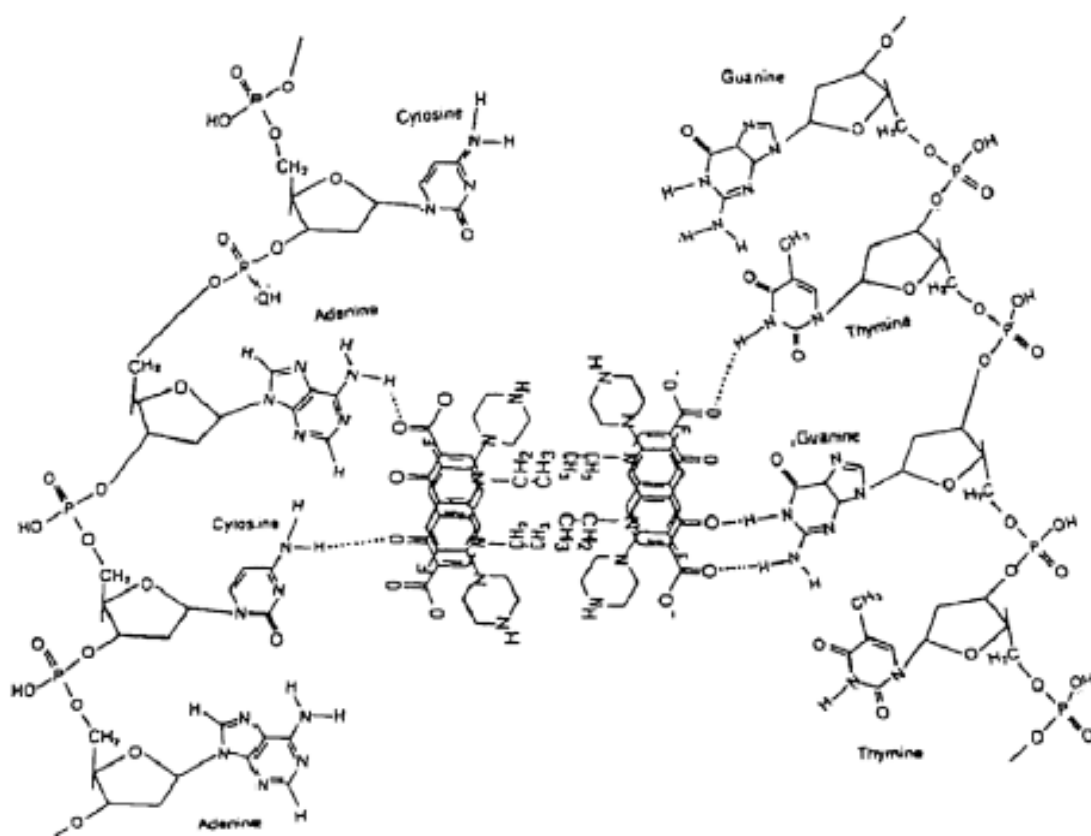
#### Mecanismo de Ação

As fluorquinolonas podem combater as infecções bacterianas, já que são capazes de inibir a DNA girase, uma enzima essencial envolvida na replicação, transcrição e reparação do DNA bacteriano.<sup>10</sup>

Nas bactérias, uma enzima usada para manipular o DNA é a topoisomerase do tipo II (DNA-girase), que converte a hélice numa forma super-helicoidal negativa para preparar a separação dos filamentos. A forma primária desta enzima existe como um tetrâmero, composto de duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas como gyrA e gyrB, respectivamente. Ambas as subunidades contêm uma região específica que liga a enzima ao DNA, como pode ser observado na Figura 6 (a). As fluorquinolonas capturam a enzima DNA-girase do cromossomo bacteriano, criando um complexo medicamento-enzima-DNA com rupturas num único filamento, o que impede a passagem contínua do DNA pelo mecanismo de replicação, Figura 6 (b). Neste estágio, a ação do fármaco é reversível. Entretanto, na presença de ações medicamentosas mais altas, aparecem rupturas nos dois filamentos e a bactéria morre.<sup>11</sup>



(a)



(b)

Figura 6. Ilustração do modo de ligação da FQ à DNA-girase. (a) Representação de quatro moléculas de fluorquinolonas (retângulos) numa cavidade do DNA anexado à DNA-girase. (b) Representação da ligação de quatro moléculas de fluorquinolonas através de ligações de hidrogênio à parte interna do DNA. <sup>11</sup>

## 2.4.

### Mecanismo de Resistência

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

Um mecanismo comum de resistência ao fármaco é a modificação do alvo do medicamento. A mutação do gene *gyrA* pode tornar a subunidade A da DNA girase imprópria para a ligação ao fármaco.<sup>1</sup>

Alterações ou características naturais da superfície bacteriana que reduzam a penetração ou que causem o efluxo rápido do fármaco constituem outro mecanismo importante de resistência.<sup>12,13</sup>

Após o uso do ácido nalidíxico em 1962, houve um rápido desenvolvimento de resistência deste composto pelas bactérias. Os fatores que predisporiam esta resistência incluem a terapia com concentrações subinibitórias da droga, terapia prolongada, uso inapropriado de antibióticos e interrupção do tratamento.<sup>14</sup>

### 3

## Complexação de fluorquinolonas a metais

Muitas drogas possuem propriedades farmacológicas e toxicológicas diferentes quando administradas na forma de complexos metálicos. Provavelmente, o cátion mundialmente mais estudado sobre este assunto é o cobre(II), uma vez que é um candidato de baixo peso molecular, os seus complexos têm sido provados benéficos contra várias doenças, tais como a tuberculose, artrite, úlceras gástricas e cânceres.<sup>15,16,17,18</sup> Tem havido um enorme crescimento de drogas a partir da família de quinolona, que se iniciou com a descoberta do ácido nalidíxico. Desde então, o crescimento exponencial desta família tem produzido mais de dez mil análogos.<sup>19</sup>

Antibióticos quinolônicos podem participar na formação de complexos, coordenando-se de vários modos.<sup>20, 21, 22, 23, 24</sup> No caso das drogas isoladas, em meio ácido, estão individualmente e/ou duplamente protonadas, sendo incapazes de se ligarem aos íons metálicos e, nestes casos, só existem interações eletrostáticas entre o fármaco e os íons metálicos.<sup>20 - 22</sup> Quando estão em meio neutro, as quinolonas encontram-se no estado zwitteriônico e são capazes de formar complexos bidentados.<sup>23, 25</sup> As quinolonas também podem atuar como ligantes em ponte e assim são capazes de formar complexos polinucleares.<sup>23, 25</sup>

Sabe-se que a complexação com metais pode levar a uma significativa redução da resistência celular e a um aumento da atividade das fluorquinolonas, provavelmente devido a um aumento da lipofilia, que leva a uma maior acumulação intracelular. Vários estudos sobre a interação entre as fluorquinolonas e cátions metálicos vêm sendo relatados na literatura.

### 3.1.

#### Ouro(III)

Drogas contendo ouro têm demonstrado eficácia no tratamento de artrite reumatóide e asma brônquica. Apesar dos 70 anos de uso clínico, os seus mecanismos de ação ainda são mal compreendidos. Isto resulta, em parte, porque o ouro é amplamente dispersado pelo corpo. Ao longo dos anos, muitos diferentes mecanismos de ação têm sido propostos. Dois que estão recebendo a

devida atenção são a formação de Aurocianida, o que aponta determinadas células imunológicas envolvidas na resposta inflamatória e o mecanismo da geração de ouro (III) *in vivo*. Estes têm sido descritos por Graham et al.<sup>26</sup> e Gleichmann et al.<sup>27,28</sup>.

Apesar da falta de um mecanismo terapêutico amplamente aceito, a química bioinorgânica do ouro foi definida pela investigação de um número de laboratórios de química e farmácia. As transformações dos complexos de ouro, as quais ocorrem *in vivo*, foram delineadas e metabólitos identificados e estudados. Continuando a investigação dos metabólitos e a sua capacidade para influenciar processos biológicos irão ajudar a testar o ouro (III) e a hipótese da Aurocianida.

Desde o início desta pesquisa até o presente momento, apenas um artigo envolvendo um antibiótico do grupo das fluorquinolonas e ouro(III) foi encontrado.<sup>29</sup> Neste trabalho, do ano de 2007, é proposta uma estrutura onde dois ligantes (norfloxacin) estão ligados ao ouro de modo monodentado, através dos nitrogênios da piperazina, como pode ser observado na Figura 7.

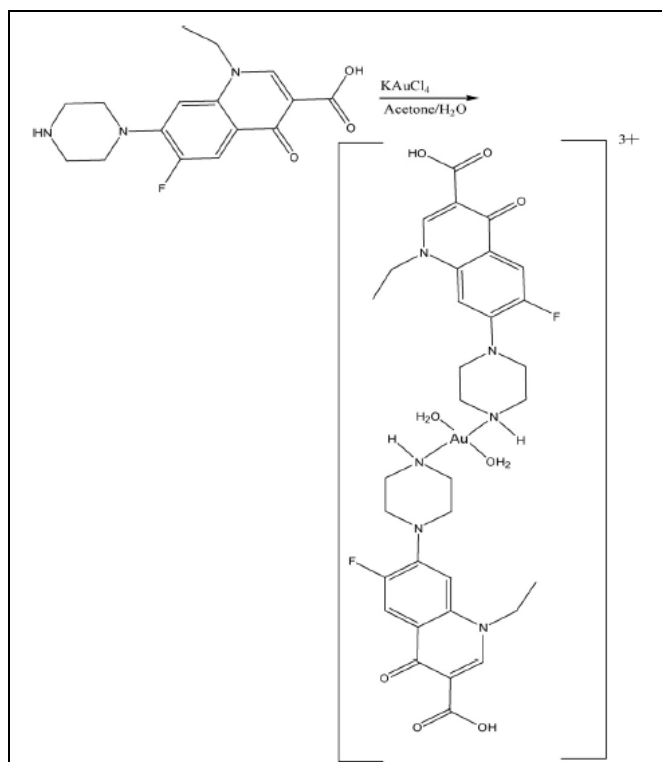


Figura 7. Estrutura do complexo  $[Au(NOR)_2(H_2O)_2]Cl_3$ .<sup>29</sup>

### 3.2.

#### Cobre(II)

O estudo de complexos ternários de íons metálicos e dois diferentes tipos de ligantes é um tópico de interesse, devido à sua presença em sistemas biológicos. Em particular, complexos de cobre (II) são conhecidos por ter um importante papel, tanto em sistemas naturais biológicos, quanto como agentes farmacológicos.<sup>30</sup>

O papel biológico do cobre(II)<sup>31</sup> e sua atividade sinérgica com drogas têm sido o sujeito de grande número de pesquisas e estudos.<sup>32</sup> As propriedades antifúngicas e antibacterianas de muitos complexos de cobre(II) têm sido aprimoradas contra muitos fungos e bactérias patogênicos.<sup>33, 34</sup>

Complexos de cobre(II) com drogas são muito mais ativos na presença de um ligante heterogêneo cíclico com nitrogênio como átomo doador, tais como 2,2' bipyridina, 1,10-fenantrolina, 2,2'-dipiridilamina.<sup>35, 36</sup>

Até o momento, muitas pesquisas já foram desenvolvidas utilizando o sal dicloro (1,10-fenantrolina) de cobre(II), porém com ligantes e rotas de síntese diferentes dos realizados neste trabalho.<sup>37, 38, 39, 40, 41, 42</sup>

### 3.3.

#### Bismuto(III)

No ano 1984, a bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) foi descoberta.<sup>43</sup> Essa bactéria vive sob a mucosa gástrica protegida por muco gástrico. Atualmente, a *H. pylori* tem sido aceita como agente de 90% das úlceras gástricas e duodenais. Tratamentos utilizando como único agente de terapias com diversos compostos, o bismuto, com eritromicina, fluoroquinolonas e doxiciclina não foram bem sucedidos.<sup>44, 45, 46</sup> As possíveis razões podem ser o efeito do pH variando sobre estes antibióticos e o desenvolvimento da resistência em estirpes de *H. pylori*. Mesmo se a erradicação desta bactéria for bem sucedida, como por exemplo, com amoxicilina e sais de bismuto, uma recaída é sempre comum. Resultados melhores e mais duradouros foram alcançados com a terapia dupla e tripla.<sup>47</sup> A combinação de uma droga anti-úlceras e dois antibióticos pode ter um efeito aditivo e também diminuir a aquisição de resistência microbiana.<sup>48</sup> O uso de sais de bismuto em tais

combinações parece vantajoso: a atividade antibacteriana e efeito citoprotetores sugeridos estimulam a síntese endógena de prostaglandinas.<sup>43, 49</sup>

Sem dúvida, o bismuto e seus compostos têm aplicações medicinais<sup>50</sup> no tratamento de uma variedade de distúrbios gastrointestinais, incluindo úlceras duodenais e gástricas, dispepsia, diarreia e colite<sup>51, 52</sup> e têm um efeito antibacteriano direto sobre a gastrite crônica e úlcera péptica<sup>53, 54, 55</sup>. Pré-tratamento com complexos de bismuto impedem efeitos colaterais tóxicos de drogas anticancerígenas, como a cisplatina, sem comprometer a sua atividade antitumoral.<sup>56</sup>

Por todos estes motivos, os sais de bismuto tornaram-se candidatos atraentes para pesquisas em novas sínteses, pois une seu efeito antibacteriano com as propriedades das fluorquinolonas escolhidas neste trabalho.

Trabalhos com bismuto e fluorquinolonas já foram realizados, porém com metodologias diferentes.<sup>57, 58</sup> Turel<sup>59</sup> relata a síntese em meio ácido, para que as fluorquinolonas interajam apenas ionicamente com o metal, resultando em um composto final mais solúvel e assim possa alcançar um melhor resultado na eficácia do tratamento.



## 4

## Sínteses dos Complexos

As fluorquinolonas levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin utilizadas nas sínteses deste trabalho são de procedência Sigma. Os sais cloreto de ouro(III)trihidratado, dicloro(1,10-fenatrolina)cobre(II) e cloreto de bismuto(III) são de procedência Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados nas sínteses são de procedência Merck, Vetec ou Synth.

## 4.1.

## Sínteses dos Complexos de Au(III) de Levofloxacin, Norfloxacin e Esparfloxacin

Os complexos de Au(III) foram obtidos dissolvendo-se 0,25 mmol dos ligantes levofloxacin (LEVO), norfloxacin (NOR) ou esparfloxacin (ESPAR), em aproximadamente 40 mL de metanol. Após a dissolução dos ligantes, adicionou-se 0,25 mmol de HAuCl<sub>4</sub>, previamente dissolvido em metanol. A mistura permaneceu sob refluxo e agitação por aproximadamente 24 horas. Os precipitados formados foram filtrados a vácuo e secos. Três novos complexos foram obtidos: [AuCl<sub>2</sub>(LEVO)]Cl (**1**), [AuCl<sub>2</sub>(NOR)]Cl (**2**), [AuCl<sub>2</sub>(ESPAR)]Cl (**3**).

Os complexos foram caracterizados por seus pontos de fusão, medidas de condutividade, análise elementar, espectros na região média do infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), fluorescência estacionária e resolvida no tempo. A Tabela 2 apresenta cor e rendimento da reação para os complexos de Au(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin. As Figuras 8, 9 e 10 mostram as equações de obtenção dos complexos.

Tabela 2. Cor e rendimento da reação para os complexos de Au(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin.

Composto	Rendimento (%)	Cor
[AuCl <sub>2</sub> (LEVO)]Cl·H <sub>2</sub> O ( <b>1</b> )	97	Bege escuro
[AuCl <sub>2</sub> (NOR)]Cl·H <sub>2</sub> O ( <b>2</b> )	91	Marrom claro
[AuCl <sub>2</sub> (ESPAR)]·H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> )	74	Marrom escuro

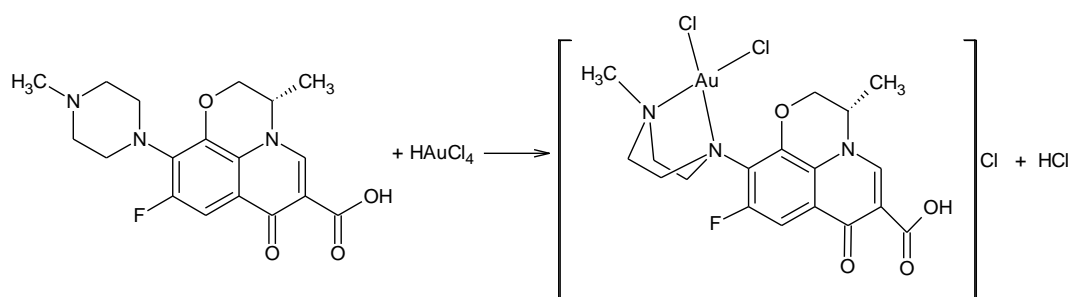


Figura 8. Equação de obtenção do complexo de Au(III) de levofloxacin (LEVO).

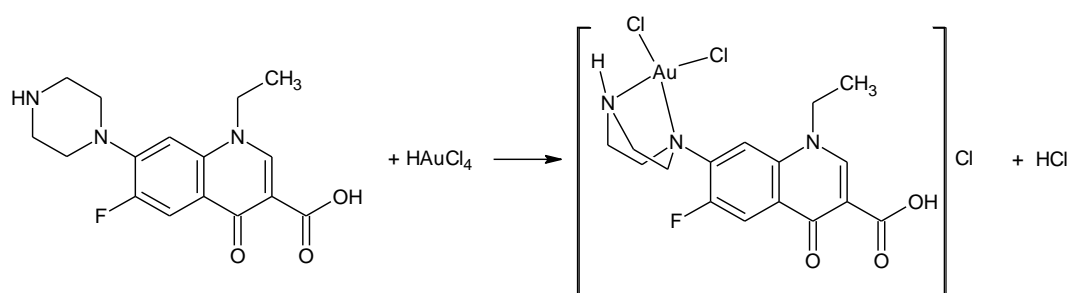


Figura 9. Equação de obtenção do complexo de Au(III) de norfloxacin (NOR).

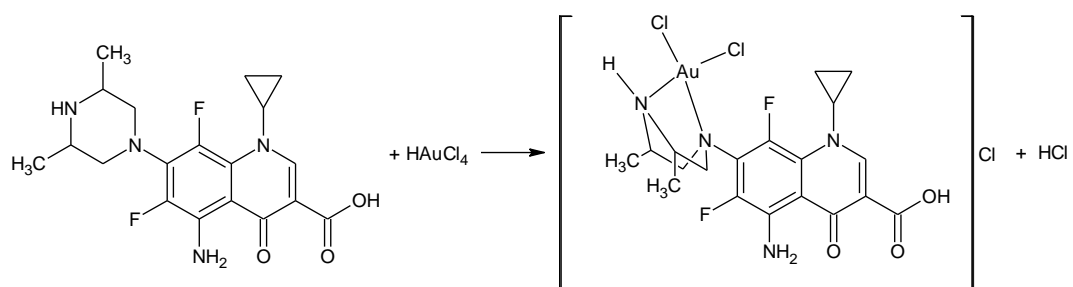


Figura 10. Equação de obtenção do complexo de Au(III) de esparfloxacin (ESPAR).

## 4.2.

### Síntese de complexos de Cu(II) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin contendo 1,10-fenantrolina

Os complexos de Cu(II) foram obtidos dissolvendo-se 0,31 mmol dos ligantes levofloxacin (LEVO), norfloxacin (NOR) ou esparfloxacin (ESPAR), em aproximadamente 40 mL de acetona, com exceção da levofloxacin que foi solubilizada em metanol. Após a dissolução dos ligantes, 0,31 mmol de dicloro(1,10-fenatrolina)cobre(II),  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ , foram adicionados, previamente dissolvidos em metanol. A mistura permaneceu sob refluxo e agitação por aproximadamente 24 horas. Os precipitados formados foram filtrados a vácuo, lavados com éter etílico e secos. Três novos complexos foram obtidos:  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (**4**),  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (**5**) e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{ESPAR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (**6**).

Os complexos foram caracterizados por seus pontos de fusão, medidas de condutividade, análise elementar, espectros na região do infravermelho e ressonância paramagnética eletrônica. A Tabela 3 apresenta cor e rendimento para os complexos de Cobre (II) - fenantrolina de LEVO, NOR e ESPAR. As Figuras 11, 12 e 13 mostram as equações de obtenção dos complexos.

Tabela 3. Cor e rendimento da reação para os complexos de Cu(II) - fenantrolina de LEVO, NOR e ESPAR.

Composto	Rendimento (%)	Cor
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ( <b>4</b> )	76	Verde
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ( <b>5</b> )	72	Verde
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{ESPAR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ( <b>6</b> )	85	Verde

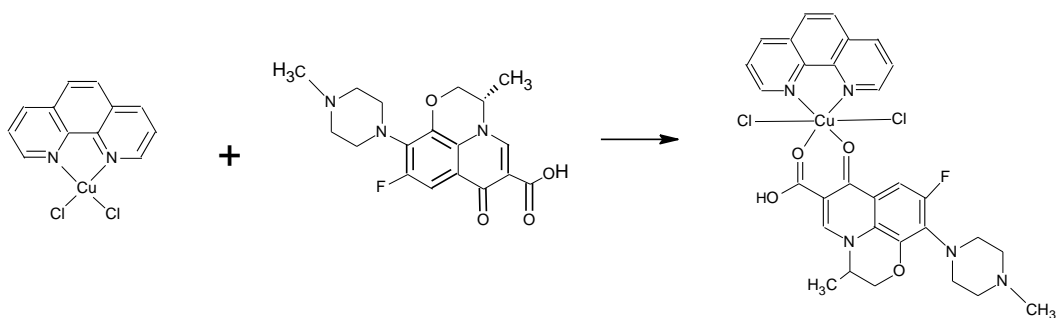


Figura 11. Equação de obtenção do complexo de Cu(II) de levofloxacin (LEVO) contendo 1,10-fenantrolina.

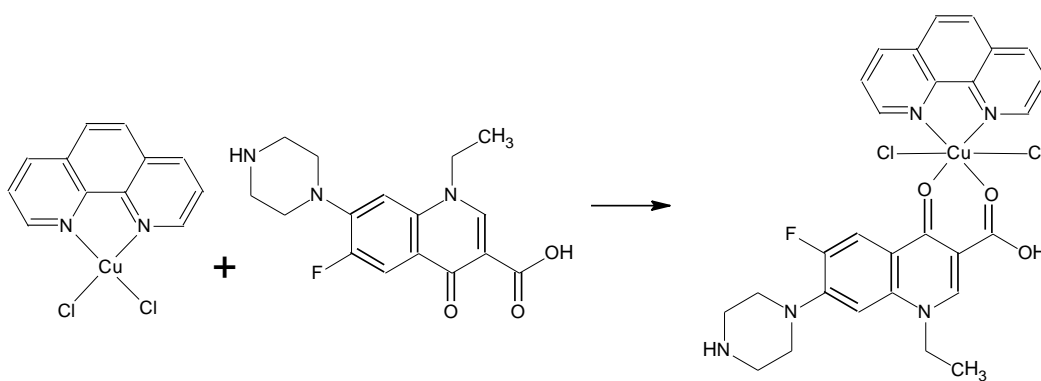


Figura 12. Equação de obtenção do complexo de Cobre (II) de norfloxacin (NOR) contendo 1,10-fenantrolina.

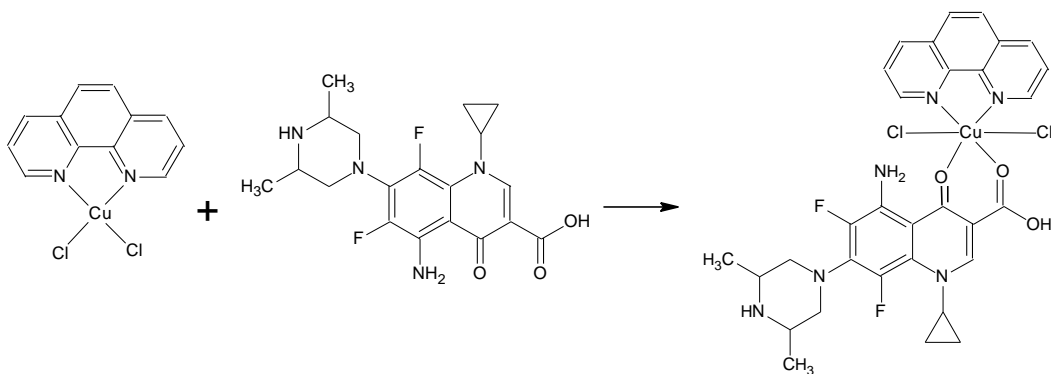


Figura 13. Equação de obtenção do complexo de Cobre (II) de esparfloxacin (ESPAR) contendo 1,10-fenantrolina.

### 4.3.

#### Síntese dos complexos de Bi(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin

Os complexos de Bi(III) foram obtidos dissolvendo-se 0,31 mmol dos ligantes levofloxacin (LEVO), norfloxacin (NOR) ou esparfloxacin (ESPAR), em aproximadamente 40 mL de acetona. Após a dissolução dos ligantes, 0,31 mmol de cloreto de bismuto(III),  $\text{BiCl}_3$ , foram adicionados, previamente dissolvidos em etanol. A mistura permaneceu sob refluxo e agitação por aproximadamente 12 horas. Os precipitados formados foram filtrados a vácuo e secos. Três novos complexos foram obtidos:  $[\text{BiCl}_3(\text{LEVO})]_2$  (**7**),  $[\text{BiCl}_3(\text{NOR})]_2$  (**8**) e  $[\text{BiCl}_3(\text{ESPAR})]_2$  (**9**).

Os complexos foram caracterizados por seus pontos de fusão, medidas de condutividade, análise elementar, espectros na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear. A Tabela 4 apresenta cor e rendimento da reação para os complexos de Bi(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin. As Figuras 14, 15 e 16 mostram as equações de obtenção dos complexos.

Tabela 4. Cor e rendimento da reação para os complexos de Bi(III) de LEVO, NOR e ESPAR.

Composto	Rendimento (%)	Cor
$[\text{BiCl}_3(\text{LEVO})]_2$ ( <b>7</b> )	70	Branco
$[\text{BiCl}_3(\text{NOR})]_2$ ( <b>8</b> )	76	Branco
$[\text{BiCl}_3(\text{ESPAR})]_2$ ( <b>9</b> )	67	Amarelo

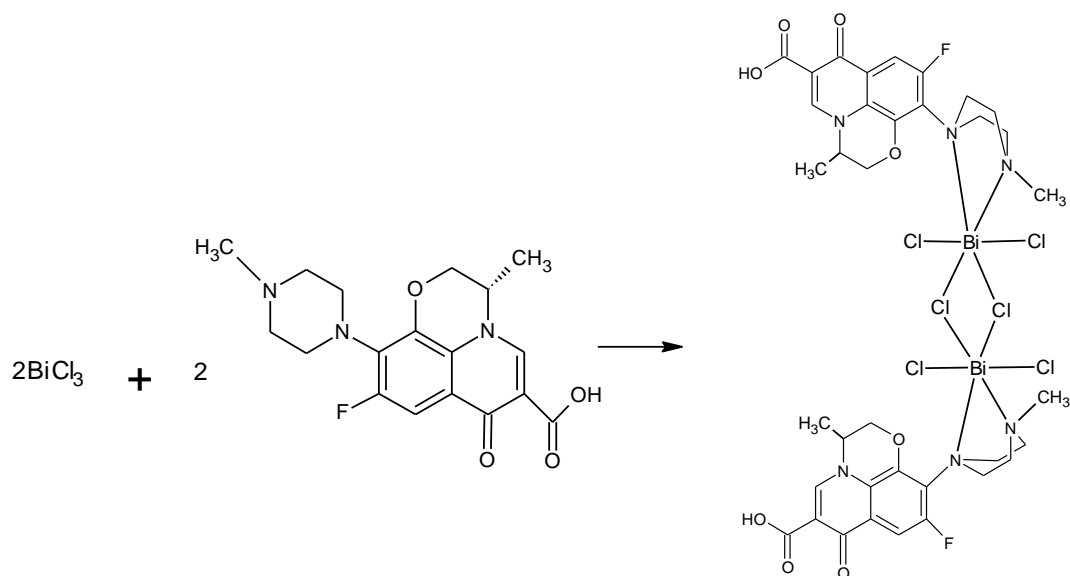


Figura 14. Equação de obtenção do complexo de Bi(III) de levofloxacin (LEVO).

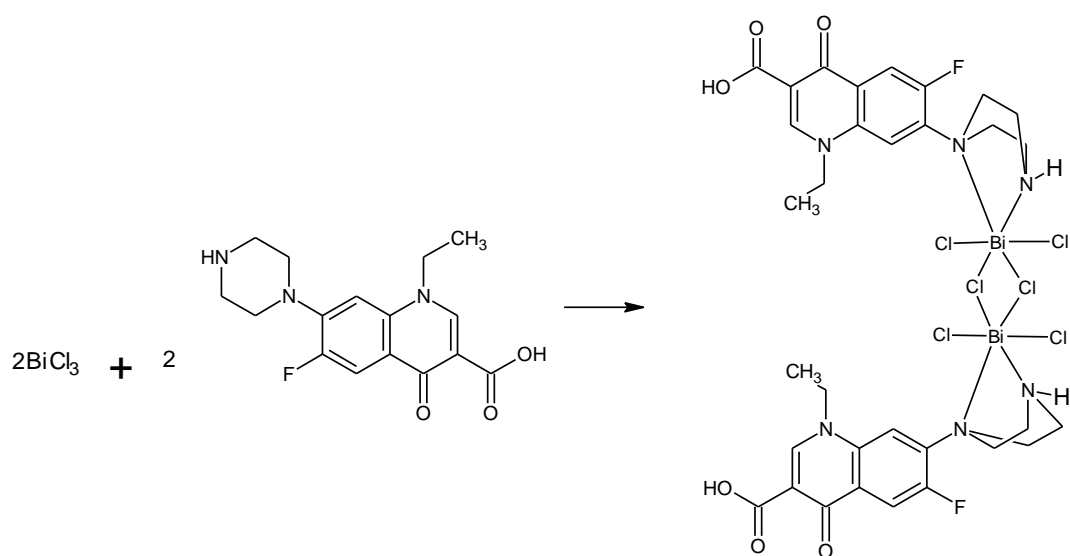


Figura 15. Equação de obtenção do complexo de Bi(III) de norfloxacin (NOR).

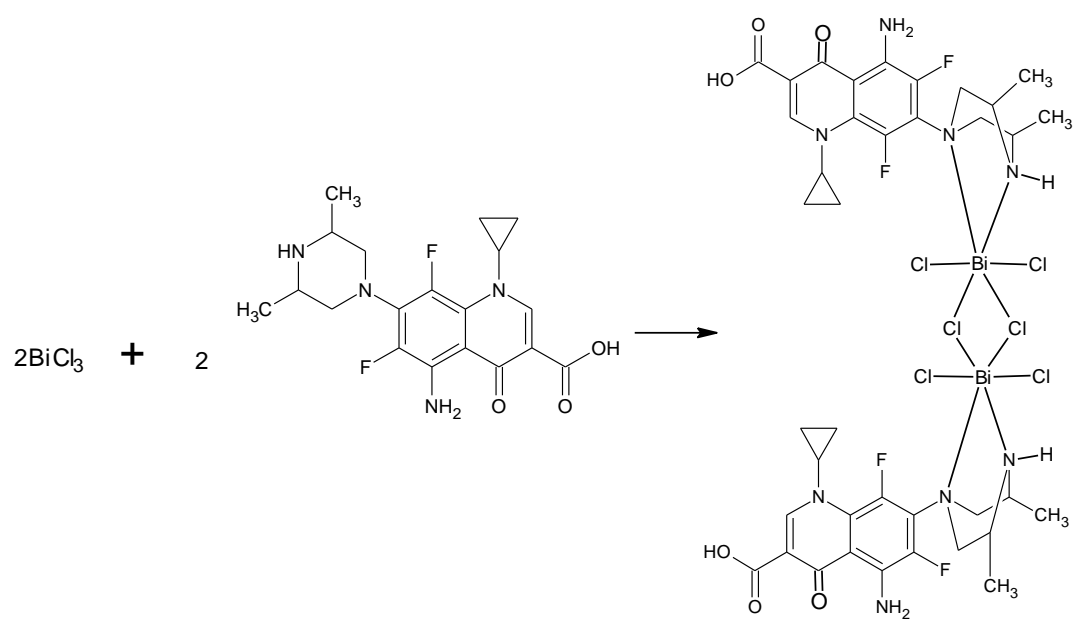


Figura 16. Equação de obtenção do complexo de Bi(III) de esparfloxacin (ESPAR).

## 5

### Caracterizações físico-químicas dos complexos

As técnicas analíticas relacionadas a seguir foram utilizadas para caracterizar os novos complexos.

#### 5.1.

##### 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 duplicatas. Em cada análise obtiveram-se os valores percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio presente em cada composto.

#### 5.2.

##### 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  $\text{cm}^{-1}$ . Foram preparadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) com as amostras a serem analisadas.

Através dos deslocamentos observados nas bandas dos compostos formados, em comparação com as dos materiais de partida, pôde-se verificar que havia realmente ocorrido a formação dos complexos. Os resultados obtidos com as demais técnicas, associados às informações fornecidas pelas bandas de infravermelho, permitiram a proposta de algumas estruturas para os complexos formados.



### 5.3.

#### **Espectroscopia Raman**

A análise dos complexos por espectroscopia Raman foi realizada num equipamento Perkin Elmer, modelo Raman Station 400. Os espectros foram coletados com laser monocromático, comprimento de onda de 875 nm, potência de 65 mW, intensidade de 100%, número de *scans* igual a 36 e resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ , faixa de número de onda: 3600 – 30  $\text{cm}^{-1}$ .

### 5.4.

#### **Medidas de Condutividade**

As medidas de condutividade foram efetuadas utilizando-se um aparelho da Tecnopon, modelo *mCA-150*, à temperatura ambiente. As soluções dos complexos formados foram preparadas nos respectivos solventes, na concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Os resultados forneceram informações que permitiram verificar se as estruturas dos complexos formados eram neutras ou tratava-se de moléculas com presença de contra-íons, mantendo o equilíbrio de cargas.

### 5.5.

#### **Ressonância Paramagnética Eletrônica**

Os espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foram obtidos no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) em colaboração com a **Profa. Eliane Wajnberg**. 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, foram medidas utilizando-se tubos de quartzo de diâmetro interno de 3 mm, em temperatura de nitrogênio líquido.

### 5.6.

#### **Ressonância Magnética Nuclear**

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e carbono ( $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos no Departamento de Química da UFRJ, em colaboração com a **Prof. Rosane San Gil**, utilizando-se os espectrômetros

Brucker DPX-200 (200 MHz) e Brucker DRX-400 Avance (400 MHz) e tetrametilsilano (TMS  $\delta = 0$ ) como referência interna.

## 5.7.

### **Espectroscopia de absorção UV-Vis, fluorescência estacionária e resolvida no tempo**

Os estudos de luminescência foram realizados com a **Profa. Sônia R. Louro**, Departamento de Física da PUC-Rio.

No primeiro passo da pesquisa, em parceria com um membro de nossa equipe, Fabrício Casarejos Lopes, a norfloxacin livre e seu complexo de Au(III) de norfloxacin foram estudados a partir da fluorescência estacionária e fluorescência resolvida no tempo. Os tempos de vida e as constantes de ionização foram determinados. Foi estudado e discutido também como as propriedades espectrais de fluorescência se alteram em função da variação do pH. Expressões para os fatores pré-exponenciais e as intensidades associadas aos tempos de vida de fluorescência em função do pH, para obtenção da constante equilíbrio da transição ácido-base foi desenvolvida. A mesma pesquisa foi realizada com a levofloxacin livre e seu complexo de Au(III), sendo o segundo passo da pesquisa. A esparfloxacin tem fluorescência desprezível e, portanto, estudos de fluorescência não foram realizados. A metodologia das análises, a descrição dos equipamentos bem como análises dos resultados prévios e os cálculos das constantes foram descritos didaticamente nesta fase inicial de trabalho.<sup>60</sup> Em paralelo, um estudo de caracterização das propriedades fotofísicas da norfloxacin foi realizado em diversos solventes, buscando relacionar as variações destas aos efeitos gerais e específicos de cada solvente através de metodologia já existente na literatura por outro membro da nossa equipe, Luis S. Goes Filho.<sup>61</sup>

A utilização do fluorímetro resolvido no tempo no Departamento de Física da PUC-Rio foi inaugurada com estas parcerias.

A partir da compreensão destes resultados, avançamos para o segundo passo da pesquisa, desenvolvido neste trabalho, com o estudo de complexação do Au(III) a norfloxacin. Para tal, as soluções catiônica, zwitteriônica e aniônica da NOR, em pH de 4,0, 7,5 e 10,6, respectivamente, foram preparadas e tituladas com ácido cloroáurico (III),  $\text{HAuCl}_4$ , em diferentes concentrações. Os

espectros de absorção no UV-visível, emissão de fluorescência em estado estacionário e decaimentos da fluorescência foram medidos.<sup>62</sup>

A complexação do Cu(II)fen a norfloxacin também foi realizado a partir da supressão da fluorescência.<sup>63</sup>

## 6

### Testes de Atividade dos Complexos

#### 6.1.

##### 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. Ziolli**. Foram testadas as fluorquinolonas Nor, Levo e Espar e seus complexos metálicos de cobre(II)-fenantrolina. Esse teste permite fazer uma boa correlação com a atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos, levando à descoberta dos *Annonaceous acetogenins* (acetogeninas anonácias) como nova classe de agentes antitumorais ativos. Valores de ED<sub>50</sub> encontrados para citotoxicidade, em geral, eram 1/10 dos valores de LC<sub>50</sub> encontrados nos testes realizados com *Artemia sp.*, sugerindo que tal teste pode ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos.<sup>64</sup>

A metodologia utilizada para os ensaios de toxicidade utilizando *Artemia sp.* foi baseada em Meyer e colaboradores<sup>65</sup>, Nascimento e colaboradores<sup>66</sup> e nas normas da CETESB-SP<sup>67</sup>.

#### 6.2.

##### Atividade antibacteriana

Foram realizados testes de atividade de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* sensíveis às fluorquinolonas, *in vitro*, para a levofloxacin, norfloxacin e a esparfloxacin e de seus complexos de Bi(III). Os testes foram realizados no Departamento de Química da UFMG, em colaboração com a **Profa. Heloísa Beraldo**. Os testes foram feitos de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS*.<sup>68</sup>

Previamente, os microorganismos foram cultivados em tubos de ensaio contendo o meio apropriado para o seu crescimento (*Agar Müller-Hinton*), por um período de 16 - 18 horas, a uma temperatura de incubação de 35 ± 2 °C.

Em seguida, os microrganismos tiveram suas concentrações medidas através da escala de *Mc. Farland*, utilizando um espectrofotômetro para ajuste das Unidades Formadoras de Colônia (UFC). De acordo com esta escala quando a absorvância, em dois comprimentos de onda fixos ( $\lambda = 530$  e  $625$  nm), está entre 0,08 e 0,1, podemos afirmar que temos  $10^8$  UFC.<sup>68</sup>

O caldo de *Müller-Hinton* foi utilizado como meio de primeira escolha para os testes de sensibilidade destes microrganismos de crescimento rápido. Este caldo apresenta uma boa reprodutibilidade entre lotes nos testes de sensibilidade, possui baixos teores de inibidores de sulfonamida, trimetoprim e tetraciclina e produz crescimento satisfatório da maioria dos patógenos. Além disso, há um grande acervo de dados e experiências sobre testes realizados com esse meio.

As massas apropriadas de cada composto foram pesadas, sendo dissolvidos em 3,0 mL de DMSO. A partir desta solução foram obtidas soluções de concentrações entre  $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mediante diluição com caldo a um volume final de 2,0 mL em cada tubo. As soluções dos compostos foram testadas, em triplicata, em séries de 10 diluições para cada um.

Para os ligantes, apenas uma série com 10 diluições foi realizada uma vez que o NCCLS<sup>68</sup> já disponibiliza as concentrações mínimas inibitórias de referência.

Seguidamente, os microrganismos foram colocados nas diferentes soluções de cada composto e nos controles e colocados na estufa, sendo incubados a  $37^\circ\text{C}$  em ar ambiente por um período de 12 horas. Verificou-se a inibição do crescimento das colônias dos microrganismos pela turvação das soluções contidas nos tubos. A inibição foi então medida através do tubo de maior concentração anterior ao qual houve turvação e comparado aos tubos dos ligantes que foram usados como controles.

### 6.3.

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

Os ensaios de toxicidade frente à *T.cruzi*, foram realizados no Laboratório de Biologia Celular da FIOCRUZ, em colaboração com a **Profa. Maria de Nazaré Correia Soeiro**. Os testes *in vitro* objetivaram verificar a ação das fluorquinolonas e seus complexos sobre as formas evolutivas relevantes para a infecção humana (formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas

intracelulares da cepa Y). A metodologia dos testes, bem como todos os materiais utilizados na preparação e obtenção das soluções estoque dos complexos, formas tripomastigotas dos parasitas, ensaios sobre as células mamárias e de toxicidade podem ser encontrados no trabalho já publicado por nosso grupo de pesquisa.<sup>63</sup>

#### 6.4.

##### **Toxicidade frente a algumas linhagens tumorais**

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

Maiores informações sobre os materiais e métodos deste ensaio, tais como: linhagens celulares e manutenção do cultivo celular; ensaio de viabilidade celular por ensaio de MTT; citometria de fluxo: avaliação das fases do ciclo celular e eletroforese em gel de agarose e análise estatística podem ser encontradas de forma detalhada no artigo já publicado.<sup>69</sup>

## 7

## Complexos de Au(III) de antibióticos da classe das fluorquinolonas: sínteses, estudos espectroscópicos e testes de atividade citotóxica

Nesse capítulo, inicialmente, descrevemos as caracterizações feitas para os três novos complexos de ouro(III) contendo levofloxacin (LEVO), norfloxacin (NOR) ou esparfloxacin (ESPAR) obtidos no presente trabalho. Em seguida, são relatados os resultados de estudos de absorção ótica, fluorescência estacionária e fluorescência resolvida no tempo para a norfloxacin e seu complexo de Au(III).

## 7.1.

### Dados de microanálises e condutividade

Os dados de microanálises, sugerem que em todos os complexos a relação metal:ligante é de 1:1 e que na estrutura há três átomos de cloro. As medidas de condutividade em dimetilformamida (DMF) indicam que os complexos obtidos são eletrólitos 1:1. Portanto, podemos sugerir que os complexos são do tipo  $[\text{AuCl}_2(\text{L})]\text{Cl}$ , onde L representa o ligante levofloxacin (LEVO), norfloxacin (NOR) ou esparfloxacin (ESPAR) coordenado de forma neutra ao ouro. Os dados de microanálises, de condutividade e faixa de decomposição são listados na Tabela 5.

Tabela 5. Dados de microanálises (valores calculados entre parênteses), condutividade ( $\Lambda$ ,  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) e faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ ) para os complexos de Au(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin.

	%C	%H	%N	$\Lambda^*$	Faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ )
$[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	31,05 (31,6)	2,95 (3,2)	5,96 (6,1)	89	190 – 210
$[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	29,02 (30,0)	3,14 (3,1)	6,16 (6,5)	102	150 – 200
$[\text{AuCl}_2(\text{ESPAR})]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	30,99 (31,9)	3,07 (3,3)	7,51 (7,8)	94	330**

\*Condutividade ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) medida em DMF; \*\*Não foi observada mudança na cor pois o complexo é muito escuro.

## 7.2.

### Espectroscopia na região do infravermelho

Nos espectros de infravermelho das fluorquinolonas livres, as bandas observadas na região entre 1719 e 1731  $\text{cm}^{-1}$ , foram atribuídas ao estiramento do ácido carboxílico livre.<sup>70, 71</sup> Essa banda não foi significativamente deslocada nos espectros dos complexos, indicando que o ácido carboxílico não deve estar coordenado ao Au(III). O modo vibracional  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , observado entre 1616 e 1634  $\text{cm}^{-1}$ , no espectro das fluorquinolonas livres<sup>70, 71</sup> também não foi deslocado significativamente nos espectros de seus respectivos complexos de ouro, indicando que esse grupo também não estaria participando da coordenação.

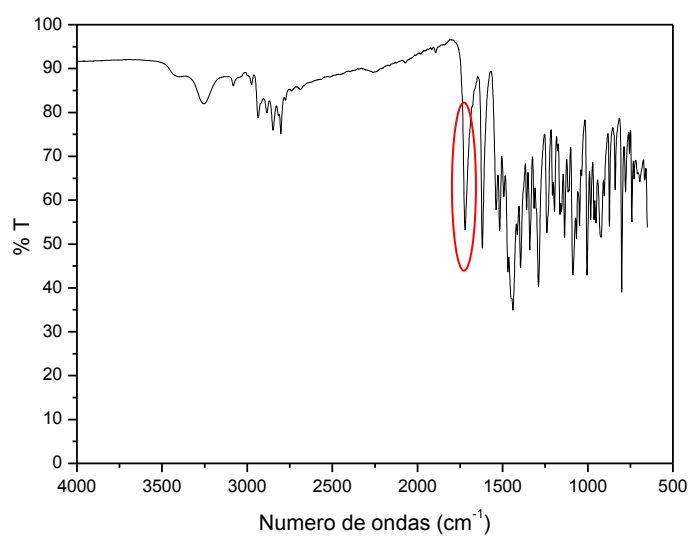
A Tabela 6 lista as atribuições das principais bandas do espectro de infravermelho das fluorquinolonas e de seus complexos de Au(III) e as Figuras 17, 18 e 19 mostram os espectros obtidos.

Tabela 6. Principais bandas do espectro de infravermelho das fluorquinolonas e de seus complexos de Au(III).

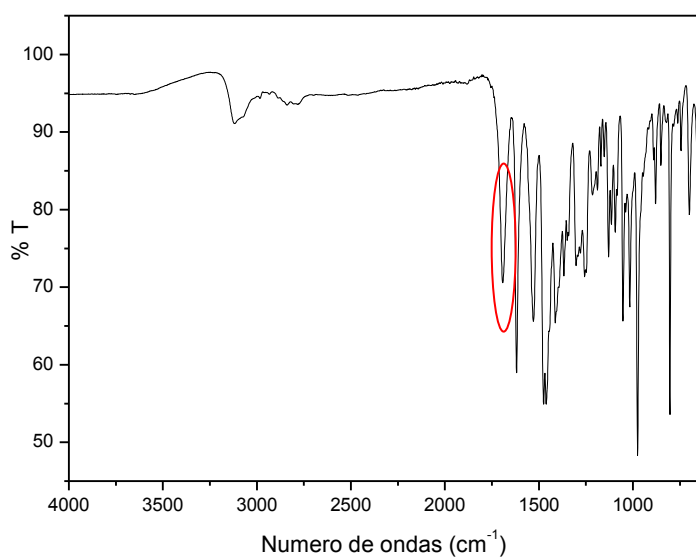
Compostos	$\nu(\text{COOH})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$
Levofloxacin	1727 F	1620 F
$[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$	1693 F	1618 F
Norfloxacin	1731 F	1616 F
$[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$	1705 F	1624 F
Esparfloxacin	1719 F	1634 F
$[\text{AuCl}_2(\text{ESPAR})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$	1676 F	1624 F

Legenda: F: forte; m: média; f: fraca.



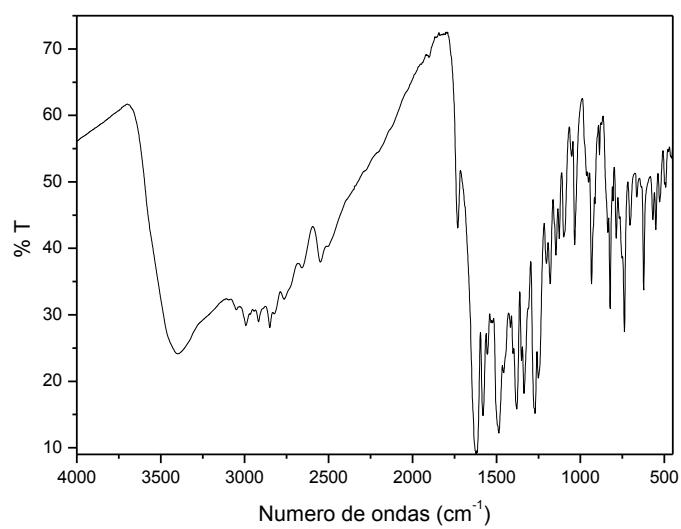


(a)

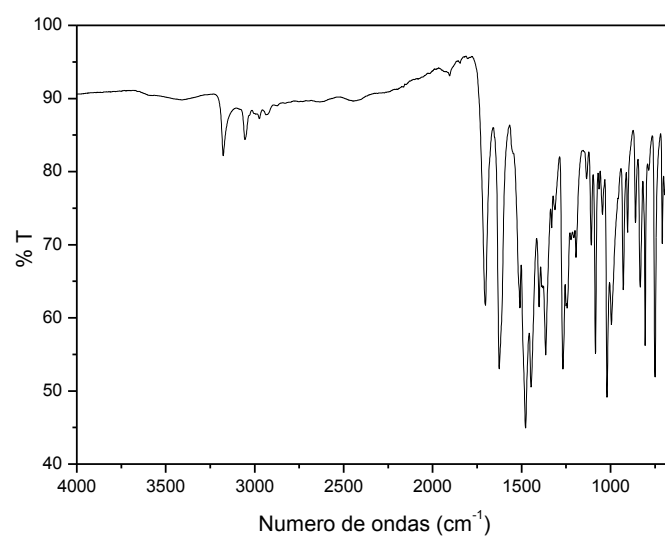


(b)

Figura 17. Espectros de IV (a) da levofloxacin e (b) de seu complexo de Au(III). Os círculos vermelhos destacam o estiramento  $\nu(\text{COOH})$ .

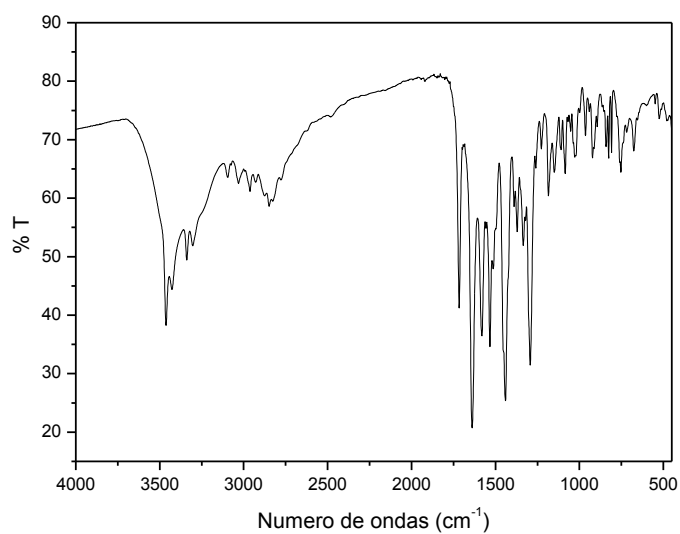


(a)

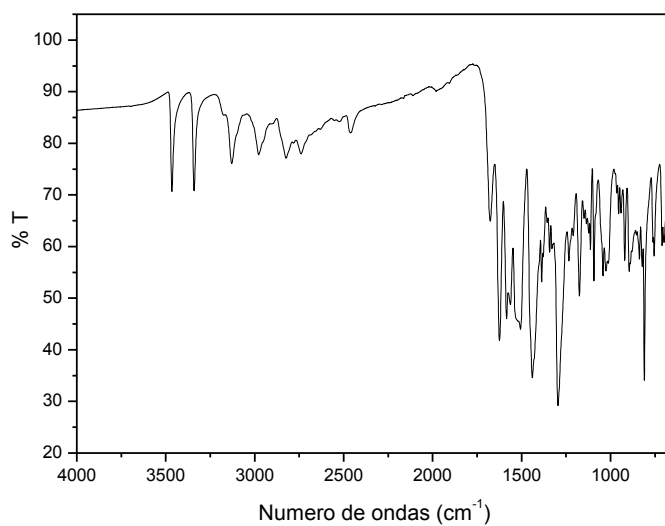


(b)

Figura 18. Espectros de IV (a) da norfloxacin e (b) de seu complexo de Au(III).



(a)



(b)

Figura 19. Espectros de IV (a) da esparfloxacina e (b) de seu complexo de Au(III).

Usualmente, as fluorquinolonas coordenam-se aos íons metálicos, de modo bidentado, através da carbonila do ácido carboxílico e da carbonila cetônica.<sup>34-42</sup> Outros membros de nosso grupo obtiveram complexos de Mn(II) e Co(II) de norfloxacin e esparfloxacin, do tipo  $[MCl_2(NOR)(H_2O)_2]$  e  $[MCl_2(ESPAR)(H_2O)_2]$ , nos quais M = Mn(II) ou Co(II) e NOR e ESPAR representam os ligantes norfloxacin e esparfloxacin coordenados aos íons

metálicos de forma neutra.<sup>72</sup> Nesses casos, a ausência da banda atribuída ao estiramento  $\nu(\text{COOH})$  nos espectros de infravermelho dos complexos, indica que as fluorquinolonas estão coordenadas aos íons metálicos de modo bidentado através do grupo carboxilato e da carbonila cetônica.<sup>70, 71</sup> A Figura 20 mostra, como exemplo, os espectros de infravermelho da norfloxacin e de seu complexo de  $\text{Mn(II)}$ . No entanto, no presente trabalho, tudo indica que a coordenação das fluorquinolonas ao  $\text{Au(III)}$  deu-se de outro modo, possivelmente através dos nitrogênios do anel piperazina.

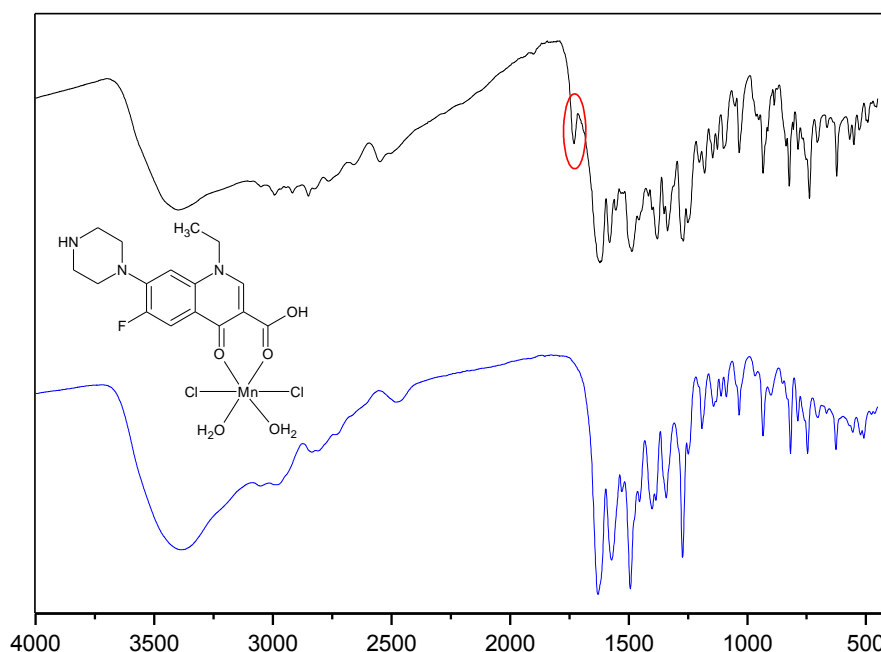


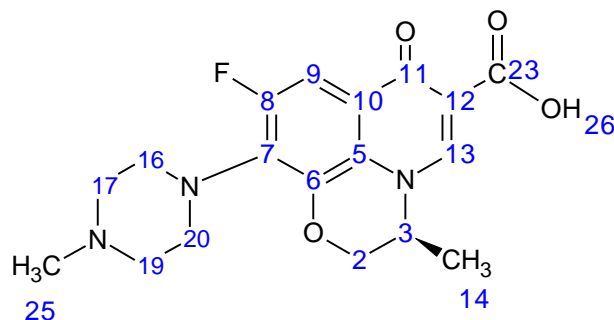
Figura 20. Espectros de IV da norfloxacin (—) e do complexo  $[\text{MnCl}_2(\text{NOR})(\text{H}_2\text{O})_2]$  (—). O círculo vermelho destaca o estiramento  $\nu(\text{COOH})$  em  $1732\text{ cm}^{-1}$ .<sup>72</sup>

### 7.3.

#### Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ )

Na Tabela 7 estão listados os sinais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e atribuições para a levofloxacin e seu complexo de  $\text{Au(III)}$ . Todas as atribuições foram confirmadas através de simulação dos espectros, utilizando o programa *ACD/Labs NMR Predictors*, dados não mostrados.

Tabela 7. Sinais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a levofloxacinina e seu complexo de Au(III) (DMSO- $d_6$ ).



Tipo De H	$\delta$		Tipo De C	$\delta$	
	Levofloxacinina	[AuCl <sub>2</sub> (LEVO)]Cl		Levofloxacinina	[AuCl <sub>2</sub> (LEVO)]Cl
H2	4,35(d)	4,41 (d)	C2	68,61	68,29
H2	4,58 (d)	4,61 (d)	C3	55,38	55,38
H3	4,91 (q)	4,94 (q)	C5	125,36	124,69
H9	7,53 (d*)	7,59 (d*)	C6	140,69	140,67
H13	8,94 (s)	8,98 (s)	C7	132,64	130,28
H14	1,45 (d)	1,47 (t)	C8	156,03	155,32
H17,H19	~2,45 (m)	~3,2 (m)	C9	103,85	103,20
H16,H20			C10	120,16	120,65
H17,H19	~3,3 (m)	~3,5 (m)	C11=O	176,93	176,32
H16,H20			C12	107,21	106,83
H25	2,22 (s)	2,88 (s)	C13	146,71	146,32
H26	~15 (s)	10,1 (s)	C14	18,48	17,92
			C16,C20	55,85	53,98
			C17,C19	50,63/50,71	47,53
			C23=O	166,61	165,86
			C25	46,62	42,42

(\*)acoplamento do hidrogênio com o flúor ( $^3\text{J}$ ).

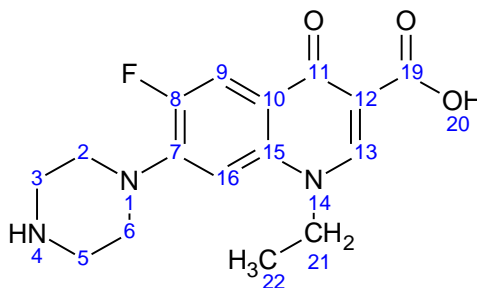
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da levofloxacinina livre, o sinal dos hidrogênios do anel piperazina, *H16,H20* e *H17,H19*, são observados em  $\delta$ 2,45 e  $\delta$ 3,3. O singlete em  $\delta$ 8,94 foi atribuído a *H13*. O dubleto em  $\delta$ 7,53 foi atribuído a *H9*. O dubleto em  $\delta$ 1,45 a *H14* e o quarteto em  $\delta$ 4,91 a *H3*. Os sinais de COOH foram atribuído em ~15ppm. No espectro do complexo de Au(III), observa-se um pequeno deslocamento dos hidrogênios do anel piperazina, *H16,H20* e *H17,H19*, com relação à levofloxacinina livre.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da levofloxacin livre, os carbonos do anel piperazina C16,C17,C19 e C20 estão localizados na faixa entre  $\delta 50,63$  e  $\delta 55,85$ . Os sinais das carbonilas C11=O e C23=O são observados em  $\delta 176,93$  e  $\delta 166,61$ , respectivamente, e o sinal de C7 em  $\delta 132,64$ . Pela complexação, os sinais dos carbonos ligados aos nitrogênios (C16,C17,C19 e C20) deslocam-se para menores frequências, com diferenças de aproximadamente 2 ppm, no caso de C16,C20 e de 3 ppm para C17 e C19. Por outro lado, as carbonilas cetônica (C11=O) e carboxílica (C23=O) não são afetadas pela coordenação.

Esses resultados reforçam aqueles obtidos por infravermelho, de que as carbonilas cetônica e carboxílica não participam da coordenação e sugerem que a coordenação do Au(III) à levofloxacin ocorre pelos dois nitrogênios do grupo piperazina.

Na Tabela 8 estão listados os sinais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e atribuições para a norfloxacin e seu complexo de Au(III). Todas as atribuições foram confirmadas através de simulação dos espectros, utilizando o programa *ACD/Labs NMR Predictors*, dados não mostrados.

Tabela 8. Sinais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a norfloxacin e seu complexo de Au(III) (DMSO- $d_6$ ).



Tipo de H	$\delta$		Tipo de C	$\delta$	
	Norfloxacin	[AuCl <sub>2</sub> (NOR)]Cl		Norfloxacin	[AuCl <sub>2</sub> (NOR)]Cl
H2,H6	2,89	3,33	C2,C6	50,71 50,80	46,47 46,56
H3,H5	3,22	3,54	C3,C5	45,35	42,70
H9	7,86(d)*	7,91(d)*	C7	146,00	144,30
H13	8,92 (s)	8,93 (s)	C8	152,88	152,68
H16	7,12 (d)	7,23 (d)	C9	111,07	111,35
H21	4,57 (q)	4,60 (q)	C10	118,95	119,93
H22	1,41 (t)	1,42 (t)	C11=O	176,09	176,08
N-H4			C12	107,00	107,14
COOH			C13	148,37	148,59
			C15	137,20	137,05
			C16	105,46	106,43
			C19=O	166,11	165,97
			C21	49,00	49,10
			C22	14,29	14,46

\*acoplamento do hidrogênio com o flúor ( $^3\text{J}$ )

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da norfloxacin livre o sinal dos hidrogênios do anel piperazina, *H2,H6* e *H3,H5*, são observados em  $\delta$ 2,89 e  $\delta$ 3,22, respectivamente. Os dubletos em  $\delta$ 7,86 e  $\delta$ 7,12 foram atribuídos, respectivamente, a *H9* e *H16*. O singlete em  $\delta$ 8,29 foi atribuído a *H13*, o tripleto em  $\delta$ 1,41 a *H22* e o quarteto em  $\delta$ 4,57 a *H21*. Os sinais de N-*H4* e COOH não puderam ser atribuídos. No espectro do complexo de Au(III) observa-se um pequeno deslocamento dos hidrogênios do anel piperazina, *H2,H6* e *H3,H5*, com relação à norfloxacin livre.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da norfloxacin livre os carbonos do anel piperazina C2,C3,C5 e C6 estão localizados na faixa entre  $\delta$ 45,35 e  $\delta$ 50,80. Os

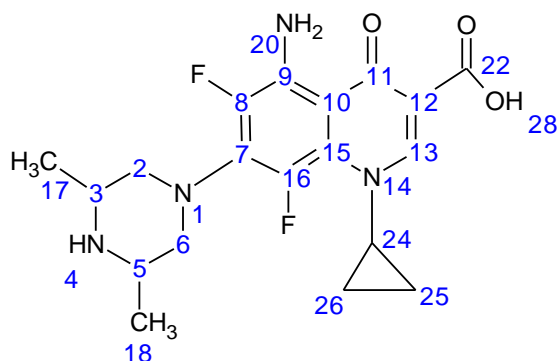
sinais das carbonilas  $C11=O$  e  $C19=O$  são observados em  $\delta 176,09$  e  $\delta 166,11$ , respectivamente, e o sinal de  $C7$  em  $\delta 146,00$ . Pela complexação, os sinais dos carbonos ligados aos nitrogênios ( $C2, C3, C5, C6$  e  $C7$ ) deslocam-se para menores frequências, com diferenças de aproximadamente 2 ppm, no caso de  $C3, C5$  e  $C7$  e de 3 ppm para  $C2$  e  $C6$ . Por outro lado, as carbonilas cetônica ( $C11=O$ ) e carboxílica ( $C19=O$ ) não são afetadas pela coordenação.

Esses resultados reforçam aqueles obtidos por infravermelho, de que as carbonilas cetônica e carboxílica não participam da coordenação e sugerem que a coordenação do  $Au(III)$  à norfloxacin ocorre pelos dois nitrogênios do grupo piperazina<sup>73</sup>.

Na Tabela 9 estão listados os sinais dos espectros de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  e atribuições para a esparfloxacin e seu complexo de  $Au(III)$ . Todas as atribuições foram confirmadas através de simulação dos espectros, utilizando o programa ACD/Labs NMR Predictors, dados não mostrados.



Tabela 9. Sinais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a esparfloxacina e seu complexo de Au(III) ( $\text{DMSO-d}^6$ ).



Tipo De H	$\delta$		Tipo de C	$\delta$	
	Esparfloxacina	$[\text{AuCl}_2(\text{ESPAR})]\text{Cl}$		Esparfloxacina *	$[\text{AuCl}_2(\text{ESPAR})]\text{Cl}$
H2,H6	2,69 (t)	3,16 (t)	C2, C6	57,59	53,07(?)
H3,H5	2,83 (t) 3,23 (d)	3,5 (m)	C3, C5	50,90	51,73 (?)
H4,H20, H28	7,22 (s)	~7,3 (sinal largo)	C7	136,36	135,75
H13	8,47 (s)	8,47(s)	C8	128,26/128,3 8	130,28
H17,H18	0,96/0,99 (d)	1,24/1,27 (d)	C9	? 105,03/105,6	136,33 (?) 105,81/105,65
H24	4,0 (alarg.)	3,98 (alarg.)	C10	4 (?)	
H25,H26	1,06(m)	1,11 (m)	C11=O	165,67	165,30
			C11=O		179,64
			C12		
			C13	(?)	
			C15		132,53
				140,83/141,7	137,09
			C16	2 (?)	
			C17,C18	19,20	15,56
			C22=O	150,17	150,07
			C24	N.OBS.	40,60
			C25,C26	8,53/8,68	8,49/8,65

\* Espectro com muito ruído (baixíssima qualidade).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da esparfloxacina livre, os sinais dos hidrogênios do anel piperazina, *H2,H6* e *H3,H5*, são observados em  $\delta 2,69$ ,  $\delta 2,83$  e  $\delta 3,23$ , respectivamente. O singlete em  $\delta 8,47$  foi atribuído a *H13*. O multiplete

em  $\delta 1,06$  foi atribuído aos  $H_{25}$  e  $H_{26}$  e o alargamento em  $\delta 4,00$  a  $H_{24}$ . Os sinais de  $N-H_4$ ,  $N-H_{20}$  e  $COOH$  foram atribuídos em  $\delta 7,22$ .

No espectro do complexo de  $Au(III)$  observa-se um pequeno deslocamento dos hidrogênios do anel piperazina,  $H_{2,H6}$  e  $H_{3,H5}$ , com relação à esparfloxacina livre.

No espectro de RMN de  $^{13}C$  da esparfloxacina livre, os carbonos do anel piperazina  $C_2, C_3, C_5$  e  $C_6$  estão localizados na faixa entre  $\delta 50,90$  e  $\delta 57,59$ . Os sinais das carbonilas  $C_{11}=O$  e  $C_{22}=O$  são observados em  $\delta 165,67$  e  $\delta 150,17$ , respectivamente, e o sinal de  $C_7$  em  $\delta 136,36$ . Pela complexação, os sinais dos carbonos ligados aos nitrogênios ( $C_2, C_3, C_5, C_6$  e  $C_7$ ) deslocam-se para menores frequências, com diferenças de aproximadamente 1 ppm, no caso de  $C_3, C_5$  e  $C_7$  e de 4,5 ppm para  $C_2$  e  $C_6$ . Por outro lado, as carbonilas cetônica ( $C_{11}=O$ ) e carboxílica ( $C_{22}=O$ ) não são afetadas pela coordenação.

Os resultados de RMN para os ligantes livres e seus complexos, apresentados nas tabelas 7, 8 e 9 reforçam aqueles obtidos por infravermelho, de que as carbonilas cetônica e carboxílica não participam da coordenação e sugerem que a coordenação do  $Au(III)$  à esparfloxacina ocorre pelos dois nitrogênios do grupo piperazina, nos três casos.

Por outro lado, esses resultados são diferentes daqueles obtidos por Refat.<sup>29</sup> Nos complexos obtidos neste trabalho, o ouro se coordena através dos dois nitrogênios da piperazina a um único ligante, enquanto a pesquisa citada mostra o ouro se coordenando a dois ligantes (NOR) através de um nitrogênio da piperazina de cada norfloxacina, como pode ser observado na Figura 7. Esta diferença pode ser explicada pela diferença nos sais de partida das sínteses, utilizados em cada pesquisa. Enquanto neste trabalho optamos pelo  $HAuCl_4$  a referência citada faz uso do sal  $KAuCl_4$ .

#### 7.4.

##### Titulação da Norfloxacin com $Au(III)$

As soluções catiônica, zwitteriônica e aniônica de norfloxacin, pH de 4,0, 7,5 e 10,6, respectivamente, foram tituladas com cloreto de ouro(III),  $HAuCl_4$ . Os espectros de absorção no UV-visível, emissão de fluorescência em estado estacionário e decaimentos da fluorescência foram medidos.

#### 7.4.1.

##### Absorção UV-vis da Titulação da Norfloxacin com Au(III)

A Figura 21 apresenta o espectro de absorção UV-Vis da NOR titulada com diferentes concentrações de  $\text{HAuCl}_4$ . Na ausência de ouro, o espectro tem uma banda em 285 nm (região I) e duas bandas parcialmente superpostas, menos intensas, em 322-335 nm (região II). O espectro de  $\text{HAuCl}_4$  é também apresentado na Figura 21, representado pela linha pontilhada nos três gráficos. Observa-se que o espectro de absorção resultante é muito semelhante a uma superposição dos espectros da NOR e  $\text{HAuCl}_4$ , indicando que a absorção UV-Vis da NOR sofre pouca modificação com a interação com o Au(III).

No pH 7,5 e 4,0, não há absorção na região visível, Figura 21 (a e b). Em pH alcalino, contudo, em concentrações de ouro maiores do que  $\sim 30 \mu\text{M}$ , a solução torna-se ligeiramente azul, e uma banda larga, pouco intensa, centrada em  $\sim 550 \text{ nm}$  aparece, Figura 21 (c). Isto é característico de nanopartículas de ouro agregadas<sup>80</sup>. Geralmente, as nanopartículas de ouro são produzidas em um líquido pela redução do ácido ( $\text{HAuCl}_4$ ). O diâmetro das nanopartículas de ouro e/ou agregados determina o comprimento de onda da luz absorvida e, portanto, a cor das soluções de nanopartículas. A cor também depende do pH e força iônica da solução. A interação das nanopartículas de ouro com a NOR não serão tratadas neste trabalho.

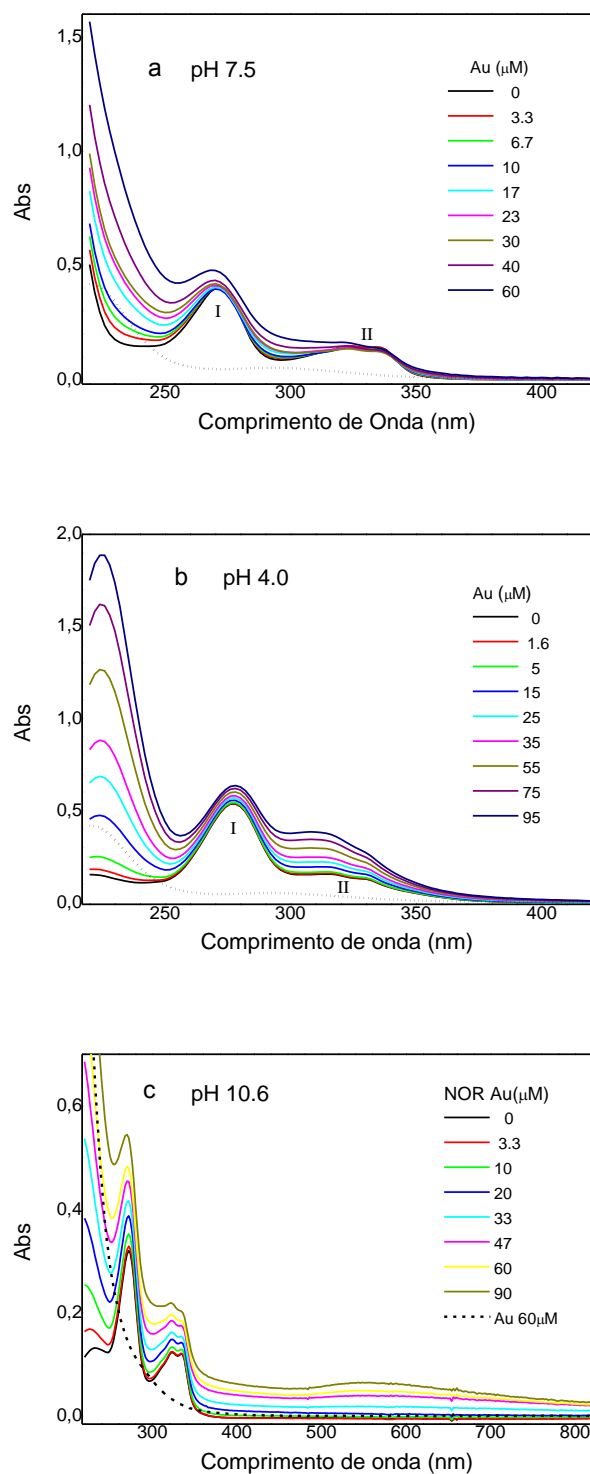


Figura 21. Espectros de absorção da norfloxacin (10  $\mu\text{M}$ ) titulada com  $\text{HAuCl}_4$  em (A) pH 7,5, (B) pH 4,0 e (C) pH 10,6. O espectro do  $\text{HAuCl}_4$  aparece nas três figuras como linhas pontilhadas (20  $\mu\text{M}$  em A e B; 60  $\mu\text{M}$  em C).

### 7.4.2.

#### Fluorescência Estacionária da Titulação da Norfloxacin com Au(III)

A norfloxacin zwitteriônica (pH 7,5) possui o pico de emissão de fluorescência em 407 nm com um rendimento quântico de  $0,10^{81}$ . A Figura 22 mostra o efeito da  $\text{HAuCl}_4$  sobre a emissão de fluorescência da NOR zwitteriônica. Isso mostra que concentrações crescentes de ouro (III) causam diminuição da fluorescência combinada com um pequeno deslocamento para o vermelho, de 407 a 412 nm, com 60  $\mu\text{M}$  de Au(III). A mudança da fluorescência em 407 nm, ( $F_0 - F$ ), foi plotada em função da concentração de Au(III) (inserção na Figura 22) e os dados foram ajustados para a expressão exata para o modelo de um sítio de ligação<sup>82</sup>, de acordo com a equação (1):

$$F_0 - F = \frac{F_0 - F_\infty}{2} \left\{ \left( 1 + \frac{c_M}{c_L} + \frac{1}{K_b c_L} \right) - \left[ \left( 1 + \frac{c_M}{c_L} + \frac{1}{K_b c_L} \right)^2 - 4 \frac{c_M}{c_L} \right]^{1/2} \right\} \quad (1)$$

onde  $K_b$  é a constante de ligação,  $c_L$  e  $c_M$  são as concentrações totais do ligante (NOR) e metal (Au), respectivamente;  $F_0$  é a intensidade da fluorescência do ligante na ausência de metal,  $F$  é a intensidade da fluorescência do ligante a uma dada concentração de metal,  $F_\infty$  é a intensidade da fluorescência do ligante com  $c_M \gg c_L$ , respectivamente.

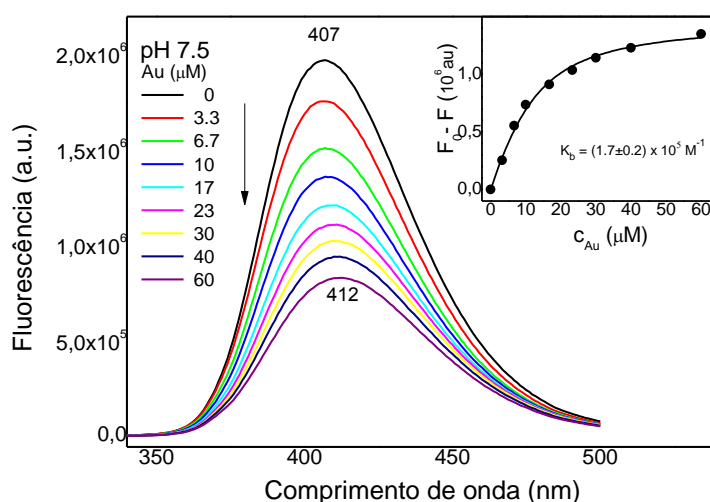


Figura 22. Espectro de fluorescência da norfloxacin (10  $\mu\text{M}$ ), em pH 7,5 titulado com  $\text{HAuCl}_4$ . A seta representa o aumento das concentrações de ouro. Inserção: fluorescência desloca de 407 nm em função da concentração de Au(III). Ajuste de um sítio de ligação, com  $K_b = 1,7 (\pm 0.2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

O ajuste não-linear foi de  $K_b^{zw} = 1,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  (linha sólida na inserção da Figura 22), onde zw se refere à NOR zwitteriônica.

A Norfloxacin catiônica (pH 4,0) tem um pico de emissão de fluorescência em 442 nm com um rendimento quântico de  $0,12^{81}$ . A titulação da NOR com  $\text{HAuCl}_4$  em pH 4,0 produziu uma diminuição da fluorescência muito menor do que no pH 7,5, além disso o pico não sofreu deslocamento (Figura 23).

É impossível estimar  $F_\infty$  a partir dos dados na Figura 23 mas é possível estimar a constante de ligação, em pH 4,0, usando a equação de Stern-Volmer, equação (2), para ajustar os dados de supressão de fluorescência, a partir do gráfico de Stern-Volmer.

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

Na supressão estática, a constante de supressão de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) é, na realidade, a própria constante de ligação  $K_b$ .<sup>82</sup>

A inserção na Figura 23 mostra o gráfico de Stern-Volmer para a NOR, em pH 4,0, e o ajuste linear usando a Eq. (2), resultando numa  $K_{SV}$  de  $2,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . É interessante notar que a Eq. (1) também ajustou os dados com  $K_b^{cat} = 2,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , quando assumimos completa supressão em altas concentrações de  $\text{Au(III)}$ , isto é,  $F_\infty = 0$ .

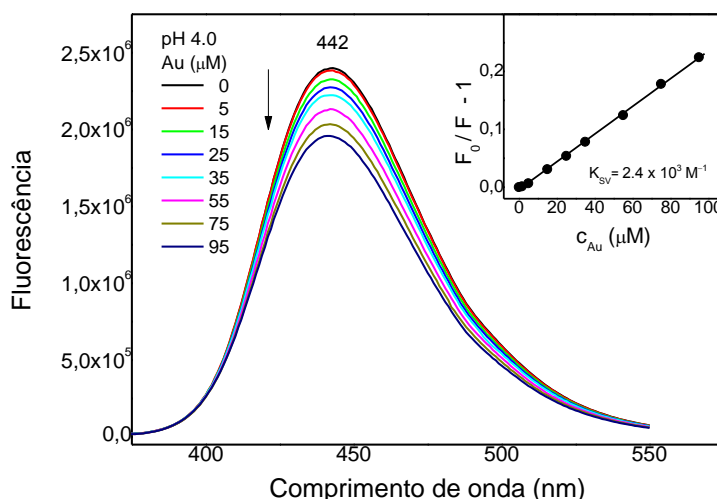


Figura 23. Espectros de fluorescência da norfloxacin (10  $\mu\text{M}$ ) em pH 4,0 titulada com  $\text{HAuCl}_4$ . A seta indica aumento na concentração de Au. Inserção: Gráfico de Stern-Volmer para a fluorescência em 442 nm, e ajuste linear com a constante de Stern-Volmer  $K_{SV} = 2,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

A constante de ligação do Au(III) com NOR catiônica (pH 4,0) é, portanto, cerca de 70 vezes menor do que com a NOR zwitteriônica (pH 7,5). Sabendo que a amina N4 está protonada nos dois pH's (4,0 e 7,5), esta não pode ser responsável pelas diferentes constantes de ligação do Au(III). Isto sugere que o íon Au(III) coordena com o íon carboxilato da NOR zwitteriônica para formar o complexo. A associação constante a este sítio é  $1,7 (\pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

Finalmente, a NOR foi titulada com  $\text{HAuCl}_4$  em pH 10,6. Os resultados de fluorescência são apresentados na Figura 24. NOR em pH 10,6 é quase não-fluorescente na ausência de íons Au(III). O rendimento quântico da fluorescência da NOR é insignificante quando a amina N4 está desprotonada e a intensidade pequena de fluorescência é devido, provavelmente, à pequena fração de moléculas com amina catiônica em pH 10,6 (~ 1%).

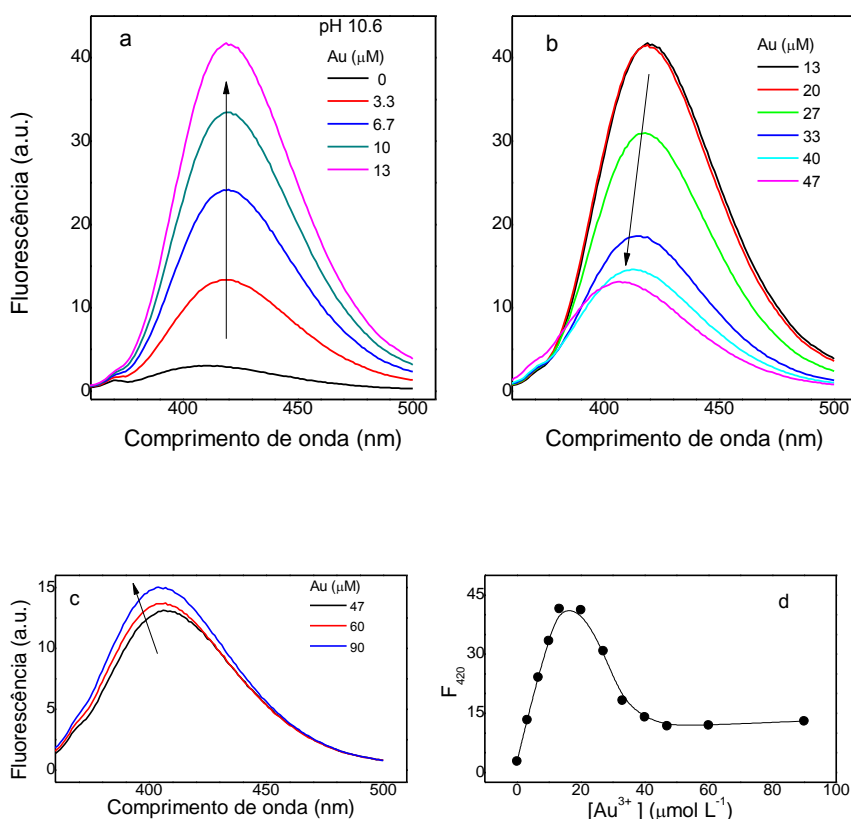


Figura 24. Espectros de fluorescência da NOR em pH 10,6 e com diferentes concentrações de  $\text{HAuCl}_4$ : (A) 0 - 13  $\mu\text{M}$ ; (B) 13 - 47  $\mu\text{M}$ ; (C) 47 - 90  $\mu\text{M}$ . As setas indicam o aumento da concentração de Au(III). (D) gráfico da intensidade da fluorescência, em 420 nm x concentração de Au(III).

Neste pH 10,6 foram detectadas três fases com o aumento da concentração de Au(III) (Figura 24). Em concentrações menores que a

concentração de NOR, o pico de fluorescência, em 420 nm, aumenta quase linearmente (a). A segunda fase é caracterizada por uma diminuição de fluorescência combinada com um deslocamento para o azul, para 407 nm (b). Finalmente, em concentrações de ouro superiores a 50  $\mu\text{M}$ , é notado um pequeno aumento acompanhado um deslocamento adicional azul (c).

A Figura 24 (d) mostra o gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração de Au(III), no qual aparecem claramente as três fases. A Figura 25 mostra a primeira fase e a curva correspondente ao ajuste com a expressão para um sítio de ligação, Eq (1), com  $K_b = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ .

A partir do aumento no rendimento de fluorescência, concluímos que o local de maior afinidade para Au(III) envolve a amina N4 da piperazina, que nesse pH encontra-se desprotonada. A NOR recupera, em parte, a fluorescência após a complexação com Au(III) nesta posição. O rendimento quântico do complexo, no entanto, é cerca de cinco vezes menor do que no pH 7,5. Como a N4 da NOR permanece desprotonada em solventes apolares, pode-se concluir também que, na maioria dos solventes orgânicos, o ouro se coordena à piperazina, de acordo com o local proposto por Refat<sup>29</sup>.

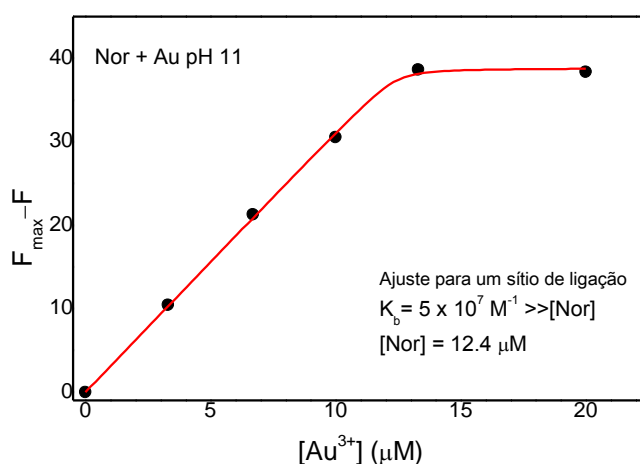


Figura 25. Mudança na fluorescência da NOR, 420 nm em pH 10,6, após titulação com  $\text{HAuCl}_4$ . A linha representa o ajuste da expressão de ligação a um único sítio, usando a Eq. (1) com  $K_b = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  e  $[\text{NOR}] = 12,4 \mu\text{M}$ .

É importante observar que, quando a afinidade é grande (ou seja,  $K_b \cdot C_L \gg 1$ ), a constante  $K_b$  determinada através do ajuste pela Eq. (1) será imprecisa, pois a curva de titulação será composta de dois segmentos de linha reta. Este é, justamente, o caso dos dados na Figura 25, onde o elevado valor de



$K_b$  deve ser considerado apenas um limite inferior para a constante de ligação de Au(III) com o grupo piperazinil desprotonado da NOR.

A segunda fase observada na Figura 24 (b), associada a uma diminuição da fluorescência, está em acordo com a ligação de Au(III) a um segundo sítio. Esse é, provavelmente, o sítio contendo o ânion carboxilato, já que a diminuição da fluorescência ocorreu na mesma faixa de concentração de ouro que, em pH 7,5, correspondeu à ligação ao carboxilato.

A última fase ocorre após a ligação de dois íons Au(III) com uma molécula de NOR. As modificações da fluorescência são muito pequenas. Esta fase está fora do escopo deste trabalho, pois diz respeito à formação de nanopartículas de ouro, Figura 24 (c).

#### 7.4.3.

#### Fluorescência resolvida no tempo da titulação da norfloxacin com Au(III)

Decaimentos de intensidade de fluorescência de norfloxacin foram medidos utilizando o método de contagem de fótons. Decaimentos de intensidade no pH 7,5, 4,0 e 10,6 são apresentadas na Figura 26. Os tempos de vida obtidos a partir de ajustes exponenciais são apresentados na Tabela 10.

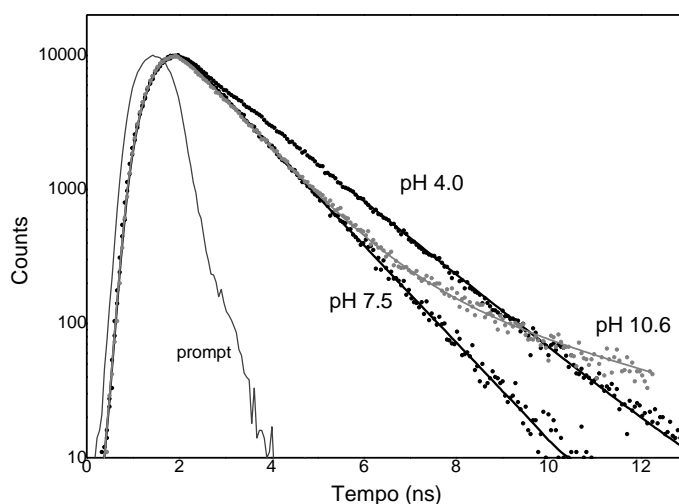


Figura 26. Decaimento da intensidade da norfloxacin, em pH 7,5, 4,0, e 10,6 (dados TCSPC). Excitação em 330 nm. Emissão em 407 nm (pH 7,5 e 10,6) e 440 nm (pH 4,0).

O decaimento em pH 7,5 foi ajustado utilizando uma única exponencial com uma constante de tempo  $\tau_1 = \tau_{zw} = 1,15$  ns. O decaimento em pH 4,0 foi ajustado com uma expressão bi-exponencial. O tempo de vida principal  $\tau_1 = \tau_{cat} = 1,58$  ns (contribuição fracionária,  $F_{CAT} = 91\%$ ) é devido a NOR catiônica.

Tabela 10. Tempo de vida  $\tau_1$  e  $\tau_2$  da fluorescência da norfloxacin. Fatores  $f_1$  e  $f_2$  são contribuições fracionárias no comprimento de onda de emissão.

pH	$\tau_1$ (ns)	$f_1$	$\tau_2$ (ns)	$f_2$
4,0	1,58	91	0,55	9
7,5	1,15	100		
10,6	1,15	90	4,6	10

É possível que o menor tempo de vida (0,55 ns) seja devido a uma pequena proporção de outras espécies, uma vez que dois outros átomos de nitrogênio da NOR podem se protonar neste pH. Finalmente, em pH 10,6, uma expressão bi-exponencial também foi necessária para ajustar o decaimento. O tempo de vida principal foi  $\tau_{zw} = 1,15$  ns, devido à pequena quantidade de NOR zwitteriônica presente neste pH, uma vez que a NOR aniônica tem fluorescência insignificante. O outro tempo de vida (4,6 ns, com a contribuição fracionária de 10%) aparece por causa do longo tempo de aquisição devido à fluorescência muito baixa neste pH.

O efeito de Au(III) sobre o decaimento da NOR também foi dependente do pH. Em pH 7,5 uma análise global foi realizada utilizando uma expressão bi-exponencial, com um tempo de vida fixo  $\tau_{zw} = 1,15$  ns. A contribuição do segundo tempo de vida,  $\tau_2 = 2,42$  ns, aumenta com o aumento da concentração de ouro (Tabela 11). Este tempo de vida é devido ao complexo formado pelo Au(III) coordenado ao carboxilato da NOR zwitteriônica.

Tabela 11. Tempos de vida da fluorescência da norfloxacin titulada com Au(III) no pH 7,5 obtidos por análise global.  $\tau = 1,15$  ns fixo;  $\tau_2 = 2,53$  ns.  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  são os fatores pré exponenciais;  $f_1$  e  $f_2$  são as contribuições fracionárias no comprimento de onda de emissão.

[Au]	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$f_1(\%)$	$f_2(\%)$
0	0,995	0,005	99,0	1,0
5	0,991	0,009	98,0	2,0
10	0,986	0,014	97,0	3,0
20	0,981	0,019	95,8	4,2
30	0,971	0,029	93,9	6,1
50	0,964	0,036	92,5	7,6
100	0,941	0,059	87,8	12,2

O efeito do Au(III) no decaimento da NOR, em pH 4,0, também foi analisado utilizando análise global, mas uma expressão de três exponenciais foi necessária: dois tempos de vidas foram fixados,  $\tau_1 = 1,58$  ns e  $\tau_2 = 0,55$  ns (os quais apareceram na ausência de ouro), e  $\tau_3 = 6,07$  ns foi ajustado aos decaimentos (Tabela 12). A contribuição deste terceiro tempo de vida é muito pequena, mas aumenta com o aumento da concentração de Au(III).

Tabela 12. Tempos de vida da fluorescência da norfloxacin titulada com Au(III) no pH 4,0 obtidos por análise global.  $\tau_1 = 1,58$  ns fixado;  $\tau_2 = 0,55$  ns fixado,  $\tau_3 = 6,07$  ns.  $\alpha_i$  são os fatores pré exponenciais;  $f_i$  são as contribuições fracionárias no comprimento de onda de emissão, com  $i = 1, 2, 3$  e  $f_i = \alpha_i \cdot \tau_i$ .

[Au]	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$f_1$	$f_2$	$f_3$
0	0,885	0,114	0,000	<b>96,0</b>	3,8	0,2
1.7	0,866	0,132	0,001	<b>94,5</b>	5,0	0,5
4.5	0,866	0,132	0,002	<b>94,2</b>	4,8	1,0
15	0,864	0,133	0,003	<b>93,8</b>	5,0	1,2
25	0,864	0,132	0,005	<b>93,2</b>	4,9	1,9
35	0,860	0,133	0,007	<b>92,2</b>	5,0	2,8
45	0,859	0,132	0,009	<b>91,6</b>	4,8	3,6
65	0,857	0,132	0,011	<b>90,5</b>	4,9	4,6
85	0,841	0,141	0,018	<b>87,9</b>	5,0	7,1

O decaimento de fluorescência da NOR titulada com ouro, em pH 10,6 correspondente à primeira fase, Figura 27, a ligação a amina da N4, são todos muito semelhantes. Um ajuste global omitindo o *prompt* resultou num único tempo de vida  $\tau_{\text{AuNF}} = 1,52$  ns. Assim, este é o tempo de vida do complexo  $\text{Au(III)(NOR}^-)$  com o ouro ligado no anel piperazinil. Este tempo de vida não muda em concentrações mais altas de ouro (segunda fase) sugerindo supressão estática de fluorescência ao se ligar ao segundo ion  $\text{Au(III)}$  no sítio envolvendo o 3-carboxi- e 4 oxo átomos de oxigênio.

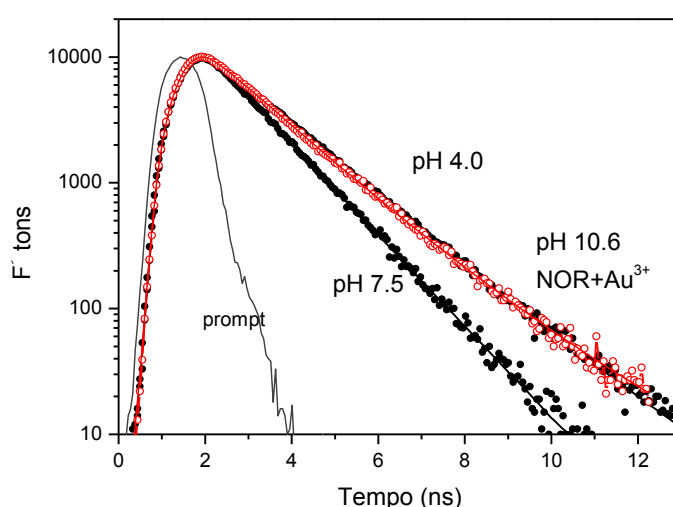


Figura 27. Decaimento da fluorescência:  $\text{Au(III)NOR}$ , em pH 10,6 (símbolo vazado, vermelho) comparado com o decaimento da NOR pura em pH 7,5 e 4,0. Concentração  $[\text{Au(III)}]/[\text{NOR}] = 1,3$ . Excitação em 330 nm; emissão em 420 nm (pH 10,6), 407 nm (pH 7,5), e 440 nm (pH 4,0).

## 7.5.

### Toxicidade dos complexos de $\text{Au(III)}$ frente a algumas linhagens antitumorais

A maior busca da química medicinal na terapia anticâncer é a síntese de novos compostos que interagem com o ácido desoxirribonucléico (ADN). Como já exposto anteriormente, algumas fluorquinolonas e vários complexos de  $\text{Au(III)}$  são agentes inibidores de diferentes células tumorais. A associação das fluoroquinolonas e do íon metálico  $\text{Au(III)}$  pode ser uma boa estratégia para a síntese de novos agentes citotóxicos.

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

A Tabela 13 lista os valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) obtidos para os complexos de Au(III) frente às linhagens tumorais A20, B16-F10 e K562 e as linhagens sadias MCR-5 e L919.

Tabela 13. Concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) dos complexos de Au(III) frente a linhagens tumorais e sadia.

Compostos	$IC_{50}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )				
	Células não tumorais		Células tumorais		
	MRC-5	L919	B16-F10	A20	K562
$[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ( <b>1</b> )	$53 \pm 13$	$106 \pm 21$	$29 \pm 9$	$49 \pm 8$	$50 \pm 10$
$[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ( <b>2</b> )	$65 \pm 13$	$45 \pm 4$	$27 \pm 15$	$25 \pm 8$	$55 \pm 10$
$[\text{AuCl}_2(\text{ESPAR})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ( <b>3</b> )	$126 \pm 18$	$65 \pm 4$	$45 \pm 7$	$48 \pm 0,3$	$61 \pm 4$

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

O complexo (**1**) apresentou valores de  $IC_{50}$  de 106 e 53  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, para as linhagens sadias L919 e MRC-5. Para a linhagem B16-F10, a concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) foi de 29  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , ou seja, quase duas vezes menor que a da MRC-5. Para as linhagens K562 e A20, as concentrações inibitórias foram de 50 e 49  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores não são estatisticamente significativos, quando comparados com a linhagem sadia MRC-5. No entanto, para a linhagem L919, os valores de  $IC_{50}$  são menores que o da linhagem sadia.

Para as linhagens sadias L919 e MRC-5, o complexo (**2**) apresentou valores de  $IC_{50}$  de 45 e 65  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Frente às linhagens tumorais B16-F10 e A20, observou-se, para esse complexo, que foram necessárias concentrações inibitórias menores que a metade, quando comparadas às linhagens sadias ( $IC_{50}$  de 27 e 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Para a linhagem

K562, a  $IC_{50}$  foi da mesma ordem de grandeza das linhagens controle ( $55\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Para as linhagens sadias L919 e MRC-5, o complexo **(3)** apresentou valores de  $IC_{50}$  de 65 e  $126\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Já para as linhagens tumorais, o composto apresentou uma maior atividade inibitória frente às linhagens B16-F10 e A20, com concentrações inibitórias de 45 e  $48\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Dos três complexos analisados no teste de MTT, o mais promissor foi o  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  e com ele fez-se outros testes para caracterizar a ação de mecanismo de morte e ciclo celular do composto.

O Ciclo celular é um processo fundamental para compreender os mecanismos de do crescimento do tumor. Os resultados obtidos a partir de testes do ciclo celular mostra que o composto  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  (2) interferiu com a cinética celular, levando a um aumento do número de células na fase G0 / G1 e diminuiu o número de células na fase G2/M quando comparado com o controle negativo.

Além disso, um aumento do número de células na fase sub-G1 também foi observado e é um indicativo de apoptose. A interferência do complexo **(1)** nas fases do ciclo das células tumorais, indica que este composto está agindo como droga específica do ciclo celular.

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção dos seres vivos, uma vez que tem a função de eliminar as células defeituosas. Uma característica importante do tumor células é a resistência à apoptose de mecanismos naturais.<sup>83</sup>

Como pode ser observado na Figura 28, o composto  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  apresenta significativa atividade apoptótica em células K562 e sua ação é dependente da concentração, levando a um aumento na apoptose à medida que a concentração do complexo é aumentada.

O tratamento com o complexo na concentração de  $50\mu\text{mol L}^{-1}$  provocou um aumento de apoptose em proximadamente 53%.

## Ciclo celular

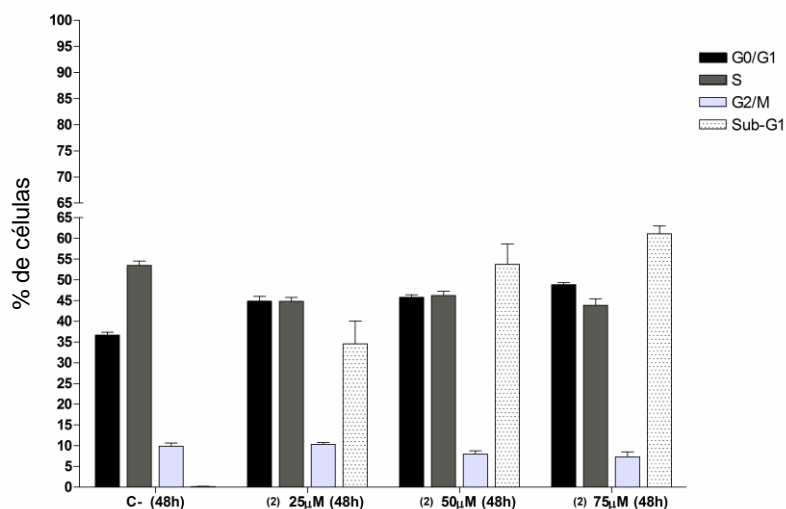


Figura 28. Análise da cinética celular da célula K562 frente ao tratamento com o complexo [AuCl<sub>2</sub>(LEVO)]Cl·H<sub>2</sub>O nas concentrações de 25, 50 e 75 μmol L<sup>-1</sup>.

## Eletroforese em gel de agarose

Após o tratamento com o complexo (1) frente à linhagem K562, pode-se notar que não houve degradação do ADN na eletroforese em gel de agarose, não demonstrando o padrão de degradação decorrente de apoptose (Figura 29). Observou-se a redução da banda de ADN nas concentrações de 25, 50 e 75 μM quando comparado com controle negativo.

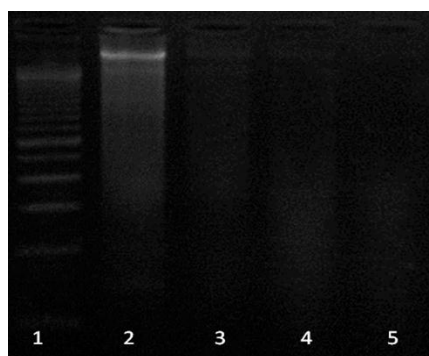


Figura 29. Eletroforese em gel de agarose de ADN de células K562 tratadas com o complexo [AuCl<sub>2</sub>(LEVO)]Cl·H<sub>2</sub>O em comparação com o controle negativo. 2x10<sup>6</sup> células foram cultivadas em diferentes concentrações: (1) Lader, (2) Controle negativo, (3) [AuCl<sub>2</sub>(LEVO)]Cl·H<sub>2</sub>O 25 μmol L<sup>-1</sup>, (4) [AuCl<sub>2</sub>(LEVO)]Cl·H<sub>2</sub>O 50 μmol L<sup>-1</sup> e (5) [AuCl<sub>2</sub>(LEVO)]Cl·H<sub>2</sub>O 75 μmol L<sup>-1</sup>.

Os dados obtidos mostram que os complexos de Au(III) estudados têm atividade citotóxica superior às fluorquinolonas livres frente às linhagens tumorais A20, B16-F10 e K562 e as linhagens sadias MCR-5 e L919, em especial, o complexo de Au(III) com a LEVO. Portanto, a associação Au-fluorquinolona mostrou ser uma estratégia eficaz para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais.



## 8

**Complexos de Cu(II) contendo um antibiótico da classe das fluorquinolonas e fenantrolina como co-ligante: sínteses e ensaios de toxicidade frente a *Artemia sp* e o *Trypanossoma cruzi***

Nessa etapa do trabalho, três complexos de Cu(II) contendo fenantrolina e um antibiótico da classe das fluorquinolonas (levofloxacin, norfloxacin ou esparfloxacin) foram obtidos e caracterizados por microanálises, medidas de condutividade, espectroscopia na região do infravermelho e ressonância paramagnética eletrônica. A toxicidade dos complexos frente à *Artemia sp.* foi avaliada como um *pré-screening* para a atividade antitumoral. Testes de atividade anti-*T-cruzi* foram igualmente feitos para os ligantes e seus complexos.

**8.1.****Dados de microanálises e condutividade**

Os dados de microanálises sugerem que em todos os casos a relação Cu:fluorquinolona:fenantrolina é de 1:1:1 e que todos os complexos têm dois átomos de cloro, além de moléculas de água de hidratação. As medidas de condutividade em dimetilformamida (DMF) indicam que os complexos obtidos são eletrólitos 1:1. No entanto, como a DMF é um solvente coordenante, ela poderia estar deslocando um átomo de cloro da esfera de coordenação do Cu(II). Desse modo, procuramos repetir as medidas de condutividade em diclorometano, mas apenas o complexo da norfloxacin mostrou-se solúvel e, nesse caso, o valor de condutividade medido foi de  $0,80 \mu\text{S cm}^{-1}$ , indicando tratar-se de um não-eletrólito. Sugerimos então que, nos três casos, a melhor estrutura para os complexos seria  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{L})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , onde L = levofloxacin (LEVO), norfloxacin (NOR) ou esparfloxacin (ESPAR). Os dados de microanálises, os valores de condutividade e das faixas de decomposição são listados na Tabela 14.

Tabela 14. Dados de microanálises (valores calculados entre parênteses), condutividade ( $\Lambda$ ,  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) e faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ ) para os complexos de Cu(II).

	%C	%H	%N	$\Lambda^*$	Faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ )
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	47,4 (49,2)	5,0 (5,0)	9,0 (9,6)	69,4	178 – 187
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	48,5 (48,7)	4,7 (5,0)	10,1 (10,2)	64,4	210 – 219
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{ESPAR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	49,1(48,8)	4,8 (5,0)	10,9 (11,1)	50,8	180 – 189

\*Condutividade ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) medida em DMF

## 8.2.

### Espectroscopia na região do infravermelho

As bandas dos espectros do infravermelho mais úteis na determinação do modo de coordenação das fluorquinolonas ao centro metálico são mostradas na Tabela 15 para os ligantes livres e para seus complexos de Cu(II).

Tabela 15. Principais bandas do espectro de infravermelho dos complexos de Cu(II) das fluorquinolonas LEVO, NOR e ESPAR.

Compostos	$\nu(\text{COOH})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-)$	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
Levofloxacin	1727 F	1620 F	-	-
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	-	1584 F	1643 m	1395 m
Norfloxacin	1731 m	1616 F	-	-
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{NOR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	-	1581 F	1629 F	1383 m
Esparfloxacin	1719 m	1634 F	-	-
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{ESPAR})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	-	1574 F	1632 F	1383 m

Legenda: F: forte; m: média; f: fraca.

Os espectros de infravermelho das fluorquinolonas livres mostram uma absorção entre  $1719\text{-}1731 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída à vibração de estiramento do grupo carboxílico,  $\nu(\text{COOH})$ <sup>84,85</sup>. Essas bandas estão ausentes nos espectros dos complexos, indicando o envolvimento do grupo carboxílico na interação com os íons metálicos.

A banda atribuída ao estiramento  $\nu(\text{C=O})$  aparece em  $1621$  e  $1634 \text{ cm}^{-1}$  nos espectros das fluorquinolonas livres<sup>84, 85</sup>. Nos espectros dos complexos,

essa banda desloca-se para a região entre  $1574 - 1584 \text{ cm}^{-1}$ , indicando a coordenação da carbonila cetônica aos íons metálicos.

As bandas entre  $1629$  e  $1643 \text{ cm}^{-1}$  nos espectros dos complexos podem ser atribuídas ao estiramento assimétrico do grupo carboxilato coordenado ao metal  $\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-)$  e as bandas em  $1383$  e  $1395 \text{ cm}^{-1}$ , ao estiramento simétrico do grupo carboxilato  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ .<sup>84, 85</sup> Essas bandas não são observadas nos espectros das fluorquinolonas livres.

A Figura 30 mostra, como exemplo, os espectros de infravermelho da esparfloxacina e de seu complexo de  $\text{Cu(II)}$ .

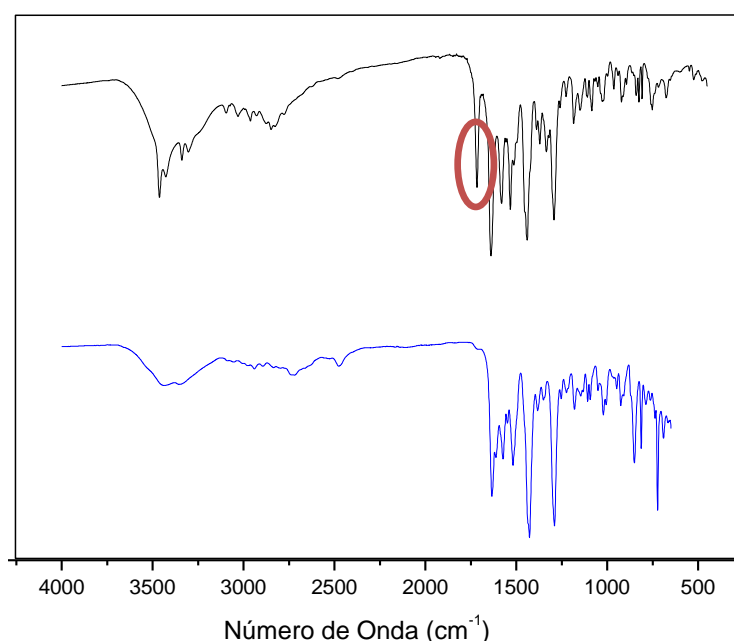


Figura 30. Espectros de IV da esparfloxacina (—) e do complexo  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{ESPAR})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (—). O círculo vermelho destaca o estiramento  $\nu(\text{COOH})$  em  $1719 \text{ cm}^{-1}$ .

O grupo carboxilato pode coordenar-se aos íons metálicos de modo monodentado, bidentado ou em ponte. A frequência de separação entre os modos vibracionais simétrico e assimétrico desse grupo ( $\Delta\nu = \nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ ) pode ser usada para distinguir entre os diferentes modos de coordenação.<sup>84, 86</sup> Deacon e Phillips<sup>87</sup> investigaram as frequências de estiramento simétrico e assimétrico de um grande número de complexos carboxilatos, cujas estruturas cristalográficas são conhecidas, e concluíram que o modo de coordenação desse grupo pode ser distinguido da seguinte forma:

- (i)  $\Delta\nu < 100 \text{ cm}^{-1}$ , o grupo carboxilato está coordenado de modo bidentado;

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

Os valores de  $\Delta\nu$  observados nesse trabalho para os complexos com a levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin são 248, 246 e 249  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, o que sugere a coordenação do grupo carboxilato de forma monodentada.

Portanto, os dados dos espectros de infravermelho indicam que a levofloxacin, a norfloxacin e a esparfloxacin estão coordenadas aos íons Cu(II) na forma zwitteriônica e de modo bidentado através do grupo carboxilato e da carbonila cetônica.

### 8.3.

#### Ressonância Paramagnética Eletrônica

##### 8.3.1.

#### Espectros de RPE de amostras sólidas dos complexos de Cu(II) a temperatura ambiente

A Figura 31 mostra os espectros de RPE (banda X) das amostras em pó de  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$  e dos seus complexos com LEVO (**4**), NOR (**5**) e ESPAR (**6**) à temperatura ambiente. O espectro do precursor,  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ , é característico de simetria axial, com  $g_{\parallel} = 2,257$  e  $g_{\perp} = 2,069$  e não apresenta desdobramento hiperfino. Este desdobramento seria esperado pela interação do elétron desemparelhado com o núcleo de cobre ( $I=3/2$ ), mas frequentemente não é observado em amostras sólidas de complexos de Cu(II) em que interações de troca estão presentes<sup>88</sup>. Os espectros de **4**, **5** e **6** são muito mais alargados, sugerem múltiplas microvizinhanças, e também sugerem a presença de complexos binucleares, principalmente em **4** e **5** (ver setas, Fig.30).

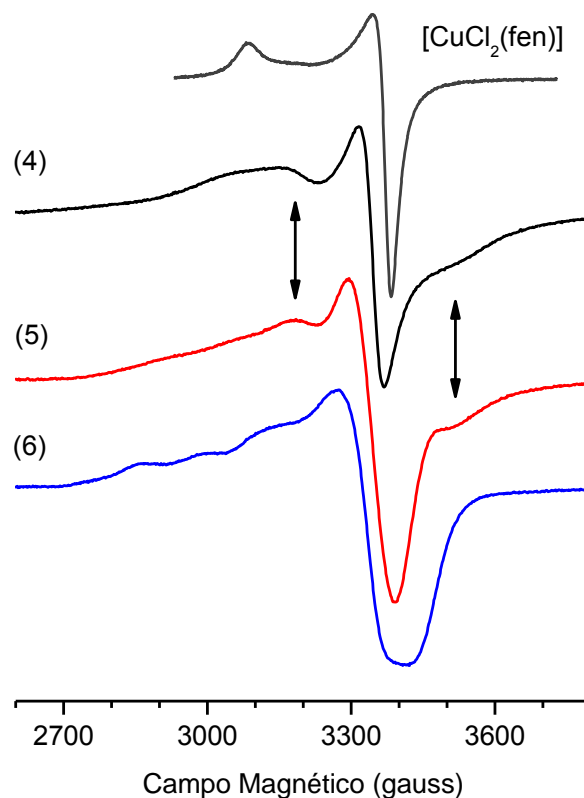


Figura 31. Espectros de RPE (banda X) das amostras em pó de  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$  e dos complexos 4, 5 e 6 a temperatura ambiente.

### 8.3.2.

#### Espectros de RPE dos complexos de Cu(II) em solução aquosa e DMSO

Os espectros de RPE de  $\text{CuCl}_2(\text{phen})$  e dos complexos **4**, **5** e **6** em solução aquosa e em DMSO foram obtidos a 77 K (soluções congeladas).

Em solução aquosa congelada (Figura 32), os espectros podem se apresentar muito alargados por causa da formação de cristais de gelo que segregam os complexos, formando agregados com forte interação dipolar magnética. Esse alargamento pode ser visto especialmente em **(6)**. Tanto o complexo **(4)** quanto o complexo **(5)** apresentaram espectros com o dublete característico de complexos binucleares<sup>89</sup>, confirmando os indícios observados no espectro de pó. O espectro de sistemas binucleares acoplados ( $S=1$ ) consiste

em duas linhas, indicadas pelas setas na Figura 32, correspondendo às transições  $\Delta m_s = \pm 1$ .<sup>90</sup>

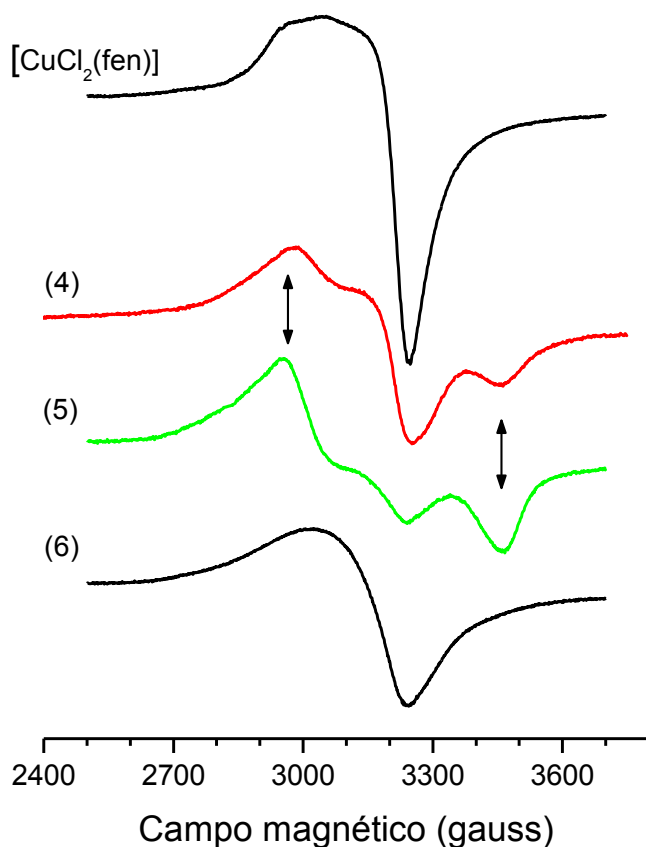


Figura 32. Espectros EPR de  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$  e dos complexos 4, 5 e 6 em solução aquosa congelada a 77 K. Concentração  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Em DMSO, por não haver agregação após congelamento, a identificação dos diferentes componentes espectrais nos espectros dos diferentes complexos fica bem mais nítida (Figura 33). Todos os complexos apresentam misturas de complexos mono e binucleares. Nestes complexos foram identificados os sinais mais fracos correspondentes à transição proibida  $\Delta m_s = \pm 2$  (ver espectro inserido com centro em  $\sim 1600$  gauss, Fig. 33), com sete linhas hiperfinas ( $2I+1$ , de  $I = 3/2+3/2$  dos dois núcleos de cobre). Essas linhas ocorrem na metade do campo magnético da transição permitida  $\Delta m_s = \pm 1$  e confirmam a presença de complexo binuclear.

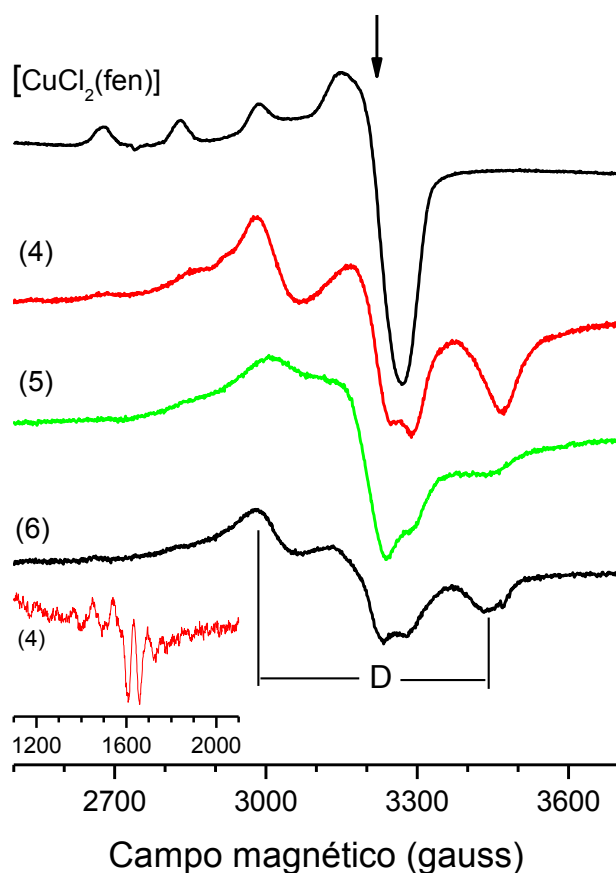


Figura 33. Espectro de RPE, banda X, para Cu(II)fen e para os complexos (4), (5) e (6), em DMSO, a 77 K. Concentração 1 mmol L<sup>-1</sup>. A seta indica  $g_{\perp}$  de cobre mononuclear.

Nos espectros com componentes mono e binucleares, a linha central na forma de primeira derivada em  $g \approx 2,08$  é atribuída à componente de  $g_{\perp}$  de Cu(II) mononuclear. A componente  $g_{\parallel}$  dessa espécie cai na região de  $g \approx 2,2$  e espera-se que apareça desdobrada em quatro linhas hiperfinas. Esse desdobramento, bem visível no espectro de Cu(II)fen, não fica tão evidente nos espectros de (4), (5) e (6) por causa dos sinais superpostos de  $\Delta m_s = m \pm 1$  dos sistemas binucleares.

A Tabela 16 mostra os parâmetros de RPE de Cu(II)fen e dos complexos 4-6 em solução congelada de DMSO.

A distância entre os dois íons de Cu(II) nos complexos binucleares pode ser estimada a partir do parâmetro  $D$  de desdobramento em campo nulo (ver Fig. 33). A distância média  $r$  entre os dois elétrons desemparelhados acoplados pode ser calculada pela equação  $D = 3/2 g \beta / r^3 = 1,39 \times 10^4 (g / r^3)$ , sendo  $D$  em

gauss e  $r$  em Angstrom<sup>91</sup>. A distância estimada  $r$  para o complexo binuclear 4, é de 3,9 Å e para 5 e 6 é de 4,0 Å em DMSO. Estas distâncias são semelhantes às obtidas para complexos de Cu (II) binucleares descritos anteriormente<sup>92,93</sup>.

Tabela 16 - Parâmetros de RPE do precursor [CuCl<sub>2</sub>(fen)] e dos complexos de Cu(II) binucleares 4, 5 e 6, em DMSO, a 77K.

	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (gauss)	$g_{\text{binucl}}$	D	$A_{\text{binucl}}$ (gauss)
[CuCl <sub>2</sub> (fen)]	2,074	2,292	155			
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(LEVO)] (4)				2,064	488	~90
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(NOR)] (5)				2,064	436	
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(ESPAR)] (6)	-	-	-	2,073	455	-

Com base nos dados de análise elementar, condutividade, infravermelho e RPE, sugerimos estruturas para os complexos. A relação M:L:fen é de 1:1:1; os átomos de cloro estão coordenados ao Cu(II) e as fluorquinolonas coordenam-se de modo bidentado através dos oxigênios carboxílico e cetônico e na forma zwitteriônica. Quando em solução, os três complexos mostraram mistura das formas monomérica e dimérica. As estruturas podem ser vistas na Figura 34.



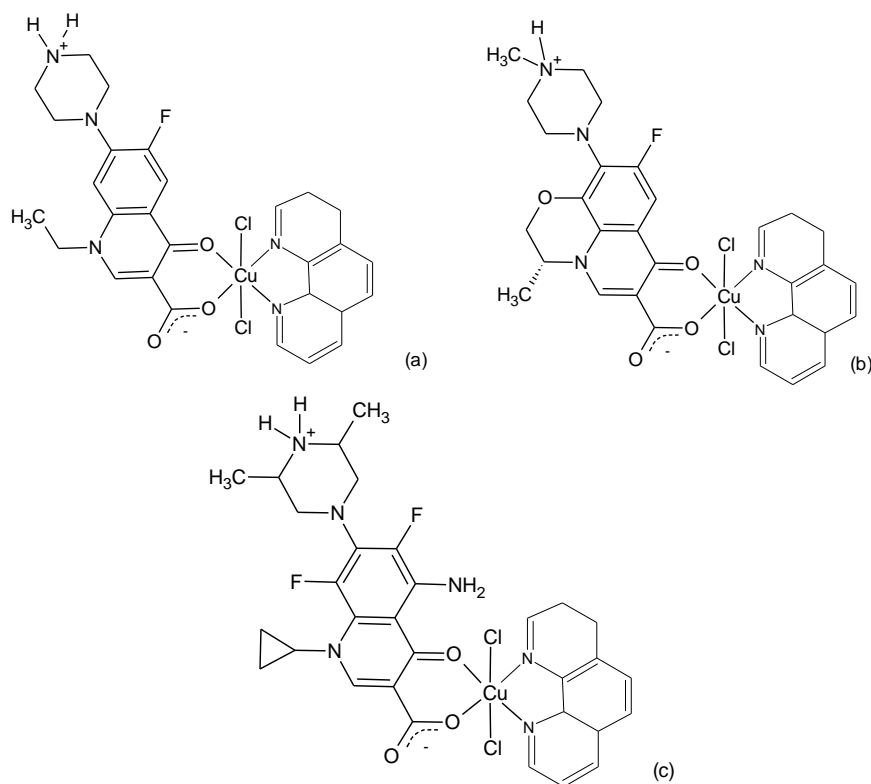


Figura 34. Estruturas propostas para os complexos (4), (5) e (6).

Complexos análogos preparados por outros membros do nosso grupo<sup>94</sup> contendo 2,2'-bipiridina, ao invés da 1,10-fenantrolina, mostraram um comportamento diferente nos espectros de RPE. Nestes complexos, as fluorquinolonas (NOR, LEVO ou ESPAR) coordenam-se também de modo bidentado através dos oxigênios carboxílico e cetônico e na forma zwitteriônica, relação M:L:bipy de 1:1:1, onde um átomo de cloro está coordenado ao Cu(II) e o outro como contra-íon. Contudo o complexo [CuCl(bipy)(LEVO)]Cl é puramente dimérico e os complexos [CuCl(bipy)(NOR)]Cl e [CuCl(bipy)(ESPAR)]Cl têm mistura das formas diméricas e monoméricas, nos quais as formas diméricas prevalecem.

Na literatura há alguns exemplos de complexos de Cu(II) de fluorquinolonas. Embora alguns sejam parecidos com os que foram obtidos no presente trabalho, nenhum complexo com a mesma estrutura foi encontrado. A maior parte dos complexos descritos na literatura possui número de coordenação igual a cinco. Os complexos obtidos no presente trabalho têm número de coordenação seis e geometria octaédrica.

#### 8.4.

#### Associação de $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$ e norfloxacin determinada por supressão de fluorescência

Os complexos metálicos sintetizados podem se dissociar em soluções aquosas de modo que é importante avaliar as constantes de ligação metal-ligante. Em geral, a modificação das propriedades espectroscópicas dos ligantes devido à interação com os metais pode ser usada para obter parâmetros de ligação. Várias fluorquinolonas são fluorescentes, incluindo norfloxacin. Íons paramagnéticos incluindo  $\text{Cu(II)}$  são bem conhecidos por serem supressores de fluorescência, então, é possível utilizar esta supressão de fluorescência para obter informações sobre a interação entre NOR e o sal de  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ . Neste experimento, observamos a associação da NOR com o sal de  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$  em solução aquosa, em pH fisiológico  $\sim 7,4$ , através de fluorescência estacionária e resolvida no tempo.

A Figura 35 mostra o espectro de fluorescência da NOR e o efeito de titulação com  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$ . Quando aumentamos a concentração do sal de cobre(II), a intensidade de fluorescência diminui sem modificar a posição do pico e a forma do espectro. Esse comportamento é característico de supressão de fluorescência.

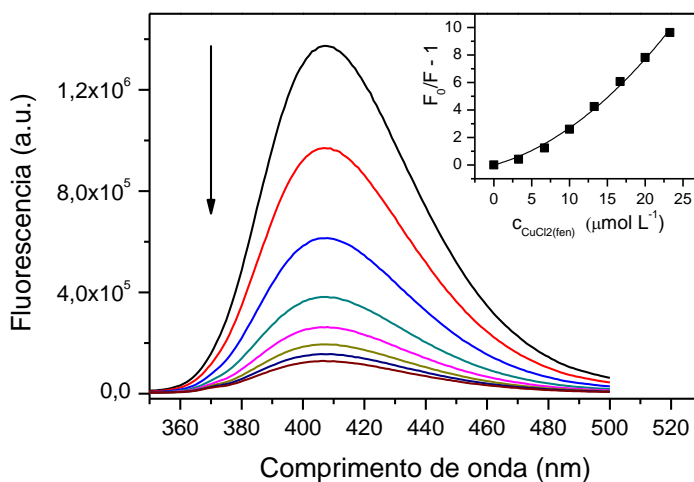


Figura 35. Espectro de fluorescência da NOR em solução aquosa (tampão fosfato pH 7,4) e o efeito da titulação com  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ . Concentração da NOR:  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; Concentrações de  $\text{Cu(fen)} = n \times 3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com  $n = 0, 1, \dots, 7$ . Excitação em 330 nm. A inserção é o gráfico de supressão de Stern-Volmer.

A medição do tempo de vida de fluorescência é o método mais definitivo para distinguir supressão estática e dinâmica.<sup>95</sup> A supressão dinâmica fornece uma rota de decaimento adicional levando a uma diminuição no tempo de vida, enquanto supressão estática apenas remove uma fração de fluoróforos, já que há formação de complexo não fluorescente, mas deixa o tempo de vida inalterado. Foram realizadas medições das curvas de decaimento de fluorescência (Figura 36) e os tempos de vida foram ajustados com expressão mono-exponencial. O tempo de vida  $\tau_0$  na ausência do supressor foi igual a 1,2 ns, não se alterando com o aumento da concentração do mesmo. Isso indica um processo de supressão estática, devido à formação de um complexo não fluorescente.

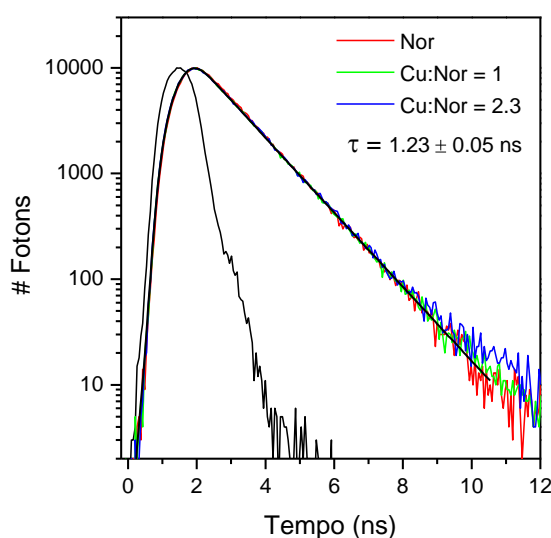


Figura 36. Curvas de decaimento de fluorescência da NOR em solução aquosa (tampão fosfato pH 7,4) pura e com  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$  adicionado. Concentração da NOR:  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; concentrações do sal de  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ : 0, 10 e  $23 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Excitação em 330 nm.

É interessante notar que o gráfico de Stern-Volmer (inserção da Figura 35) deve ser linear para supressão estática, com a constante de Stern-Volmer igual à constante de ligação.<sup>95, 96</sup> Na verdade, seria linear, se  $(F_0 / F - 1)$  fosse plotado contra a concentração livre de  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$ . A concentração livre é geralmente considerada como a concentração total adicionada em experimentos de ligação ou experimentos de supressão estática, mas isso é válido somente se  $K_b c_L \ll 1$ , o que não parece ser a presente situação. Neste caso, a constante de ligação  $K_b$  pode ser obtida a partir da variação da fluorescência ( $F_0 - F$ ), utilizando a expressão exata para o modelo de um sítio de ligação<sup>97</sup>: (Equação 1).

A Figura 37 mostra o gráfico de  $(F_0 - F) \times c_M$  e o ajuste por mínimos quadrados usando a Equação (1), o qual resultou  $K_b = 1,3 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ . Pode-se notar que a expressão exata se ajusta muito bem aos pontos experimentais, mostrando a adequação do modelo.

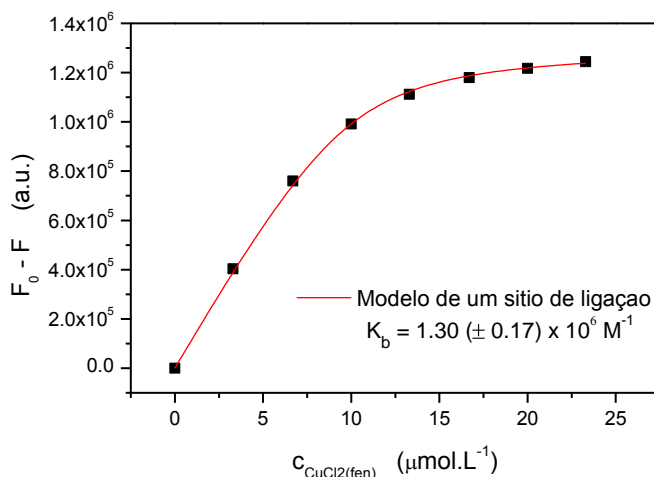


Figura 37. Fluorescência da NOR em 407 nm em função do total de  $\text{CuCl}_2(\text{fen})$  adicionado. Concentração total da NOR,  $c_{\text{NOR}} = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

É interessante comparar as constantes de ligação do Au(III) e do Cu(II) com a NOR zwitteriônica. Usando a supressão de fluorescência, a constante de ligação do Cu(II) encontrada foi de  $1,3 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$ , em pH 7,4<sup>98</sup>, que é uma ordem de grandeza maior do que a de Au(III), mencionada neste trabalho anteriormente.

## 8.5.

### Toxicidade das fluorquinolonas e de seus complexos de Cu(II) frente a *Artemia sp.*

O ensaio de toxicidade aguda com *Artemia sp.* é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e que requer uma pequena quantidade de amostra (2 – 20 mg). A simplicidade desse teste, que não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais, favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório.<sup>99</sup>

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

As doses testadas variaram entre 30 e 200 mg L<sup>-1</sup>. Nessas doses, nenhum dos complexos apresentou toxicidade significativa frente à *Artemia sp.* Contudo, como este ensaio só tem correlação em alguns tipos de tumores, não se pode afirmar que os complexos não possuem atividade citotóxica ou antitumoral.

## 8.6.

### **Testes de atividade anti-*T.cruzi* para as fluorquinolonas e seus complexos de Cu(II)**

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* é uma parasitose endêmica com cerca de 12 milhões de casos na América Latina. As duas únicas drogas usadas na clínica para o tratamento da doença são o Nifurtimox e a Benznidazole, introduzidos nas décadas de 1960-70. Estes nitroderivados geram sérios efeitos colaterais, requerem longos períodos de tratamento, além de apresentarem resultados variáveis de acordo com a fase da doença (sendo em especial não efetivos para pacientes crônicos), o período de tratamento e dose empregada, a idade e a origem geográfica dos pacientes.<sup>100</sup> Assim, as limitações da corrente quimioterapia para esta enfermidade justificam a busca por novos fármacos e estimulam o desenho, síntese e pesquisa de agentes que possam ser efetivos e seletivos contra este parasito, mas que exerçam baixa toxicidade e cuja produção envolva baixo custo.

O *Trypanosoma cruzi* possui um ciclo biológico complexo que envolve um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado, apresenta três formas distintas: epimastigota (forma presente no vetor e em cultura axênica), tripomastigota (forma sanguínea circulante e infectante) e amastigota (forma de replicação intracelular).<sup>101</sup> As formas evolutivas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares são as formas relevantes para a infecção humana, figura 38.

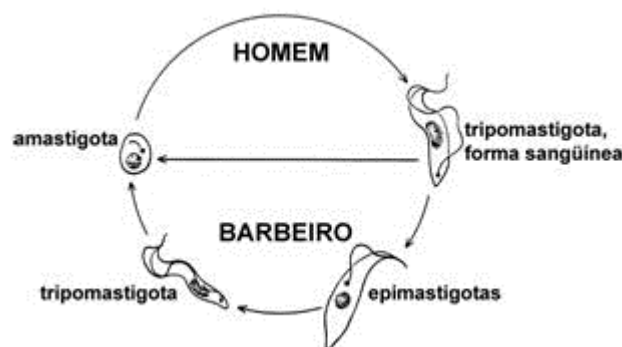


Figura 38. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.<sup>102</sup>

Nesse trabalho, a atividade tripanocida das fluorquinolonas livres (NOR, LEVO, ESPAR), dos complexos de Cu(II) {(4)-(6)}, dos sais  $\text{CuCl}_2$  e  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})]$ , da 1,10-fenantrolina livre e da droga de referência para doença de Chagas, o Benznidazol, foi testada sob as formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. Para os compostos selecionados foram feitos também testes sob as formas amastigotas do parasito. De modo a selecionar os compostos que serão futuramente testados *in vivo*, os parâmetros de  $\text{IC}_{50}$  (concentração da droga que mata 50% os parasitas),  $\text{LC}_{50}$  (concentração da droga que diminui em 50% a viabilidade de células cardíacas não infectadas) e  $\text{IS}$  (Índice de seletividade – Razão entre  $\text{LC}_{50}/\text{IC}_{50}$ ) que identifica a dose efetiva dos complexos contra o parasito, mas que não exerça toxicidade para a célula hospedeira), foram determinados.

A Tabela 17 lista os valores de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e os índices de seletividade (IS) obtidos para os compostos sob as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*. Os valores correspondem à média de três replicatas  $\pm$  desvio padrão (SD).

Tabela 17. Atividade (média  $\pm$  SD) e índice de seletividade (IS) para as fluorquinolonas e seus complexos de Cu(II) sob as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* (cepa Y), *in vitro* (24 h de incubação a 37 °C).

Compostos	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Índice de Seletividade (IS)*
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	82,5 $\pm$ 3,3	6
1,10-fenantrolina (fen)	11,0 $\pm$ 3,0	A
[CuCl <sub>2</sub> (fen)]	7,2 $\pm$ 5,3	<4
Norfloxacin (NOR)	126 $\pm$ 30	>1,25
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(NOR)].4H <sub>2</sub> O (4)	4,4 $\pm$ 1,4	2,68
Levofloxacin (LEVO)	211 $\pm$ 38	A
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(LEVO)].4H <sub>2</sub> O (5)	1,6 $\pm$ 1,4	19
Esparfloxacin (ESPAR)	114,1 $\pm$ 20,3	>1,75
[CuCl <sub>2</sub> (fen)(ESPAR)].3H <sub>2</sub> O (6)	4,7 $\pm$ 0,1	2,86
Benznidazol	12,94 $\pm$ 1,9	77

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

NOR, LEVO e ESPAR não mostraram atividade significativa sob as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, exibindo valores de IC<sub>50</sub> de 126, 211 e 114  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Os complexos (4), (5) e (6) mostraram-se ativos em concentrações de cerca de 4, 2 e 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Ou seja, esses complexos são significativamente mais ativos que o benznidazol, que é a droga de referência.

Embora a fenantrolina livre e o sal precursor, [CuCl<sub>2</sub>(fen)], mostrem atividade significativa, os complexos que unem o Cu(II), às fluorquinolonas e a fen, são mais ativos, em especial o complexo (5), que apresenta também o maior índice de seletividade (IS = 19), sendo portanto o mais promissor destes três novos complexos.

Resultados de atividade anti-*T. cruzi* para complexos de Cu(II) análogos aos obtidos no presente trabalho, preparados por outro membro do nosso grupo<sup>94</sup>, são listados na Tabela 18 para efeito de comparação e discussão, uma vez que na literatura os exemplos de complexos de fluorquinolonas com atividade antiparasitária são raríssimos.

Tabela 18. Resultados de atividade anti-*T.cruzi* para complexos de Cu(II) análogos.

Compostos	IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )	Índice de Seletividade (IS)*
Série A		
[CuCl <sub>2</sub> (NOR)] (A1)	78 ± 11,6	0,8
[CuCl <sub>2</sub> (LEVO)] (A2)	59,7 ± 9,1	a
[CuCl <sub>2</sub> (ESPAR)] (A3)	45,0 ± 29,9	a
Série B		
[CuCl <sub>2</sub> (py)(NOR)] (B1)	87 ± 41	2,86
[CuCl <sub>2</sub> (py)(LEVO)] (B2)	Nd	a
[CuCl <sub>2</sub> (py)(ESPAR)] (B3)	52 ± 22	0,12
Série C		
[CuCl(bipy)(NOR)]Cl (C1)	15,8 ± 3,7	4
[CuCl(bipy)(LEVO)]Cl (C2)	14,9 ± 2,7	4,18
[CuCl(bipy)(ESPAR)]Cl (C3)	18,2 ± 4	3,4

py = piridina, bipy = 2,2-bipiridina. IS = LC<sub>50</sub>/ IC<sub>50</sub>. \*Os dados são expressos como média ± SD de três experimentos independentes. <sup>a</sup> testes em andamento

A associação do Cu(II) às fluorquinolonas levou a um aumento da atividade. Observa-se que nos complexos da série A, (A1) – (A3), os valores de IC<sub>50</sub> são significativamente menores que nas fluorquinolonas livres (78, 60 e 45 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente) e aproximadamente da mesma ordem de grandeza do CuCl<sub>2</sub> (82 μmol L<sup>-1</sup>).

A introdução da piridina (py) como co-ligante, nos complexos da série B, não foi uma estratégia eficaz para a melhora da atividade. Nos complexos (B1) e (B3) os valores de IC<sub>50</sub> são de 87 e 52 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, ou seja, da mesma ordem de grandeza dos complexos que não contém piridina em sua estrutura. Adicionalmente, o precursor [CuCl<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>] revelou IC<sub>50</sub> = 54 μmol L<sup>-1</sup>.

Uma diminuição significativa dos valores de IC<sub>50</sub> pode ser observada quando a 2,2'-bipiridina (bipy) foi associada ao cobre e às fluorquinolonas, levando a um aumento da atividade. Para estes complexos (C1) a (C3), os valores de IC<sub>50</sub> são 16, 15 e 18 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, ou seja, cerca de três vezes menores que para os complexos citados anteriormente. Essa atividade



deve-se a presença da bipy, pois o precursor  $[\text{CuCl}_2(\text{bipy})]$  apresenta  $\text{IC}_{50}$  igual a  $14 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Além disso, esses complexos apresentam altos índices de seletividade ( $\text{IS} \approx 4$ ).

Como pode ser observado, a estratégia mais eficaz para o aumento da atividade anti-*T. cruzi* dos complexos foi a introdução do grupo 1,10-fenantrolina (fen). Esses complexos são até 36 vezes mais ativos que os complexos análogos, sem a fen.

A partir destes resultados, os complexos contendo 1,10-fenantrolina como co-ligante, foram selecionados para os testes sob as formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi*, assim como seus respectivos ligantes. No entanto, serão descritos apenas os resultados para os complexos (4) e (6) e seus ligantes, já que os testes para o complexo (5) encontram-se em andamento.

A Tabela 19 lista os valores de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e os índices de seletividade (IS) obtidos para a NOR e ESPAR e seus complexos sob as formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi* (48 horas de tratamento a  $37^\circ\text{C}$ ).

Tabela 19. Atividade (média  $\pm$  SD) e índice de seletividade (IS) para a NOR, ESPAR e seus complexos de Cu(II) sob as formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi* (cepa Y) *in vitro*.

Compostos	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Índice de Seletividade (IS)*
Norfloxacina (NOR)	$172 \pm 17$	$>1,16$
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{NOR})].4\text{H}_2\text{O}$ (4)	$1,6 \pm 0,1$	2,66
Levofloxacina (LEVO)	a	A
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{LEVO})].4\text{H}_2\text{O}$ (5)	a	A
Esparfloxacina (ESPAR)	$129 \pm 43$	$>1,55$
$[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{ESPAR})].3\text{H}_2\text{O}$ (6)	$2 \pm 1$	2,57
Benznidazole	$2,7 \pm 1,9$	$> 360$

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

Como pode ser observado, as fluorquinolonas NOR e ESPAR não têm atividade significativa sob as formas amastigotas do *T. cruzi*, exibindo valores de  $\text{IC}_{50}$  de 172 e  $129 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. A coordenação ao Cu(II) e a fen

levou a um aumento significativo da atividade. Os complexos (4) e (6) mostram valores de  $IC_{50}$  de 1,6 e 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sendo 80 e 77% mais ativos que seus respectivos ligantes livres (Tabela 1). Além disso, esses complexos são mais seletivos que as drogas livres ( $IS \sim 2,6$ ).

A Figura 39 mostra o efeito dos complexos (4) e (6) sob as formas amastigotas intracelulares do parasito, obtido através da quantificação do percentual de inibição do índice endocítico (IE) que representa a multiplicação entre o percentual de células hospedeiras infectadas pelo número de parasitos por célula infectada.

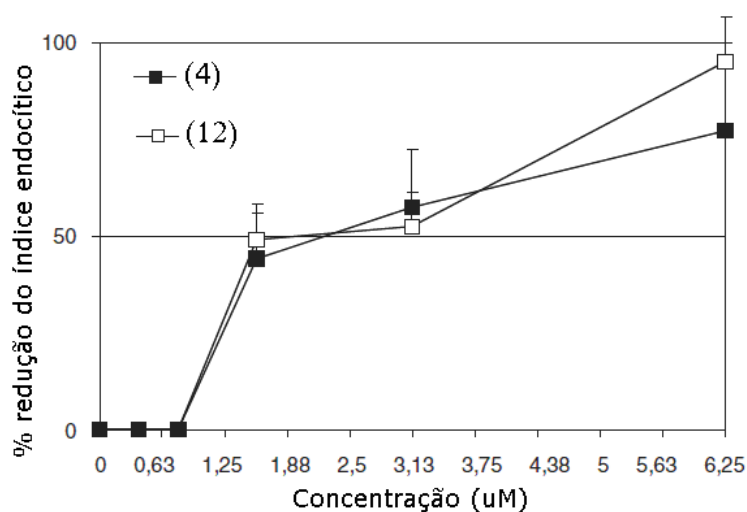


Figura 39. Atividade dos complexos (4) e (6) sob as formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi* (cepa Y).

Os dados obtidos mostram que os complexos de Cu(II) estudados têm atividade superior às fluorquinolonas livres nas duas formas do *T. cruzi* relevantes para a infecção em mamíferos: tripomastigota sanguínea e amastigota.

Os complexos que contêm o grupo fenantrolina como co-ligante são os mais ativos. Isso pode ser devido à maior facilidade desses complexos de transpor membranas biológicas, incluindo a dos parasitos e de suas células hospedeiras, já que a fen é um grupo muito hidrofóbico e/ou potencial de atuar sobre distintos alvos celulares (incluindo ADN-mitocondrial ou ADN nuclear).

Embora várias classes de compostos tenham sido testadas contra o *T. cruzi*, *in vitro* e *in vivo*, desde a introdução do Nifurtimox e do Benznidazol na prática clínica, poucos chegaram à fase de ensaios clínicos.

Dessa forma, o potencial anti-parasitário de várias fluorquinolonas, juntamente com a atividade anti-*T.cruzi* dos complexos de Cu(II) (4), (5) e (6) descrita no presente trabalho, justificam novos estudos *in vitro* e *in vivo* e sugerem que a associação fluorquinolona – cobre – fen, em um mesmo composto, pode representar uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos agentes anti-*T.cruzi*.

## 9

### **Complexos de Bi(III) contendo fluorquinolonas: sínteses, estudos espectroscópicos e testes de atividade antibacteriana**

Nesse capítulo, inicialmente, descrevemos as caracterizações dos três novos complexos de Bi(III) contendo levofloxacin (LEVO), norfloxacin (NOR) ou esparfloxacin (ESPAR). Em seguida, são relatados resultados de testes de atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **9.1.**

##### **Dados de microanálises e condutividade**

Os dados de microanálises sugerem que em todos os complexos há um ligante e três cloretos para cada átomo do metal. As medidas de condutividade em dimetilsulfóxido (DMSO) indicam que os complexos obtidos são não eletrólitos. Como o DMSO é um solvente coordenante, esperava-se que ele substituísse pelo menos um dos cloretos na esfera de coordenação do bismuto. Como isso não ocorre, pareceu-nos razoável supor que os complexos são dímeros, nos quais dois átomos de cloro estariam ligados em ponte. Essa suposição baseia-se também no fato do Bi(III) ser um cátion grande que normalmente forma complexos com número de coordenação 6 ou 7.

Portanto, sugerimos que os complexos são do tipo  $[\text{BiCl}_3(\text{L})]_2$ , onde L representa o ligante levofloxacin (LEVO), norfloxacin (NOR) ou esparfloxacin (ESPAR) coordenado de forma neutra ao bismuto. Os dados de microanálises, de condutividade e faixa de decomposição são listados na Tabela 20.

Tabela 20. Dados de microanálises (valores calculados entre parênteses), condutividade ( $\Lambda$ ,  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) e faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ ) para os complexos de Bi(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin.

	%C	%H	%N	$\Lambda^*$	Faixa de decomposição ( $^{\circ}\text{C}$ )
$[\text{BiCl}_3(\text{LEVO})]_2$	31,08 (32,0)	3,30 (3,0)	5,90 (6,2)	22,70	240 – 285
$[\text{BiCl}_3(\text{NOR})]_2$	27,93 (30,3)	3,48 (2,9)	6,13 (6,6)	24,83	245 – 300
$[\text{BiCl}_3(\text{ESPAR})]_2$	32,06 (32,2)	3,30 (3,4)	7,63 (7,9)	17,50	188 – 290

\*Condutividade ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) medida em DMSO

## 9.2.

### Espectroscopia na região do infravermelho

As bandas dos espectros do infravermelho, mostradas na Tabela 21, são usadas para investigar o modo de coordenação das fluorquinolonas ao centro metálico.

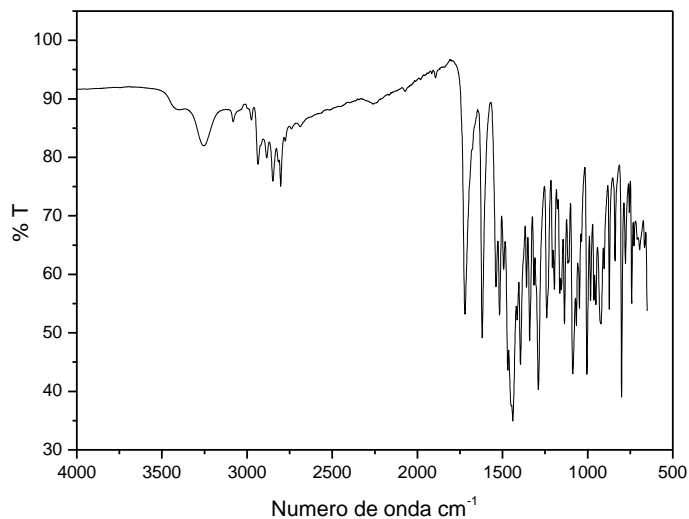
Tabela 21. Principais bandas do espectro de infravermelho dos complexos de Bi(III) das fluorquinolonas LEVO, NOR e ESPAR.

Compostos	$\nu(\text{COOH})$	$\nu(\text{C=O})$
Levofloxacin	1724 m	1620 F
$[\text{BiCl}_3(\text{LEVO})]_2$	1705F	1622 F
Norfloxacin	1732 m	1621 F
$[\text{BiCl}_3(\text{NOR})]_2$	1696m	1627 F
Esparfloxacin	1716 m	1638 F
$[\text{BiCl}_3(\text{ESPAR})]_2$	1712m	1635 F

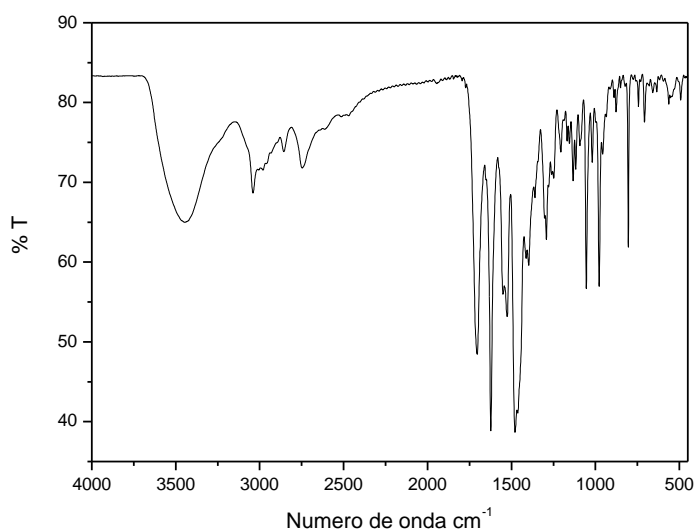
Legenda: F: forte; m: média; f: fraca.

Nos espectros de infravermelho das fluorquinolonas livres, Figuras 40 (a), 41 (a) e 42 (a), as bandas observadas na região entre  $1719$  e  $1731 \text{ cm}^{-1}$ , foram atribuídas ao estiramento do ácido carboxílico livre.<sup>103, 104</sup> Essa banda permanece nos espectros dos complexos, Figuras 40 (b), 41 (b) e 42 (b), indicando que o ácido carboxílico não estaria coordenado ao Bi(III). O modo

vibracional  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , observado entre  $1616$  e  $1634\text{ cm}^{-1}$ , no espectro das fluorquinolonas livres<sup>70, 71</sup>, não se desloca significativamente nos espectros de seus respectivos complexos de bismuto, indicando que esse grupo também não estaria participando da coordenação.

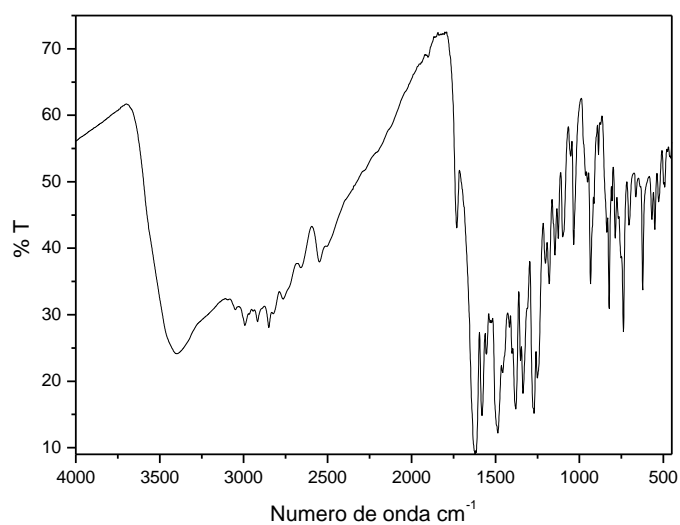


(a)

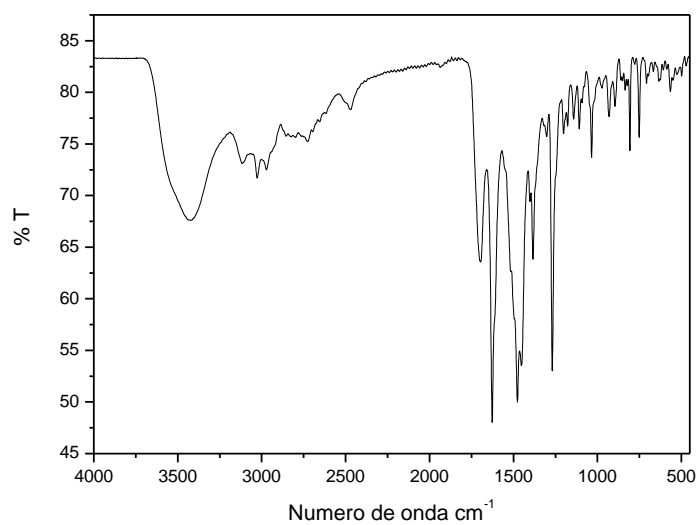


(b)

Figura 40. Espectros de IV (a) da levofloxacina e (b) de seu complexo de Bi(III).

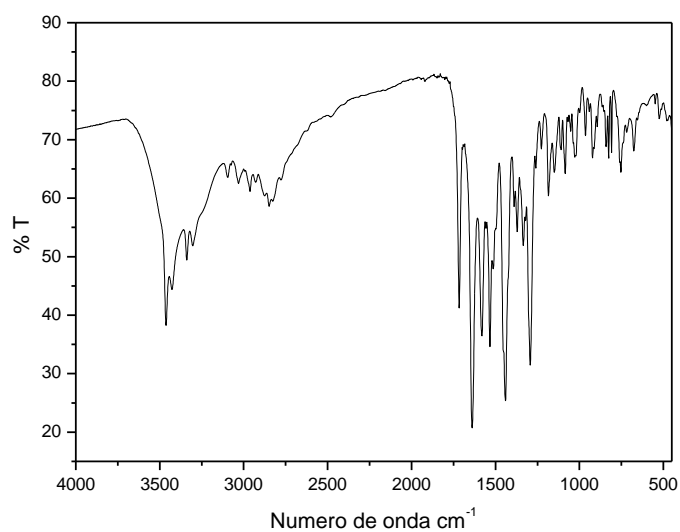


(a)

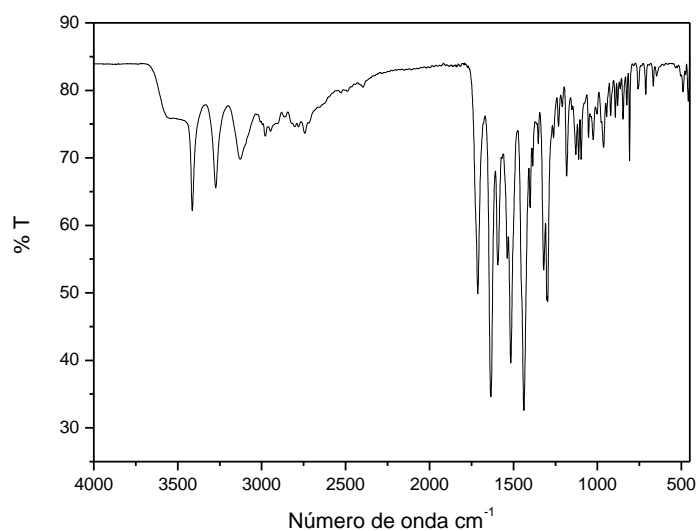


(b)

Figura 41. Espectros de infravermelho da norfloxacin (a) e de seu complexo de Bi(III) (b).



(a)



(b)

Figura 42. Espectros de infravermelho da esparfloxacina (a) e do complexo de Bi(III) (b).

Nas discussões anteriores, observamos que a levofloxacin, a norfloxacin e a esparfloxacin coordenam-se de forma neutra e bidentada ao Au(III) e ao Cu(II). No entanto, no primeiro caso, a coordenação ocorre pelos nitrogênios do anel piperazina e, no segundo, pelos oxigênios cetônico e carboxílico. Nos complexos de Bi(III), a coordenação parece ocorrer também pelos nitrogênios do anel piperazina. Isso pode ser explicado pelo caráter duro-macio desses cátions



metálicos. O Cu(II) é um cátion de um ácido duro, e por isso prefere ligar-se aos oxigênios que são bases mais duras. O Au(III), por outro lado, é um cátion de um ácido macio e prefere os nitrogênios, que são bases mais macias. O Bi(III) é um cátion grande, facilmente polarizável e, por isso, é macio. Portanto, parece lógico que o Bi(III) prefira ligar-se aos nitrogênios. A Figura 43 mostra as possíveis estruturas para os complexos.

Foram feitas tentativas de obter espectros de ressonância magnética nuclear e espectros de massas para os complexos de Bi(III). No entanto, devido a baixa solubilidade dos mesmos não pudemos obter resultados conclusivos.

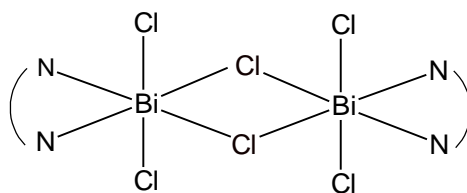


Figura 43. Estruturas propostas para os complexos de Bi(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin (N - N = NOR, LEVO ou ESPAR).

### 9.3.

#### Espectroscopia Raman

As análises dos espectros de Raman, das fluorquinolonas livres e de seus complexos de Bi(III), foram realizadas para auxiliar na análise dos espectros obtidos no infravermelho, uma vez que as fluorquinolonas possuem as mesmas vibrações ativas, tanto no infravermelho, como no Raman. Raramente uma banda no espectro de Raman é devida apenas a uma vibração de dois átomos. Na maioria das vezes é uma combinação de muitas vibrações devido ao acoplamento de coordenadas internas.<sup>105</sup>

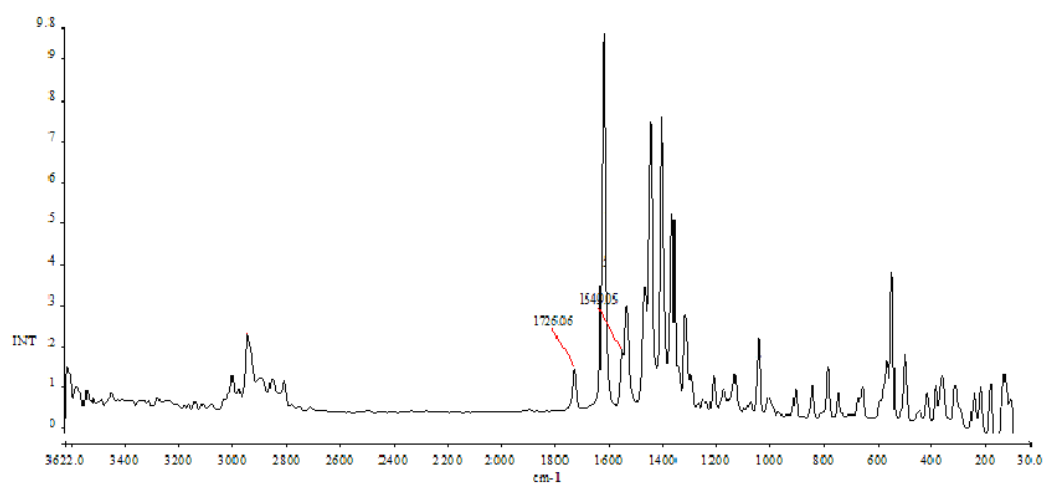
Exceções nos espectros Raman das fluorquinolonas livres, são as bandas observadas na região entre 1718 e 1726 cm<sup>-1</sup>, que são atribuídas ao estiramento do grupo carboxílico. Essa banda não desloca significativamente nos espectros dos complexos, indicando que o ácido carboxílico não deve estar coordenado ao Bi(III).

A Tabela 22, lista as atribuições das principais bandas do espectro Raman das fluorquinolonas e de seus complexos de Bi(III) e as Figuras 44, 45 e 46 mostram os espectros obtidos.

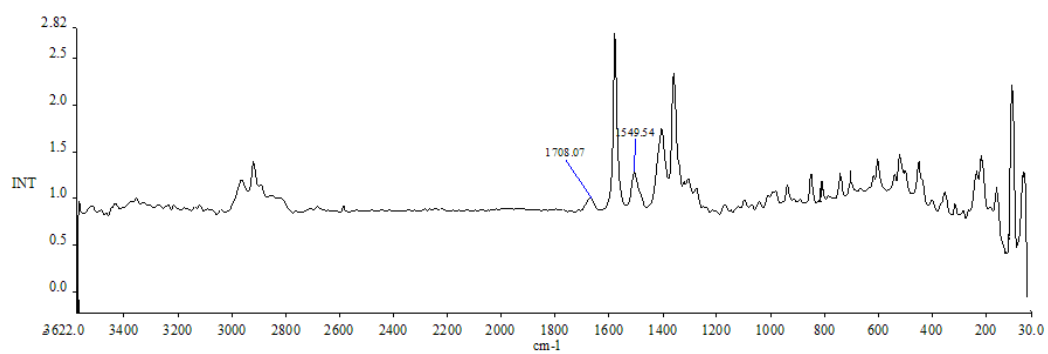
Tabela 22. Principais bandas do espectro Raman dos complexos de Bi(III) das fluorquinolonas LEVO, NOR e ESPAR.

Compostos	$\nu(\text{C=O})_{\text{carb}}$	$\nu(\text{C=O})_{\text{cet}}$
Levofloxacin	1726 f	1549
$[\text{BiCl}_3(\text{LEVO})]_2$	1708 f	1549
Norfloxacin	1724 f	1548
$[\text{BiCl}_3(\text{NOR})]_2$	1712 f	1549
Esparfloxacin	1718 f	1549
$[\text{BiCl}_3(\text{ESPAR})]_2$	1719 f	1534

O modo de estiramento  $\nu(\text{C=O})$  cetônico, observado em baixos comprimentos de onda,  $1549 \text{ cm}^{-1}$ , nos espectro das fluorquinolonas livres tem baixa intensidade devido a forte ligação de hidrogênio intramolecular<sup>105</sup> Nos espectros dos complexos, estas bandas não se deslocam significativamente, indicando que esse grupo também não estaria participando da coordenação, em concordância com os espectros obtidos no infravermelho.

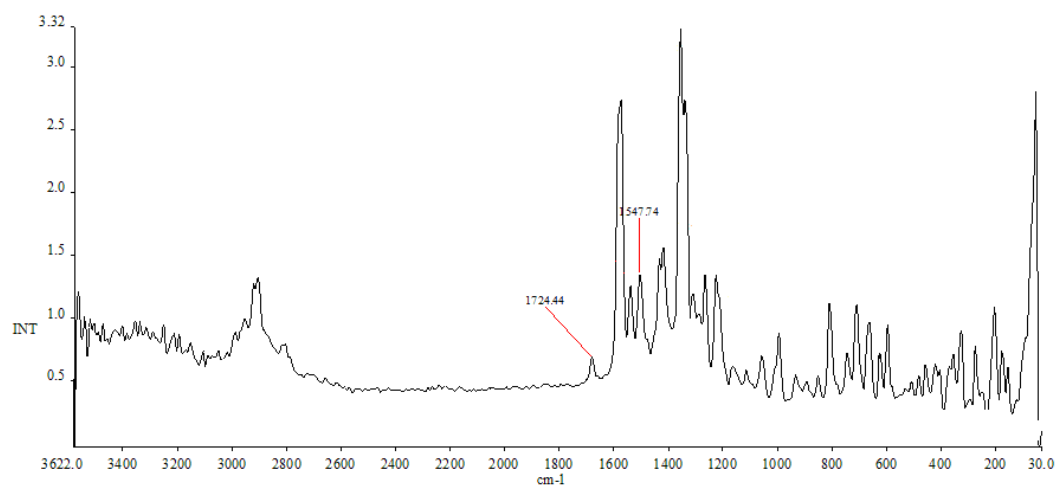


(a)

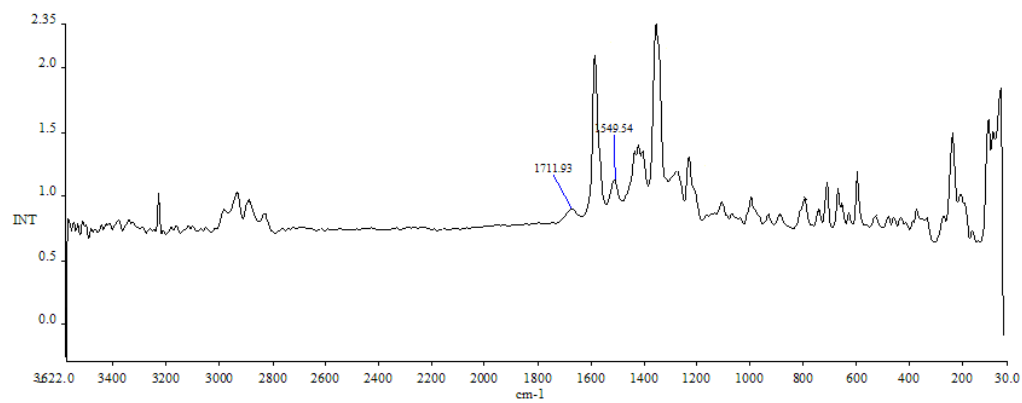


(b)

Figura 44. Espectros Raman da levofloxacina (a) e de seu complexo de Bi(III) (b).

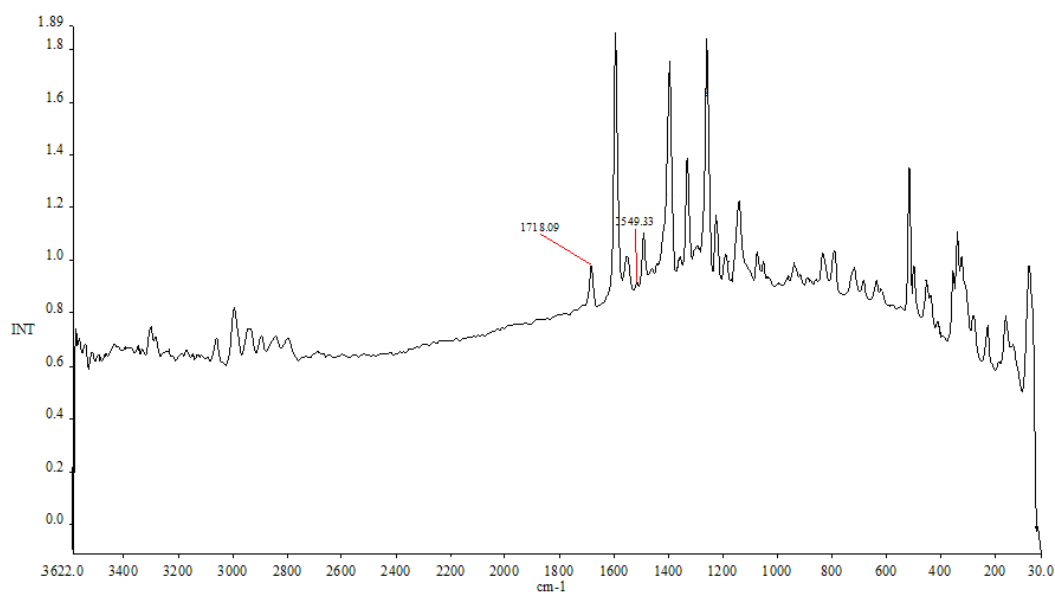


(a)

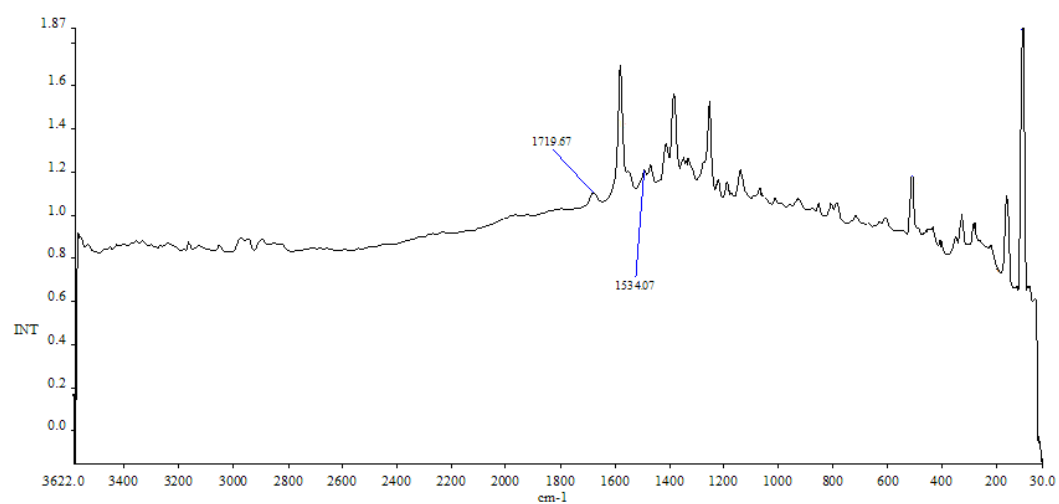


(b)

Figura 45. Espectros Raman da norfloxacin (a) e do complexo de Bi(III) (b).



(a)



(b)

Figura 46. Espectros Raman da esparfloxacina (a) e do complexo de Bi(III) (b).

#### 9.4.

#### Testes de Atividade Antimicrobiana para as fluorquinolonas e seus complexos de Bi(III)

A atividade antibacteriana, *in vitro*, dos complexos de Bi(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin, bem como os ligantes livres, foi testada utilizando-se cepas de *Staphylococcus aureus* (gram-positivas) e *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativas). Os testes foram realizados de acordo com a metodologia do NCCLS, previamente descrita.

A concentrao inibitria mnima (CIM) a menor concentrao de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo nos tubos ou poos de microdiluiio, conforme detectado a olho nu. Para sua determinao, a quantidade de crescimento nos poos ou tubos contendo o antibiico deve ser comparada com a quantidade de crescimento nos poos ou tubos de controle de crescimento (sem antibiico) usada em cada conjunto de testes ao determinar os pontos finais de crescimento. Para que o teste seja considerado vlido, a necessrio que haja crescimento ( $\geq 2$  mm de turbidez definitiva) no poio de controle positivo.

Os testes foram realizados em uma srie com dez diluiies para a droga livre e em trs sries com dez diluiies para os complexos. Contudo, como as diluiies partiram da mesma soluo estoque ( $C_0$ ) apenas uma srie dos complexos e suas respectivas concentraes foi apresentada na tabela.

Abaixo, na Tabela 23, os valores da srie de diluiio ( $C_0$  a  $C_{10}$ ) para o teste com *Pseudomonas aeruginosa* podem ser visualizados. As concentraes inibitrias mnimas encontram-se destacadas em negrito.

Tabela 23. Valores da série de diluição das concentrações do teste de atividade antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* para as fluorquinolonas e seus complexos de Bi(III). Os valores em negrito representam as CIM.

Compostos	Concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )										
	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>
Levofloxacin	131,5	65,75	32,88	16,44	8,22	4,11	<b>2,05</b>	1,03	0,51	0,26	0,13
Bi <sub>2</sub> Cl <sub>6</sub> (LEVO) <sub>2</sub>	156,25	78,13	39,06	19,53	9,76	4,88	2,44	<b>1,22</b>	0,61	0,31	0,15
Norfloxacin	133,5	66,75	33,38	16,69	8,34	4,17	<b>2,08</b>	1,04	0,52	0,26	0,13
Bi <sub>2</sub> Cl <sub>6</sub> (NOR) <sub>2</sub>	159	79,5	39,75	19,87	9,93	4,97	<b>2,48</b>	1,24	0,62	0,31	0,15
Esparfloxacin	126,75	63,37	31,69	15,84	7,92	3,96	<b>1,98</b>	0,99	0,49	0,25	0,12
Bi <sub>2</sub> Cl <sub>6</sub> (ESPAR) <sub>2</sub>	148,75	74,37	37,19	18,60	9,30	4,65	<b>2,32</b>	1,16	0,58	0,29	0,14

Para os testes do composto [BiCl<sub>3</sub>(LEVO)]<sub>2</sub>, o mesmo resultado foi encontrado para as três séries, indicando a ausência de erros, uma vez que a repetibilidade foi boa. As três séries tiveram seus tubos turvados na concentração C<sub>8</sub>, ficando translúcidas em C<sub>7</sub>. Isto mostra que a concentração mínima inibitória foi no tubo de concentração 7 (1,22  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

No teste da levofloxacin, a turvação ocorreu no tubo de concentração 7, indicando que a concentração mínima inibitória ocorreu no tubo de concentração 6 (2,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Para os testes do composto [BiCl<sub>3</sub>(NOR)]<sub>2</sub>, o mesmo resultado foi encontrado para as três séries, indicando a ausência de erros mais uma vez. As três séries tiveram seus tubos turvados na concentração C<sub>7</sub>, ficando translúcidas em C<sub>6</sub>. Isto mostra que a concentração mínima inibitória foi no tubo de concentração 6 (2,48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

No teste da droga livre, norfloxacin, a turvação ocorreu no tubo de concentração 7, indicando que a concentração mínima inibitória ocorreu no tubo de concentração 6 (2,08  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Para os testes do composto [BiCl<sub>3</sub>(ESPAR)]<sub>2</sub> o mesmo resultado foi encontrado para as três séries, indicando que o resultado pode ser considerado confiável. As três séries tiveram seus tubos turvados na concentração C<sub>7</sub>, ficando translúcidas em C<sub>6</sub>. Isto mostra que a concentração mínima inibitória foi no tubo de concentração 6 (2,32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

No teste da esparfloxacin a turvação ocorreu no tubo de concentração 7, indicando que a concentração mínima inibitória ocorreu no tubo de concentração 6 (1,98  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

A Tabela 24 mostra os resultados da CIM em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Tabela 24. Resultados dos cálculos das concentrações inibitórias mínimas, contra *P. aeruginosa*, em  $\mu\text{mol L}^{-1}$  das drogas livres e de seus complexos com Bi(III).

Compostos	Cálculo da Concentração Mínima Inibitória (CIM)			
	CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	CIM ( $\text{g L}^{-1}$ )	MM (g)	CIM ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
Levofloxacina	2,05	$2,05 \times 10^{-3}$	361,37	5,68
$[\text{BiCl}_3(\text{LEVO})]_2$	1,22	$1,22 \times 10^{-3}$	676,7	1,80
Norfloxacina	2,08	$2,08 \times 10^{-3}$	319,33	6,52
$[\text{BiCl}_3(\text{NOR})]_2$	2,48	$2,48 \times 10^{-3}$	634,7	3,91
Esparfloxacina	1,98	$1,98 \times 10^{-3}$	392,40	5,05
$[\text{BiCl}_3(\text{ESPAR})]_2$	2,32	$2,32 \times 10^{-3}$	706,7	3,29

Como pode ser observado na tabela acima, em todos os casos, a CIM para os complexos é menor que para os ligantes livres, indicando que os complexos são mais ativos que as respectivas drogas livres. Em especial o complexo com a Levo, cerca de 70% mais ativo.

Abaixo, na Tabela 25, encontram-se os valores da série de diluição ( $C_0$  a  $C_{10}$ ) para o teste com *Staphylococcus aureus*. As concentrações inibitórias mínimas encontram-se destacadas em negrito.



Tabela 25. Valores da série de diluição das concentrações do teste de atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* para as fluorquinolonas e seus complexos de Bi(III). Os valores em negrito representam as CIM.

Compostos	Concentrações (µg/mL)										
	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>
Levofloxacin	131,5	65,75	32,88	16,44	8,22	4,11	2,05	1,03	0,51	<b>0,26</b>	0,13
[BiCl <sub>3</sub> (LEVO)] <sub>2</sub>	156,25	78,13	39,06	19,53	9,76	4,88	2,44	1,22	<b>0,61</b>	0,31	0,15
Norfloxacin	133,5	66,75	33,38	16,69	8,34	4,17	2,08	1,04	<b>0,52</b>	0,26	0,13
[BiCl <sub>3</sub> (NOR)] <sub>2</sub>	159	79,5	39,75	19,87	9,93	4,97	2,48	1,24	<b>0,62</b>	0,31	0,15
Esparfloxacin	126,75	63,37	31,69	15,84	7,92	3,96	1,98	0,99	<b>0,49</b>	0,25	0,12
[BiCl <sub>3</sub> (ESPAR)] <sub>2</sub>	148,75	74,37	37,19	18,60	9,30	4,65	2,32	1,16	<b>0,58</b>	0,29	0,14

Para os testes do composto [BiCl<sub>3</sub>(LEVO)]<sub>2</sub>, o mesmo resultado foi encontrado para as três séries, indicando a ausência de erros uma vez que a repetibilidade foi boa. As três séries tiveram seus tubos turvados na concentração C<sub>9</sub>, ficando translúcidas em C<sub>8</sub>. Isto mostra que a concentração mínima inibitória foi no tubo de concentração 8 (0,61 µg mL<sup>-1</sup>).

No teste da levofloxacin a turvação ocorreu no tubo de concentração 10, indicando que a concentração mínima inibitória ocorreu no tubo de concentração 9 (0,26 µg mL<sup>-1</sup>).

Para os testes do composto [BiCl<sub>3</sub>(NOR)]<sub>2</sub>, o mesmo resultado foi encontrado para as três séries, indicando a ausência de erros mais uma vez. As três séries tiveram seus tubos turvados na concentração C<sub>9</sub>, ficando translúcidas em C<sub>8</sub>. Isto mostra que a concentração mínima inibitória foi no tubo de concentração 8 (0,62 µg mL<sup>-1</sup>).

No teste da droga livre, norfloxacin, a turvação ocorreu no tubo de concentração 9, indicando que a concentração mínima inibitória ocorreu no tubo de concentração 8 (0,52 µg mL<sup>-1</sup>).

Para os testes do composto [BiCl<sub>3</sub>(ESPAR)]<sub>2</sub>, o mesmo resultado foi encontrado para as três séries, indicando que o resultado pode ser confiável. As três séries tiveram seus tubos turvados na concentração C<sub>9</sub>, ficando translúcidas em C<sub>8</sub>. Isto mostra que a concentração mínima inibitória foi no tubo de concentração 8 (0,58 µg mL<sup>-1</sup>).

No teste da esparfloxacin a turvação ocorreu no tubo de concentração 9, indicando que a concentração mínima inibitória ocorreu no tubo de concentração 8 (0,49 µg mL<sup>-1</sup>).

A Tabela 26 mostra os resultados da CIM em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Tabela 26. Resultados dos cálculos das concentrações inibitórias mínimas, contra *P. aeruginosa*, em  $\mu\text{Mol L}^{-1}$  das drogas livres e de seus complexos com Bi(III).

Compostos	Cálculo da Concentração Mínima Inibitória			
	CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	CIM ( $\text{g L}^{-1}$ )	MM (g)	CIM ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
Levofloxacin	0,26	$0,26 \times 10^{-3}$	361,37	0,71
$[\text{BiCl}_3(\text{LEVO})]_2$	0,61	$0,61 \times 10^{-3}$	676,7	0,61
Norfloxacin	0,52	$0,52 \times 10^{-3}$	319,33	1,63
$[\text{BiCl}_3(\text{NOR})]_2$	0,62	$0,62 \times 10^{-3}$	634,7	0,98
Esparfloxacin	0,49	$0,49 \times 10^{-3}$	392,40	1,26
$[\text{BiCl}_3(\text{ESPAR})]_2$	0,58	$0,58 \times 10^{-3}$	706,7	0,82

Como pode ser observado na tabela acima, a CIM para os complexos é menor que para os ligantes livres, indicando que os complexos são mais ativos que as respectivas drogas livres.

Na literatura, a maior parte dos complexos de Bismuto (III) relatados com fluorquinolonas está coordenado ionicamente (Ligante-Metal). De acordo com estas pesquisas, os complexos coordenados desta forma apresentariam maior atividade biológica, pois sua solubilidade ajudaria a permeabilidade e transposição no meio, facilitando o mecanismo de ação do complexo. Apesar de insolúveis, os complexos obtidos neste trabalho, quando colocados no caldo para dar início aos testes ficaram solúveis no meio, não havendo qualquer tipo de interferência nos testes e por fim nos resultados apresentados.

## 10

### Conclusões

#### Complexos de Au(III)

Inicialmente, descrevemos a obtenção de três novos complexos de Au(III) de alguns antibióticos da classe das fluorquinolonas. Os complexos obtidos são do tipo  $[\text{AuCl}_2(\text{L})]\text{Cl}$ , onde L= levofloxacin, norfloxacin ou esparfloxacin. Em todos os casos, as fluorquinolonas coordenam-se de modo neutro ao metal. Dados de infravermelho sugerem que as carbonilas cetônica e carboxílica não estão coordenadas ao Au. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  confirmam os dados de infravermelho e sugerem que a coordenação das fluorquinolonas ao Au(III) ocorre através dos nitrogênios do anel piperazina.

Em seguida, são relatados resultados de estudos de absorção ótica, fluorescência estacionária e fluorescência resolvida no tempo para a norfloxacin e seu complexo de Au(III). Os resultados mostraram que a presença do Au(III) modificou as propriedades da fluorescência da norfloxacin em toda a faixa de pH, indicando que há complexo em meio aquoso com as três espécies iônicas da NOR, porém com constantes de associação bem diferentes. As propriedades de luminescência da norfloxacin foram utilizadas para estudar a associação dos íons Au(III) com as formas catiônicas, aniônicas e zwitteriônica do ligante livre. Os íons de Au(III), ao se complexarem com NOR zwitteriônica, produziu uma diminuição na fluorescência e um pequeno deslocamento para o vermelho. As modificações da intensidade de fluorescência foram ajustadas com a expressão exata para o modelo de um sítio de ligação e a constante de ligação foi obtida:  $K_b^{\text{zw}} = 1,7 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$ . O tempo de vida de fluorescência para a NOR zwitteriônica, que foi  $\tau_{\text{zw}} = 1,15 \text{ ns}$ , tornou-se  $\tau_2 = 2,42 \text{ ns}$  quando o complexo foi formado. A associação do Au(III) com a NOR catiônica foi muito mais fraca. A constante de ligação obtida a partir das mudanças de fluorescência foi  $K_b^{\text{cat}} = 2,4 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ . Os resultados revelaram que o sítio de coordenação da NOR zwitteriônica com Au(III) envolve o grupo carboxilato. Os resultados também mostraram que existe uma associação muito mais forte do Au(III) com o ânion carboxilato do que com o ácido neutro.

Associação de Au(III) com a NOR aniônica, não fluorescente em pH 10,6, apresentou uma clara evidência de dois sítios de ligação. O aumento da fluorescência em baixas concentrações de Au(III), sugere que o local de

coordenação de maior afinidade é o grupo piperazinil desprotonado. A constante de ligação para este sítio é muito alta e somente um limite mais baixo foi determinado a partir de mudanças na fluorescência:  $K_b^{pip} \geq 5 \times 10^7 \text{ mol L}^{-1}$ . A medição do decaimento da fluorescência permitiu calcular um tempo de vida de 1,52 ns para o complexo. Ligação de um segundo íon Au(III) suprime a fluorescência do complexo da Nor com Au nesse pH. O segundo sítio de ligação da NOR aniônica seria o mesmo que o sítio único de ligação da NOR zwitteriônica, i.e., os átomos de oxigênio da carbonila e do grupo carboxílico.

Os resultados sugerem que o pH local de um ambiente é muito importante para determinar a associação de íons metálicos com fluoroquinolonas. Os sítios de ligação são diferentes em diferentes pH e as constantes de ligação mudam por várias ordens de magnitude.

Os testes de atividade biológica mostraram que os complexos de Au(III) estudados têm atividade citotóxica superior às fluorquinolonas livres frente às linhagens tumorais A20, B16-F10 e K562 e as linhagens sadias MCR-5 e L919, em especial, o complexo de Au(III) com a LEVO. Portanto, a associação Au-fluorquinolona mostrou ser uma estratégia eficaz para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais.

## Complexos de Cu(II)

Dando continuidade aos nossos trabalhos, investimos na obtenção de complexos de Cu(II) de levofloxacin, norfloxacin e da esparfloxacin, tendo a fenantrolina como co-ligante. Os dados sugerem a formação de complexos do tipo  $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{L})]$  onde LEVO, NOR e ESPAR representam os ligantes levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin coordenados aos íons metálicos na forma zwitteriônica. Os dados dos espectros de infravermelho indicam que os ligantes estão coordenados aos íons Cu(II) de modo bidentado através do grupo carboxilato e da carbonila cetônica.

A toxicidade dos complexos de Cu(II) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin foi testada frente a *Artemia sp.* como um pré-screening para a atividade citotóxica e antitumoral. Nas doses testadas, nenhum dos complexos estudados apresentou toxicidade, não significando, no entanto, que não têm potencial como agentes antitumorais, uma vez que este teste só se correlaciona a alguns tumores. Testes de atividade anti T-cruzi foram realizados com

sucesso, com rendimentos de até 80% melhores do que a droga atualmente disponível para o tratamento da Doença de Chagas.

### Complexos de Bi(III)

Obtivemos, igualmente, complexos de Bi(III) de algumas fluorquinolonas. Nesse caso, os complexos obtidos são do tipo  $[\text{BiCl}_3(\text{L})_2]_2$ , onde L representa os ligantes LEVO, NOR ou ESPAR coordenados de forma neutra ao metal. Dados de infravermelho e Raman sugerem que as carbonilas cetônica e carboxílica não estão coordenadas ao Bi.

A atividade antibacteriana dos complexos de Bi(III) de levofloxacin, norfloxacin e esparfloxacin foi testada utilizando-se estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. As drogas livres e os complexos foram testados em doses que variaram entre 0,10 e 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em todos os casos, observou-se que os complexos são mais ativos que as respectivas drogas livres.

## 11

## Produções Acadêmicas

Os trabalhos **“Complexos de Au(III) contendo fluorquinolonas: sínteses e estudos espectroscópicos”** e **“Estudo do antibiótico norfloxacin e do seu complexo com Au(III) através da técnica de fluorescência estacionária e resolvida no tempo”** com parte dos resultados descritos aqui, foram apresentados durante a 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, sendo que o último foi apresentado oralmente durante uma seção coordenada de química inorgânica.

Os trabalhos **“Complexos de Cu(II) de norfloxacin e esparfloxacin: novos candidatos a agentes anti-*T.cruzi*”** e **“Estudo da formação de complexos de Cu(II)-fenantrolina com norfloxacin através de supressão de fluorescência”** com parte dos resultados descritos aqui, foram apresentados durante a 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

O trabalho **“Spectrofluorometric studies of the interaction of the metal ions Au(III) and Cu(II) with the antibiotic norfloxacin”** foi aceito no XXXIII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, 2010.

O trabalho **“EPR Spectral Properties of Cu(II) complexes with fluorquinolone and 1,10-phenanthroline”** foi aceito e apresentado no XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry/ II Latin American Meeting on Inorganic Chemistry – XV BMIC/ II LABIC 2010.

O trabalho **“Co(II), Mn(II) and Cu(II) complexes of fluorquinolones: spectroscopical studies and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*”** foi aceito para o 15<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry - ICBIC 2011.

O trabalho **“Gold(III) Levofloxacin complex: a promising antitumor candidate”** foi aceito e apresentado no XVI Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry/ II Latin American Meeting on Inorganic Chemistry – XV BMIC/ III LABIC 2012.

Três artigos com parte dos resultados descritos nesta tese foram publicados. O artigo **“Fluorescence studies of gold(III)-norfloxacin complexes in aqueous solutions”** no “Journal of Fluorescence”, o artigo **“Co(II), Mn(II) and Cu(II) complexes of fluorquinolones: synthesis, spectroscopical studies and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*”** na Polyhedron e o

artigo ***“Atypical fluoroquinolone gold(III) chelates as potential anticancer agents: Relevance of DNA and protein interactions for their mechanism of action”*** no *European Journal of Medicinal Chemistry*.

## 12

## Referências Bibliográficas

- 
- 1 Souza, M.V.N. de, Almeida, M.V. de, Silva, A.D. da, Couri, M.R.C., Ciprofloxacina, uma importante fluorquinolona no combate ao antraz. **Rev. Bra. Farm.**, 85 (2004) 13.
  - 2 Barbosa J., Barrón D., Lozano E. Jiménez, Eletrophoretic behavior of quinolones in capillary electrophoresis. Effect of pH and evaluation of ionization constants, **Journal of Chromatography A**, 839, 183-192, (1999).
  - 3 Drakopoulos A. I. and Ioannou P. C., Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behavior of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and pefloxacin in aqueous solution, **Analytica Chimica Acta**, 354, 197-204, (1997).
  - 4 Barbosa J., Barrón D., Lozano E. Jiménez, Eletrophoretic behavior of quinolones in capillary electrophoresis. Effect of pH and evaluation of ionization constants, **Journal of Chromatography A**, 839, 183-192, (1999).
  - 5 Lu J. Q., Jin F., Sun T. Q. e Zhou X. W., Multi-epectroscopic study on iteration of bovine serum albumin with lomefloxacin-copper (II) complex, **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, vol. 40, 299-304, (2007).
  - 6 Barbato F., Martino G., Grumetto L. e Rotonda M. I., Retention of quinolones on human serum albumin and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein HPLC columns: Relationships with different scales of lipophilicity, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 30, 211-219, (2007).



- 
- 7 G.Y. Lescher, M.D. Gruet, J.H. Bailey, R.P. Brundage, 1,8-Naphthyridine Derivates. A new class of chemotherapeutic Agents. **Med. Pharmaceut. Chem.**, 5 (1962) 1063.
  - 8 APPELBAUM, PC; HUNTER, PA. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents** 16 (2000) 5 - 15.
  - 9 Mitscher, L. A. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. **Chem. Rev.**, 2005, 105, 559.
  - 10 Barret, J. F.; Sutcliff, J. A.; Gootz, T. D.; In vitro assays used to measure the activity of topoisomerases. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, 34 (1990) 1.
  - 11 Vieira, Lígia Maria Mendonça. **Síntese e caracterização de complexos de paládio (II), platina (II), zinco (II) e cobre (II) com ligantes do grupo das fluorquinolonas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química, 2007.
  - 12 Takenouch, T.; Tabata, F.; Iwata, Y.; Hanzawa, H.; Sugawara, M.; Ohya, S.; Hydrophilicity of quinolones is not an exclusive factor for decreased activity in efflux-mediated resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, 1996, 40, 1835.
  - 13 Gootz, TD; Brighty, KE; Fluoroquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance, and clinical aspects. **Medicinal Research Reviews** 16 (1996) 433- 486.
  - 14 HOOPER, DC. Mode of action of fluoroquinolones. **Drugs** 58 (1999) 6-10.
  - 15 J.R.J. Sorenson, Copper chelates as possible active forms of the antiarthritic agents. **J. Med. Chem.** 19 (1976) 135 - 148.
  - 16 D.H. Brown, A.E. Lewis, W.E. Smith, J.W. Teape, Anti-inflammatory effects of some copper complexes. **J. Med. Chem.** 23 (1980) 729.
  - 17 D.R. Williams, **The Metals of Life**, Van Nostrand Reinhold, London, 1971.

- 18 M. Ruiz, L. Perello, R. Ortiz, A. Castineiras, C. Maichlemossmmer, E. Canton, Synthesis, Characterization, and Crystal-Structure of Cu(Cinoxacinate) $\cdot$ 2H $_2$ O Complex. A Square-Planar CuO $_4$  Chromophore, Antibacterial Studies. **J. Inorg. Biochem.** 59 (1995) 801.
- 19 Castillo-Blum, S.E.; Barba-Behrens, N. Coordination Chemistry of Some Biologically Active Ligands. **Coord. Chem. Rev.** 2000, 196, 3 - 30.
- 20 I. Turel, I. Leban, G. Klintschar, N. Bukovec, S. Zalar, Syntheses, Crystal Structure and Characterization of Two Metal-Quinolones Compounds. **J. Inorg. Biochem.** 66 (1997) 77.
- 21 I. Turel, K. Gruber, I. Leban, N. Bukovec, **J. Inorg. Biochem.** 61 (1996) 197.
- 22 I. Turel, I. Leban, M. Zupancic, P. Bukovec, K. Gruber, **Acta Crystallog, Sect. C: Cryst. Struct. Commun.** 52 (1996) 2443.
- 23 Z.F. Chen, R.J. Xiong, J.L. Zuo, Z. Guo, X.Z. You, K.H. Fun, J. Chem. Soc., **Dalton Trans.** 22 (2000) 4013.
- 24 J. Al-Mustafa, **Acta Chim. Slov.** 49 (2002) 457.
- 25 M. Ruiz, L. Perello, J.S. Cario, R. Ortiz, S.G. Granda, M.R. Diaz, E. Canton, **J. Inorg. Biochem.** 69 (1998) 231.
- 26 Graham, G. G.; Champion, G. D.; Ziegler, J. B. **Met.-Based Drugs** 1994, 1, 395-404.
- 27 Takahashi, K.; Griem, P.; Goebel, C.; Gonzalez, J.; Gleichmann, E. **Met.-Based Drugs** 1994, 1, 483-496.
- 28 Shaw, C. F., III; Schraa, S.; Gleichmann, E.; Grover, Y. P.; Dunemann, L.; Jagarlamudi, A. **Met.-Based Drugs** 1994, 1, 351-362.
- 29 Refat, MS. Synthesis and characterization of norfloxacin-transition metal complexes (group 11, IB): Spectroscopic, thermal, kinetic measurements and biological activity. **Spectrochimica Acta** 68 (2007) 1393-1405.
- 30 P.M. May, D.R. Williams, **Met. Ions Biol. Sys.** 12 (1981) 283–311.
- 31 J.R.J. Sorenson, **Prog. Med. Chem.** 26 (1989) 437–568.

- 
- 32 J.E. Weder, C.T. Dillon, T.W. Hambley, B.J. Kennedy, P.A. Lay, J.R. Bi.n, H.L. Regtop, N.M. Davies, **Coord. Chem. Rev.** 232 (2002) 95–126.
- 33 M. Ruiz, L. Perello, J. Servercarrio, R. Ortiz, S. Garciagrande, M.R. Diaz, E. Canton, Cinoxacin complexes with divalent metal ions. Spectroscopic characterization. Crystal structure of a new dinuclear Cd(II) complex having two chelate-bridging carboxylate groups. Antibacterial studies. **J. Inorg. Biochem.** 69 (1998) 231–239.
- 34 F. Hueso-Urena, M.N. Moreno-Carretero, M.A. Romero-Molina, J.M. Salas-Peregrin, M.P. Sanchez-Sanchez, G. Alvarez de Cienfuegos-Lopez, R. Faure, Transition Metal Complexes with Monodeprotonated Isoorotic and 2-Thioisoorotic Acids: Crystal Structure, Spectral and Magnetic Study, and Antimicrobial Activity. **J. Inorg. Biochem.** 51 (1993) 613–632.
- 35 G. Psomas, C. Dendrinou-Samara, P. Philippakopoulos, V. Tangoulis, C.P. Raptopoulou, E. Samaras, D.P. Kessissoglou, Cu<sup>II</sup>-herbicide complexes: structure and bioactivity. **Inorg. Chim. Acta** 272 (1998) 24 – 32.
- 36 C. Dendrinou-Samara, G. Psomas, C.P. Raptopoulou, D.P. Kessissoglou, *Copper(II)* Complexes with Phenoxyalkanoic Acids and Nitrogen Donor Heterocyclic Ligands: Structure and Bioactivity. **J. Inorg. Biochem.** 83 (2001) 7–16.
- 37 Saha, DK; Sandbhor; Shirisha, UK; Padhye, S; Deobagkar, D; Anson, CE; Powell, AK. A novel mixed-ligand antimycobacterial dimeric copper complex of ciprofloxacin and phenanthroline. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 14 (2004) 3027-3032.

- 
- 38 E.K. Efthimiadou et al. Mononuclear copper(II) complexes with quinolones and nitrogen-donor heterocyclic ligands: Synthesis, characterization, biological activity and interaction with DNA. **Inorganica Chimica Acta** 360 (2007) 4093 – 4102.
- 39 Katsarou et al. Novel Copper(II) Complex of *N*-Propyl-norfloxacin and 1,10-Phenanthroline with Enhanced Antileukemic and DNA Nuclease Activities. **Journal of Medicinal Chemistry** 51 (2008) 470 – 478.
- 40 E.K. Efthimiadou et al. Structure and biological properties of the copper(II) complex with the quinolone antibacterial drug *N*-propyl-norfloxacin and 2,20-bipyridine. **Journal of Inorganic Biochemistry** 101 (2007) 64–73.
- 41 P. Ruiz, R. Ortiz, L. Perello, G. ALZUET, M. Gonzalez-Alvarez, M. Liugonzalez, F. Sanz-Ruiz, Synthesis, structure, and nuclease properties of several binary and ternary complexes of copper(II) with norfloxacin and 1,10 phenanthroline. **Journal of Inorganic Biochemistry** 101 (2007) 831-840.
- 42 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.
- 43 J. Marshall, J.R. Warren, Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. **Lancet** (1984) i: 1311 - 1315.
- 44 E.A.J. Rauws, G.N.J. Tytgat, Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. **Lancet** 335 (1990) 1233.
- 45 C.A.M. McNulty, J. Dent, R. Wise, Susceptibility of Clinical Isolates of *Campylobacter pyloridis* to 11 Antimicrobial Agents. **Antimicrob. Agents Chemother.** 28 (1985) 837.
- 46 Y. Glupczynski, M. Labbe, A. Burette, M. Delmee, V. Avesani, C. Bruck, *Lancet*. Treatment failure of ofloxacin in *Campylobacter pylori* infection. (1987) 1096.

- 
- 47 B. van der Linden, **Curr. Opin. Inf. Dis.** 7 (1994) 577.
  - 48 D.Y. Graham, *Helicobacter pylori*. Basic Mechanisms to Clinical Cure, Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, 1994, 531- 537.
  - 49 C.S. Goodwin, P. Blake, E. Blincow, The minimum inhibitory and bactericidal concentrations of antibiotics and anti-ulcer agents against *Campylobacter pyloridis*. **J. Antimicrob. Chemother.** 17 (1986) 309.
  - 50 N.M. Leonard, L.C. Wieland and R.S. Mohan, **Tetrahedron**, 58, 8373 (2002).
  - 51 H. Sun and K.Y. Szeto, Binding of bismuth to serum proteins: implication for targets of Bi(III) in blood plasma. **Inorg. Biochem.**, 94, 114 (2003).
  - 52 J. Pannequin, S. Kovac, J.P. Tantiongco, R.S. Norton, R.S. Shulkes, K.J. Barnham and G.S. Baldwin, **J. Biol. Chem.**, 279, 2453 (2004).
  - 53 U. Dittes, E. Vogel and B.K. Keppler, Overview on bismuth (III) and bismuth (V) complexes with activity against *Helicobacter pylori*. **Coord. Chem. Rev.**, 163 (1997) 345 - 364.
  - 54 D.Y. Graham, G. Belson, S. Abudayyeh, M.S. Osato, M.P. Dore and H.M.T. El-Zimaity, **Digest. Liver Dis.**, 36 (2004) 384.
  - 55 I. Turel, L. Golic, P. Bukovec and M. Gubina, Antibacterial tests of bismuth (III) -quinolone (Ciprofloxacin, cf) compounds against helicobacter pylori and some other bacteria. **J. Inorg. Biochem.**, 71 (1998) 53.
  - 56 H. Sun, H. Li, I. Harvey and P.J. Sadler, nteractions of bismuth complexes with metallothionein(II). **J. Biol. Chem.**, 274 (1999) 29094 - 29101.
  - 57 Turel, I.; Leban, I.; Bukovec, N. Crystal Structure and Characterization of the Bismuth (III) Compound with Quinolone Family Member (Ciprofloxacin). Antibacterial Study. **J Journal of Inorganic Biochemistry** 66 (1997) 241 – 245.
  - 58 A. Piecha et al. Structural characterization, molecular dynamics, dielectric and spectroscopic properties of tetrakis(pyrazolium) bis(m<sub>2</sub> -bromo-

tetrabromobismuthate(III)) dihydrate,  $[C_3N_2H_5]_4[Bi_2Br_{10}]2H_2O$ . Solid State Sciences 9 (2007) 1036 – 1048.

- 59 Turel, I.; Golic, L.; Bukovec, P.; Gubina, M. Antibacterial Tests of Bismuth (III) – Quinolone (Ciprofloxacin, cf) Compounds against Helicobacter Pylori and Some Other Bacteria. Crystal Structure of  $(cfH_2)_2[Bi_2Cl_{10}] \cdot 4H_2O$ . **J. Inorg. Biochem.** 71 (1998) 53 - 60.
- 60 LUIZ, Fabrício Casarejos Lopes; LOURO, Sonia Renaux Wanderley. **Estudos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo de anestésicos locais e de antibióticos da classe das fluorquinolonas.** 2009. Dissertação (Mestrado)-Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Física, 2009.
- 61 GÓES FILHO, Luiz da Silva; LOURO, Sonia Renaux Wanderley. **Estudo do efeito de solventes nas propriedades espectroscópicas do antibiótico norfloxacin:** absorção, fluorescência estacionária e resolvida no tempo. 2010. Tese (Doutorado)-Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Física, 2010.
- 62 Luiz, F. C. L., Garcia, L. S., Góes Filho, L. S.; Teixeira, L. R.; Louro, S. R. W., Fluorescence Studies of gold(III)-Norfloxacin Complex in Aqueous Solutions. **Journal of Fluorescence** 21 (2011) 1933-1940.
- 63 D.G.J. Batista, P.B. da Silva, L. Stivanin, D.R. Lachter, R.S. Silva, J. Felcman, S.R.W. Louro, L.R. Teixeira, M.N.C. Soeiro, Co(II), Mn(II) and Cu(II) complexes of fluorquinolones: synthesis, spectroscopical studies and biological evaluation against Trypanosoma cruzi, **Polyhedron** 30 (2011) 1718 – 1725.
- 64 McLaughlin, J.L. Rogers, L.L. Anderson, J.E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal** 32 (1998) 513.
- 65 B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, Brine shrimp: a convenient general bioassay for active *plant* constituents. **J. Med. Plant Res.** 45 (1982) 31.

- 
- 66 I.A. Nascimento, M.M.S. Araújo, Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. **Ecotoxicology and Environmental Restoration** 2 (1999) 41.
- 67 CETESB. Água do Mar – **Teste de Toxicidade Aguda com *Artemia***. Norma Técnica L5.021, São Paulo, 1991.
- 68 **Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9].
- 69 Gouvêa, L. R., Garcia, L. S., Lachter, D. R., Nunes, P. R., Pereira, F. C., Lacerda, E. P. S., Louro, S. W., Barbeira, P. S. J., 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.
- 70 Sadeek, AS. Synthesis, thermogravimetric analysis, infrared, electronic and mass spectra of Mn(II), Co(II) and Fe(III) norfloxacin complexes. **Journal of Molecular Structure** 753 (2005) 1-12.
- 71 Efthimiadou, EK; Sanakis, Y; Raptopoulou, CP; Karaliota, A; Katsarosa, N; Psomas, G. Crystal structure, spectroscopic, and biological study of the copper(II) complex with third-generation quinolone antibiotic sparfloxacin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 16 (2006) 3864-3867.
- 72 Silva, R. S. **Complexos de Mn(II) e Co(II) de Tiossemicarbazonas e Fluorquinolonas: Síntese, Estudos das Propriedades Espectroscópicas e Eletroquímicas e Testes de Atividade Biológica**. Dissertação (Mestrado), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2009.
- 73 Boat versus chair conformation in N-methyl and N,N-dimethylpiperazine platinum(II) complexes studied by X-ray analysis. A rare example of metal chelate piperazine: cis-[PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>ppz)]. Part I. A.Cicarese, D.A.Clemente, F.P.Fanizzi, A.Marzotto, G.Valle, **Inorg. Chim. Acta**, (1998), Vols 275 - 276, 410 - 418.

- 
- 80 C.A. Burns, K. Ward, W.U. Spindel, G.E. Pacey, (2006), Ionic Strength Effects on Gold Nanoparticle Surface Plasmon Resonance, **Talanta** 69, 873-876.
- 81 P. Bilski, L.J. Martinez, E. B. Koker, and C.F. Chignell, (1996), Photosensitization by norfloxacin is a function of pH, **Photochem. Photobiol.** 64, 496-500.
- 82 B. Valeur, **Molecular Fluorescence**, Chap. 10, Appendix B, Wiley-VCH, Weinheim, 1st ed, 2nd reprint, Federal Republic of Germany, 2005.
- 83 Grivicich, A. Regner, A.B. da Rocha, Morte celular por apoptose, **Revista Brasileira de Cancerologia** 53 (2007) 335 - 343.
- 84 Sadeek, AS. Synthesis, thermogravimetric analysis, infrared, electronic and mass spectra of Mn(II), Co(II) and Fe(III) norfloxacin complexes. **Journal of Molecular Structure** 753 (2005) 1-12.
- 85 Efthimiadou, EK; Sanakis, Y; Raptopoulou, CP; Karaliota, A; Katsarosa, N; Psomas, G. Crystal structure, spectroscopic, and biological study of the copper(II) complex with third-generation quinolone antibiotic sparfloxacin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 16 (2006) 3864 - 3867.
- 86 Refat, MS. Synthesis and characterization of norfloxacin-transition metal complexes (group 11, IB): Spectroscopic, thermal, kinetic measurements and biological activity. **Spectrochimica Acta** 68 (2007) 1393-1405.
- 87 G.B. Deacon, R.J. Phillips, Coord. Chem. Rev. 33 (1980) 227.
- 88 Hathaway, B. J. Billing, D. E. Electronic properties and stereochemistry of mononuclear complexes of copper(II) ion Coord. **Chem. Rev.** 5 (1970) 143-207.
- 89 L. Jaideva Singh, N. Shantibala Devi, S. Pramodini Devi, W. Bembee Devi, RK Hemakumar Singh, B. Rajeswari, RM Kadam, **Inorg. Chem. Commun.** 13 (2010) 365-368.
- 90 Weil, J. A. Bolton, J. R. Wertz, J. E. Electron Paramagnetic Resonance, elementary theory and practical applications, **John Wiley & Sons, Inc.**, 1993, ch. 6.3.



- 91 Eaton, SS; More, KM; Sawant, BM; Eaton, GR. Use of the ESR half-field transition to determine the interspin distance and the orientation of the interspin vector in systems with two unpaired electrons. **Journal of the American Chemical Society** 105 (1983) 6560-6567.
- 92 Saha, D.K., Sandbhor; Shirisha, Uk; Padhye, S; Deobagkar, D; Anson, Ce; Powell, AK. A novel mixed-ligand antimycobacterial dimeric copper complex of ciprofloxacin and phenanthroline. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 14 (2004) 3027-3032.
- 93 Psomas, G; Tarushi, A; Efthimiadou, E K; Sanakis ; Raptopoulou, Cp; Katsaros, N., Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with oxolinic acid. **J. Inorg. Biochem.** 100 (2006) 1764–1773.
- 94 Martins, Darliane Aparecida. **Complexos de Cu(II) de algumas fluorquinolonas: sínteses, atividade anti-T.cruzi e investigação do mecanismo de ação.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química, 2011.
- 95 Lakovicz, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 3rd ed, Springer, New York, 2006.
- 96 Valeur, Bernard., **Molecular Fluorescence**, 1 st ed 2nd reprinted, Wiley-VCH, Weinheim, Federal Republic of Germany, 2005.
- 97 Valeur, Bernard. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**, cap. 10, Apêndice B, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- 98 D.G.J. Batista, P.B. da Silva, L. Stivanin, D.R. Lachter, R.S. Silva, J. Felcman, S.R.W. Louro, L.R. Teixeira, M.N.C. Soeiro, Co(II), Mn(II) and Cu(II) complexes of fluorquinolones: synthesis, spectroscopical studies and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*, **Polyhedron** 30 (2011) 1718 – 1725.
- 99 J.M. Siqueira, M.D. Bomm, N.F.G. Pereira, W.S. Garcez, M.A.D. Boaventura, **Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach.** Química Nova 21 (1998) 557.
- 100 Lannes-Vieira, Joseli et al . Chagas disease centennial anniversary celebration: historical overview and prospective proposals aiming to

---

maintain vector control and improve patient prognosis - a permanent challenge. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2012 .

- 101 Hoare CA, Wallace FC. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. **Nature** 212 (1966) 1358.
- 102                                      Figura                                      disponível em:  
<http://www.sbimunologia.com.br/sbinarede/SBInarede70/default.asp?action=artigo>.
- 103 Sadeek, AS. Synthesis, thermogravimetric analysis, infrared, electronic and mass spectra of Mn(II), Co(II) and Fe(III) norfloxacin complexes. **Journal of Molecular Structure** 753 (2005) 1-12.
- 104 E.K. Efthimiadou, Y. Sanakis, C.P. Raptopoulou, A. Karaliota, N. Katsaros, G. Psomas, Crystal structure, spectroscopic, and biological study of the copper(II) complex with third-generation quinolone antibiotic sparfloxacin. **Bioorg. Med. Chem. Letters** 16 (2006) 3864 - 3867.
- 105 Neugebauer, U., A. Szeghalmi, M. Schmitt, W. Kiefer, J. Popp, U. Holzgrabe, Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones. **Spectrochimica Acta Part A** 61 (2005) 1505.