



PAULA CRISTINA HUBER

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NA
INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO β -AMILÓIDE**

CAMPINAS

2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

PAULA CRISTINA HUBER

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NA INIBIÇÃO DA
AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO β -AMILÓIDE**

ORIENTADOR: PROFA. DRA. WANDA PEREIRA ALMEIDA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA NA
ÁREA DE QUÍMICA ORGÂNICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
PAULA CRISTINA HUBER, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. WANDA PEREIRA ALMEIDA.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

H862a Huber, Paula Cristina (1983-).
Avaliação do efeito de agentes antimicrobianos na
inibição da agregação do peptídeo β -amilóide / Paula
Cristina Huber. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientadora: Wanda Pereira Almeida.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Alzheimer, doença de. 2. β -amilóide. 3. Metais.
4. Antimicrobianos. I. Almeida, Wanda Pereira.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of the effect of antimicrobial agents on the inhibition of
aggregation of β -amyloid peptide

Palavras-chave em inglês:

Alzheimer disease

β -amyloid

Metals

Antimicrobial

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Wanda Pereira Almeida [Orientadora]

José Augusto Rosário Rodrigues

Marco Edilson Freire de Lima

Data de defesa: 28/09/2012

Programa de pós-graduação: Química

Dedico essa dissertação aos meus pais, Erwin Arthur Huber e Aparecida de Lourdes Pitteri Huber, motivo de existência, espelho de perseverança, família e seres-humanos. Amo vocês!!!

Dedico essa dissertação

À toda minha família que sempre me apoiou, torceu por mim e acreditou que tudo fosse dar certo, mesmo nos momentos mais difíceis. Em especial aos meus irmãos Maria Fernanda Huber e Erwin Alexandre Huber e ao meu amor Julio Cezar Pastre, por sempre estar ao meu lado.

Agradecimentos

A Deus!!

À Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida, pelo aceite nessa difícil jornada. Sobretudo pelo apoio, confiança e amizade. Obrigada por tudo. Serei eternamente grata e levarei comigo todos os ensinamentos e a ética ao se trabalhar.

Aos colegas do Instituto Vita Nova, em especial Gustavo, Jardel e Patrícia pelo ENORME apoio e paciência que me ajudaram a nunca desistir deste sonho. Pessoas grandiosas com as quais tenho honra de poder dividir conhecimentos, pedir conselhos, “aulas” de orgânica e livros emprestados (rsrs). Adoooooro o ambiente de trabalho com vocês!!!

Aos colegas do LAFAME, Renan, Gisele, Caio, Cibelle, Gustavo, Gabi e aos colegas do LabiComb: Pedro, Raquel, Suellens, Débora e Lucas, o meu muito obrigada a todos pelos agradáveis momentos de convivência no Lab. À técnica Rê, um agradecimento especial pela ajuda e disponibilidade.

À Gabriella Pitondo Reis, aluna de IC sem igual. Esforçada, determinada, estudiosa e sempre solícita em ajudar. Sem a sua companhia e ajuda, este trabalho seria muito mais difícil!!! Muito obrigada e serei grata por tudo sempre!!!

Ao meu grande amor, sobretudo pela paciência de ficar ao meu lado sempre, nos finais de semana ensolarados quando os estudos me consumiam e pelas deliciosas refeições. Enfim, não tenho palavras para agradecer o que fez e faz por mim. TE AMO MAIS QUE TUDO!!!!!!

Ao meu Amiguinho mais lindo (Marília) por sempre dividir comigo cada pedacinho da vida desde que ela se tornou acadêmica e por estar comigo mais uma vez nessa jornada!! Obrigada por tudo, agora por escrito.

Ao meu Grande amigo Bruninho!!! Obrigada pela força, amizade verdadeira, carinho, confiança e ajuda sempre que precisei.

Aos professores, são muitos, que contribuíram para o aprendizado desde a graduação, sendo solícitos sempre em dividir os conhecimentos. Em especial, gostaria de agradecer a enorme ajuda de Fernando Galembeck (IQ), Roger Frigério Castilho (FCM), Marcelo Lancellotti (IB), Fernando Coelho (IQ), Marcos Eberlin (IQ) e Pedro Paulo Corbi (IQ), que muito contribuíram para este trabalho.

Aos pós-graduandos que sempre estiveram à disposição para ensinamentos e troca de conhecimentos: Daniel Corrêa (IQ) e Carlos Benevento (FCM).

Aos técnicos: Daniel (dicroísmo circular), Cláudia Martelli (fluorimetria e ultravioleta), Marcia (infravermelho), José e Rita (Espectrometria de massas), Rita (CHN), Fabiane (Análise térmica), Anderson e Paula (RMN) e Douglas Soares (MFA), o meu muito obrigada pelos trabalhos, análises, treinamentos e ensinamentos realizados.

Aos meus amigos “campineiros” sem os quais a vinda, permanência e estada nesta cidade não teria feito sentido algum. São eles: Rodriguete, Livia, Bel, Morg’s, Lesmo (Carol), Daiene, Ana Maria, Nakinha, Zeca, Tamara.

Aos amigos de Osasco: Carol, Carla, Ligia, por sempre acreditarem em mim e dividirem momentos maravilhosos nestes quase 15 anos de amizade.

A todos os mencionados acima e àqueles que por ventura tenham sido esquecidos, o meu muito obrigado!!!! Todos, de alguma forma, tornaram possível a conclusão deste trabalho. Mais um sonho realizado, mais uma etapa cumprida. Serei eternamente grata por ter encontrado pessoas tão especiais e capazes de me fazer seguir em frente, mesmo nas dificuldades da vida!!!

Aos membros da banca do exame de qualificação Marcelo Lancellotti (IB) e Marcos Eberlin (IQ) pela leitura e sugestões para o enriquecimento do trabalho.
À EMS/SA pelas amostras de levofloxacino e ciprofloxacino

À FAPESP (2010/20861-2) pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto.

PAULA CRISTINA HUBER

1. Dados Pessoais

Nome: Paula Cristina Huber

Citação: Huber, P. C.

<http://lattes.cnpq.br/1609869787578322>

e-mail: paulahub@gmail.com

2. Experiência

2008-2009: Instituto Vita Nova – Cargo: Estagiário

2009-2010: Instituto Vita Nova – Cargo: Técnico de laboratório

2010-2011: Instituto Vita Nova – Cargo: Analista de laboratório

2011-2012: Instituto Vita Nova – Cargo: Pesquisador Científico Junior

3. Formação Acadêmica

2004-2008: Graduação em Farmácia. Universidade Estadual de Campinas

4. Produção científica

4.1. Artigos publicados

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. “Glicoproteína-P, Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) e Relação Estrutura-Atividade de Moduladores”. *Química Nova*. **2010**, *33*, 2148-2154.

ALMEIDA, W. P.; HUBER, P. C.; FATIMA, A. “Glutationa e Enzimas Relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos”. *Química Nova*. **2008**, *31*, 1170-1179.

4.2. Artigos aceitos para publicação

ALMEIDA, W. P.; HUBER, P. C.; CARVALHO, J. E.; KOHN, L. K. “*In vitro* antiproliferative effect of β -phenylethylamine derivatives and doxorubicin combinations on MCF/ADR cell lines”. *Medicinal Chemistry Research*. **2012**. DOI: 10.1007/s00044-012-0050-x

4.3. Artigos submetidos

OLIVEIRA, F. A.; HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; SABINO, J. R.; APARÍCIO, R. “*Tris*(2-(1,3-thiazol-2-yl)-1H-benzimidazole)zinc(II) nitrato mono-hydrate at 100 K”. *Acta Cryst. C*

4.4. Trabalhos apresentados em eventos

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; Reis, G. P.; Castilho, R. F.; Benevento, C. E. Effect of some 4-quinolones on the fibrillation of A β ₄₂ peptide. In: **13th Tetrahedron Symposium**, 2012, Amsterdam – Holanda.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; Reis, G. P. Avaliação do antimicrobiano Levofloxacina como inibidor da fibrilogênese do peptídeo β -amilóide. In: **35^a Reunião Anual da SBQ, 2012**, Águas de Lindóia – SP.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; Reis, G. P. Síntese de Complexos de Ferro, cobre e zinco com ciprofloxacina. In: **XIX Congresso Interno de Iniciação científica da Unicamp**, 2011, Campinas – SP.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; PETTENAZZI, M. C. R.; Kohn, L, K. β -Phenylethylamine derivatives: small molecules displaying P-glycoprotein inhibition. In: **10th Tetrahedron Symposium**, 2009, Paris – França.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; COELHO, F. A. S. Preparação de beta-aminoésteres potencialmente reversores da resistência a múltiplas drogas, mediada pela glicoproteína P. In: **30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007, Águas de Lindóia – SP.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; VERONESE, D.; COELHO, F. A. S. Resultados preliminares da síntese total da Nocardimicina-A. Síntese dos fragmentos A e C. In: **30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007, Águas de Lindóia – SP.

5. Participação em Congressos

- XVIII Escola de Verão em Química Farmacêutica e Medicinal. Rio de Janeiro, RJ, 2012.
- 14th Brazilian Meeting on Organic Synthesis. Brasília, DF. 2011.
- III International Workshop on Organic Chemistry. Araraquara, SP. 2011.
- 13th Brazilian Meeting on Organic Synthesis. São Pedro, SP. 2009.
- 30^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, SP. 2007.
- XV Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP (autor). Campinas, SP. 2007.

6. Cursos realizados

- Fundamentals of Scale-up. São Paulo – SP Período: 10/08/2009 a 11/08/2009
- Informação Básica em Propriedade Intelectual – Patentes de Invenções Químicas, Biotecnológicas e Farmacêuticas, promovido pela ABIFINA – 32 horas. Campinas– SP Período: 26/05/2008 a 29/05/2008

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”

(Mahatma Gandhi)

“Ambição é o caminho para o sucesso. Persistência é o veículo no qual se chega lá.”

(Bill Eardley)

“Leva tempo para alguém ser bem sucedido porque o êxito não é mais do que a recompensa natural pelo tempo gasto em fazer algo direito.”

(Joseph Ross)

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

(George Bernard Shaw)

RESUMO

A Doença de Alzheimer é um processo neurodegenerativo associado ao envelhecimento. Seu arsenal terapêutico é muito pobre. Dentre as características fisiopatológicas desta doença, destaca-se a formação de placas senis constituídas de fibrilas do peptídeo β -amilóide, principalmente do $A\beta_{42}$. Neste trabalho, avaliou-se o efeito de agentes antimicrobianos na inibição da agregação do peptídeo $A\beta_{42}$. Considerando a importância crescente do reposicionamento de fármacos, foram selecionados alguns antimicrobianos, que estão no mercado farmacêutico e tem o seu perfil farmacológico bastante conhecido, a fim de suprimir algumas etapas clínicas no caso destas substâncias apresentarem atividade anti-fibrilogênica. Levofloxacino e ciprofloxacino foram as fluorquinolonas selecionadas. Levofloxacino inibiu *in vitro* a agregação do peptídeo $A\beta_{42}$ quando submetido a condições de fibrilogênese. As metodologias empregadas foram o ensaio de fluorescência da tioflavina-T, microscopia de força atômica e eletroforese em gel de poliacrilamida. Os resultados promissores obtidos nos motivaram a buscar o grupo farmacofórico responsável pela atividade observada. Para tanto, sintetizamos a 3-carboetoxi-4-quinolona, correspondente à porção quinolônica mais simples e planar do levofloxacino. Os ensaios indicaram que esta substância é ainda mais eficaz do que o levofloxacino. Sabendo que *in vivo* o processo de agregação é metal dependente (zinco e cobre divalentes), fizemos um estudo comparativo das propriedades geométricas destas substâncias com as de conhecidos agentes complexantes de metais. De acordo com a literatura, fluorquinolonas apresentam interações medicamentosas com antiácidos que apresentam em sua formulação cátions divalentes. Então, realizamos um estudo de formação de complexos de cobre e zinco tendo como ligantes as substâncias estudadas. Estes complexos foram obtidos e caracterizados, e, um estudo de propriedades importantes foi realizado, incluindo a solubilidade em água e coeficiente de partição. A atividade antimicrobiana e citotóxica dos complexos também foi determinada, o que é de extrema importância para o caso destes serem formados *in vivo*.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a neurodegenerative pathology associated with aging. The therapeutic arsenal to treat it is very poor. Among the main pathophysiological characteristics of this disease, there is the formation of senile plaques composed of fibrils of β -amyloid peptide, mainly of $A\beta_{42}$. This study assessed the effects of antimicrobial quinolones on peptide $A\beta_{42}$ aggregation inhibition. Considering the growing importance of drug repositioning, some antimicrobial agents available in the pharmaceutical market with a well known pharmacological profile were selected, in order to eliminate some Clinical Study steps in case they present anti-fibrillogenic activity. Levofloxacin and ciprofloxacin were the selected fluoroquinolones. Levofloxacin inhibited *in vitro* aggregation of the peptide $A\beta_{42}$ when subjected to fibrillogenesis conditions. The methods used were thioflavin T fluorescence, atomic force microscopy and polyacrylamide gel electrophoresis. The promising results obtained motivated us to seek the pharmacophore group responsible for the observed activity. For this purpose, we synthesized the 3-carboethoxy-4-quinolone, quinolone portion corresponding to the planar portion of levofloxacin. The tests indicated that this substance is more effective than levofloxacin. Knowing that *in vivo* aggregation process is metal dependent (divalent zinc and copper), we made a comparative study of the geometric properties of these substances with known metal complexing agents. According to the literature, fluoroquinolones have drug interactions with antacids that contain divalent cations in its formulation. So, we conducted a study of complex formation with copper and zinc using the studied substances as ligands. These complexes were obtained and characterized, and a study of important properties was conducted, including water solubility and partition coefficient. The antimicrobial and cytotoxic activities of the complexes were also determined, which is extremely important in case these are formed *in vivo*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E CONVENÇÕES	xxvii
LISTA DE ESQUEMAS	xxix
LISTA DE TABELAS	xxx
LISTA DE FIGURAS	xxxí
LISTA DE GRÁFICOS.....	xxxvii
1. Introdução Geral	1
1.1. Hipótese da cascata β -amilóide	2
1.1.1. O processamento da proteína precursora do amilóide (PPA).....	3
1.1.2. O peptídeo β -amilóide ($A\beta$).....	5
1.2. Hipótese da degeneração do citoesqueleto neuronal	6
1.3. Hipótese colinérgica	7
1.4. Epidemiologia	7
1.5. Diagnóstico.....	8
1.6. Tratamento	9
1.7. Estresse oxidativo e o metabolismo de metais.....	11
1.8. As fluorquinolonas	12
2. Objetivos Gerais.....	14
CAPÍTULO 1: Avaliação da fibrilogênese do peptídeo β -amilóide na presença de potenciais inibidores.....	15
1. Contextualização.....	17
2. Objetivos.....	19
3. Resultados e discussão.....	20

3.1. Preparação do filme peptídico	20
3.2. Obtenção das formas fibrilares.....	20
3.3. Ensaio de fluorescência da Tioflavina T para detecção da agregação do peptídeo A β	21
3.4. Ensaio de fluorescência do levofloxacino e cloridrato de ciprofloxacino	23
3.5. Ensaio de inibição da fibrilogênese do peptídeo A β por fluorescência.....	25
3.6. Ensaio de microscopia de força atômica (MFA).....	32
3.7. Ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida.....	34
3.8. Ensaio de inibição da fibrilogênese do peptídeo A β por fluorescência na presença de Zn ²⁺	36
3.9. Ensaio de dicroísmo circular (DC).....	42
3.10. Síntese da quinolona 6.....	42
4. Conclusão	50
CAPÍTULO 2: Síntese de complexos metálicos dos antimicrobianos levofloxacino e ciprofloxacino.	
	51
1. Contextualização.....	53
2. Objetivos.....	54
3. Resultados e discussão	55
3.1. Caracterização dos ligantes levofloxacino e ciprofloxacino.....	55
3.1.1. Caracterização do levofloxacino	55
3.1.2. Caracterização do ciprofloxacino	56
3.2. Cálculos teóricos	56
3.3. Síntese e caracterização dos complexos entre metais (Zn ²⁺ e Cu ²⁺) e os compostos teste.	58
3.3.1. Caracterização por Infravermelho (IV) e massas de alta resolução..	59

3.3.2. Análise por Ultravioleta (UV).....	61
3.3.3. Análise Termogravimétrica	62
3.3.3.1. Complexo zinco-ciprofloxacino	62
3.3.3.2. Complexo cobre-ciprofloxacino.....	63
3.3.3.3. Complexo zinco-levofloxacino.....	64
3.3.3.4. Complexo cobre-levofloxacino	64
3.3.4. Análises de Ressonância Magnética Nuclear.....	66
3.3.4.1. Complexo zinco-ciprofloxacino	66
3.3.4.2. Complexo zinco-levofloxacino.....	66
3.4. Solubilidade dos complexos sintetizados	67
3.5. Determinação do coeficiente de partição dos complexos sintetizados.....	67
3.6. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> dos complexos de ciprofloxacino e levofloxacino.....	68
3.7. Atividade antimicrobiana dos complexos de ciprofloxacino e levofloxacino ...	71
3.8. Síntese dos complexos do ácido 8	73
3.8.1. Análise no infravermelho	74
3.8.2. Análise termogravimétrica	74
3.8.3. Análises de ressonância magnética nuclear.....	77
4. Conclusão	78
5. Parte Experimental	79
5.1. Geral.....	79
5.2. Procedimentos experimentais referentes ao Capítulo 1	81
5.2.1. Preparação do 2-[hidroxi-(2-nitro-fenil)-metil] acrilato de metila (4) ..	81
5.2.2. Preparação do Óxido de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila (5)	
.....	83

5.2.3. Preparação do 4-Oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etila (6)..	86
5.2.4. Protocolo para preparação do filme peptídico e estocagem	88
5.2.5. Preparação das formas A β ₄₂ fibrilares	88
5.2.6. Ensaio de inibição da agregação do peptídeo A β	89
5.2.7. Preparação da solução de tioflavina-T.....	89
5.2.8. Análise da fluorescência do levofloxacino	90
5.2.9. Análise da fluorescência da quinolona 6.....	90
5.2.10. Análise de fluorescência do ciprofloxacino	90
5.2.11. Análise de microscopia do peptídeo β -amilóide.....	91
5.2.12. Procedimento para realização da análise de dicroísmo circular	91
5.2.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida	91
5.2.14. Ensaio de agregação do peptídeo A β na presença de Zn(II).....	93
5.2.15. Ensaio de inibição da agregação do peptídeo A β na presença de Zn(II).....	93
5.3.Procedimentos Experimentais referentes ao Capítulo 2	93
5.3.1. Cálculos teóricos.....	93
5.3.2. Caracterização do cloridrato de ciprofloxacino	94
5.3.3. Obtenção do sal potássico de ciprofloxacino	96
5.3.4. Síntese do complexo de zinco com ciprofloxacino	96
5.3.5. Síntese do complexo de cobre com ciprofloxacino	99
5.3.6. Caracterização do levofloxacino	100
5.3.7. Obtenção do sal potássico de levofloxacino.....	102
5.3.8. Síntese do complexo de cobre com levofloxacino.....	102
5.3.9. Síntese do complexo de zinco com levofloxacino.....	103
5.3.10. Determinação do coeficiente de partição do levofloxacino.....	106

5.3.11. Determinação do coeficiente de partição do complexo de zinco-levofloxacino.....	106
5.3.12. Determinação do coeficiente de partição do complexo de cobre-levofloxacino.....	106
5.3.13. Síntese do ácido 3-carboxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolínico (8).....	107
5.3.14. Síntese do complexo de cobre do ácido 3-carboxi-4-oxo-1,4-diidroquinolínico.....	109
5.3.15. Síntese do complexo de zinco com o ácido 3-carboxi-4-oxo-1,4-diidroquinolínico	110
5.3.16. Ensaio de citotoxicidade dos complexos de ciprofloxacino e levofloxacino.....	112
5.3.17. Atividade antimicrobiana dos complexos de ciprofloxacino e levofloxacino.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS E CONVENÇÕES

A β :	peptídeo β -amilóide
A β ₄₂ :	peptídeo β -amilóide contendo 42 resíduos de aminoácidos
BHE:	barreira hemato-encefálica
CIM:	concentração inibitória mínima
DA:	Doença de Alzheimer
DABCO:	1,4-diazabicyclo-[2.2.2.]-octano
DI:	domínio intracelular
ESI-MS:	espectrometria de massas por electrospray
FCT:	fragmentos carboxi terminais
HFIP:	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
I-AChE:	inibidores da acetilcolinesterase
IRM:	imagem por ressonância magnética
Log P:	logaritmo do coeficiente de partição
MBH:	Morita-Baylis-Hillman
NEQs:	novas entidades químicas
NIH:	National Institute of Health
NMDA:	<i>N</i> -metil-D-aspartato
OMS:	Organização Mundial da Saúde
PPA:	proteína precursora de amilóide

sPPA α : fragmentos solúveis da PPA provenientes da clivagem pela α -secretase

sPPA β : fragmentos solúveis da PPA provenientes da clivagem pela β -secretase

TEMED: tetrametilenodiamina

TEP: tomografia de emissão de pósitron

TFA: ácido trifluoroacético

ThT: tioflavina T

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Síntese da quinolona 6 a partir do aldeído 3	43
Esquema 2: Reação de Morita-Baylis-Hillman.....	43
Esquema 3: Mecanismo geral da reação de MBH.....	44
Esquema 4: Reação para obtenção do aduto de MBH 4	44
Esquema 5: Reação para obtenção do N-óxido 5	45
Esquema 6: Mecanismo proposto por Kim para formação de 5	46
Esquema 7: Mecanismo proposto por Coelho e cols. para formação de 5	47
Esquema 8: Reação para obtenção da quinolona 6	48
Esquema 9: Proposta mecanística para a obtenção da quinolona 6	48
Esquema 10: Síntese do ácido 8	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de reposicionamento de fármacos.....	19
Tabela 2 : Deconvolução dos resultados de CD para o peptídeo A β ₄₂	42
Tabela 3: Principais absorções no IV.....	59
Tabela 4: Resultados da análise de massas de alta resolução.....	61
Tabela 5: Solubilidade dos complexos de levofloxacino.....	67
Tabela 6: Log P dos complexos de levofloxacino.....	68
Tabela 7: Concentração inibitória mínima dos complexos sintetizados frente a diferentes microrganismos G ⁺ e G ⁻	72
Tabela 8: Principais absorções no IV do ácido 8 e seus complexos.....	74
Tabela 9: Composição do Gel de acrilamida para empacotamento e separação (SDS-PAGE 17%).....	92
Tabela 10: Soluções tampão utilizadas no preparo de amostras.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação entre cérebro normal e cérebro com DA.....	1
Figura 2: Placas senis (extracelulares) e emaranhadas neurofibrilares (intracelulares).....	2
Figura 3: O processamento da PPA pelas vias amiloidogênica e não amiloidogênica.....	4
Figura 4: O processo de fibrilogênese do peptídeo A β	5
Figura 5: A proteína tau, constituinte dos microtúbulos neuronais e causando a sua desestabilização após a hiperfosforilação formando os emaranhados neurofibrilares.....	7
Figura 6: Envelhecimento progressivo da população mundial.....	8
Figura 7: Peptídeo A β_{42} e seus sítios de interação com metais.....	11
Figura 8: Estrutura do ácido nalidíxico.....	12
Figura 9: Estrutura do levofloxacino (1) e ciprofloxacino (2).....	13
Figura 10: Estrutura do clioquinol (A) e hidroxipiridinonas (B).....	17
Figura 11: Estrutura da Tioflavina T.....	21
Figura 12: Ligação da ThT às folhas- β	22
Figura 13: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl no decorrer dos tempos de incubação. No tempo zero (linha normal), após 24h (linha em negrito) e após 48h de incubação (linha pontilhada).....	23
Figura 14: Análise de fluorescência do levofloxacino: excitação (linha preta normal) e emissão (linha preta em negrito) e emissão quando excitada a 450 nm (linha vermelha).....	24
Figura 15: Análise de fluorescência do cloridrato de ciprofloxacino: excitação (linha preta normal) e emissão (linha preta em negrito) e emissão quando excitada a 450 nm (linha vermelha).....	25
Figura 16: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β controle isolado e na presença de levofloxacino após 24h de incubação.....	26
Figura 17: Porção quinolônica (6) do levofloxacino (1) possível grupo	

farmacofórico da inibição da fibrilogênese do A β	27
Figura 18: Estruturas minimizadas do levofloxacino e da quinolona 6	27
Figura 19: Análise de fluorescência da quinolona 6 : excitação (linha preta normal) e emissão (linha preta em negrito) e emissão quando excitada a 450 nm (linha vermelha).....	28
Figura 20: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β controle (linha em negrito) e na presença da quinolona 6 (linha pontilhada) após 24h de incubação.....	29
Figura 21: Médias das análises de fluorescência da ThT no decorrer do tempo de incubação do peptídeo controle (linha vermelha), peptídeo em HCl na presença de levofloxacino (linha preta) e peptídeo em HCl na presença da quinolona 6 (linha azul).....	30
Figura 22: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl na presença do levofloxacino no decorrer dos tempos de incubação. No tempo zero (linha normal), após 24h (linha em negrito) e após 48h de incubação (linha pontilhada).....	31
Figura 23: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl na presença da quinolona 6 no decorrer dos tempos de incubação. No tempo zero (linha normal), após 24h (linha em negrito) e após 48h de incubação (linha pontilhada).....	32
Figura 24: Imagem do peptídeo A β nos tempos t_0 e após 24h de incubação (A): Peptídeo em DMSO; (B): Peptídeo em HCl (controle); (C): Peptídeo em HCl na presença de levofloxacino e (D): Peptídeo em HCl na presença da quinolona 6	33
Figura 25: SDS-PAGE obtido após incubação a 37°C por 24 horas (1- Padrão de peso molecular; 2- Peptídeo fibrilar; 3- Peptídeo incubado em DMSO; 4- Peptídeo incubado em presença de levofloxacina; 5- Peptídeo incubado em presença da quinolona 6).....	35
Figura 26: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl na presença de Zn ²⁺ no decorrer dos tempos de incubação. No tempo zero (linha normal), após 24h (linha em negrito) e após 48h de incubação (linha	

pontilhada).....	37
Figura 27: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl na presença de Zn ²⁺ e do levofloxacinono decorrer dos tempos de incubação. No tempo zero (linha normal), após 24h (linha em negrito) e após 48h de incubação (linha pontilhada).....	38
Figura 28: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl na presença de Zn ²⁺ e da quinolona 6 no decorrer dos tempos de incubação. No tempo zero (linha normal), após 24h (linha em negrito) e após 48h de incubação (linha pontilhada).....	39
Figura 29: Comparação entre os espectros de fluorescência do peptídeo A β na presença de Zn ²⁺ (linhas superiores) e na sua ausência (linhas inferiores), após 24h de incubação. Peptídeo na presença de Zn ²⁺ e/ou HCl (linhas em negrito), peptídeo na presença de Zn ²⁺ e/ou HCl e levofloxacino (linhas normais) e peptídeo na presença de Zn ²⁺ e/ou HCl e quinolona 6 (linhas pontilhadas).....	40
Figura 30: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl na presença de Zn ²⁺ (linha pontilhada) e da quinolona 6 (linha vermelha) ou levofloxacino (linha normal) após 48h de incubação.....	41
Figura 31: Possíveis centros de ligação a cátions metálicos na estrutura do levofloxacino (1) e ciprofloxacino (2).....	53
Figura 32: Estruturas e distâncias entre os átomos dos sítios de coordenação com o metal (Å) do levofloxacino, ciprofloxacino, da quinolona 6 e dos ligantes conhecidos.....	57
Figura 33: Estruturas tridimensionais do levofloxacino (A), ciprofloxacino (B), quinolona 6 (C) e cliquinol (D), respectivamente.....	58
Figura 34: Possibilidade de ligação metal-ligantes.....	60
Figura 35: Análises no ultravioleta do cloridrato de ciprofloxacino e seus complexos metálicos.....	61
Figura 36: Análises no ultravioleta do cloridrato de ciprofloxacino e seus complexos metálicos.....	62

Figura 37: Análise termogravimétrica do complexo zinco-ciprofloxacino.....	63
Figura 38: Análise termogravimétrica do complexo cobre-ciprofloxacino.....	63
Figura 39: Análise termogravimétrica do complexo zinco-levofloxacino.....	64
Figura 40: Análise termogravimétrica do complexo cobre-levofloxacino.....	65
Figura 41: Possíveis estruturas para complexos metal-ciprofloxacino.....	65
Figura 42: Possíveis estruturas para complexos metal-levofloxacino.....	65
Figura 43: Análise termogravimétrica do complexo zinco-ácido 8	75
Figura 44: Análise termogravimétrica do complexo cobre-ácido 8	76
Figura 45: Possíveis estruturas para complexos metal-ácido 8	76
Figura 46: Espectro no infravermelho (filme, ν_{\max}) do 2-[hidroxi-(2-nitro-fenil)-metil] acrilato de metila (4).....	82
Figura 47: Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) do 2-[hidroxi-(2-nitro-fenil)-metil] acrilato de metila (4).....	82
Figura 48: Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) do 2-[hidroxi-(2-nitro-fenil)-metil] acrilato de metila (4).....	83
Figura 49: Espectro no Infravermelho (KBr, ν_{\max}) do óxido de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila.....	84
Figura 50: Espectro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 250 MHz) do óxido de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila.....	85
Figura 51: Espectro de RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 62,5 MHz) do óxido de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila.....	85
Figura 52: Espectro no Infravermelho (KBr, ν_{\max}) do 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila.....	87
Figura 53: Espectro de RMN ¹ H (CF ₃ CO ₂ D, 250 MHz) do 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila.....	87
Figura 54: Espectro de RMN ¹³ C (CF ₃ CO ₂ D, 62,5 MHz) do 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila.....	88
Figura 55: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{\max}) do cloridrato de ciprofloxacino..	94
Figura 56: Espectro de RMN ¹ H (CF ₃ CO ₂ D, 500 MHz) do cloridrato de ciprofloxacino.....	95

Figura 57: Espectro de RMN ¹³ C (CF ₃ CO ₂ D, 125 MHz) do cloridrato de ciprofloxacino.....	95
Figura 58: Espectro no infravermelho (KBr, ν _{max}) do ciprofloxacino potássico.....	96
Figura 59: Espectro no infravermelho (KBr, ν _{max}) do complexo de zinco-ciprofloxacino.....	97
Figura 60: Espectro de RMN ¹ H (CF ₃ CO ₂ D, 250 MHz) do complexo zinco-ciprofloxacino.....	98
Figura 61: Espectro de RMN ¹³ C (CF ₃ CO ₂ D, 125 MHz) do complexo zinco-ciprofloxacino.....	98
Figura 62: Espectro no infravermelho (KBr, ν _{max}) do complexo de cobre-ciprofloxacino.....	99
Figura 63: Espectro no infravermelho (KBr, ν _{max}) do levofloxacino.....	100
Figura 64: Espectro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 500 MHz) do levofloxacino.....	101
Figura 65: Espectro de RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 125 MHz) do levofloxacino.....	101
Figura 66: Espectro no infravermelho (KBr, ν _{max}) do levofloxacino potássico.....	102
Figura 67: Espectro no infravermelho (KBr, ν _{max}) do complexo cobre-levofloxacino.....	103
Figura 68: Espectro no infravermelho (KBr, ν _{max}) do complexo zinco-levofloxacino.....	104
Figura 69: Espectro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 250 MHz) do complexo zinco-levofloxacino.....	105
Figura 70: Espectro de RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 125 MHz) do complexo zinco-levofloxacino.....	105
Figura 71: Espectro no infravermelho (KBr, ν _{max}) do ácido 3-carboxi-4-oxo-1,4-diidroquinolínico.....	108
Figura 72: Espectro de RMN ¹ H (CF ₃ CO ₂ D, 250 MHz) do ácido 3-carboxi-4-oxo-1,4-diidroquinolínico.....	108
Figura 73: Espectro de RMN ¹³ C (CF ₃ CO ₂ D, 62,5 MHz) do ácido 3-carboxi-4-oxo-1,4-diidroquinolínico.....	109

Figura 74: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{\max}) do complexo de cobre-ácido	
8.....	110
Figura 75: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{\max}) do complexo de zinco-ácido	
8.....	111
Figura 76: Espectro de RMN- ^1H ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 500 MHz) do complexo zinco-ácido	
8.....	111
Figura 77: Espectro de RMN- ^{13}C ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 125 MHz) do complexo zinco-ácido	
8.....	112

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Ensaio de citotoxicidade em células 3T3 do ciprofloxacino e seus complexos.....	69
Gráfico 2: Ensaio de citotoxicidade em células 3T3 do levofloxacino e seus complexos.....	70
Gráfico 3: Ensaio de citotoxicidade em células NG 97 do ciprofloxacino e seus complexos.....	70
Gráfico 4: Ensaio de citotoxicidade em células NG 97 do levofloxacino e seu complexo de zinco.....	71

1. Introdução Geral

A doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais comum que afeta diretamente cerca de 10% da população com até 65 anos e cerca de 50% com até 85 anos.¹ Descoberta em 1906 pelo médico Alois Alzheimer², a DA manifesta-se gradualmente, com um progressivo e irreversível declínio cognitivo.¹

A DA é um tipo de demência que culmina com problemas na memória, pensamento e comportamento.³ Uma de suas características mais marcantes é a perda difusa de neurônios⁴, que culmina com uma significativa diminuição do tecido cerebral, conforme mostrado na **Figura 1**.

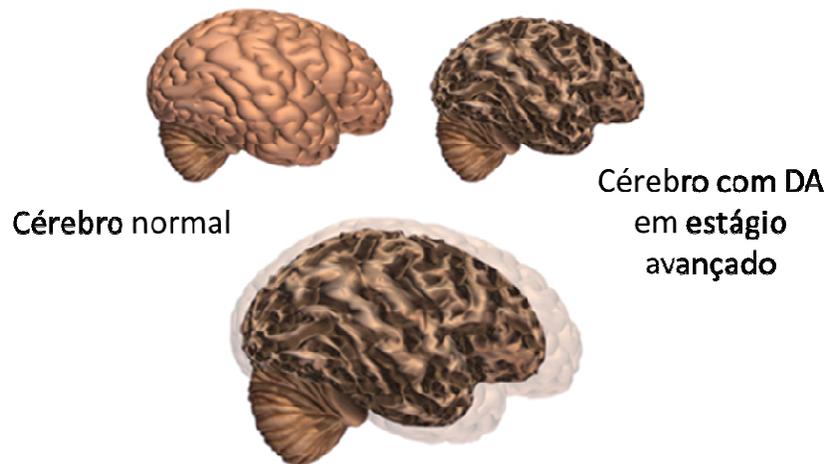


Figura 1: Comparação entre cérebro normal e cérebro com DA.³

A DA é uma doença extremamente complexa e que não apresenta os mecanismos patogênicos ainda suficientemente elucidados. Os dois principais achados morfológicos relacionados à DA são as placas senis ou neuríticas e os emaranhados neurofibrilares (**Figura 2**). As placas senis são formadas pela deposição extracelular de fibrilas do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) e os emaranhados

¹ Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. *Chem. Rev.* **2006**, 106(6), 1995.

² <http://www.alzheimermed.com.br> – acesso em 01/08/2012

³ <http://www.alz.org/> - acesso em 05/08/2012

⁴ Zatta, P.; Drago, D.; Bolognin, S.; Sensi, S. L. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2009**, 30(7), 346.

neurofibrilares, por agregados intraneuronais de proteína tau hiperfosforilada.⁴ Estes achados morfológicos conduziram à elaboração das duas principais hipóteses que tentam explicar a patogênese da DA: a hipótese da cascata β -amilóide e a hipótese da degeneração do citoesqueleto neuronal.^{1,5}

As placas senis e os emaranhados neurofibrilares estão presentes principalmente em regiões cerebrais que estão envolvidas com aprendizado, memória e comportamento emocional, sendo que a principal região é o córtex cerebral.⁶

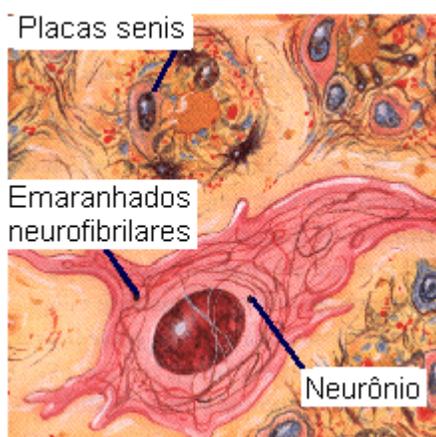


Figura 2: Placas senis (extracelulares) e emaranhadas neurofibrilares (intracelulares).⁷

1.1. Hipótese da cascata β -amilóide

A identificação do peptídeo $A\beta$ nas placas senis extracelulares, por meio de análises histológicas *post mortem* em cérebros de pacientes com DA, levantou a hipótese de que este evento pudesse estar relacionado ao desencadeamento da patologia. Segundo esta hipótese, a neurodegeneração na DA começa com o processamento anormal da proteína precursora do amilóide (PPA), discutido a seguir, e resulta na produção, agregação e deposição do peptídeo $A\beta$. Aparentemente, a cascata amilóide pode facilitar a formação dos emaranhados neurofibrilares e a morte celular.¹

⁵ Kung, H. F. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 265.

⁶ Nilsson, M. R., *Methods*, **2004**, *34*, 151.

⁷ National Institute of Health.

1.1.1. O processamento da proteína precursora do amilóide (PPA)

O peptídeo A β é gerado extracelularmente a partir da clivagem de uma proteína transmembrânica chamada proteína precursora de amilóide (PPA), que é expressa no organismo em condições fisiológicas normais. A PPA pode apresentar 695, 751 e 770 resíduos de aminoácidos, sendo que a proteína de 695 aminoácidos é predominantemente expressa nos neurônios.⁸ O processamento proteolítico da PPA é feito por duas proteases conhecidas como β - e γ -secretases (**Figura 3**). Em condições não patológicas, além da γ , outra secretase predomina (α -secretase), que é considerada não amiloidogênica, uma vez que o seu processamento impede a formação do peptídeo A β ₄₂.⁹ Na DA, ou a expressão da β -secretase está aumentada ou a depuração dos fragmentos insolúveis está comprometida. Os peptídeos amiloidogênicos apresentam de 39-43 resíduos de aminoácidos e são os principais constituintes das placas senis e depósitos amilóides cerebrovasculares havendo, entretanto, a predominância do resíduo de 42 aminoácidos (A β ₄₂).¹⁰

⁸ Guo, Q.; Li, S.; Gaddam, S. S. K.; Justice, N. J.; Robertson, C. S.; Zheng, H. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287(4), 2437.

⁹ Prox, J.; Rittger, A.; Saftig, P. *Exp. Brain Res.* **2012**, 217, 331.

¹⁰ Price, K. A.; Crouch, P. J.; Donnelly, P. S.; Masters, C. L.; White, A. R.; Curtain, C. C. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, 13(2), 249.

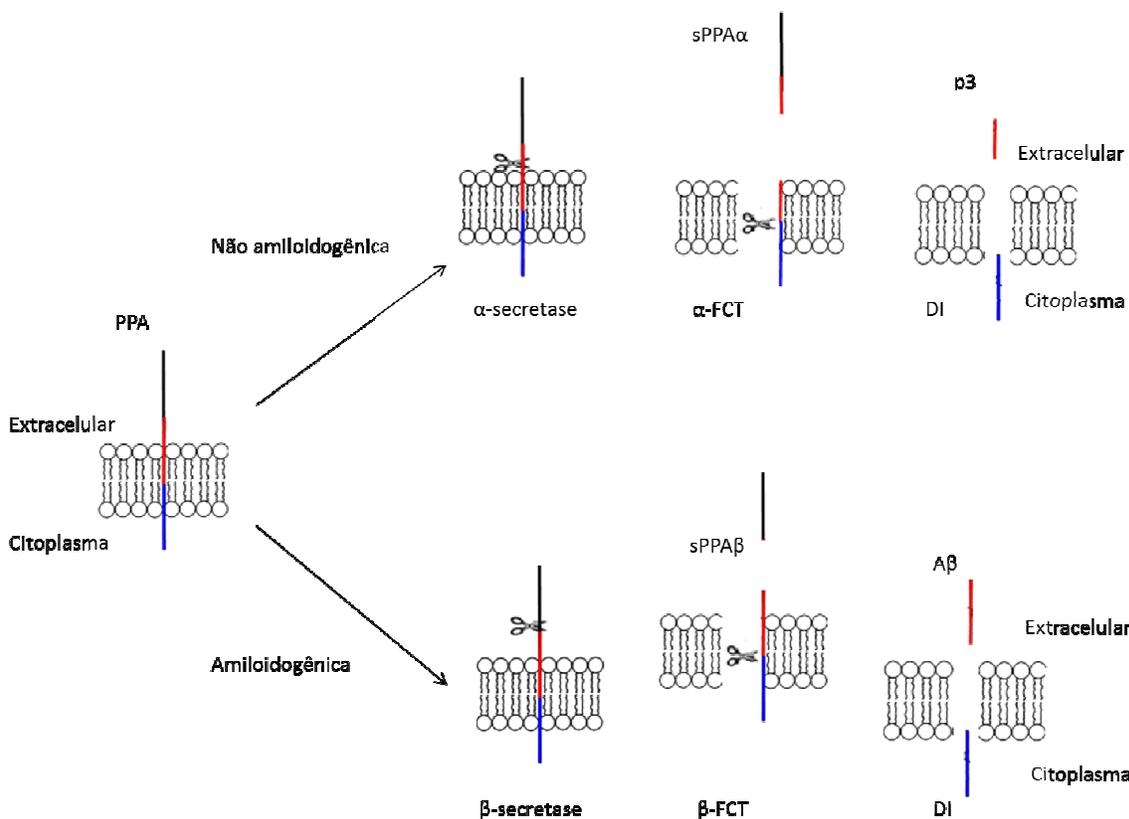


Figura 3: O processamento da PPA pelas vias amiloidogênica e não amiloidogênica. Adaptado de Wilquet, *et al.*¹¹

A α -secretase, membro da família das metaloproteases, e a β -secretase, uma aspartil protease ligada à membrana também chamada BACE, clivam o domínio extracelular N-terminal da PPA, liberando os fragmentos solúveis sPPA α e sPPA β (Figura 3).¹ Os fragmentos sPPA α parecem apresentar atividade neurotrófica e sinaptogênica, enquanto que os fragmentos sPPA β parecem apresentar atividade sinalizadora.⁸ A γ -secretase finalmente cliva fragmentos carboxi terminais (FCT) do domínio transmembrana da PPA, liberando o fragmento p3 e o peptídeo A β , respectivamente, para o meio extracelular e o domínio intracelular da PPA (DI) para o citoplasma.¹

A evidência mais forte de que o processamento proteolítico anormal e o aumento na geração de A β são cruciais para o processo patológico vem de estudos de formas raras hereditárias da DA. Mutações na PPA e nas presenilinas,

¹¹ Wilquet, V.; De Strooper, B. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004**, *14*, 582.

as proteínas do núcleo do complexo γ -secretase, afetam a geração do peptídeo $A\beta$, sua agregação, ou degradação. Além disso, todas as mutações identificadas em PPA são agrupadas em torno dos três sítios de clivagem das secretases.¹

1.1.2. O peptídeo β -amilóide ($A\beta$)

O peptídeo $A\beta_{42}$, além de ser particularmente tóxico às células nos estágios iniciais do processo de agregação, possui uma atividade fibrilogênica, de forma que possui um papel central na patogênese da DA. É descrito na literatura que oligômeros de $A\beta_{42}$ inibem a viabilidade neuronal 10 vezes mais do que fibrilas e 40 vezes mais do que o peptídeo não agregado, com $A\beta_{42}$ oligomérico promovendo inibição significativa a 10 nmol.L^{-1} .¹²

O processo da fibrilogênese ocorre em cascata e envolve estruturas intermediárias. Primeiramente, o peptídeo coalesce e forma pequenos oligômeros que se agregam produzindo grupamentos de alto peso molecular, chamados de protofibrilas. Estas, eventualmente excedem o limite de solubilidade e depositam na forma de fibrilas (**Figura 4**).¹³

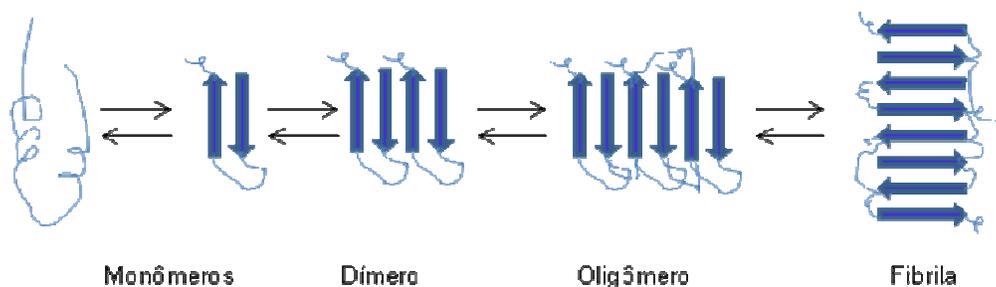


Figura 4: O processo de fibrilogênese do peptídeo $A\beta$. Adaptado de: Evans *et al.*¹⁴

O peptídeo $A\beta$ adota várias conformações, das aleatórias às folhas- β e α -hélices em solução, o que torna difícil o desenho de inibidores baseado na estrutura sua 3D. A cascata de agregação do peptídeo $A\beta$ envolve a transição de conformações aleatórias para folhas- β . Muitos estudos *in vitro* a respeito da

¹² Dahlgren, K. K., Manelli, A. M., Stine, W. B. Jr., Baker, L. K., Krafft, G. A., LaDu, M. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (35), 32046.

¹³ Gaeta, A.; Hider, R. C. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, 146, 1041.

¹⁴ Evans C. G.; Wilsén, S.; Gestwlcckl, J. E. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281 (44), 33182.

fibrilogênese do peptídeo A β tem indicado que a transição estrutural de α -hélice para folha- β pode desempenhar papel fundamental na formação de fibrilas amilóides.¹⁵

1.2. Hipótese da degeneração do citoesqueleto neuronal

A observação dos emaranhados neurofibrilares intracelulares, bem como a identificação da proteína tau como parte destas estruturas, suportaram a hipótese de que a sua formação pudesse estar envolvida na patogênese da DA. De acordo com esta hipótese, as alterações do citoesqueleto são os principais eventos que levam à neurodegeneração na DA, como a hiperfosforilação e agregação da proteína tau relacionados à ativação de processos de morte celular.¹

O papel fisiológico da proteína tau consiste em controlar a montagem dos microtúbulos neuronais proporcionando um elemento essencial para a estabilização do citoesqueleto neuronal. Este citoesqueleto é um sistema chave para manter a integridade estrutural e o transporte axonal. Na DA, a hiperfosforilação da proteína tau promove a desorganização dos microtúbulos e a formação de emaranhados de agregados de tau, processo adicional ligado à morte neuronal.⁴

¹⁵ Chen, Y. R., Huang, H. B., Chyan, C. L., Shiao, M. S., Lin, T. H., Chen, Y. C. *J. Biochem.* **2006**, 139, 733.

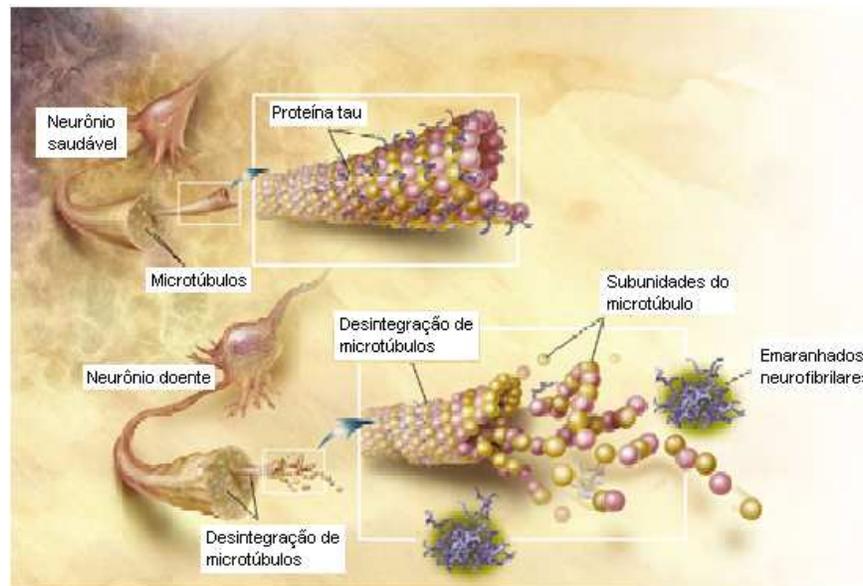


Figura 5: A proteína tau, constituinte dos microtúbulos neuronais e causando a sua desestabilização após a hiperfosforilação formando os emaranhados neurofibrilares.⁵

1.3. Hipótese colinérgica

A acetilcolina é um neurotransmissor associado ao processo cognitivo, incluindo memória e aprendizado, e foi observado que há um déficit deste neurotransmissor na DA. De acordo com a “hipótese colinérgica”, o início da DA se daria pela disfunção dos neurônios colinérgicos presentes no cérebro, contribuindo para o declínio cognitivo observado nos pacientes com DA e na demência senil não-Alzheimer.¹

1.4. Epidemiologia

O principal fator de risco para o desenvolvimento da DA é a idade.¹⁶ Em 1950, havia 214 milhões de pessoas com 60 anos ou mais. Atualmente, 11% da população mundial já atingiu esse patamar. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2025, existirão 1,2 bilhão de pessoas com mais de 60 anos, sendo que, os indivíduos muito idosos (com 80 anos ou mais) compõem o grupo de maior crescimento.²

¹⁶Abbott, A. *Nature* **2011**, 475, S2

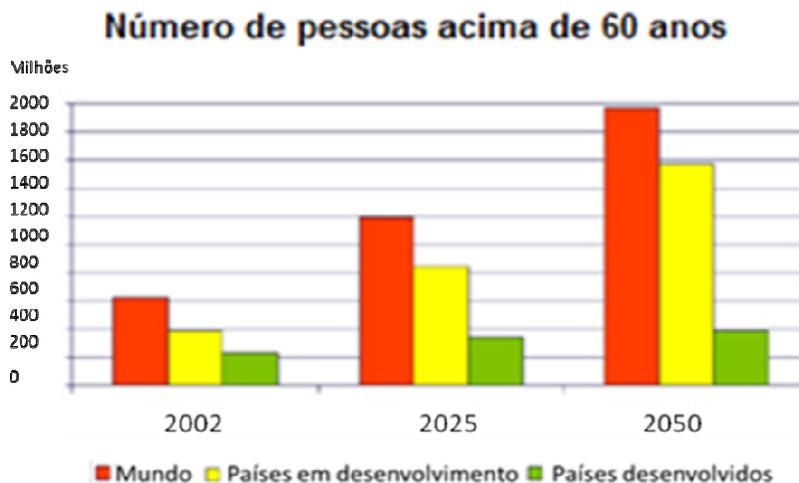


Figura 6: Envelhecimento progressivo da população mundial.²

De acordo com a Associação de Alzheimer, mais de 5,4 milhões de americanos apresentam os sintomas da doença de Alzheimer.³ Sendo uma doença cerebral degenerativa devastadora, seu custo anual para a economia dos EUA é superior a 180 bilhões de dólares e acredita-se que até 2050 mais de 115 milhões de pessoas em todo o mundo estarão vivendo com a doença. Infelizmente, mesmo após várias décadas de pesquisa nesta área, muitos dos fármacos aprovados para o seu tratamento somente atenuam os sintomas e apresentam pouco efeito sobre a progressão da doença. Estima-se que, no Brasil, a DA afete 1,2 milhão de pessoas.²

1.5. Diagnóstico

O diagnóstico provável da DA é realizado principalmente através de testes clínicos, enquanto que o diagnóstico definitivo só pode ser realizado por meio de exame histopatológico do tecido cerebral, obtido por biópsia ou após a morte por necropsia.^{2,17}

Ao longo das últimas décadas, ocorreu um grande avanço no diagnóstico da DA. Atualmente, centros norte americanos especializados na doença são capazes de fazer o diagnóstico rotineiramente, com precisão de 90%. Entretanto,

¹⁷ Bibl, M., Wiltfang, J. *Expert Rev. Proteomics*, **2008**, 5(2), 153.

o desafio ainda é bastante grande nas tentativas de se conseguir fazer o diagnóstico precoce da doença, ainda na sua fase assintomática. Seguindo este raciocínio, agentes terapêuticos capazes de modificar o estado de doença serão eficazes, provavelmente, nos estágios iniciais da DA. Portanto, alcançar o sucesso no diagnóstico precoce será importante e dependerá, em última análise, de encontrar biomarcadores adequados da DA.¹⁸ Neste sentido, muitas pesquisas em amostras biológicas como sangue e líquido cefalorraquidiano, na tentativa de encontrar marcadores e alelos de risco da doença, vem sendo desenvolvidas. Além disso, o aperfeiçoamento de modalidades de imagem incluindo a imagem do peptídeo A β com tomografia de emissão de pósitron (TEP) e imagem por ressonância magnética (IRM) também são alvo de pesquisas.¹⁸

1.6. Tratamento

O tratamento farmacológico da DA apresenta quatro abordagens:

a) terapêutica específica, que tem como objetivo reverter processos fisiopatológicos que conduzem à morte neuronal e à demência;

b) abordagem profilática, que visa retardar o início da demência ou prevenir o declínio cognitivo adicional, uma vez deflagrado o processo;

c) tratamento sintomático, que visa restaurar, ainda que parcial ou provisoriamente, as capacidades cognitivas, as habilidades funcionais e o comportamento dos pacientes portadores de demência;

d) terapêutica complementar, que busca o tratamento das manifestações não cognitivas da demência, tais como depressão, psicose, agitação psicomotora, agressividade e distúrbio do sono.

Apesar dos avanços no conhecimento da fisiopatologia da DA, a terapêutica e o diagnóstico precoce permanecem um desafio.

¹⁸ Carrillo, M. C., Blackwell, A., Hampel, H., Lindborg, J., Sperling, R., Schenk, D., Sevigny, J. J., Ferris, S., Bennett, D. A., Craft, S., Hsu, T., Klunk, W., *Alzheimer's & Dementia*, **2009**, 5, 182.

Os efeitos dos fármacos hoje aprovados no tratamento da DA limitam-se ao retardo na evolução natural da doença, permitindo apenas uma melhora temporária do estado funcional do paciente.¹⁹

Os inibidores da acetilcolinesterase (I-AChE), galantamina e donepezila, são os principais fármacos hoje licenciados para o tratamento da DA. Seu uso baseia-se no pressuposto déficit colinérgico que ocorre na doença, conforme discutido no item 1.3., e visa o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina através da inibição de sua enzima hidrolítica. A acetilcolinesterase apresenta também outro sítio importante para interação com ligantes. Este sítio é conhecido como sítio periférico ou aniônico e tem sido apontado como um local onde ocorre a organização das fibrilas, no processo de fibrilogênese, dando a esta enzima uma característica de chaperona. A donepezila é um inibidor duplo da acetilcolinesterase, pois se liga aos sítios catalítico e aniônico, através de interações hidrofóbicas e de ligação de hidrogênio com resíduos de triptofano (W86 e W 286).²⁰ Infelizmente, a resposta aos I-AChE é heterogênea, sendo que alguns pacientes beneficiam-se muito, enquanto que para outros, a melhora observada é muito discreta.²¹

Outro fármaco usado no tratamento da DA é a memantina, um antagonista não competitivo de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), que é um dos receptores para o glutamato, principal neurotransmissor excitatório cerebral. Quando este neurotransmissor está em excesso no cérebro, há ativação crônica destes receptores que promovem extensivo influxo de cálcio para o neurônio. Como consequência, há um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio que levam à morte celular. Na doença de Alzheimer, foi comprovado que há alterações nos níveis deste neurotransmissor. Assim, a memantina age impedindo que o excesso de glutamato ative estes receptores.^{2,3,20}

¹⁹ Forlenza, O. V. *Rev. Psiq. Clín.* **2005**, 32(3), 137.

²⁰ Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Structure*. **1999**, 7, 3.

²¹ Tayeb, H. O.; Yang, H. D.; Price, B. H.; Tarazi, F. I. *Pharmacol. Ter.* **2012**, 134, 8.

1.7. Estresse oxidativo e o metabolismo de metais

Acredita-se que o estresse oxidativo tenha papel importante na DA. O mesmo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a habilidade da célula de se defender contra eles. Este desequilíbrio na homeostase de espécies pró-oxidantes e antioxidantes resulta na produção de várias espécies potencialmente tóxicas, que participam na iniciação e/ou propagação de reações radicalares em cadeia.²² No caso particular de células sensíveis como os neurônios, esta perda de controle dos sistemas de defesa pode levar à morte celular.²³

O peptídeo A β apresenta sítios de coordenação para Zn²⁺ e Cu²⁺. Os dois resíduos de histidina (His6 e His14) localizados na parte N-terminal do peptídeo A β_{42} e um resíduo de metionina (Met35) na região C-terminal, tem sido apontados como regiões fundamentais para ligação com o íon metálico conforme ilustrado na **Figura 7**. Os resíduos de histidina mencionados ligam-se ao cobre, enquanto a metionina parece estar envolvida com a redução do cobre e geração de peróxido de hidrogênio. O processo de formação de fibrilas A β *in vivo* é dependente da interação destes metais com o peptídeo.²³



Figura 7: Peptídeo A β_{42} e seus sítios de interação com metais. Adaptado de Gaeta *et al.*¹¹

O cérebro é um órgão especializado que normalmente concentra cobre (Cu²⁺) e zinco (Zn²⁺) no neocórtex. O desequilíbrio de íons metálicos no organismo

²² Contestabile, A. *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *1*, 553.

²³ Prox, J.; Rittger, A.; Saftig, P. *Exp. Brain Res.* **2012**, *217*, 331.

é um co-fator bem conhecido em várias desordens neurodegenerativas. Os metais são essenciais para a vida e tem papel central em muitas vias bioquímicas. O seu desequilíbrio, especialmente no caso de Cu^{2+} e Zn^{2+} , tem atraído o interesse na investigação da etiologia de uma variedade de condições neurodegenerativas e, em particular, a patogênese da DA.⁴ Dados recentes indicam que a homeostase destes íons metálicos está intimamente associada a DA,³ existindo relatos de que a deposição destes metais nos cérebros de pacientes com DA, em concentrações de três a cinco vezes maiores do que o controle.^{4,12}

1.8. As fluorquinolonas

As fluorquinolonas compreendem uma série de agentes antimicrobianos sintéticos modelados a partir do ácido nalidíxico (**Figura 8**), uma quinolona com interessante atividade antibacteriana, que foi sintetizada e patenteada em 1962 por Lescher e colaboradores.²⁴

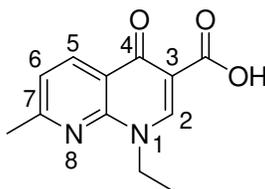


Figura 8: Estrutura do ácido nalidíxico.

Estas fluorquinolonas são resultado de estudos de relação estrutura atividade para o desenvolvimento de compostos com maior potência, espectro de atividade estendido e propriedades de absorção e distribuição melhoradas. Tais características culminaram com o envolvimento de novos membros da classe no tratamento de uma variedade de infecções sistêmicas graves.²⁵ A introdução de um átomo de flúor em posição C-6 e um grupo piperazila em posição C-7 conferiram um amplo e potente espectro de atividade antibacteriana.

²⁴ Lescher, G. Y.; Froelich, E. D.; Gruet, M. D.; Bailey, J. H.; Brundage, R.P.; *J. Med. Pharmaceut. Chem.* **1962**, 5, 1063.

²⁵ Wilson, C. O.; Gisvold's, O.; Block, J. H.; Beale, J. M. *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. Eleventh edition. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2004.

Após a importante descoberta do norfloxacin, inúmeras fluorquinolonas foram sintetizadas e avaliadas, merecendo destaque o levofloxacin e o ciprofloxacino (**Figura 9**), que possuem um amplo espectro de atividade contra vários microrganismos patogênicos, em seres humanos e animais, resistentes a outros antibióticos. Essa eficácia está diretamente ligada ao seu mecanismo de ação, baseado na inibição da DNA girase bacteriana, uma enzima essencial para a replicação, transcrição e reparação do DNA bacteriano.²³

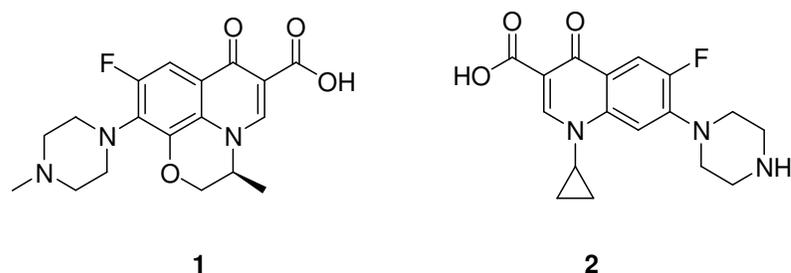


Figura 9: Estrutura do levofloxacin (1) e ciprofloxacino (2).

O levofloxacin é um dos membros das fluoroquinolonas mais comumente usados, sendo o isômero ativo o S-isômero isolado do ofloxacin racêmico. Essa classe de compostos tem atualmente destacada importância no combate a diferentes tipos de bactérias.²⁶

²⁶ Souza, M. V. N.; Vasconcelos, T. R. A. *Quim. Nova*. **2005**, 28(4), 678.

2. Objetivos gerais

Com base no que foi exposto sobre a correlação entre a Doença de Alzheimer, acúmulo de íons metálicos e o peptídeo A β , este trabalho tem como objetivos:

1- avaliar o efeito de quinolonas na inibição da fibrilogênese do peptídeo A β_{42} ;

2- comparar as propriedades das quinolonas estudadas neste projeto com quelantes metálicos conhecidos, e;

3- avaliar a capacidade quelante das quinolonas estudadas por meio da síntese de complexos metálicos das mesmas;

4 – estudar algumas propriedades destes complexos.

Considerando estes objetivos, e para fins de simplificação na apresentação dos resultados, este trabalho foi dividido em duas partes. A primeira, discutida no capítulo 1, relata o estudo do efeito de quinolonas sobre a agregação e fibrilogênese do peptídeo A β . A segunda, discutida no capítulo 2, refere-se ao estudo da formação de complexos metálicos de zinco e cobre formados com compostos da classe das fluorquinolonas, potencialmente inibidores da agregação do peptídeo A β .

CAPÍTULO 1

Avaliação da fibrilogênese do peptídeo β -amilóide na presença de potenciais inibidores.

1. Contextualização

Com o número crescente de pacientes com DA, é urgente a necessidade de uma farmacoterapia efetiva e segura que ajude no controle de seu desenvolvimento e sintomas.

Uma das atuais estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos na pesquisa para a DA visa interferir no acúmulo de íons metálicos, principalmente Cu^{2+} e Zn^{2+} . Para tanto, quelantes metálicos seriam compostos potenciais para estas pesquisas. Dentre estes, podemos citar o clioquinol (**Figura 10**), protótipo de um composto que concluiu a fase clínica II para DA^{21, 27} (PBT 2 – estrutura em sigilo). Compostos da classe das hidroxipiridinonas (**Figura 10 – B**), também tem sido protótipos importantes para o desenvolvimento de potenciais fármacos para a DA, baseados na estratégia de complexação de metais.²⁸

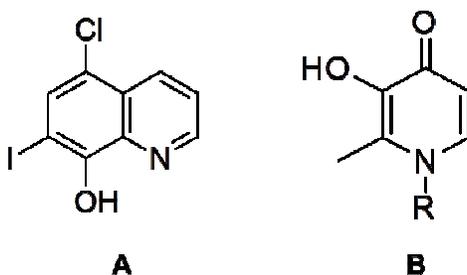


Figura 10: Estrutura do clioquinol (A) e hidroxipiridinonas (B).

Fluorquinolonas antimicrobianas apresentam interações medicamentosas quando co-administradas com antiácidos e fármacos contendo cátions divalentes (magnésio e cálcio). Estes complexos formados não são absorvidos e contribuem para a redução da biodisponibilidade do antimicrobiano. A semelhança estrutural existente entre o clioquinol, hidroxipiridinonas e a classe de antimicrobianos das fluorquinolonas nos guiou para a escolha desta classe como potenciais agentes inibidores da agregação do peptídeo β -amilóide.

²⁷ www.alzforum.org – acesso em 02/09/2012.

²⁸ Schugar et al, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46.1716-1718.

Assim, devido à importância crescente do reposicionamento de fármacos²⁹ e à boa aceitação das fluorquinolonas pelos pacientes em tratamento contra infecções, este capítulo refere-se ao estudo do efeito de duas fluorquinolonas, levofloxacino e ciprofloxacino, sobre a agregação do peptídeo A β e formação de fibrilas.

²⁹Ashburn, T. T.; Thor, K. B. *Nat. Rev. Drug Discovery*. **2004**, *3*, 673.

2. Objetivos

Nos últimos anos, há um interesse crescente no reposicionamento de fármacos. Este reposicionamento consiste no encontro de novos usos terapêuticos, além da indicação médica original, para fármacos já existentes no mercado ou ainda em estudo clínico. Esta estratégia apresenta risco reduzido de desenvolvimento, já que o perfil farmacocinético e segurança destes fármacos já são, na maioria dos casos, conhecidos. Existem diversos exemplos de fármacos que passaram a ser prescritos para fins diferentes do uso original, como os relacionados na **Tabela 1**.²⁸

Tabela 1: Exemplos de reposicionamento de fármacos.

Princípio ativo	Indicação original	Nova indicação
Sibutramina	Depressão	Obesidade
Galantamina	Poliomielite, paralisia, anestesia	Doença de Alzheimer
Finasterida	Hiperplasia benigna da próstata	Queda de cabelo
Minoxidil	Hipertensão	Queda de cabelo
Sildenafil	Angina	Disfunção erétil
Zidovudina	Câncer	HIV/AIDS

No contexto em que se insere este projeto, há, além da galantamina em uso como agente terapêutico na DA, derivados quinolínicos que se encontram em fase II de estudo clínico.³ O protótipo desta nova série foi o clioquinol, um fármaco antimicrobiano utilizado em associações para uso tópico. Assim, os fármacos que se encontram no mercado para um primeiro uso, servem também como protótipos para o desenvolvimento de novas entidades químicas (NEQ) potencialmente ativas para outras patologias.

Motivados pelo que foi exposto, apontamos como objetivo específico deste trabalho, a avaliação do efeito do levofloxacino e do ciprofloxacino (**Figura 9**), antimicrobianos da classe das fluorquinolonas, frente à fibrilogênese do peptídeo A β ₄₂.

3. Resultados e discussão

3.1. Preparação do filme peptídico

A formação de fibrilas amilóides pode ser estudada *in vitro* a partir do peptídeo A β ₄₂, comercialmente disponível. Inicialmente, devido à propriedade auto-agregante do peptídeo A β e conhecida variabilidade existente entre diferentes lotes, os mesmos foram padronizados. Para isso, o peptídeo foi dissolvido em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), e a solução resultante, dividida igualmente em seis alíquotas e após centrifugação sob vácuo para total evaporação do HFIP, o filme resultante foi estocado a -80°C. Este procedimento inicial, desenvolvido por Dahlgren e colaboradores¹² garante a reprodutibilidade entre diferentes lotes analisados.

3.2. Obtenção das formas fibrilares

Para fazermos a avaliação do efeito dos compostos selecionados sobre a agregação/fibrilogênese do peptídeo A β , foi necessário preparar o peptídeo em sua forma fibrilar para usar como controle positivo em nossos ensaios.

A literatura descreve duas metodologias para a preparação de formas fibrilares de peptídeo A β . O protocolo desenvolvido por Dahlgren e colaboradores¹², usa pH ácido, através da adição de HCl ao filme dissolvido em DMSO e sonicado por 10 minutos, para induzir a formação de fibrilas sob incubação a 37°C por 24 horas. Zhou e colaboradores³⁰ descrevem o uso de tampão fosfato pH 7,4 em microplacas.

Para realizar os nossos ensaios, a primeira metodologia se mostrou mais eficaz, já que as formas fibrilares são obtidas após incubação das amostras por um período de 24 h. A metodologia de Zhou e colaboradores²⁵ não foi selecionada para este trabalho devido à necessidade de um período maior para formação das formas fibrilares (17 dias) e da quantidade restrita de nossas amostras.

³⁰ Zhou, Y.; Jiang, C.; Zhang, Y.; Liang, Z.; Liu, W.; Wang, L.; Luo, C.; Zhong, T.; Sun, Y.; Zhao, L.; Xie, X.; Jiang, H.; Zhou, N.; Liu, D.; Liu, H. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5449.

Assim, o modelo de peptídeo fibrilar empregado neste trabalho foi o gerado em meio com HCl.

A detecção das formas fibrilares foi realizada por técnicas de fluorescência, microscopia de força atômica (MFA) e eletroforese em gel de poliacrilamida, que foram as mesmas para a avaliação do efeito das substâncias-teste, conforme discutido posteriormente.

3.3. Ensaio de fluorescência da Tioflavina T para detecção da agregação do peptídeo A β

O fenômeno da fluorescência ocorre quando uma molécula é excitada, ou seja, absorve fótons e seus elétrons passam para níveis de energia superiores e, ao voltar ao estado fundamental, emitem radiação. A emissão de fluorescência, na maior parte dos casos, tem comprimento de onda maior que a radiação usada para sua excitação. Esse deslocamento para comprimentos de onda maiores é denominado deslocamento de Stokes.³¹

A fluorescência da tioflavina T (ThT – **Figura 11**) é usada para monitorar a formação de fibrilas β -amilóides.

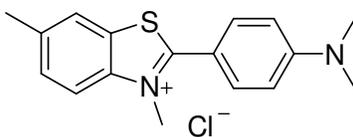


Figura 11: Estrutura da Tioflavina T.

A literatura relata que a ThT emite fluorescência somente quando ligada a agregados de peptídeo A β ricos em estruturas contendo folhas- β e/ou fibrilas³² (**Figura 12**), sendo que a reação inicia imediatamente após a mistura do peptídeo

³¹ Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5ª edição. Porto Alegre: Ed Bookman, **2002**.

³² Bolognin, S.; Messori, L.; Drago, D.; Gabbiani, C.; Cendron, L.; Zatta, P. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43*, 877.

A β e ThT em meio aquoso, e se completa em até 1 minuto. A ThT não interfere na agregação das fibrilas β -amilóides.³³

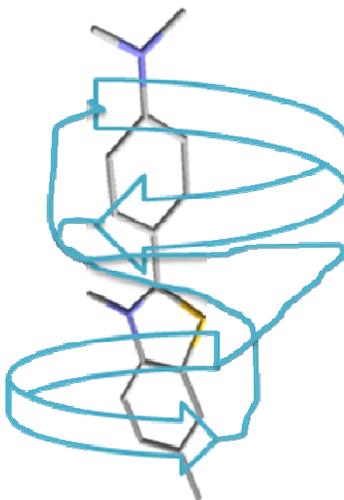


Figura 12: Ligação da ThT às folhas- β .

A ThT ligada ao peptídeo A β emite fluorescência no comprimento de onda 485 nm quando excitada em 450 nm, de acordo com nossas análises.

Observou-se, nas análises de fluorescência, um aumento inicial da fluorescência da ThT, no período de 24h de incubação (**Figura 13**). Em seguida, houve uma queda na intensidade observada após 48h de incubação. Este fenômeno já foi relatado por Nilsson⁷ e indica que a precipitação das fibrilas pode dificultar o acesso da ThT às mesmas, além da possível saturação da ThT pelos agregados ou fibrilas do peptídeo A β .

³³ Bourhim, M.; Kruzel, M.; Srikrishnan, T.; Nicotera, T. *J. Neurosci. Methods* **2007**, *160*, 264.

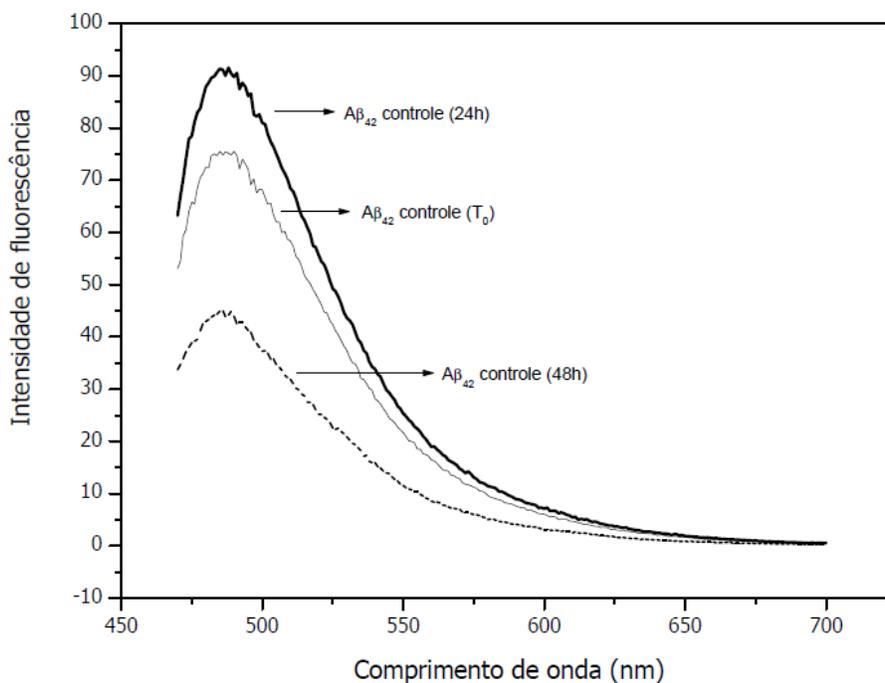


Figura 13: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl no decorrer dos tempos de incubação. No tempo zero (linha normal), após 24h (linha em negrito) e após 48h de incubação (linha pontilhada).

3.4. Ensaio de fluorescência do levofloxacinó e cloridrato de ciprofloxacino

As fluoroquinolonas como o levofloxacinó e cloridrato de ciprofloxacino apresentam fluorescência intrínseca.³⁴ Desta maneira, antes de avaliar o efeito destes compostos sobre a inibição da agregação do peptídeo A β , fez-se necessário determinar o comprimento de onda de excitação e emissão de fluorescência destes compostos. Isto foi importante para se garantir que não houvesse interferência na fluorescência da ThT quando ligada ao peptídeo A β , gerando então resultados falso negativos.

As análises de fluorescência indicaram que o levofloxacinó emite fluorescência no comprimento de onda 492 nm quando excitado em 393 nm (**Figura 14**). Quando o levofloxacinó é excitado no comprimento de onda de

³⁴ Polishchuk, A. V.; Karaseva, E. T.; Proskurina, N. A.; Karasev, V. E. *High Energy Chem.* **2008**, 42(6), 459.

excitação da ThT (450 nm), não há emissão de fluorescência (**Figura 14** – linha vermelha).

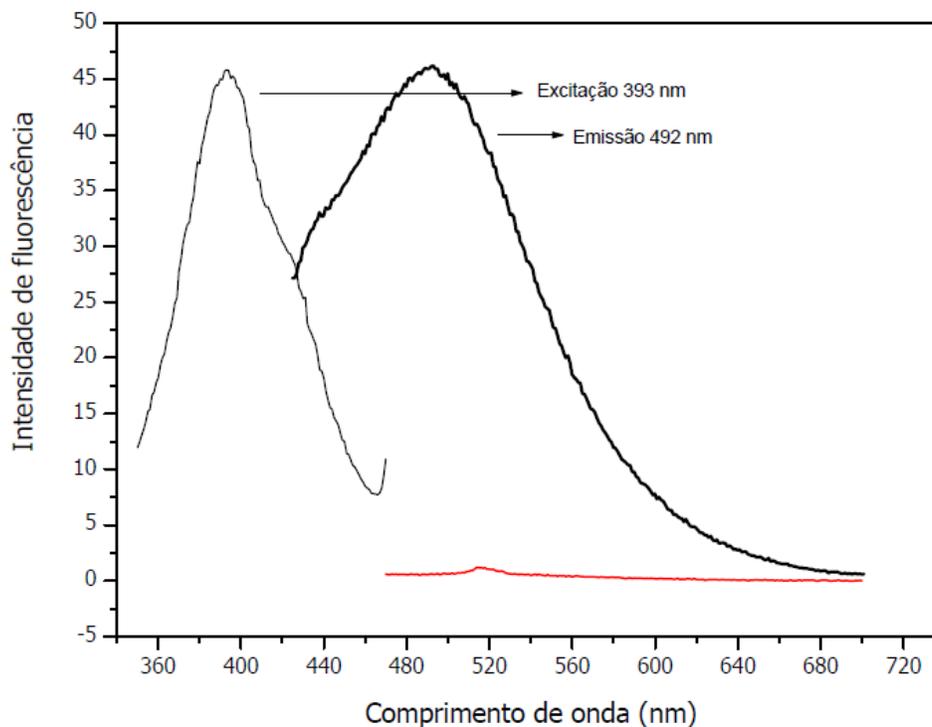


Figura 14: Análise de fluorescência do levofloxacin: excitação (linha preta normal) e emissão (linha preta em negrito) e emissão quando excitada a 450 nm (linha vermelha).

As análises de fluorescência do cloridrato de ciprofloxacino indicaram que ele emite fluorescência no comprimento de onda 453 nm, quando excitado em 276 nm (**Figura 15**). Assim como o levofloxacin, quando o ciprofloxacino é excitado no comprimento de onda de excitação da ThT (450 nm), não há emissão de fluorescência (**Figura 15** – linha vermelha).

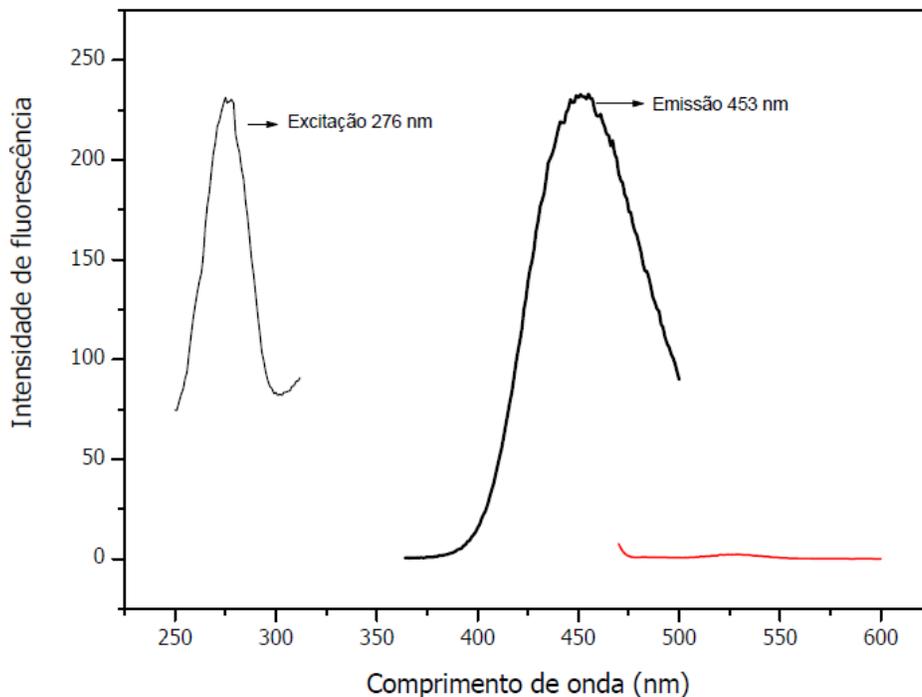


Figura 15: Análise de fluorescência do cloridrato de ciprofloxacino: excitação (linha preta normal) e emissão (linha preta em negrito) e emissão quando excitada a 450 nm (linha vermelha).

No caso do cloridrato de ciprofloxacino, embora ele possa ser dissolvido em HCl 10 mmol.L⁻¹, no momento de sua adição ao filme de peptídeo dissolvido em DMSO, ocorreu precipitação, inviabilizando assim o seu uso neste ensaio. No caso do levofloxacino, não observamos problemas de solubilidade.

Desta forma, o efeito do levofloxacino na agregação do peptídeo A β pode ser analisado por meio de fluorescência sem que haja interferência.

3.5. Ensaio de inibição da fibrilogênese do peptídeo A β por fluorescência

Estabelecido o protocolo de agregação, ensaios visando avaliar a inibição desta foram realizados. Uma solução de levofloxacino em DMSO (0,2 mmol.L⁻¹) foi adicionada ao filme peptídico e a solução resultante sonicada por 10 min. Após este período, adicionou-se HCl 10 mmol.L⁻¹ para promover a formação de fibrilas. Vale ressaltar que a concentração final do peptídeo no meio foi mantida constante

(1 mmol.L⁻¹), de modo que as análises pudessem ser comparadas. Os resultados de fluorescência estão expressos na **Figura 16**. O peptídeo em HCl foi utilizado como controle (linha em negrito) e comparado ao levofloxacino (linha normal). Em comparação à amostra controle do peptídeo submetido às condições de formação de fibrilas, foi observado que houve uma diminuição na intensidade de fluorescência na amostra incubada com o levofloxacino em aproximadamente 22%, após 24h. Este resultado sugere que esta fluorquinolona retarda o processo de formação de agregados/fibrilas.

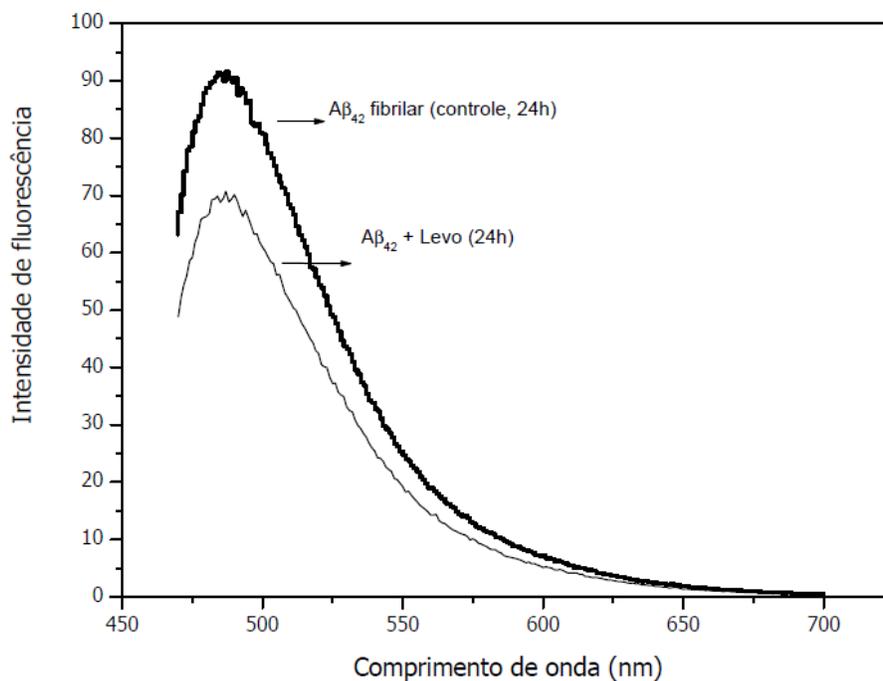


Figura 16: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo Aβ controle isolado e na presença de levofloxacino após 24h de incubação.

Este resultado despertou o nosso interesse pela investigação da parte da estrutura do levofloxacino responsável pela diminuição na intensidade de fluorescência da ThT. Assim, incluímos em nosso estudo a quinolona **6** (**Figura 17**), que foi sintetizada em nosso laboratório. A sua síntese está descrita na seção 4.

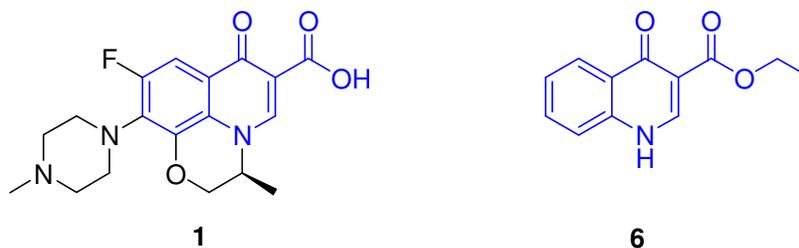


Figura 17: Porção quinolônica (**6**) do levofloxacino (**1**) possível grupo farmacofórico da inibição da fibrilogênese do A β .

A quinolona **6** pode ser vista como uma simplificação molecular do levofloxacino, correspondendo à sua porção planar (**Figura 18**). Esta estratégia de planejamento molecular de novos fármacos consiste no desenho de análogos estruturalmente mais simples a partir de protótipos estruturalmente mais complexos.³⁵

É possível que uma conformação planar e o tamanho da molécula sejam importantes para a interação com a estrutura secundária do peptídeo, inibindo a formação de fibrilas. O resultado obtido contribui para estudos futuros do mecanismo pelo qual estes compostos inibem a formação de fibrilas.

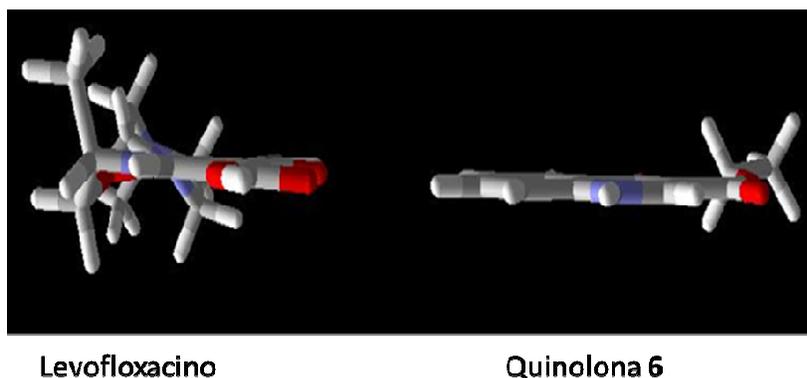


Figura 18: Estruturas minimizadas do levofloxacino e da quinolona **6**.

A quinolona **6** também foi analisada quanto à emissão de fluorescência (**Figura 19**). Esta última emite fluorescência no comprimento de onda 369 nm

³⁵ Barreiro, E. J. *Quim. Nova.* **2002**, 25(6B), 1172.

quando excitada em 335 nm não emitindo fluorescência quando excitada em 450 nm (**Figura 19**– linha vermelha).

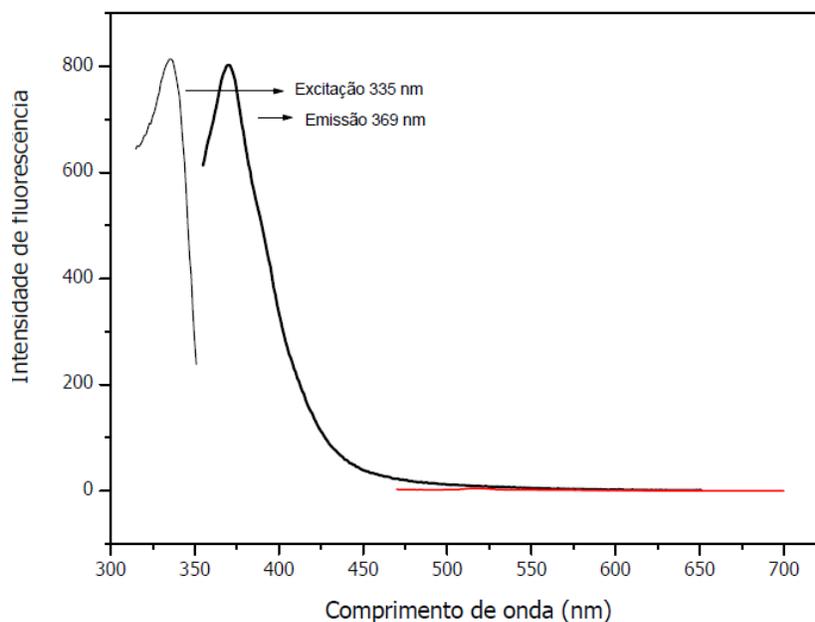


Figura 19: Análise de fluorescência da quinolona **6**: excitação (linha preta normal) e emissão (linha preta em negrito) e emissão quando excitada a 450 nm (linha vermelha).

Assim, a quinolona **6** foi submetida ao ensaio de inibição da agregação nas mesmas condições do levofloxacin. O gráfico representativo deste resultado está na **Figura 20** (linha pontilhada). Foi observado que houve uma diminuição na intensidade de fluorescência na amostra incubada com a quinolona **6** em aproximadamente 50%. Esta redução foi ainda mais pronunciada quando comparada à redução obtida com o levofloxacin.

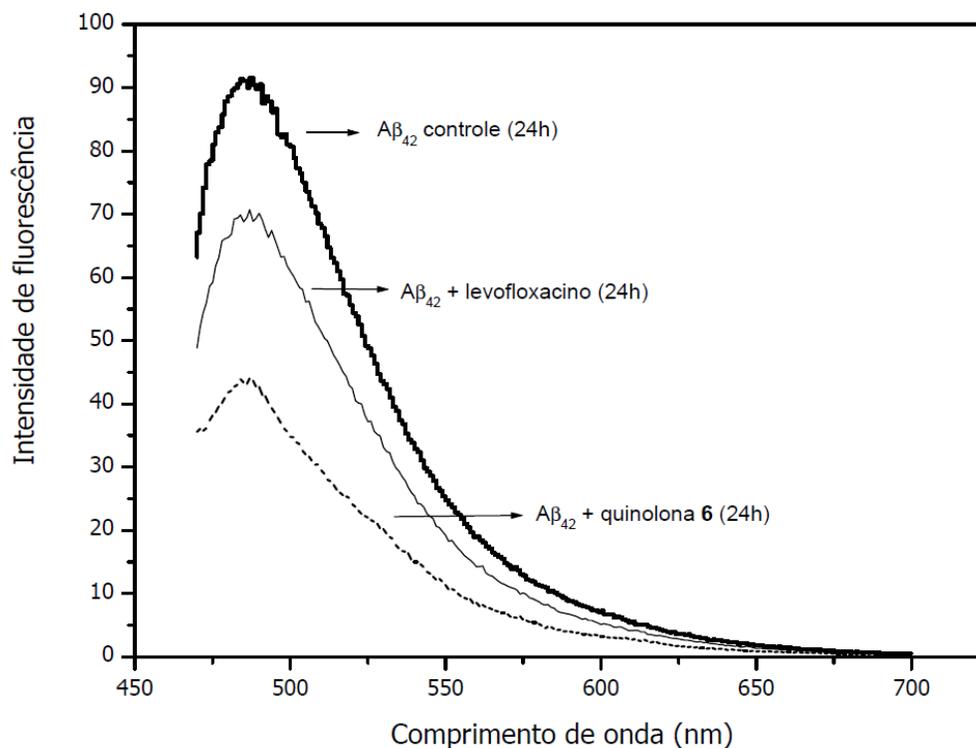


Figura 20: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β controle (linha em negrito) e na presença da quinolona **6** (linha pontilhada) após 24h de incubação.

Como já relatado, até 24 horas de incubação observa-se um aumento na emissão de fluorescência até atingir um platô. Após 24 horas há uma diminuição na emissão. Este comportamento é observado para o peptídeo controle e na presença da quinolona **6**. Os resultados de fluorescência expressos na **Figura 21** são a média de 10 leituras.

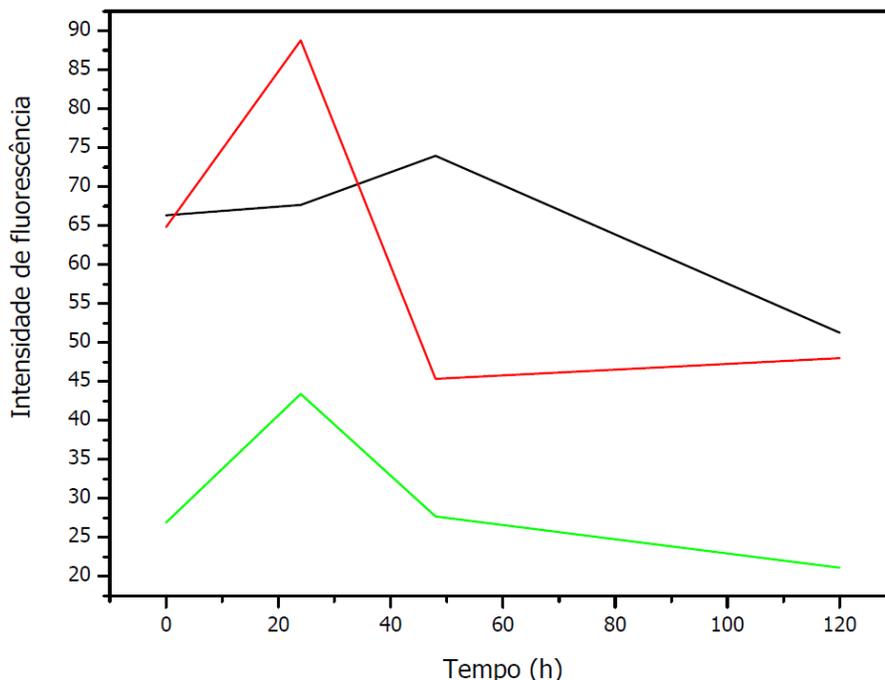


Figura 21: Médias das análises de fluorescência da ThT no decorrer do tempo de incubação do peptídeo controle (linha vermelha), peptídeo em HCl na presença de levofloxacino (linha preta) e peptídeo em HCl na presença da quinolona **6** (linha azul).

Quando analisamos a fluorescência do peptídeo na presença do levofloxacino e da quinolona **6**, no decorrer do tempo, os resultados são diferentes. Observa-se em todas as amostras analisadas, inclusive no controle, uma emissão de fluorescência no tempo zero (t_0). Assim, é possível que pré-agregados, ou seja, pequenos oligômeros, já estivessem presentes nos filmes peptídicos. Entretanto, se compararmos a intensidade dessa fluorescência no tempo zero, a diferença é significativa para as diferentes amostras. Já neste tempo zero é possível observar que a amostra contendo quinolona **6** apresenta baixa intensidade de emissão. Além disso, a amostra contendo HCl na presença de levofloxacino (**Figura 22**) não apresentou diferença significativa na fluorescência no decorrer do tempo de incubação. Este resultado nos leva a pensar que o levofloxacino possa minimizar a agregação do peptídeo A β .

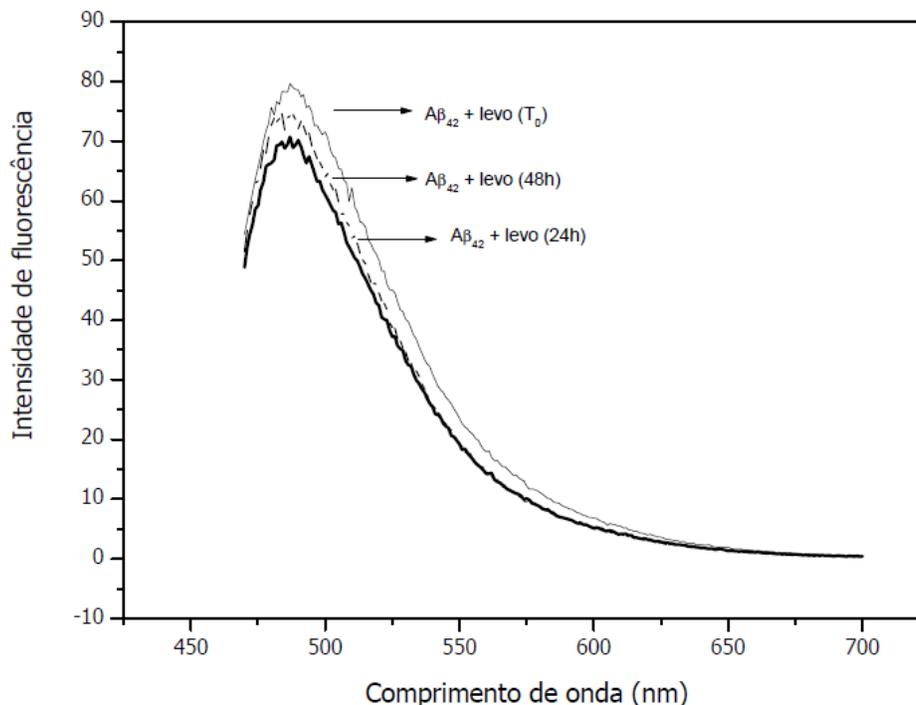


Figura 22: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl na presença do levofloxacino no decorrer dos tempos de incubação. No tempo zero (linha normal), após 24h (linha em negrito) e após 48h de incubação (linha pontilhada).

A amostra da quinolona **6** na presença de HCl (**Figura 23**) apresentou aumento na fluorescência após 24h de incubação, seguida de um decréscimo na intensidade após 48h. Embora este resultado evidencie que haja um aumento inicial na agregação, observa-se que a intensidade da fluorescência máxima é ainda bastante inferior ao resultado obtido com o controle. Dessa forma, embora alguns agregados possam ser formados, parecem ser em pequena quantidade. Além disso, o decréscimo observado na intensidade da fluorescência após 48h de incubação não pode ser resultado da saturação da ThT. Acreditamos que a quinolona **6** promova a desagregação dos oligômeros que sejam formados.

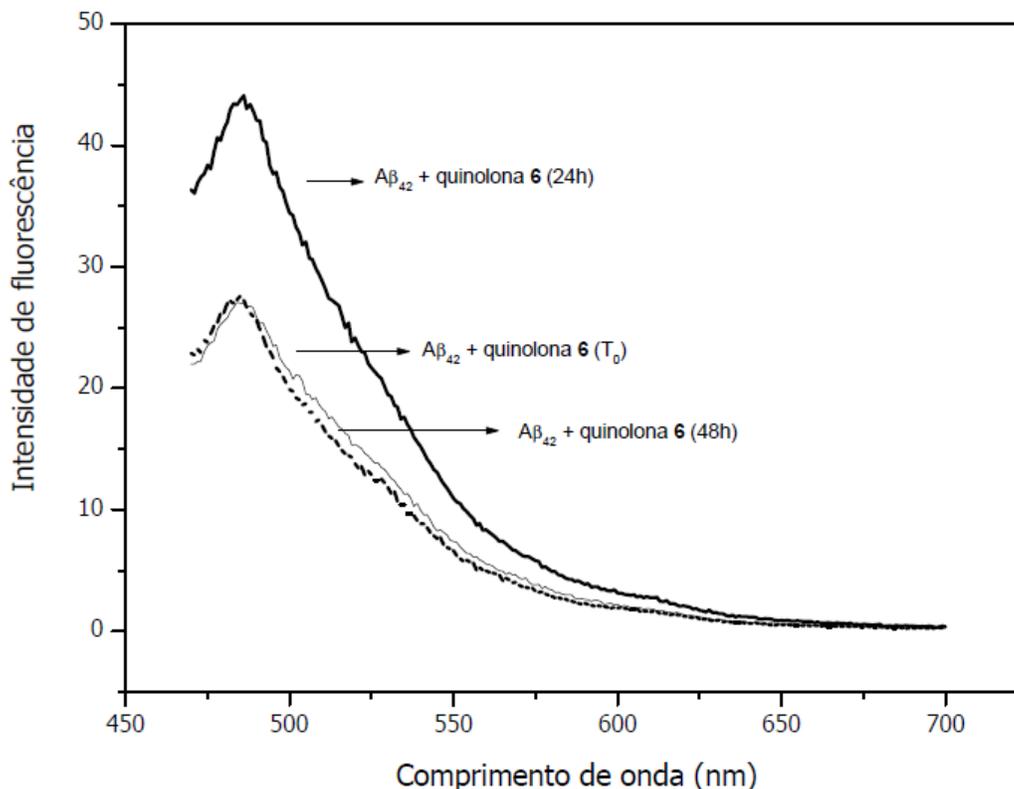


Figura 23: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl na presença da quinolona **6** no decorrer dos tempos de incubação. No tempo zero (linha normal), após 24h (linha em negrito) e após 48h de incubação (linha pontilhada).

Embora estes resultados sejam uma evidência de possível inibição/retardo da fibrilogênese do peptídeo A β , outras análises foram realizadas como forma de comprovar tal fenômeno.

3.6. Ensaio de microscopia de força atômica (MFA)

A MFA é uma técnica capaz de caracterizar uma vasta gama de estruturas presentes em misturas de agregados de peptídeo A β com resolução suficiente para detectar estruturas individuais de 0,9 nm que aparecem monoméricas em preparações não agregadas até densos agregados fibrilares com dimensões micrométricas.³⁶

³⁶ Stine Jr., W. B.; Dahlgren, K. N.; Krafft, G. A.; LaDu, M. J. *J. Biol. Chem.*; **2003**, 278 (13), 11612.

As amostras foram analisadas por MFA imediatamente após o preparo (t_0) e após 24 h de incubação na presença das substâncias em estudo. As seguintes amostras foram preparadas:

A - peptídeo $A\beta_{42}$ em DMSO;

B – peptídeo $A\beta_{42}$ submetido a condições de agregação com HCl (controle)

C - peptídeo $A\beta_{42}$ submetido a condições de agregação com HCl, na presença de levofloxacino

D - peptídeo $A\beta_{42}$ submetido a condições de agregação com HCl, na presença da quinolona **6**.

Análise no tempo zero

As imagens se encontram na **Figura 24** (imagens superiores, A-D). Como pode ser observado, no tempo zero, não foram detectadas fibrilas em nenhuma das preparações, apenas pequenos agregados oligoméricos com dimensões de 6,4 a 8 nm. A presença destes oligômeros no tempo zero já havia sido detectada por fluorescência, pois ocorreu emissão, justificada pelo fato de que a ThT se liga ao peptídeo na sua conformação β , característica dos oligômeros (pré-fibrilas).³¹

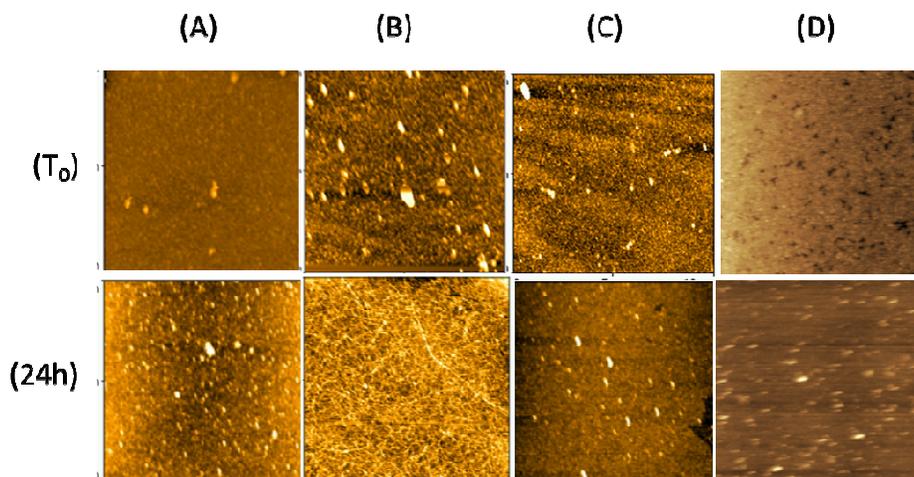


Figura 24: Imagem do peptídeo $A\beta$ nos tempos t_0 e após 24h de incubação (A): Peptídeo em DMSO; (B): Peptídeo em HCl (controle); (C): Peptídeo em HCl na presença de levofloxacino e (D): Peptídeo em HCl na presença da quinolona **6**.

Análise após 24h de incubação

Nas imagens obtidas após 24h de incubação (**Figura 24** - imagens inferiores, A-D) observa-se a presença de fibrilas com dimensões 6 x 70 x 3.000 nm, somente nas amostras do peptídeo submetido a condições de agregação em HCl (**Figura 24** - imagem inferior B). De acordo com a literatura, as fibrilas amilóides tendem a ser longas apresentando comprimento maior do que 1 μ m.³⁷ Na amostra do peptídeo em DMSO (**Figura 24** – imagem inferior A) observou-se oligômeros maiores (~16nm) dos que os encontrados na amostra do tempo zero, provavelmente devido à conhecida propriedade auto-agregante do peptídeo A β .

Na amostra contendo levofloxacino, formas oligoméricas de dimensões equivalentes às encontradas no tempo zero foram visualizadas, o que está de acordo com o resultado da análise por fluorescência, ou seja, sem aumento significativo na emissão. Já a amostra contendo a quinolona **6**, apresentou formas oligoméricas menores (~4 nm) do que as observadas no tempo zero, sugerindo que esta substância promova a desestabilização dos agregados oligoméricos.

Estes resultados indicam fortemente que ocorreu inibição/retardo da formação de fibrilas do peptídeo A β na presença dos compostos testados. Inclusive, o levofloxacino foi capaz de impedir a agregação das formas oligoméricas já existentes no tempo t_0 . Além disso, a quinolona **6** pode ter atuado na desestabilização de agregados já formados, conforme indica análise de 24h de MFA do peptídeo na presença deste composto.

3.7. Ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida tem sido usada para a detecção de proteínas e peptídeos, uma vez que as massas variam de acordo com os estados de agregação. Utilizando-se um padrão de peso molecular, é possível então estimar o estado de agregação: monômeros, dímeros, oligômeros e outras organizações mais complexas. Esta técnica tem sido usada também para avaliação da agregação do peptídeo A β .

³⁷ Krebs, M. R. H.; Bromley, E. H. C.; Donald, A. M. J. *Struct. Biol.* **2005**, *149*, 30.

A eletroforese das amostras foi realizada nos tempos t_0 e t_{24h} , diluindo-se a solução contendo a amostra com peptídeo em tampão. As amostras foram aplicadas no gel, tendo como referência um padrão de peso molecular. O gel obtido após a corrida foi revelado com kit de prata. A **Figura 25** mostra o gel obtido após incubação de 24 horas para amostras com levofloxacino e quinolona **6**. As amostras e os controles foram empregados sempre nas mesmas concentrações. Foram utilizados como controle o peptídeo em HCl (**2**) e o peptídeo em DMSO (**3**). Em ambos os casos, observa-se a predominância de formas agregadas em relação aos monômeros. Em (**2**), há predominância de formas fibrilares e, em (**3**), de oligômeros. A presença destes em (**3**) é devida à propriedade auto-agregante do peptídeo A β .

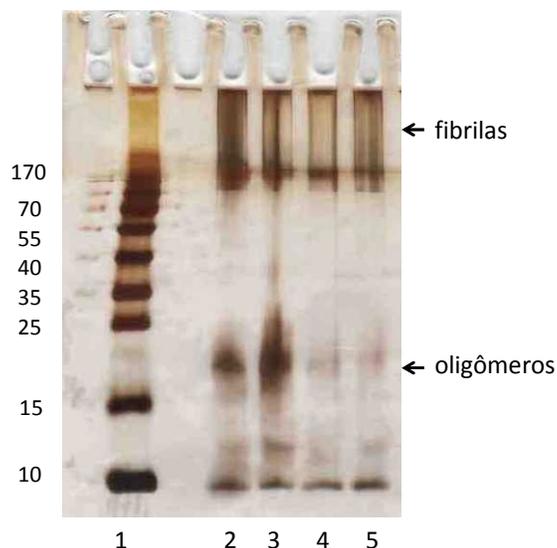


Figura 25: SDS-PAGE obtido após incubação a 37°C por 24 horas (1- Padrão de peso molecular; 2- Peptídeo fibrilar; 3- Peptídeo incubado em DMSO; 4- Peptídeo incubado em presença de levofloxacina; 5- Peptídeo incubado em presença da quinolona **6**).

Entretanto, é importante relatar que, embora a eletroforese seja uma técnica usual na análise da agregação do peptídeo A β , ela fornece somente informações limitadas, como indica a literatura.³⁶ Isto se justifica pela existência das manchas entre as bandas dos agregados peptídicos. Estas manchas caracterizam a dissociação dos agregados formados, devido ao próprio processo eletroforético, que combina tampão, glicerol, detergente e voltagem. Por este

motivo, a eletroforese é uma técnica utilizada para confirmar resultados obtidos por outras técnicas de avaliação da agregação do peptídeo A β .

Os resultados da eletroforese mostram uma menor proporção ou inexistência de formas fibrilares na amostra de peptídeo em levofloxacino (**4**), comparado com o controle positivo (peptídeo fibrilar, **2**). O mesmo se observa com a quinolona **6** (**5**). Estes resultados corroboram com os observados nas técnicas de MFA e fluorescência.

3.8. Ensaio de inibição da fibrilogênese do peptídeo A β por fluorescência na presença de Zn²⁺

De acordo com os resultados obtidos até o presente momento e levando-se em consideração a importância dos metais no processo de agregação do peptídeo A β , bem como na patogênese da DA, um ensaio preliminar de avaliação da agregação do peptídeo foi feito na presença de metais.

Considerando-se que o processo de fibrilogênese é conhecidamente intensificado em presença de pequenas quantidades de íons metálicos^{31,38,39}, em especial o Zn²⁺ e a restrita quantidade de amostra, optou-se por avaliar a agregação em presença deste íon.

Dessa forma, o peptídeo foi submetido a condições de agregação em meio contendo HCl na presença de zinco na proporção 1:1, conforme ensaios preliminares relatados na literatura.⁴⁰ As análises de fluorescência em ThT no decorrer do tempo de incubação estão abaixo evidenciadas (**Figura 26**).

³⁸Faller, P.; Hureau, C. *Dalton Trans.* **2009**, 7, 1080.

³⁹Bush, A. I. *Trends Neurosci.* **2003**, 26(4), 207.

⁴⁰Mancino, A. M.; Hindo, S. S.; Kochi, A.; Lim, M. H. *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 9596.

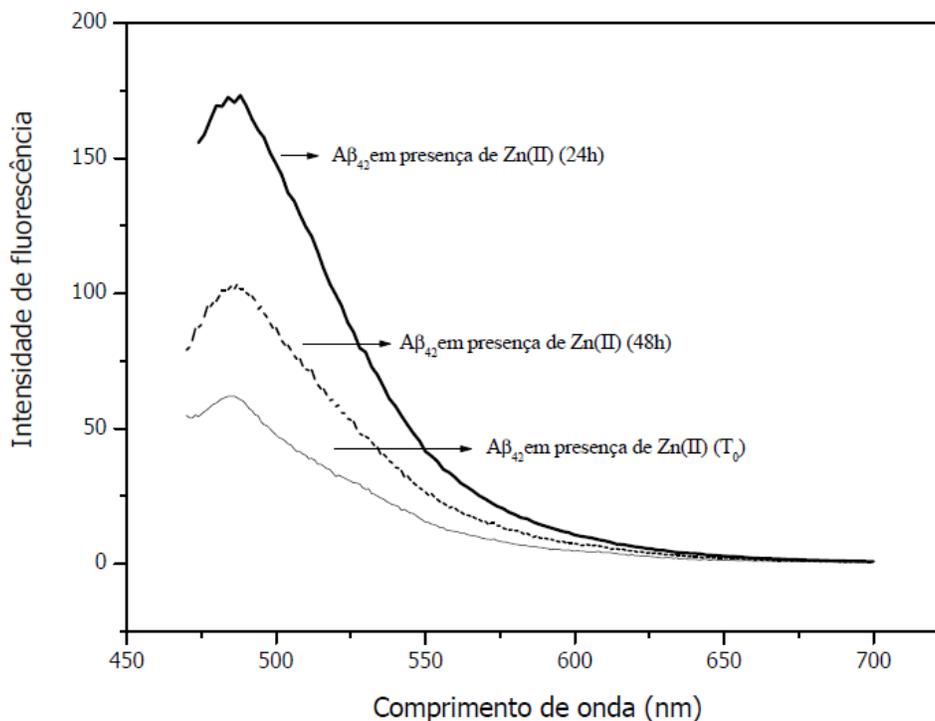


Figura 26: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo Aβ em HCl na presença de Zn²⁺ no decorrer dos tempos de incubação. No tempo zero (linha normal), após 24h (linha em negrito) e após 48h de incubação (linha pontilhada).

Pode-se observar que a intensidade de fluorescência apresenta um aumento após 24h de incubação, seguida de uma diminuição após 48h. Entretanto, observa-se que as intensidades de fluorescência nos tempos 24 e 48h são maiores quando comparadas às análises em que o metal não está presente. Esta observação confirma o envolvimento de zinco no processo de agregação do peptídeo Aβ.

Seria interessante, também, como forma de comparação com os resultados anteriormente obtidos, que a análise em presença de metal fosse realizada com os compostos de estudo. Dessa forma, o peptídeo foi submetido a condições de agregação em meio contendo HCl na presença de zinco na proporção 1:1⁴⁰, contendo também levofloxacino ou quinolona **6**. As análises de fluorescência em ThT no decorrer do tempo de incubação estão abaixo evidenciadas (**Figuras 27 e 28**).

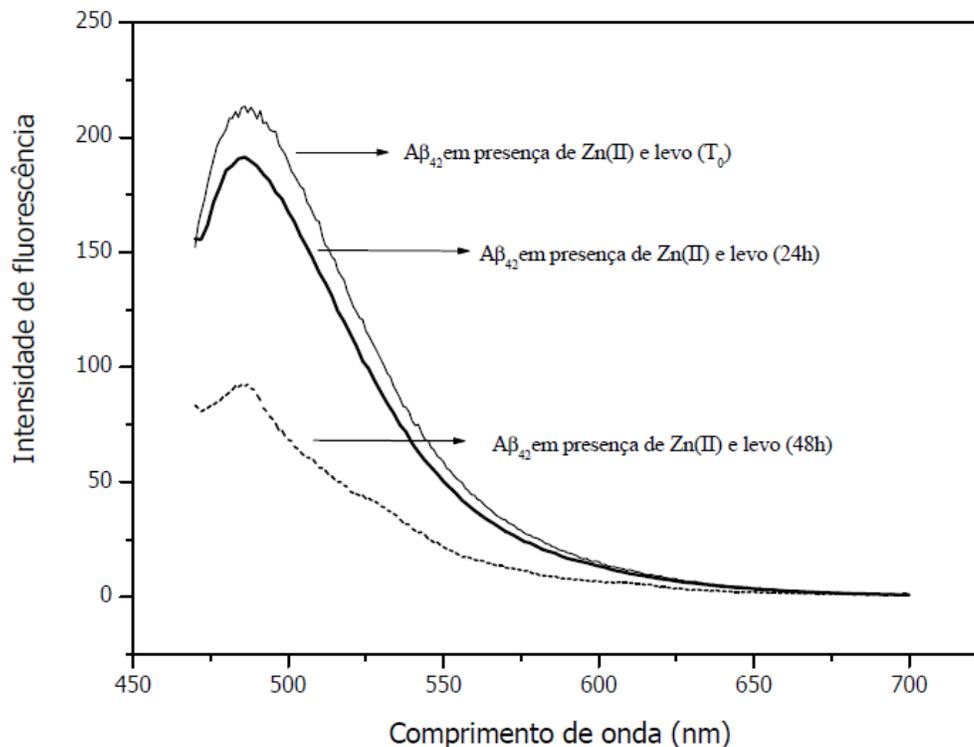


Figura 27: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl na presença de Zn²⁺ e do levofloxacino decorrer dos tempos de incubação. No tempo zero (linha normal), após 24h (linha em negrito) e após 48h de incubação (linha pontilhada).

Na presença do levofloxacino, pode-se observar que a intensidade de fluorescência apresenta-se quase que constante até 24h de incubação, seguida de uma diminuição após 48h. Este resultado apresenta certa semelhança com o resultado da fluorescência na presença de levofloxacino e ausência de metal. Entretanto, observa-se que as intensidades de fluorescência são maiores quando comparadas às análises em que o metal não está presente. Ainda assim, fica evidenciada a influência do levofloxacino no processo de agregação.

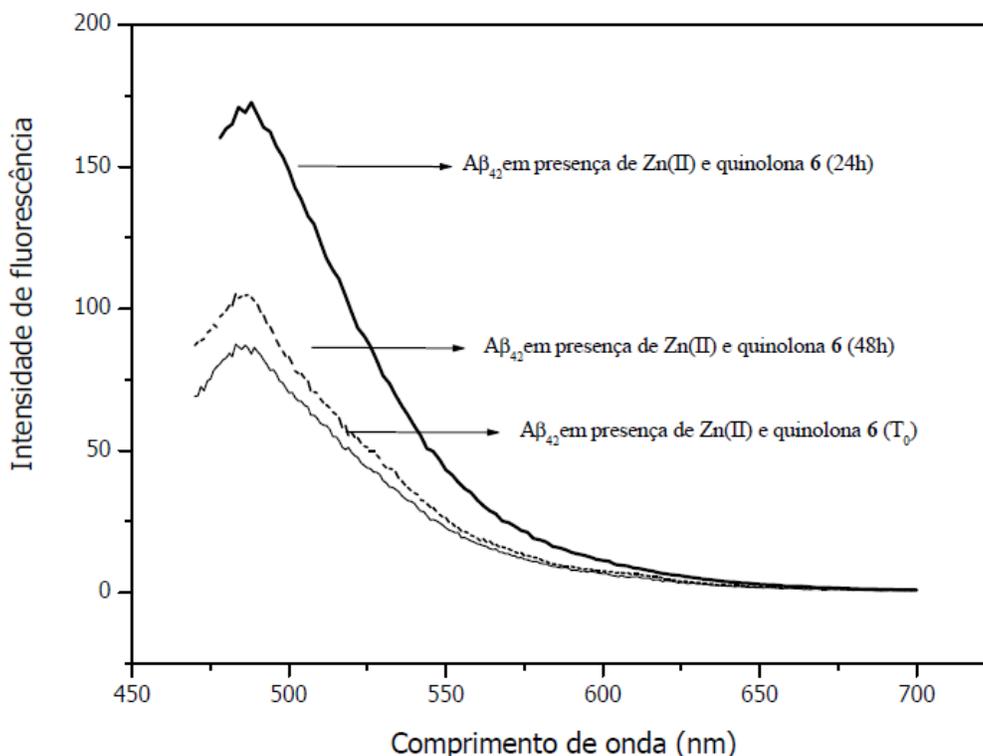


Figura 28: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl na presença de Zn²⁺ e da quinolona **6** no decorrer dos tempos de incubação. No tempo zero (linha normal), após 24h (linha em negrito) e após 48h de incubação (linha pontilhada).

Na presença da quinolona **6**, pode-se observar a intensidade de fluorescência apresenta um aumento após 24h de incubação, seguida de uma diminuição após 48h. Entretanto, mais uma vez observa-se que as intensidades de fluorescência são maiores em todos os tempos, quando comparadas com às análises em que o metal não está presente.

Fazendo-se a comparação após 24h de incubação para as amostras de peptídeo com e sem metal, na presença e ausência do levofloxacino ou quinolona **6**, apresentamos a **Figura 29** a seguir:

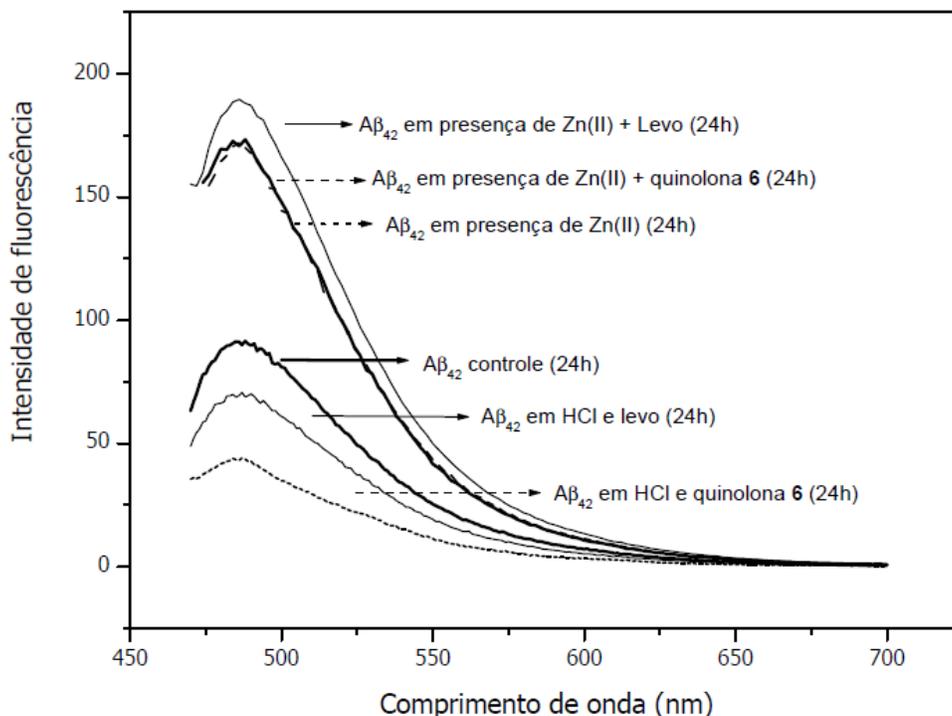


Figura 29: Comparação entre os espectros de fluorescência do peptídeo Aβ na presença de Zn²⁺ (linhas superiores) e na sua ausência (linhas inferiores), após 24h de incubação. Peptídeo na presença de Zn²⁺ e/ou HCl (linhas em negrito), peptídeo na presença de Zn²⁺ e/ou HCl e levofloxacino (linhas normais) e peptídeo na presença de Zn²⁺ e/ou HCl e quinolona **6** (linhas pontilhadas).

Podemos observar que, na presença de Zn²⁺, a intensidade de fluorescência é praticamente o dobro se comparada com a fluorescência das amostras na ausência do metal. Isto pode ser indício de uma maior quantidade de agregados, bem como fibrilas já formadas.

É interessante observar que, após 48h de incubação, a intensidade de fluorescência é maior nas amostras dos peptídeos na presença de Zn²⁺ em comparação às amostras dos peptídeos sem o metal. De fato, a ThT ainda não havia sido saturada nestas últimas amostras. Parece que, na presença do metal, mais agregados foram formados e, como consequência, a ThT é saturada, justificando a intensidade de fluorescência quase equivalente de todas as amostras (**Figura 30**).

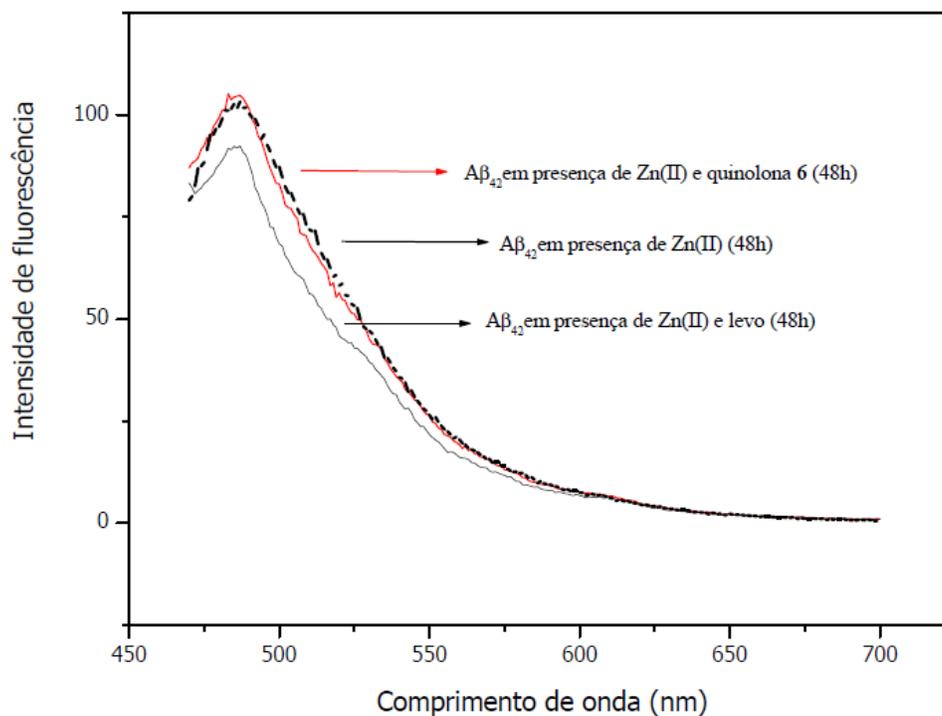


Figura 30: Intensidade de fluorescência da ThT ligada ao peptídeo A β em HCl na presença de Zn²⁺ (linha pontilhada) e da quinolona **6** (linha vermelha) ou levofloxacino (linha normal) após 48 h de incubação.

Em todos os casos, o Zn²⁺ parece ter intensificado a formação de agregados do peptídeo A β . Dessa forma, os compostos parecem não ter apresentado o mesmo efeito inibitório após 48h de incubação. Este ensaio preliminar foi capaz de comprovar o efeito do metal quando em contato com o peptídeo. O conhecimento dos complexos que podem ser formados entre o metal e os compostos-teste, relatados no capítulo 2 deste trabalho, pode auxiliar no desenho de novos ensaios. Dessa maneira, outro ensaio possível de ser realizado e que ajudaria na determinação do efeito dos compostos estudados na agregação do peptídeo A β , seria diminuir a quantidade do Zn²⁺ até um valor em que pudessem ser formados complexos com os compostos-teste ou aumentar a concentração do potencial agente inibidor. Dessa forma, o metal ficaria indisponível para interagir com o peptídeo e promover sua agregação.

Em virtude da falta de amostra, este experimento não pôde ser realizado.

3.9. Ensaio de dicroísmo circular (DC)

O dicroísmo circular (DC) é uma técnica que pode ser usada para determinar mudanças na estrutura secundária de amostras em uma dada solução. Em álcoois fluorados como o 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), o peptídeo A β adota uma conformação predominantemente α -hélice devido à quebra das interações hidrofóbicas, que são as principais estabilizadoras da folha- β .³⁶

Foram realizadas análises de DC em HFIP nos tempos zero e após incubação a temperatura ambiente por 24 horas. Entretanto, os resultados mostraram que não houve mudança significativa no conteúdo de estruturas folha- β e α -hélice para as análises realizadas.

Tabela 2 : Deconvolução dos resultados de CD para o peptídeo A β ₄₂.

Conformação	A β ₍₁₋₄₂₎ tempo zero	A β ₍₁₋₄₂₎ incubado
α -hélice	24%	21%
folha- β	42%	45%
random coil	35%	38%

Este resultado mostra que o peptídeo, apesar de estocado em filme, já contém predominantemente folhas- β , porém ainda não em estado fibrilar. Este resultado corrobora com a análise de fluorescência em ThT que mostra uma emissão significativa já no tempo t_0 .

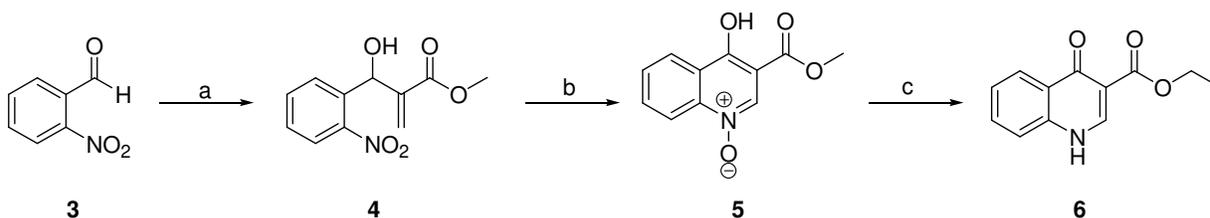
3.10. Síntese da quinolona **6**

De acordo com os resultados promissores obtidos para o levofloxacino, utilizou-se da estratégia de simplificação molecular e a quinolona **6** foi sintetizada na tentativa de correlacionar a porção quinolônica do levofloxacino ao efeito observado.

A síntese foi feita empregando-se a estratégia já relatada por Coelho e colaboradores⁴¹ de formação de quinolonas a partir de adutos de Morita-Bayllis-Hilman (MBH) utilizando *o*-nitrobenzaldeído (**3**) em presença de DABCO e acrilato

⁴¹ Amarante, G. W.; Benassi, M.; Pascoal, R. N.; Eberlin, M. N.; Coelho, F. A. S. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4370.

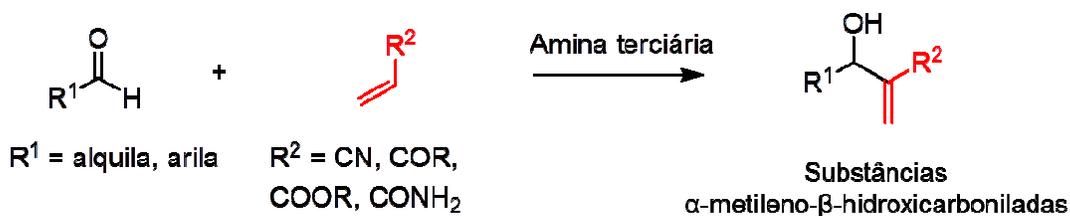
de metila. A partir do aduto de MBH (**4**) houve formação do N-óxido (**5**) através de uma ciclização intramolecular descrita por Kim e colaboradores⁴² que, posteriormente, foi reduzido e transesterificado para fornecer a quinolona **6** (**Esquema 1**).



Reagentes e condições : a) Acrilato de metila, DABCO, overnight, 96%; b) TFA, 70-75°C, 20 h, 70%; c) Mo(CO)₆, Etanol anidro, refluxo, 45 min, 49%.

Esquema 1: Síntese da quinolona **6** a partir do aldeído **3**.

O aduto **4** foi obtido em 96% de rendimento por meio de uma reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH). A reação de MBH pode ser definida, de modo geral, como uma reação de condensação entre carbonos eletrofílicos sp² (geralmente um aldeído) e a posição α de uma olefina contendo grupos retiradores de elétrons, catalisada por uma amina terciária ou fosfina, levando à formação de uma nova ligação σ C-C e produzindo moléculas polifuncionalizadas⁴³ (**Esquema 2**).



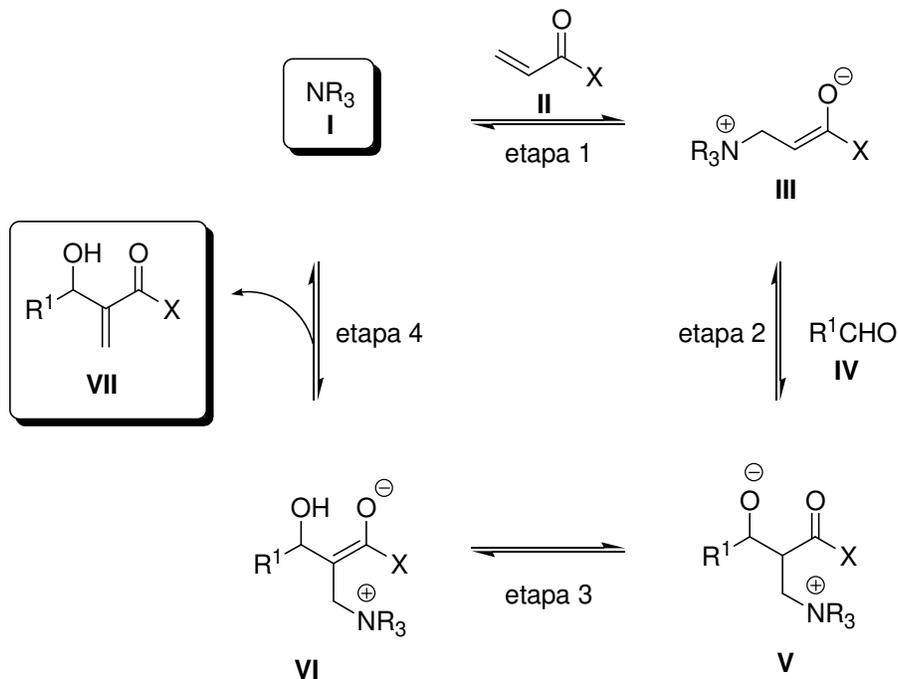
Esquema 2: Reação de Morita-Baylis-Hillman.

O mecanismo da reação de MBH se dá em quatro etapas e envolve, inicialmente, a adição de Michael do catalisador I* (amina terciária ou fosfina) ao sistema α,β-insaturado II gerando o zwitterion III. A adição aldólica de III e o

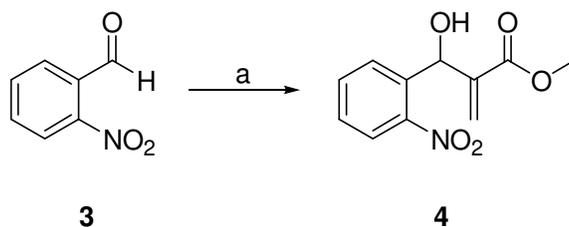
⁴² Kim, J. N.; Lee, K. Y.; Kim, H. S.; Kim, T. Y. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 343-345.

⁴³ Santos, L. S.; Pavam, C. H.; Almeida, W. P.; Coelho, F.; Eberlin, M. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4330.

aldeído **IV** gera o alcóxido **V**, que sofre uma transferência de próton, gerando o enolato **VI**. A decomposição deste último intermediário gera o produto β -hidroxi- α -metileno carbonilado **VII**, com regeneração do catalisador **I**.



Esquema 3: Mecanismo geral da reação de MBH.



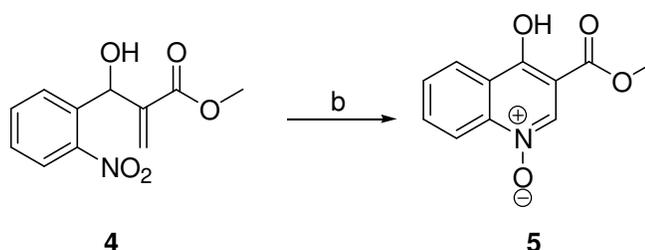
Reagentes e condições : a) Acrilato de metila, DABCO,), 12 h, t.a., 96%.

Esquema 4: Reação para obtenção do aduto de MBH **4**.

A formação do aduto de MBH **4** foi comprovada pelas análises de IV, RMN de ^1H e ^{13}C . Pela análise de IV, o aparecimento da absorção em 1630 cm^{-1} característica de $\text{C}=\text{C}$, a absorção em 1714 cm^{-1} característica de $\text{C}=\text{O}$ de ésteres α,β -insaturados, a absorção em 3448 cm^{-1} característica de $\text{O}-\text{H}$, além das absorções referentes ao grupo NO_2 em 1527 e 1350 cm^{-1} .

Através do espectro de RMN de ^1H , observou-se dois singletos 5,73 e 6,21 ppm, correspondentes aos hidrogênios metilênicos e um sinal em 3,74 ppm correspondente ao grupo metila do éster. Além destas análises, através do espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar um sinal em 67,9 ppm correspondente ao carbono carbinólico.

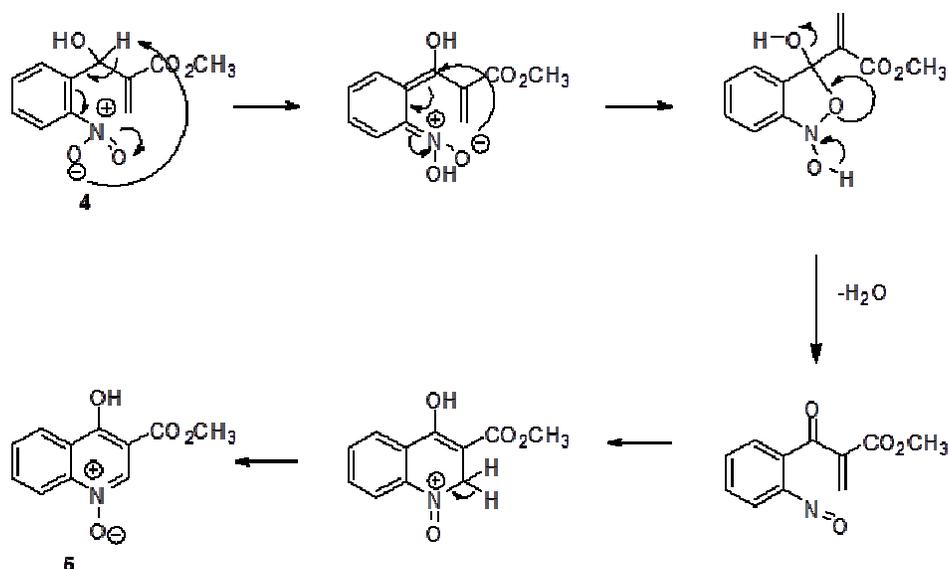
O aduto de MBH **4** foi então tratado com ácido trifluoracético (TFA) em excesso, sob refluxo durante 20 horas, fornecendo o N-óxido **5** em 70% de rendimento. Esta metodologia já havia sido descrita por Kim e colaboradores.⁴²



Reagentes e condições : b) TFA, 70-75°C, 20 h, 70%.

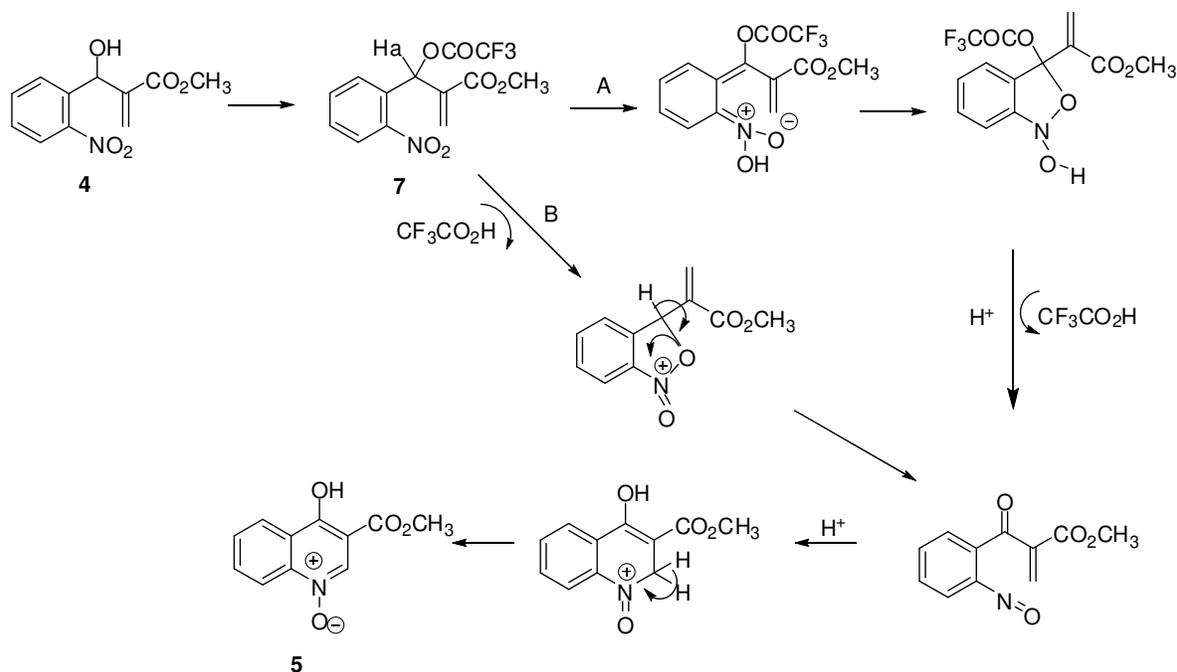
Esquema 5: Reação para obtenção do N-óxido **5**.

O mecanismo desta reação não foi comprovado, mas Kim⁴¹ propõe um mecanismo para explicar essa reação, onde em uma primeira etapa ocorre uma abstração de próton intramolecular, seguida de uma ciclização para formar o intermediário N,O-acetal. Este, por sua vez, sofre um rearranjo eletrônico com eliminação de água para formar um derivado nitroso que, após uma adição do tipo Michael intramolecular seguida pela perda de próton, regenera o sistema aromático e conduz ao N-óxido de quinolina (**Esquema 6**).



Esquema 6: Mecanismo proposto por Kim para formação de 5.

Este mecanismo foi estudado por Coelho e colaboradores⁴¹ por meio da espectrometria de massas utilizando ESI-MS. Durante este estudo, pretendeu-se observar o papel do TFA na reação. No caso do mecanismo proposto por Kim,⁴² o TFA funcionaria como fonte de prótons. Entretanto, no estudo feito por Coelho e colaboradores⁴¹ foi possível observar que o TFA participa ativamente da reação por meio da acilação do aduto de MBH. Assim, foi proposto um mecanismo estendido para a preparação de *N*-óxido de hidroxiquinolinas a partir de adutos de MBH derivados de *o*-nitrobenzaldeídos, com a inclusão do intermediário trifluoroacetilado **7** (**Esquema 6**). Nesta proposta, alternativamente ao proposto por Kim (caminho A), o intermediário **7** poderia se decompor diretamente para o derivado nitroso, perdendo ácido trifluoroacético, sem passar por um intermediário onde observa-se perda momentânea da aromaticidade do sistema (**caminho B**, **Esquema 7**).



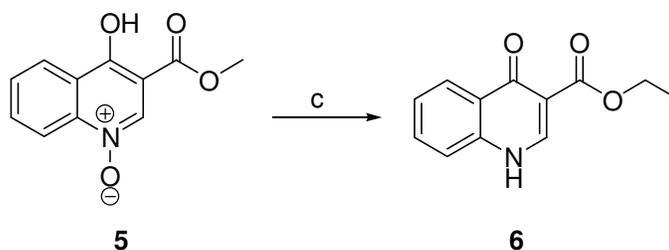
Esquema 7: Mecanismo proposto por Coelho e colaboradores para formação de **5**.

A formação do N-óxido **5** foi comprovada pelas análises de IV, RMN de ^1H e ^{13}C . Pela análise de IV, o aparecimento da absorção em 1714 cm^{-1} característica de $\text{C}=\text{O}$, além da absorção em 3454 cm^{-1} característica de $\text{O}-\text{H}$.

Através do espectro de RMN de ^1H , observou-se o desaparecimento dos dois singletos 5,73 e 6,21 ppm, correspondentes aos hidrogênios metilênicos. Além disso, observou-se o aparecimento do singlete em 8,71 ppm atribuído ao hidrogênio quinolínico em posição alfa ao grupo N-óxido.

De posse do N-óxido **5**, o mesmo foi submetido a uma redução utilizando quantidades estequiométricas de hexacarbonil molibdato (VI)⁴⁴ em etanol sob refluxo. Assim, o produto foi obtido em 49% de rendimento, sendo que ocorreu também uma transesterificação pelo solvente etanol. Este fato já havia sido observado por Coelho e colaboradores⁴¹

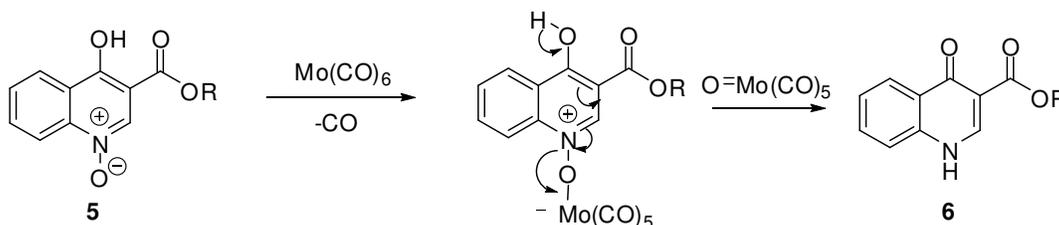
⁴⁴Yoo, B. W.; Choi, J. W.; Yoon, C. M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 125.



Reagentes e condições : c) $\text{Mo}(\text{CO})_6$, Etanol anidro, refluxo, 45 min, 49%.

Esquema 8: Reação para obtenção da quinolona **6**.

Um mecanismo plausível é proposto por Yoo e colaboradores⁴⁴ para a redução do grupo *N*-óxido de **5** (**Esquema 9**). Em um primeiro momento, ocorre a perda de um grupo CO pela molécula de $\text{Mo}(\text{CO})_6$. Então, o oxigênio da molécula de *N*-óxido coordena ao $\text{Mo}^-(\text{CO})_5$, facilitando a clivagem da ligação N-O e levando à formação da amina correspondente.



Esquema 9: Proposta mecanística para a obtenção da quinolona **6**.

A formação da quinolona **6** foi comprovada pelas análises de IV, RMN de ^1H e ^{13}C . Pela análise de IV, o aparecimento da absorção em 1624 cm^{-1} característica de C=O da quinolona e a absorção em 1703 cm^{-1} atribuída à C=O do grupo éster.

Através do espectro de RMN de ^1H , observou-se um singlete em 9,28 ppm atribuído ao hidrogênio em posição alfa ao grupo nitrogênio quinolínico. Observa-se também um quarteto em 4,66 ppm e um tripleto em 1,51 ppm correspondentes aos hidrogênios do grupo etila. No espectro de RMN de ^{13}C , observa-se dois sinais correspondentes aos carbonos carbonílicos em 176,0 e 170,0 ppm, além dos sinais correspondentes aos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ em 67,0 e 14,5, respectivamente.

A quinolona **6** foi obtida com rendimento global de 33% e caracterizada por análises de IV, RMN de ^1H e ^{13}C .

4. Conclusão

Nesta parte do trabalho foi avaliado o efeito do levofloxacino e de uma quinolona sintética sobre a agregação do peptídeo β -amilóide, utilizando técnicas de fluorescência da ThT, MFA e eletroforese em gel de poliacrilamida.

Observou-se que os compostos estudados inibem ou retardam a formação de fibrilas do peptídeo β -amilóide em baixas concentrações. O levofloxacino foi empregado em concentração sub-antimicrobiana. A quinolona **6** mostrou-se mais efetiva do que o levofloxacino, sugerindo fortemente que a porção quinolônica do levofloxacino é a região da estrutura relacionada à atividade.

O ciprofloxacino não pôde ser avaliado em nosso estudo em função de problemas de solubilidade.

A quinolona **6** foi sintetizada em 3 etapas, em 33% de rendimento global e foi caracterizada por métodos espectroscópicos.

A avaliação da agregação do peptídeo na presença do metal Zn^{2+} mostrou-se mais eficiente, sendo que os compostos avaliados parecem não terem sido capazes de afetar a agregação nas condições utilizadas.

Os resultados obtidos até o presente momento são promissores. O sucesso dessa proposta pode permitir o desenvolvimento de uma nova abordagem no tratamento da DA, fortalecendo a estratégia de reposicionamento de fármacos. Dessa forma, os resultados obtidos até o momento nos levam a acreditar que a quinolona **6** possa ser usada como um protótipo de NEQs.

Perspectivas de formulações capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) estão em estudo para dar continuidade ao trabalho.⁴⁵

⁴⁵ Dissertação de Mestrado de Cibelle A. Rossi Teixeira, em andamento sob a orientação da Profa. Dra. Wanda P. Almeida, no Instituto de Biologia.

CAPÍTULO 2

Síntese de complexos metálicos dos antimicrobianos levofloxacino e ciprofloxacino.

1. Contextualização

Estudos revelam que placas A β amilóides insolúveis em cérebros com DA analisados post-mortem, apresentam um enriquecimento anormal de Cu²⁺ e Zn²⁺. Quelantes metálicos foram capazes de dissolver depósitos proteicos em tecidos cerebrais com DA *post-mortem*.⁹ Existem diferentes relatos na literatura⁴⁶ de complexos metálicos de fluorquinolonas, em especial o ciprofloxacino. Comprovando-se a capacidade quelante dos compostos estudados, tem-se um fator adicional para sua utilização na terapia da DA. Conforme mencionado na introdução geral, este capítulo refere-se ao estudo da capacidade quelante de dois compostos da classe das fluorquinolonas, levofloxacino e ciprofloxacino.

O levofloxacino e o ciprofloxacino são agentes antimicrobianos da classe das fluorquinolonas comercialmente disponíveis. Suas estruturas apresentam heteroátomos com elétrons não ligantes que poderiam complexar com metais (**Figura 31**).^{46e} Entretanto, a maioria dos complexos relatam a ligação do átomo metálico central aos grupos: **3-carboxi** e **4-oxo** (**Figura 31**), que também são conhecidos por serem essenciais para a atividade farmacológica dos fármacos.

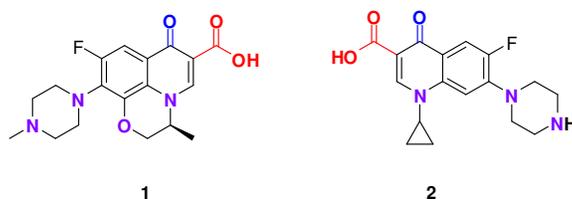


Figura 31: Possíveis centros de ligação a cátions na estrutura do levofloxacino (1) e ciprofloxacino (2).

⁴⁶ a) López-Gresa, M. P.; Ortiz, R.; Perelló, L.; Latorre, J.; Liu-González, M.; García-Granda, S.; Pérez-Priede, M.; Cantón, E. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 92, 65. b) Chohan, Z. H.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2005**, 20(3), 303. c) Anaconda, J. R.; Toledo, C. *Transition Met. Chem.* **2001**, 26, 228. d) Jiménez-Garrido, N.; Perelló, L.; Ortiz, R.; Alzuet, G.; González-Álvarez, M.; Cantón, E.; Liu-González, M.; García-Granda, S.; Pérez-Priede, M. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 677. e) Li, Y.; Chai, Y.; Yuan, R.; Liang, W. *Russ. J. Inorg. Chem.* **2008**, 53(5), 704. f) Zupancic, M.; Turel, I.; Bukovec, P.; Andrew, J. P. W.; Williams, D. J. *Croatia Chemica Acta.* **2001**, 74(1), 61. g) Wallis, S. C.; Gahan, L. R.; Charles, B. G.; Hambley, T. W.; Duckworth, P. A. *J. Inorg. Biochem.* **1996**, 62, 1. h) Macías, B.; Villa, M. V.; Rubio, I.; Castiñeiras, A.; Borrás, J. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, 84, 163. i) Anaconda, J. R.; Toledo, C.; *Transition Met. Chem.* **2001**, 26, 228. j) Drevensek, P.; Kosmrlj, J.; Giester, G.; Skauge, T.; Sletten, E.; Sepcic, K.; Turel, I. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 1755.

2. Objetivos

Em função do acúmulo de metais no cérebro de pacientes com DA bem como a presença de sítios de ligação de metal no peptídeo A β , estes representam importante alvo terapêutico. Compostos com propriedades quelantes podem reverter este desequilíbrio de metais no cérebro.

Com estas considerações, este capítulo do trabalho apresenta como objetivo conhecer a capacidade quelante das fluorquinolonas levofloxacino e ciprofloxacino e da quinolona **6**, por meio da síntese de complexos entre estes compostos e os íons metálicos Zn²⁺ e Cu²⁺, relacionados à patologia da DA.

Inicialmente, cálculos de otimização de energia e geometria das moléculas foram realizados em comparação a quelantes metálicos conhecidos, inclusive o clioquinol, protótipo para o composto em estudo clínico de fase II para a DA.

Ainda, a determinação de propriedades como coeficiente de partição água/octanol, solubilidade, citotoxicidade e atividade antimicrobiana são de extrema importância como conhecimentos preliminares que dão ideia das características destes complexos, caso sejam formados *in vivo*. Desta forma, parte deste capítulo do trabalho visa determinar as propriedades acima mencionadas.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização dos ligantes levofloxacino e ciprofloxacino

Levofloxacino e ciprofloxacino foram doados ao Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, IQ-UNICAMP, pela EMS/SA Indústria Farmacêutica. Eles não apresentam certificado de análise e, uma vez que as análises dos complexos formados foram feitas comparativamente aos fármacos, fez-se necessária a sua prévia caracterização. A caracterização dos mesmos foi feita por análises de RMN de ^1H e de ^{13}C e IV.

3.1.1. Caracterização do levofloxacino

De acordo com a análise de IV do levofloxacino, observa-se o aparecimento da absorção em 1724 cm^{-1} característica de C=O de ácido carboxílico e a absorção em 1620 cm^{-1} atribuída à C=O da quinolona.

O espectro de RMN de ^1H do levofloxacino, mostra um singlete em 8,94 ppm que foi atribuído ao hidrogênio em posição alfa ao nitrogênio quinolínico. Na porção correspondente aos hidrogênios aromáticos, observa-se um dubleto em 7,54 ppm correspondente ao hidrogênio aromático que acopla com o flúor ($J = 12,45\text{ Hz}$). Em 4,91 ppm observa-se um quarteto que foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono assimétrico e em 1,44 ppm observa-se um dubleto atribuído à $-\text{CH}_3$ ligada ao carbono assimétrico da molécula de levofloxacino. Em 2,23 ppm observa-se um singlete que foi atribuído à $-\text{CH}_3$ ligada à piperazina. Além disso, observa-se um singletos largo em 2,23 ppm e um multiplete em 3,32-3,25 ppm atribuídos aos hidrogênios da piperazina.

No espectro de RMN de ^{13}C do levofloxacino, observam-se dois sinais correspondentes aos carbonos carbonílicos em 176,3 e 166,0 ppm, além dos sinais correspondentes aos grupos $-\text{CH}_2$ em 68,0; 55,2 e 50,0 ppm e aos grupos $-\text{CH}_3$ em 46,0 e 17,9 ppm. Além disso, observa-se dubletos em 155,4; 140,1; 132,0 e 119,6 ppm correspondentes aos carbonos $-\text{C}_0$ vizinhos ao flúor e que acoplam

com o mesmo. O dubleto observado em 103,2 ppm também acopla com o flúor e foi atribuído ao –CH aromático.

Para a correta atribuição dos sinais foram feitas análises de DEPT, HSQC e HMBC.

3.1.2. Caracterização do ciprofloxacino

De acordo com a análise de IV do ciprofloxacino, o aparecimento da absorção em 1711 cm^{-1} característica de C=O de ácido carboxílico e a absorção em 1624 cm^{-1} atribuída à C=O da quinolona.

De acordo com as análises de RMN de ^1H do ciprofloxacino, pode-se observar um singleto em 9,46 ppm que foi atribuído ao hidrogênio em posição alfa ao nitrogênio quinolínico. Na porção correspondente aos hidrogênios aromáticos, observam-se dois dubletos em 8,42 ppm ($J = 12,4$ Hz) e 8,10 ppm ($J = 6,80$ Hz) correspondentes aos hidrogênios aromáticos nas posições *orto* e *meta* ao flúor, respectivamente. Além disso, observa-se dois singletos largos em 4,16 e 3,94 ppm atribuídos aos hidrogênios da piperazina.

No espectro de RMN de ^{13}C do ciprofloxacino, observam-se dois sinais correspondentes aos carbonos carbonílicos em 172,9 e 172,0 ppm, além dos sinais correspondentes aos grupos $-\text{CH}_2$ em 48,2; 46,4 e 9,6 ppm. Além disso, observam-se dubletos em 157,3 e 150,2 ppm correspondentes aos carbonos $-\text{C}_0$ vizinhos ao flúor e que acoplam com o mesmo. O dubleto observado em 113,8 ppm foi atribuído ao –CH aromático em posição *orto* ao flúor e que acopla com o mesmo. .

Para a correta atribuição dos sinais foram feitas análises de DEPT, HSQC e HMBC.

3.2. Cálculos teóricos

Os cálculos teóricos para o levofloxacino, ciprofloxacino e quinolona **6** foram realizados em comparação com cinco ligantes conhecidos (**Figura 32**)

considerando a distância entre os átomos dos sítios de coordenação com os metais. Os resultados obtidos estão apresentados a seguir.

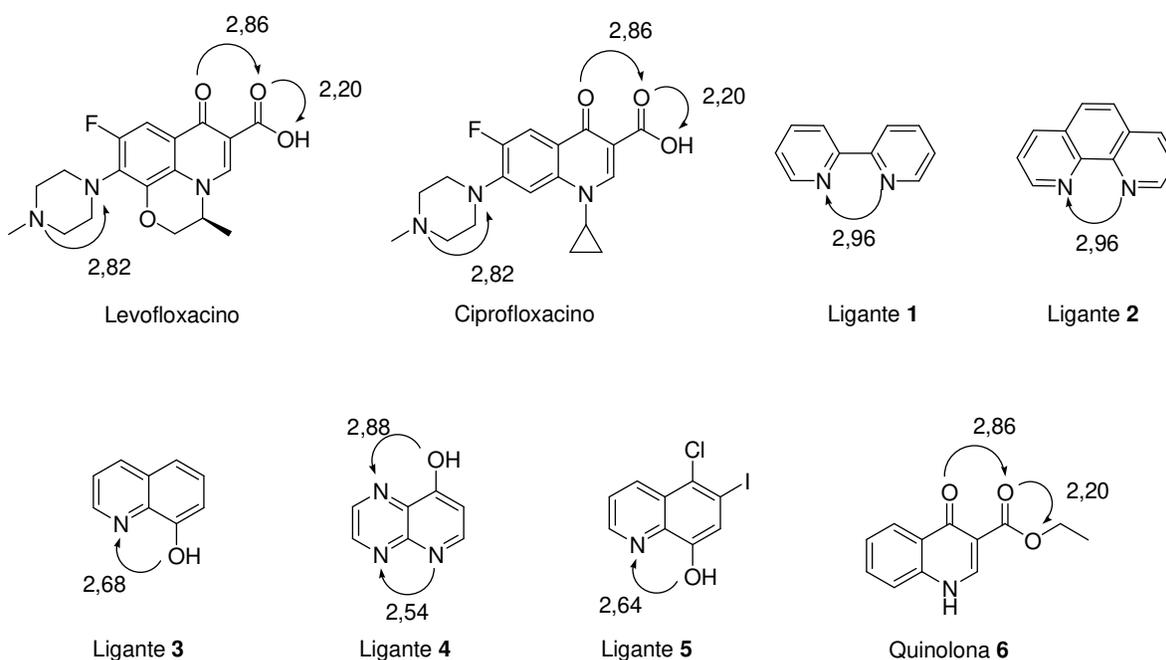


Figura 32: Estruturas e distâncias entre os átomos dos sítios de coordenação com o metal (Å) do levofloxacino, ciprofloxacino, da quinolona **6** e dos ligantes conhecidos.

Os ligantes **1** e **2** foram selecionados por serem agentes quelantes que apresentam grande seletividade para metais de transição geralmente utilizando átomos de nitrogênio como ligantes. Os quelantes **3** e **4** tem sido utilizados como protótipos para o desenvolvimento de candidatos a fármacos em doenças neurodegenerativas e intoxicações. O quelante **5** é o clioquinol, agente antifúngico e antibacteriano clássico disponível em associação com corticóides para uso tópico. Este fármaco foi descontinuado em estudos clínicos fase II para a DA, pois foi associado à neuropatia mielo-óptica subaguda, possivelmente causada por deficiência de vitamina B12. Entretanto, os pacientes tratados com o fármaco apresentaram declínio cognitivo mais lento em comparação aos pacientes tratados com placebo.²⁶ A quinolona **6** foi sintetizada para os objetivos deste trabalho.

Comparando-se as distâncias entre os grupos carbonila dos compostos alvo com átomos do sítio de coordenação de ligantes de metais conhecidos

(**Figura 32**), é possível observar um potencial destas substâncias de atuarem como agentes quelantes de metais, já que os resultados foram muito próximos.

Ainda, é possível observar, através da comparação entre as estruturas tridimensionais dos compostos avaliados, levofloxacino, ciprofloxacino, quinolona **6** e clioquinol (**Figura 33**), uma grande semelhança entre a porção quinolônica, possível grupo farmacofórico, de acordo com os resultados observados neste trabalho. A porção quinolônica apresenta certa rigidez, o que explica a semelhança observada e já previamente prevista.

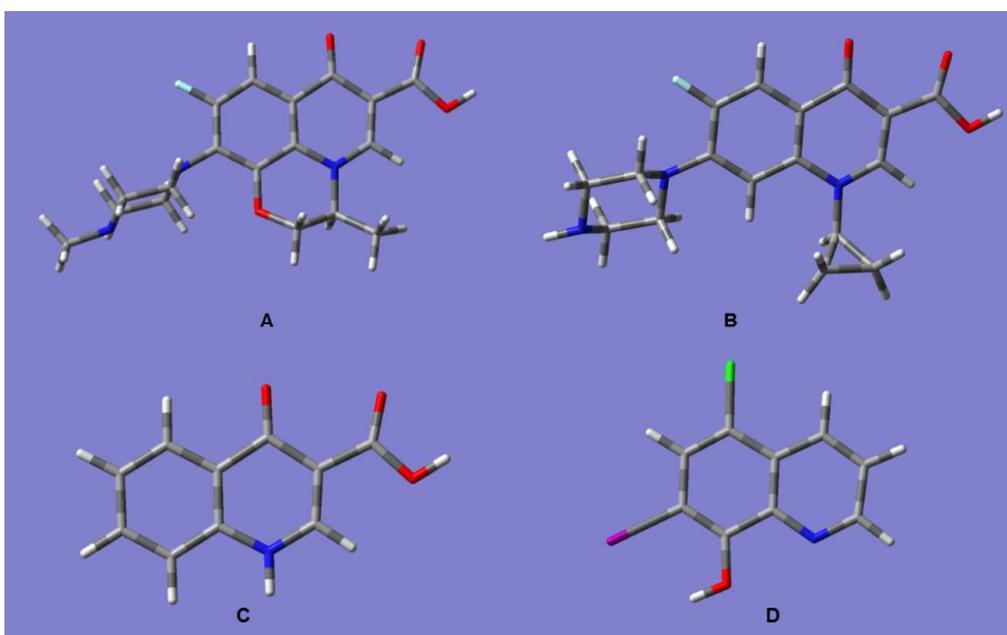


Figura 33: Estruturas tridimensionais do levofloxacino (**A**), ciprofloxacino (**B**), quinolona **6** (**C**) e clioquinol (**D**), respectivamente.

3.3. Síntese e caracterização dos complexos entre metais (Zn^{2+} e Cu^{2+}) e os compostos teste.

Os complexos foram preparados adicionando-se uma solução do sal de nitrato do metal em questão (Zn^{2+} ou Cu^{2+}) a uma solução do ligante, conforme descrito na parte experimental.

3.3.1. Caracterização por Infravermelho (IV) e massas de alta resolução

As análises no IV dos complexos de ciprofloxacino e levofloxacino mostram o deslocamento da absorção característica de carbonila de ácidos carboxílicos, sendo evidência de que a mesma esteja desprotonada. Estas bandas aparecem em 1711 e 1724 cm^{-1} , para ciprofloxacino e levofloxacino, respectivamente. Para efeitos de comparação e confirmação do deslocamento que ocorre com a desprotonação, análises no IV dos sais potássicos dos compostos-teste foram realizadas. A **Tabela 3** mostra as principais mudanças observadas no espectro no IV.

Tabela 3: Principais absorções no IV.

Compostos	$\nu_{\text{ác}}(\text{C}=\text{O})$	$\nu_{\text{ceto}}(\text{C}=\text{O})$
Ciprofloxacino	1711	1624
Ciprofloxacino potássico	1628	1581
Zinco-cipro	1628	1581
Cobre-cipro	1633	1585
Levofloxacino	1724	1620
Levofloxacino potássico	1618	1589
Zinco-levo	1622	1580
Cobre-levo	1622	1589

A absorção característica de $\nu(\text{C}=\text{O})$ da quinolona apresenta-se deslocada nos espectros dos complexos. Assim, esta pode ser uma evidência de coordenação da mesma com o metal. Alguns dados da literatura são similares e evidenciam a coordenação do ligante ao metal através da carbonila da cetona e um dos oxigênios carboxílicos da quinolona.⁴⁷ Entretanto, uma conclusão definitiva da participação do grupo cetona na ligação com o metal não pode ser feita devido à absorção correspondente no espectro dos ligantes e dos complexos, em torno de 1620-1625 cm^{-1} , ser muito próxima.

⁴⁷ Turel, I. ; Bukovec, P. ; Quirós, M. *Int. J. Pharm.* **1997**, 152, 59-65.

Alguns autores sugerem que carboxilatos iônicos não apresentam absorções de carbonila em torno de 1700 cm^{-1} , mas ao invés disso, apresentam duas absorções devido às vibrações de estiramento assimétrico ($\nu_{as}(\text{O-C-O})$) e simétrico ($\nu_s(\text{O-C-O})$) que ocorrem nas faixas $1610\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ e $1400\text{-}1280\text{ cm}^{-1}$, respectivamente.⁴⁷ De acordo com as análises dos complexos aqui mencionados, pode-se observar absorções nestas regiões. É difícil, entretanto, atribuir inequivocamente estas vibrações no espectro das quinolonas por conta de várias outras absorções presentes nestas regiões, de modo que, faz-se importante unir outras análises para se chegar à conclusão. A análise de raio-X de monocristal dos complexos seria capaz de revelar a estrutura. Entretanto, não conseguimos obter os monocristais para tal análise.

A grande maioria dos complexos relatados com metais e fluorquinolonas são bidentados. Existem, nas moléculas desta classe de compostos, diferentes átomos com elétrons não ligantes que poderiam complexar com metais. Entretanto, devido a efeitos estéricos, eletrônicos e de natureza conformacional, o metal pode se ligar somente a dois átomos do ligante.^{46e} Sendo assim, duas possibilidades são plausíveis para os complexos em questão e que estão mostradas na **Figura 34**.

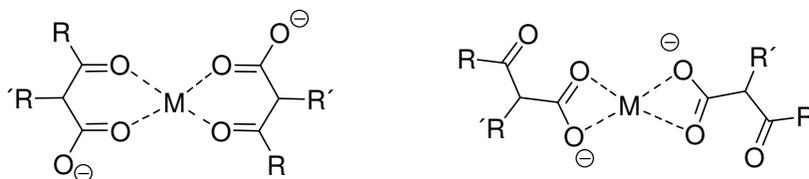


Figura 34: Possibilidade de ligação metal-ligantes.

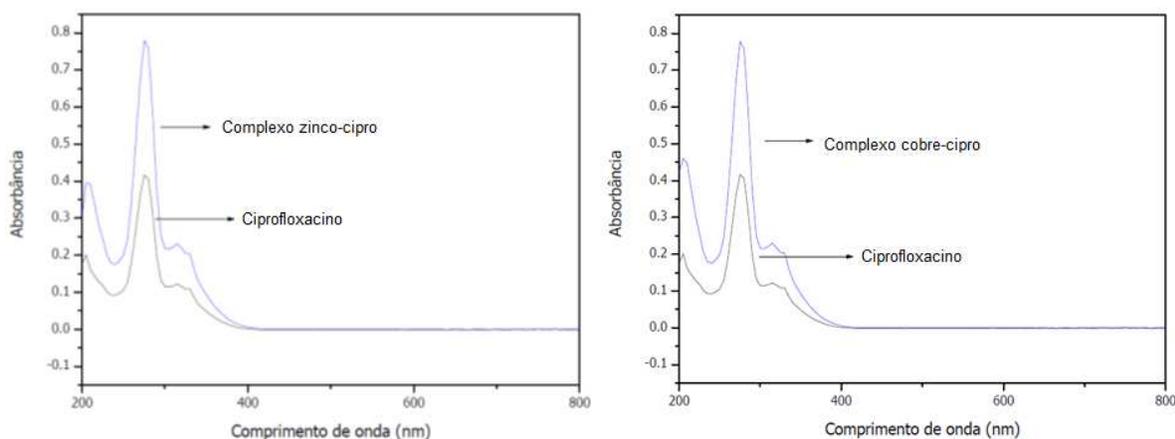
Uma confirmação de que os complexos obtidos apresentam duas moléculas de ligante coordenadas ao átomo metálico foi feita pela análise de massas de alta resolução que também mostrou não haver outras espécies coordenadas ao metal (**Tabela 4**).

Tabela 4: Resultados da análise de massas de alta resolução.

Complexos	MS (ESI) calculado	MS (ESI) obtido
Cobre-levo	784,2094	784,2034
Zinco-levo	785,2089	785,2028
Cobre-cipro	724,1882	724,1827
Zinco-cipro	725,1877	725,1834

3.3.2. Análise por Ultravioleta (UV)

As análises no ultravioleta (**Figuras 35 e 36**) dos complexos e seus ligantes isolados foram feitas, sempre utilizando as mesmas concentrações como forma de comparação dos espectros. De acordo com estas análises, as absorções dos complexos apresentam-se duplicadas em relação aos seus ligantes isolados, nas mesmas concentrações. Dessa maneira, há novamente a evidência de que os complexos apresentam duas moléculas de ligante para cada átomo metálico, além de a análise de UV poder servir como forma de quantificar os ligantes no complexo.

**Figura 35:** Análises no ultravioleta do cloridrato de ciprofloxacino e seus complexos metálicos.

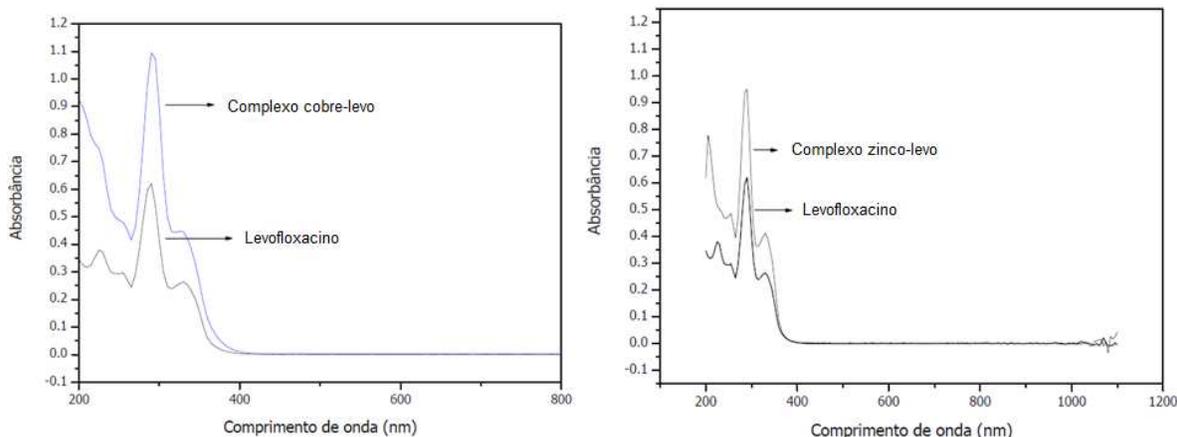


Figura 36: Análises no ultravioleta do cloridrato de ciprofloxacino e seus complexos metálicos.

3.3.3. Análise Termogravimétrica

As análises de TGA confirmam a evidência de que os complexos apresentam duas moléculas de ligante para cada átomo metálico e que não apresentam moléculas de água ou nitrato coordenadas ao metal.

3.3.3.1. Complexo zinco-ciprofloxacino

A curva termogravimétrica do complexo de ciprofloxacino com zinco (**Figura 37**) mostra uma perda inicial de massa na faixa de 25-99°C, indicando perda de água de hidratação. O valor experimental (5,60%) está de acordo com o valor teórico (4,72%) para cálculo da perda de duas moléculas de água. Há uma segunda perda de massa entre 279-568°C, correspondendo à perda do ligante devido à decomposição do complexo, sendo que valor experimental (14,17%) está de acordo com o valor teórico (10,67%) para cálculo do resíduo de óxido do metal.

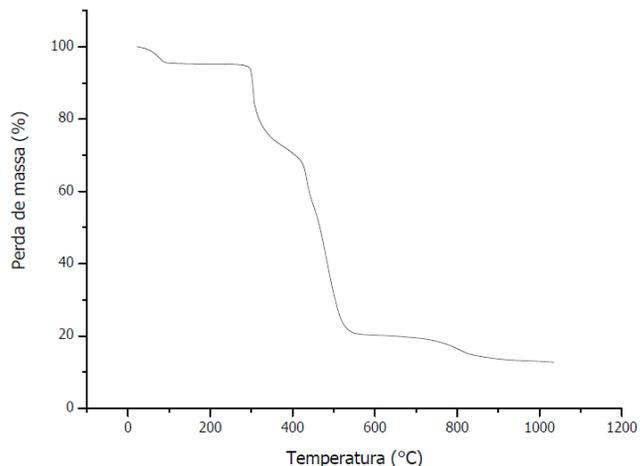


Figura 37: Análise termogravimétrica do complexo zinco-ciprofloxacino.

3.3.3.2. Complexo cobre-ciprofloxacino

A curva termogravimétrica do complexo de ciprofloxacino com cobre (**Figura 38**) mostra uma perda inicial de massa na faixa de 27-82°C, indicando perda de água de hidratação. O valor experimental (4,60%) é compatível com o valor teórico (4,73%) para cálculo da perda de duas moléculas de água. Há uma segunda perda de massa entre 210-608°C, correspondendo à perda do ligante devido à decomposição do complexo, sendo que o valor experimental (13,60%) está de acordo com o valor teórico (10,40%) para cálculo do resíduo de óxido do metal.

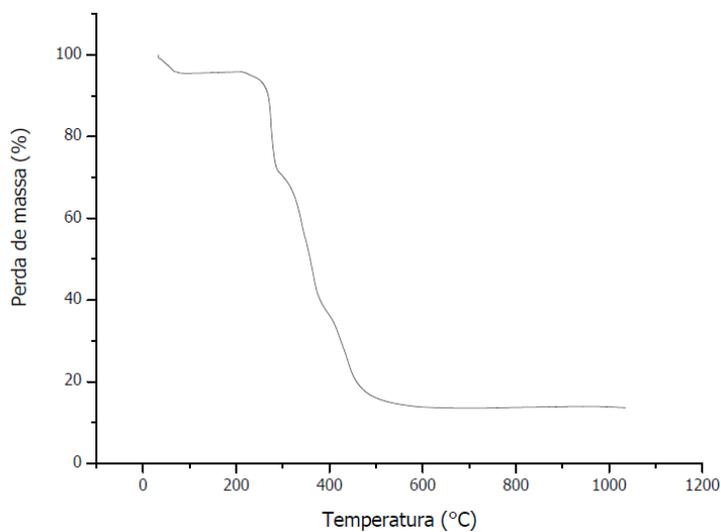


Figura 38: Análise termogravimétrica do complexo cobre-ciprofloxacino.

3.3.3.3. Complexo zinco-levofloxacino

A curva termogravimétrica do complexo de levofloxacino com zinco (**Figura 39**) mostra uma perda inicial de massa na faixa de 25-136°C, indicando perda de água de hidratação. O valor experimental (5,50%) está de acordo com o valor teórico (4,72%) para cálculo da perda de duas moléculas de água. Há uma segunda perda de massa entre 214-632°C, correspondendo à perda do ligante devido à decomposição do complexo, sendo que valor experimental (10,28%) está de acordo com o valor teórico (10,67%) para cálculo do resíduo de óxido metálico.

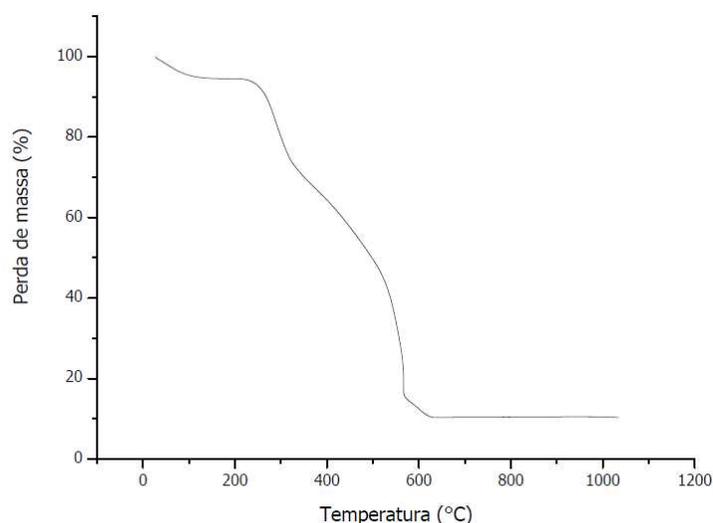


Figura 39: Análise termogravimétrica do complexo zinco-levofloxacino.

3.3.3.4. Complexo cobre-levofloxacino

A curva termogravimétrica do complexo de levofloxacino com cobre (**Figura 40**) mostra uma perda inicial de massa na faixa de 25-77°C, indicando perda de água de hidratação. O valor experimental (5,18%) está de acordo com o valor teórico (4,73%) para cálculo da perda de duas moléculas de água. Há uma segunda perda de massa entre 224-509°C, correspondendo à perda do ligante devido à decomposição do complexo, sendo que valor experimental (7,13%) está de acordo com o valor teórico (10,46%) para cálculo do resíduo de óxido do metal.

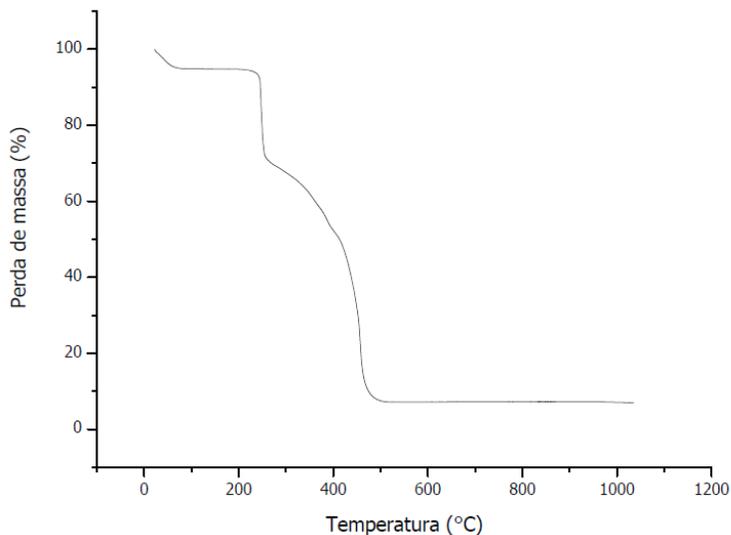


Figura 40: Análise termogravimétrica do complexo cobre-levofloxacino.

De acordo com as análises de TGA, os complexos apresentaram duas moléculas de água de hidratação para os diferentes ligantes e metais. Desta forma, as possíveis estruturas são propostas a seguir (**Figuras 41 e 42**).

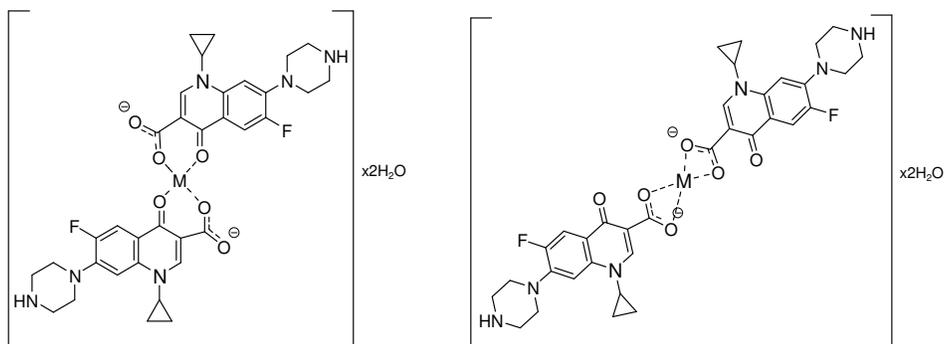


Figura 41: Possíveis estruturas para complexos metal-ciprofloxacino.

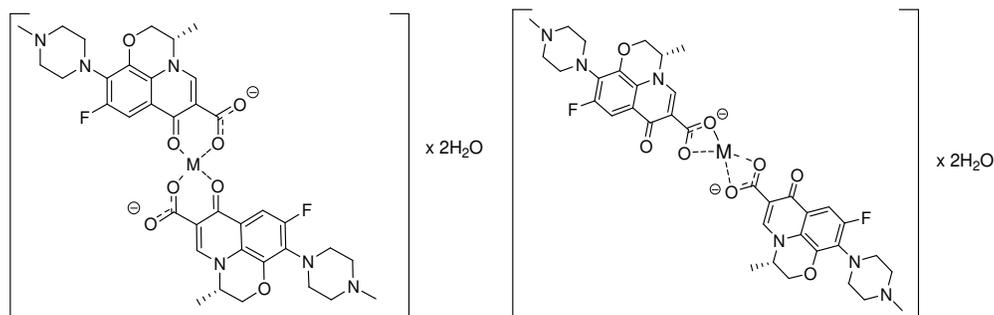


Figura 42: Possíveis estruturas para complexos metal-levofloxacino.

3.3.4. Análises de Ressonância Magnética Nuclear

3.3.4.1. Complexo zinco-ciprofloxacino

Na análise de RMN de ^1H pode-se observar pequeno deslocamento em alguns sinais na faixa de 0,05 a 0,17 ppm, sendo que os também houve alargamento de alguns sinais.

Ainda, o pequeno deslocamento observado nos espectros não é conclusivo sobre a formação dos complexos e também já havia sido relatado para complexos de fluorquinolonas.^{46j}

O espectro de RMN de ^{13}C mostra deslocamento de sinais em torno de 0,1 a 0,7 ppm para campos mais baixos em comparação com o ligante isolado, mas esta análise não foi conclusiva sobre a formação dos complexos.

3.3.4.2. Complexo zinco-levofloxacino

Na análise por espectroscopia de RMN de ^1H pode-se observar pequeno deslocamento na faixa de 0,01 a 0,04 ppm, sendo que os sinais correspondentes aos hidrogênios do anel piperazínico e o dos hidrogênios da metila ligada neste grupo sofreram um maior deslocamento (0,4 a 0,6 ppm) apesar da distância do centro de ligação ao metal. Estes deslocamentos indicam o envolvimento da molécula de levofloxacino com o metal.⁴⁸

No espectro de RMN de ^{13}C , não se observa as absorções das carbonilas que foram observadas no espectro do ligante levofloxacino (176,3 e 166,0 ppm), sendo evidência da participação destas na coordenação com o metal. Além disso, os sinais dos carbonos quaternários em 132,0, 119,6 e 106,6 ppm presentes no espectro do levofloxacino, não foram observados. Houve também deslocamento de outros sinais, na faixa de 0,2 a 7,3 ppm para campos mais baixos em comparação ao ligante isolado. O deslocamento evidente de vários sinais pode indicar a complexação do ligante com o metal. Tal evidência é ainda reforçada pelo desaparecimento das carbonilas.

⁴⁸ Guaita, D. P.; Boudesocque, S.; Sayen, S.; Guillon, E. *Polyhedron*, **2011**, *30*, 438.

3.4. Solubilidade dos complexos sintetizados

Uma característica interessante de um quelante seria ter a capacidade de capturar metais livres com atividade redox presentes em excesso no cérebro, formando complexos não tóxicos que seriam excretados.

Tendo em mãos os complexos caracterizados, foi realizado um teste de solubilidade dos mesmos em água. Observou-se, neste caso, que os complexos de levofloxacino foram solúveis em água e tampão fosfato pH 7,4 (simulando o pH fisiológico).

Tabela 5: Solubilidade dos complexos de levofloxacino.

Compostos	Levofloxacino	Cobre-levo	Zinco-levo
Solubilidade em água (g.mL ⁻¹)	0,92 x 10 ⁻²	2,75 x 10 ⁻²	5,05 x 10 ⁻²
Solubilidade em tampão pH 7,4 (g.mL ⁻¹)	1,40 x 10 ⁻²	2,67 x 10 ⁻²	5,05 x 10 ⁻²

Entretanto, os complexos de ciprofloxacino não foram solúveis nestes meios. Este comportamento reforça o uso do levofloxacino, pois, caso haja complexação *in vivo*, é pouco provável que o complexo acumule nos tecidos.

3.5. Determinação do coeficiente de partição dos complexos sintetizados

A lipofilicidade de um fármaco é importante na predição da facilidade com que uma molécula é capaz de atravessar membranas celulares. A mudança de substituintes na molécula pode ter efeitos significativos na sua lipofilicidade e, portanto, na sua atividade biológica.⁴⁹ A lipofilicidade de um fármaco (log P) pode ser medida experimentalmente pelo teste em que se determina o coeficiente de partição (P) do fármaco em uma mistura água/octanol. Este método, denominado shake-flask⁵⁰ foi utilizado na determinação do Log P dos complexos de

⁴⁹ Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Third Edition, New York: Oxford University Press, 2001.

⁵⁰ a) Novák, K. T.; Józán, M.; Hermecz, I.; Szász, G. *Int. J. Pharmac.* **1992**, 79, 89.; b) Novák, K. T.; Avdeef, A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, 14, 1405.

levofloxacino sintetizados. De acordo com este método, uma quantidade conhecida do complexo foi particionada entre água/octanol. O conteúdo foi mantido sob agitação e, após separação das fases, a fase aquosa teve sua absorbância determinada por ultravioleta. A concentração do composto foi obtida por meio de uma curva de calibração previamente realizada. Então, a concentração do composto na fase orgânica pode ser obtida por meio da subtração da quantidade do composto total e da quantidade do composto na fase aquosa. O coeficiente de partição foi determinado pela fórmula abaixo:

$$\text{Log P} = [\text{Composto}_{\text{FO}}] / [\text{Composto}_{\text{FA}}],$$

Em que, FO = fase orgânica e FA = fase aquosa.

Os valores obtidos estão mostrados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Log P dos complexos de levofloxacino.

Compostos	Levofloxacino	Cobre-levo	Zinco-levo
Log P*	2,41	2,00	2,88

* Método Shake-flask (octanol/água) e quantificado por UV.

Existem relatos na literatura^{46d} de que a complexação das fluorquinolonas aumenta a sua atividade antimicrobiana frente a algumas cepas. De posse dos complexos, os mesmos foram avaliados quanto à citotoxicidade e atividade contra diferentes microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos.

3.6. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* dos complexos de ciprofloxacino e levofloxacino

O ensaio de citotoxicidade é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer composto de acordo com a International Standard Organization (ISO 10993). Em ensaios de citotoxicidade, a substância teste é

colocada em contato com culturas de células verificando as alterações celulares por diferentes mecanismos, permitindo avaliar a viabilidade celular.⁵¹

Os ligantes levofloxacino e ciprofloxacino, e seus respectivos complexos de cobre e zinco, foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica frente às linhagens celulares 3T3 e NG97, que são células de fibroblastos murinos e neuroglioblastoma humano obtidos por excisão cirúrgica, respectivamente. O método utilizado foi de recaptação do vermelho neutro. De acordo com estes ensaios, os complexos não apresentaram toxicidade para a linhagem de células 3T3 (**Gráficos 1 e 2**).

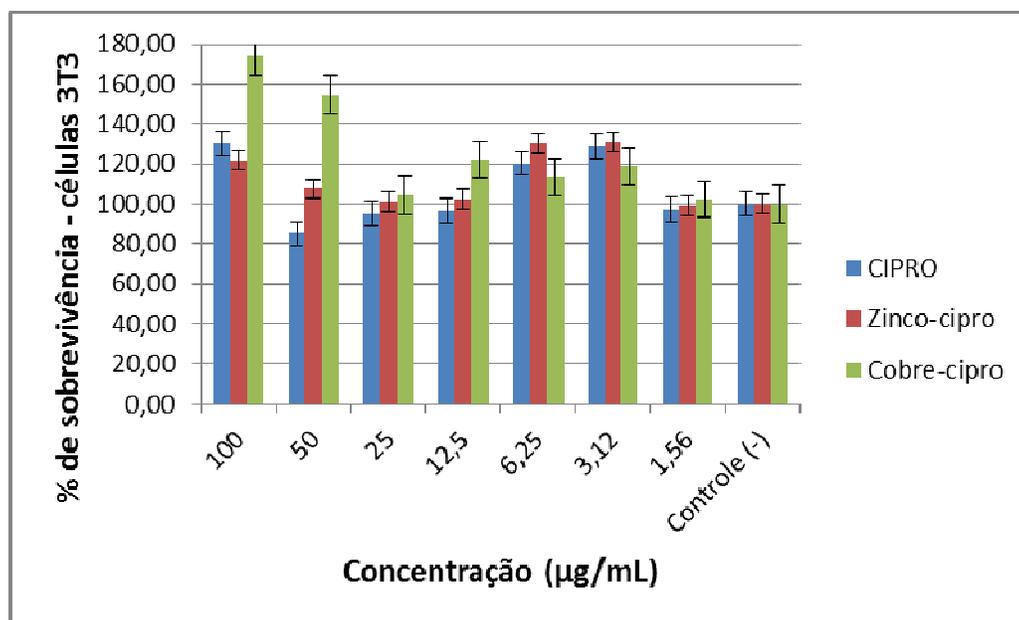


Gráfico 1: Ensaio de citotoxicidade em células 3T3 do ciprofloxacino e seus complexos.

⁵¹ Rogero, S. O.; Lugão, A. B.; Ikeda, T. I.; Cruz, A. S. *Mater. Res.* **2003**, 6(3), 317.

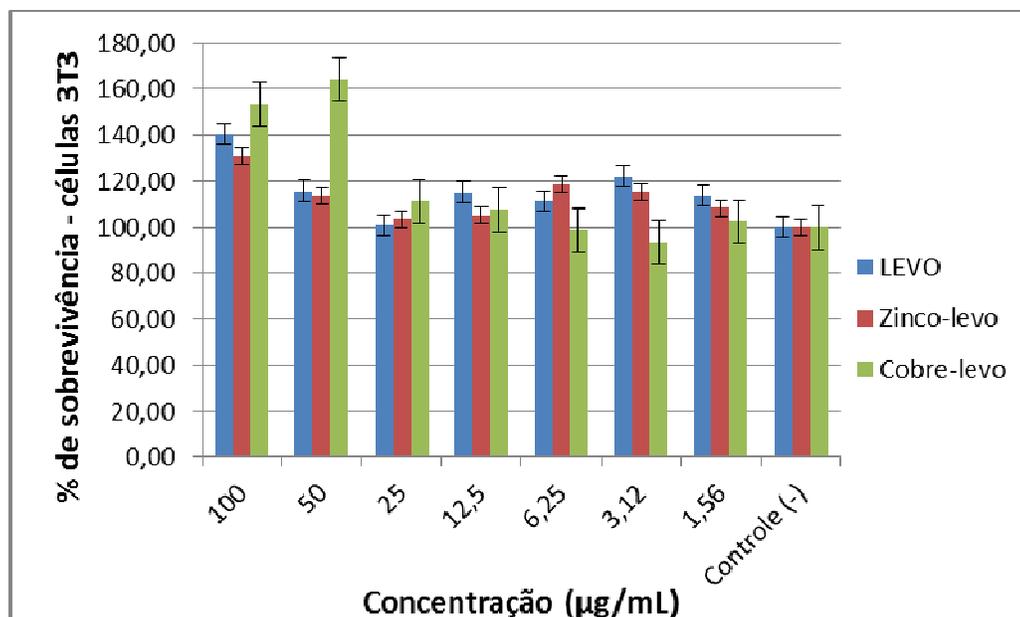


Gráfico 2: Ensaio de citotoxicidade em células 3T3 do levofloxacino e seus complexos.

Entretanto, para linhagem NG97 os complexos e os ligantes apresentaram toxicidade somente nas concentrações mais altas (100 µg/mL), com exceção do complexo de Cobre-levo que não apresentou toxicidade para esta linhagem celular. Estes resultados podem ser observados nos **Gráficos 3 e 4**.

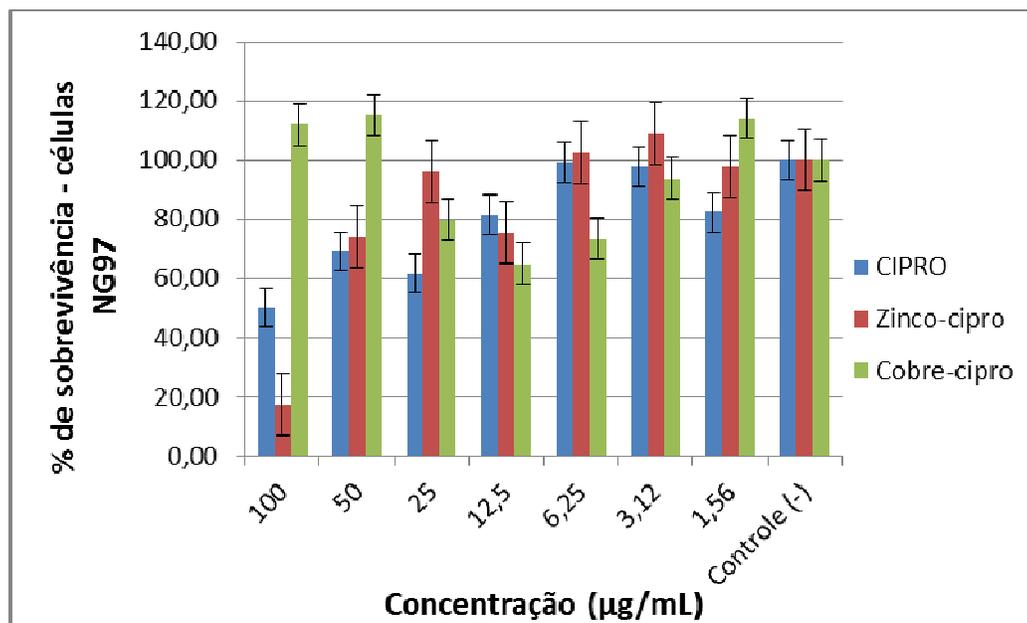


Gráfico 3: Ensaio de citotoxicidade em células NG 97 do ciprofloxacino e seus complexos.

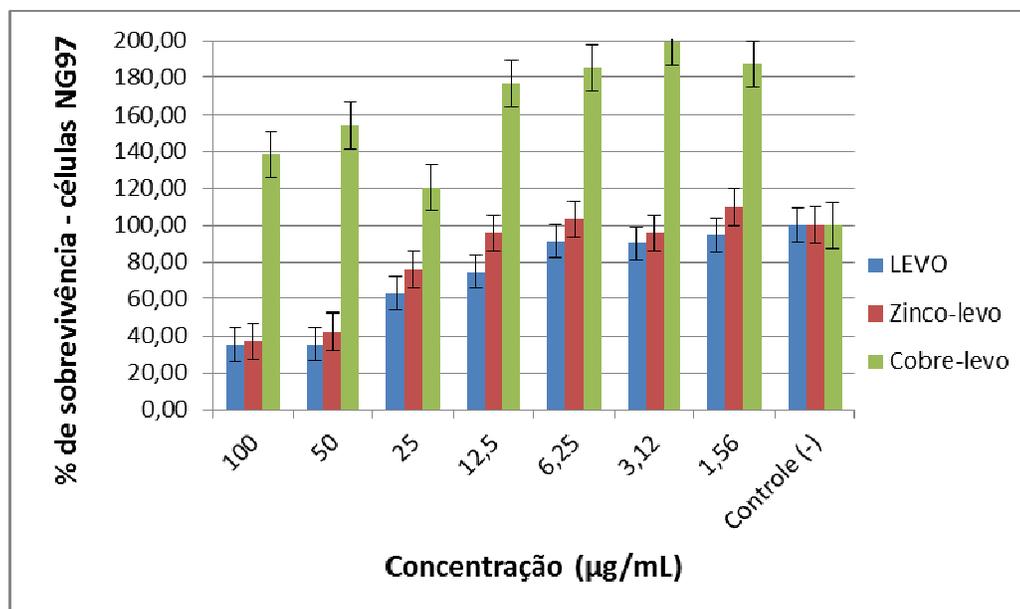


Gráfico 4: Ensaio de citotoxicidade em células NG 97 do levofloxacino e seus complexos.

3.7. Atividade antimicrobiana dos complexos de ciprofloxacino e levofloxacino

As fluorquinolonas estudadas neste projeto apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana. Tais compostos compreendem quinolonas de segunda geração e resultam de estudos de relação estrutura-atividade para desenvolvimento de compostos mais potentes e de maior espectro.⁵²

Dessa forma, os complexos sintetizados e seus correspondentes ligantes, ciprofloxacino e levofloxacino, foram avaliados frente a várias cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Estes ensaios foram realizados no Instituto de Biologia, sob a supervisão do Prof. Dr. Marcelo Lancellotti. Foram utilizados os meios ágar Mueller–Hinton e Mueller–Hinton⁵³ como meios de cultura nos testes de zona de inibição e para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

⁵² Wilson, C. O.; Gisvold's, O.; Block, J. H.; Beale, J. M. *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. Eleventh edition. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2004.

⁵³ (a) Rojas, G.;Levaro, J.; Tortoriello, J.; Navarro, V. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, 74, 97; (b) de Lima, M.R.;de Souza Luna, J.; dos Santos, A.F.; de Andrade, M.C.; Sant'Ana, A.E., Genet, J.P., Marquez, B., Neuville, L. Moreau, N. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 105, 137.

Estes parâmetros de avaliação antimicrobiana foram determinados de acordo com o Clinical Laboratory Standard Institute.⁵⁴ Os resultados de avaliação antimicrobiana estão dispostos na **Tabela 7**.

Tabela 7: Concentração inibitória mínima dos complexos sintetizados frente a diferentes microrganismos G+ e G-.

Linagem	Zinco-cipro	Cobre-cipro	Zinco-levo	Cobre-levo
Rib 1	< 0,78	<0,78	<0,75	< 0,78
BEC 9393	> 100	> 100	> 100	< 0,78
SA ATCC 29213	<0,78	<0,78	<0,78	> 100
PA ATCC 27853	< 0,78	< 0,78	< 0,78	< 0,78
PA 31NM	< 0,78	< 0,78	< 0,78	< 0,78
EC ATCC 25922	< 0,78	< 0,78	< 0,78	< 0,75

Rib 1: *Staphylococcus aureus*-resistente à metilina (isolado clínico); BEC 9393: *Staphylococcus aureus*-resistente à metilina (clone brasileiro); SA ATCC 29213: *Staphylococcus aureus*; PA ATCC 27853: *Pseudomonas aeruginosa*; PA 31NM: *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem (isolado clínico); EC ATCC: *Escherichia coli*.

Com relação aos ensaios antimicrobianos, considera-se uma linhagem resistente, neste ensaio, os complexos em que os valores de CIM foram superiores a 100 µg/mL.

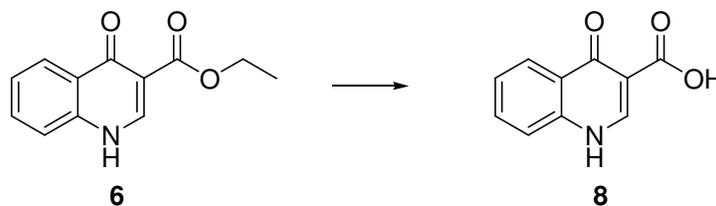
Assim, de acordo com os dados da **Tabela 7**, verifica-se que os complexos apresentaram resultados promissores, com exceção do complexo Cobre-levo para linhagens SA ATCC 29213 e dos complexos Zinco-levo, Cobre-cipro e Zinco-cipro para linhagens BEC 9393.

É importante ressaltar que a linhagem BEC 9393 é conhecidamente resistente, tanto que apresentou resistência para os complexos das fluorquinolonas em questão. Entretanto, o complexo de Cobre-levo apresentou atividade frente a esta linhagem. Este resultado evidencia o possível uso deste complexo como agente antimicrobiano, capaz de agir na linhagem BEC 9393.

⁵⁴ <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp> - acesso em 09/09/2012.

3.8. Síntese dos complexos do ácido **8**

Sabendo-se que a quinolona **6** pode ser hidrolisada no meio fisiológico, consideramos importante conhecer os complexos que seriam formados caso esta hidrólise ocorra *in vivo*. O ácido **8** foi obtido por meio da reação de hidrólise em meio básico (**Esquema 10**).



Reagentes e condições: KOH, H₂O, MeOH, refluxo 1 h.

Esquema 10: Síntese do ácido **8**.

O ácido **8** foi obtido com rendimento de 64% e foi caracterizado por IV, RMN de ¹H e ¹³C.

A análise no IV do ácido **8** mostra que a absorção característica de carbonila de ácido carboxílico aparece deslocada, sendo evidência de que a mesma possa estar em ligação de hidrogênio intramolecular. Esta absorção aparece em 1670 cm⁻¹.

De acordo com as análises de RMN de ¹H do ácido **8**, pode-se observar um singlete em 9,34 ppm que foi atribuído ao hidrogênio em posição alfa ao nitrogênio quinolínico. Os hidrogênios aromáticos aparecem como dois dubletos em 8,67 ppm ($J = 8,3$ Hz) e 8,12 ppm ($J = 8,4$ Hz) e dois tripletos em 8,22 ppm ($J = 8,2$ Hz) e 7,97 ppm ($J = 7,9$ Hz). Além disso, não foram observados os sinais correspondentes ao grupo etila da quinolona **6** (quarteto em 4,66 ppm e um triplete em 1,51 ppm).

No espectro de RMN de ¹³C, observa-se dois sinais correspondentes aos carbonos carbonílicos em 176,2 e 172,7 ppm.

Tendo o ácido **8** em mãos, prosseguimos com a síntese de seus complexos de Cu²⁺ e Zn²⁺.

3.8.1. Análise no infravermelho

As análises no IV dos complexos do ácido **8** mostram o deslocamento da absorção característica de carbonila de ácido carboxílico, podendo ser evidência de coordenação da mesma com o metal.

A **Tabela 8** mostra as principais mudanças observadas no espectro no IV.

Tabela 8: Principais absorções no IV do ácido **8** e seus complexos

Compostos	$\nu_{\text{ác}}(\text{C}=\text{O})$	$\nu_{\text{ceto}}(\text{C}=\text{O})$
Ácido 8	1670	1633
Cobre-ácido 8	1639	1587
Zinco-ácido 8	1624	1593

A absorção característica de $\nu(\text{C}=\text{O})$ da quinolona apresenta-se deslocada nos espectros dos complexos. Assim, esta pode ser uma evidência de coordenação da mesma com o metal. Conforme já especificado anteriormente, esta análise não é completamente conclusiva sobre a forma de ligação dos centros quelantes ao metal. A análise de raio-X de monocristal dos complexos seria capaz de revelar a estrutura. Entretanto, não conseguimos obter os monocristais para tal análise.

Como as fluorquinolonas apresentam complexos com metais e fluorquinolonas bidentados, acreditamos que o ácido **8** também apresente. Entretanto, não tivemos tempo hábil para a realização da análise de massas de alta resolução para confirmação desta hipótese.

3.8.2. Análise termogravimétrica

A curva termogravimétrica do complexo do ácido **8** com zinco (**Figura 43**) mostra uma perda inicial de massa na faixa de 25-116°C, indicando perda de água de hidratação. O valor experimental (5,26%) está de acordo com o valor teórico (7,51%) para cálculo da perda de duas moléculas de água. Há uma segunda perda de massa entre 143-568°C, correspondendo à perda do ligante devido à

decomposição do complexo, sendo que valor experimental (16,95%) está de acordo com o valor teórico (17%) para cálculo do resíduo de óxido do metal.

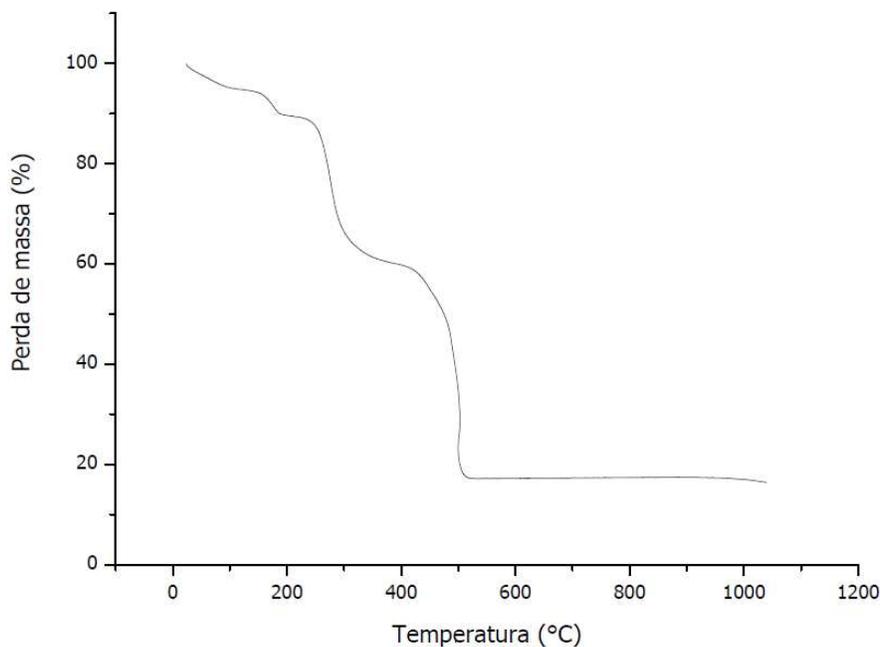


Figura 43: Análise termogravimétrica do complexo zinco-ácido **8**.

A curva termogravimétrica do complexo do ácido **8** com cobre (**Figura 44**) mostra uma perda inicial de massa na faixa de 25-139°C, indicando perda de água de hidratação. O valor experimental (5,32%) está de acordo com o valor teórico (7,53%) para cálculo da perda de duas moléculas de água. Há uma segunda perda de massa entre 259-450°C, correspondendo à perda do ligante devido à decomposição do complexo, sendo que valor experimental (16,64%) está de acordo com o valor teórico (21,01%) para cálculo do resíduo de óxido do metal.

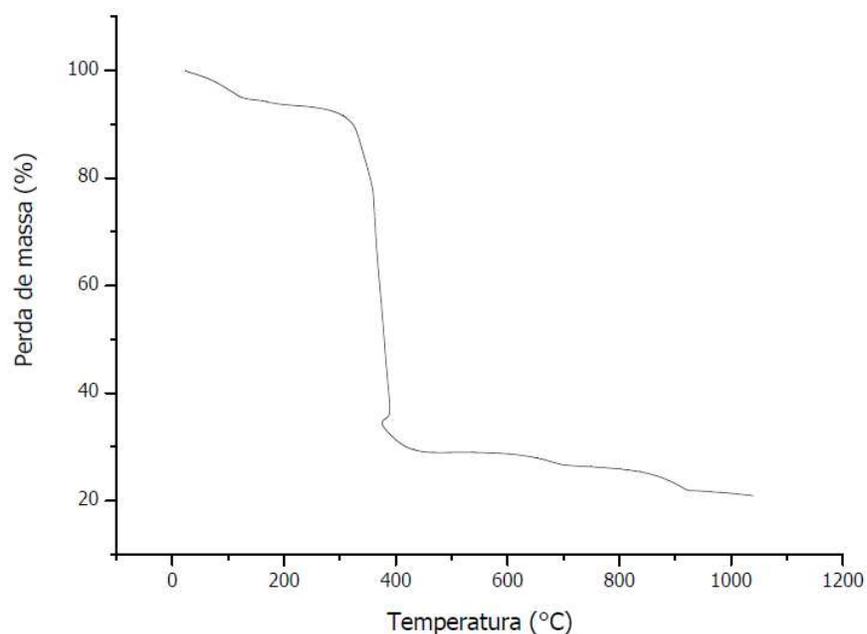


Figura 44: Análise termogravimétrica do complexo cobre-ácido **8**.

De acordo com as análises TGA, os complexos apresentaram duas moléculas de água de hidratação para o composto e os diferentes metais. Desta forma, as possíveis estruturas dos compostos são propostas a seguir (**Figuras 45**).

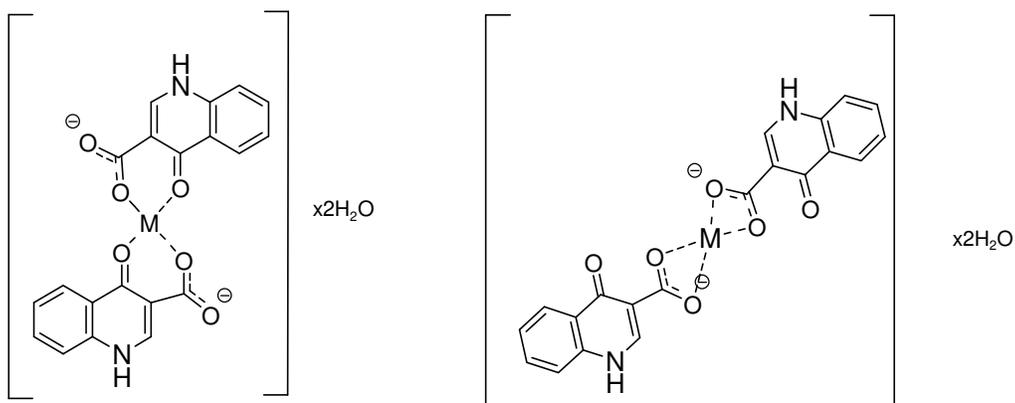


Figura 45: Possíveis estruturas para complexos metal-ácido **8**.

3.8.3. Análises de ressonância magnética nuclear

Na análise por espectroscopia de RMN de ^1H pode-se observar pequeno deslocamento na faixa de 0,02 a 0,03 ppm para campos mais baixos em todos os sinais dos hidrogênios presentes na molécula em relação ao ácido **8** isolado. Embora não seja conclusivo, o deslocamento é indício da interação do metal com a molécula do ácido **8**.⁴⁷

O espectro de RMN de ^{13}C mostra deslocamento de sinais em torno de 0,1 ppm para campos mais baixos em comparação com o ligante isolado, mas esta análise não foi conclusiva sobre a formação dos complexos.

Como estes últimos complexos não foram solúveis em diferentes solventes como DMSO, água, tampão ou HCl 10 mmol.L⁻¹, não foi possível realizar as análises de UV ou determinação do seu Log P.

4. Conclusão

Estudos iniciais obtidos comprovam a ação quelante dos compostos estudados e culminam com um promissor candidato a agente terapêutico para DA, não só pela inibição/retardo da agregação do peptídeo β -amilóide, como também pela possibilidade de reestabelecimento da homeostase de íons metálicos no cérebro.

Foram sintetizados com sucesso complexos metálicos entre as fluorquinolonas estudadas, bem como uma quinolona sintética, e os metais zinco e cobre. Todos os complexos foram caracterizados por análises de IV, UV, EM e TGA, além da análise por RMN para os complexos de zinco. Os complexos apresentam duas moléculas do ligante, um átomo metálico central e duas moléculas de água de hidratação.

De acordo com as primeiras análises, o levofloxacino se mostrou favorável como composto protótipo devido às características físico-químicas de seu complexo. Entretanto, tanto complexos quanto o ligante livre do ciprofloxacino apresentaram-se de difícil solubilidade, sendo desfavoráveis para os objetivos deste projeto. Os complexos do ácido **8** também foram sintetizados e apresentaram difícil solubilidade em água.

Os compostos não apresentaram citotoxicidade apreciável para linhagens celulares 3T3. No caso da linhagem NG97 foi observada uma diminuição no crescimento das células, porém apenas nas concentrações mais elevadas, que diferem das concentrações inibitórias mínimas. Dessa forma, há uma margem de segurança no caso do uso/formação destes complexos.

5. Parte Experimental

5.1. Geral

As reações envolvendo solventes sensíveis à umidade foram realizadas em atmosfera inerte de nitrogênio em balão previamente flambado ou seco em estufa anidra. Metanol e etanol foram destilados a partir do correspondente alcóxido de magnésio, gerado a partir de magnésio ativado com iodo.⁵⁵ Os demais solventes e reagentes foram obtidos de fornecedores especializados e não tiveram purificação prévia. DMSO estéril foi obtido da Sigma Aldrich Co. O peptídeo A β ₄₂ foi adquirido da American Peptide Co. As reações foram monitoradas por CCD e a revelação, por luz ultravioleta e solução etanólica de ácido fosfomolibdico 5%. As purificações e separações cromatográficas foram efetuadas em sílica flash (230-400 mesh).

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram adquiridos em aparelhos Inova 500 operando a 500 e a 125 MHz, para ¹H e de ¹³C, respectivamente; BRUKER 250 operando a 250 MHz para ¹H e a 62,5 MHz para ¹³C e Avance 400 operando a 400 e a 100 MHz para ¹H e de ¹³C, respectivamente. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, tendo padrão interno tetrametilsilano, clorofórmio, ácido trifluoroacético, metanol ou dimetilsulfóxido deuterados. Os espectros no infravermelho (IV) foram registrados em equipamento BOMEN modelo MB SERIES e as amostras preparadas em pastilha de KBr seco ou em filme, foram analisadas no intervalo 4000-400 cm⁻¹. Os pontos de fusão foram obtidos em equipamento Electrothermal 9100. Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro Quadrupolo Híbrido Time-of-Flight (Q-TOF, Micromass) com fonte Electrospray (ESI). As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas em equipamento TG/DTA 6200 modelo EXSTAR6000. As amostras foram submetidas à atmosfera oxidante e aquecimento de 25°C a 1000°C, com velocidade de aquecimento de 10°C/minuto. As imagens de microscopia de força atômica (MFA) foram obtidas em Microscópio de Força Atômica Topometrix TMX2010 utilizando o modo intermitente (Non-contact).

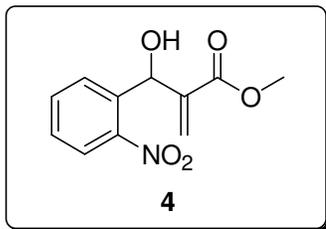
⁵⁵ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*, 2^a Ed., Pergamon Press, 1987.

Utilizou-se um cantilever de silício com frequência de ressonância na faixa de 180-191 KHz. Os espectros de fluorescência foram obtidos em Espectrofluorímetro-Varian modelo Cary Eclipse. As análises de eletroforese foram realizadas usando fonte Electrophoresis Power Supply, modelo EPS 601 da Amersham pharmacia biotech.

A nomenclatura dos compostos foi fornecida pelo programa ChemDraw e não corresponde obrigatoriamente à nomenclatura oficial da IUPAC.

5.2. Procedimentos experimentais referentes ao Capítulo 1

5.2.1. Preparação do 2-[hidroxi-(2-nitro-fenil)-metil] acrilato de metila (4)



Em um balão de 50 mL adicionou-se o 2-nitro-benzaldeído **3** (1,2 g, 7,9 mmol) dissolvido em acrilato de metila (utilizado em excesso – 5,0 equivalentes). Em seguida, adicionou-se DABCO (0,65 equivalentes). A mistura reacional foi submetida à sonicação em um banho de ultrassom de 81 W e 40 Hz, e monitorada por CCD. Após o término da reação, o excesso de acrilato foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo foi particionado entre acetato de etila e água destilada (20 mL). A fase orgânica foi reservada e, a aquosa, extraída com acetato de etila (2 x 20 mL). As fases orgânicas foram agrupadas e a solução resultante lavada com solução saturada de NaCl e seca sob sulfato de sódio anidro. Após filtração e evaporação do solvente a pressão reduzida, o bruto foi purificado por cromatografia em coluna empregando gradiente de eluição hexano: acetato de etila 80:20 até 50:50 para fornecer um óleo amarelo em 96% de rendimento.

IV (Filme, ν_{\max}): 3448, 1714, 1630, 1527, 1350 cm^{-1} .

RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz), δ 7,95 (d, $J = 8$ Hz, 1H); 7,76 (d, $J = 8$ Hz, 1H); 7,65 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H); 7,47 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H); 6,37 (s, 1H); 6,21 (s, 1H); 5,73 (s, 1H); 3,74 (s, 3H); 3,45 (sl, 1H, OH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz), δ 166,6 (C=O); 148,5 (C_0); 140,9 (C_0); 136,3 (C_0); 133,7 (CH); 129,1 (CH); 128,9 (CH); 126,7 (CH); 124,8 (CH_2); 67,9 (CH); 52,4 (CH_3).

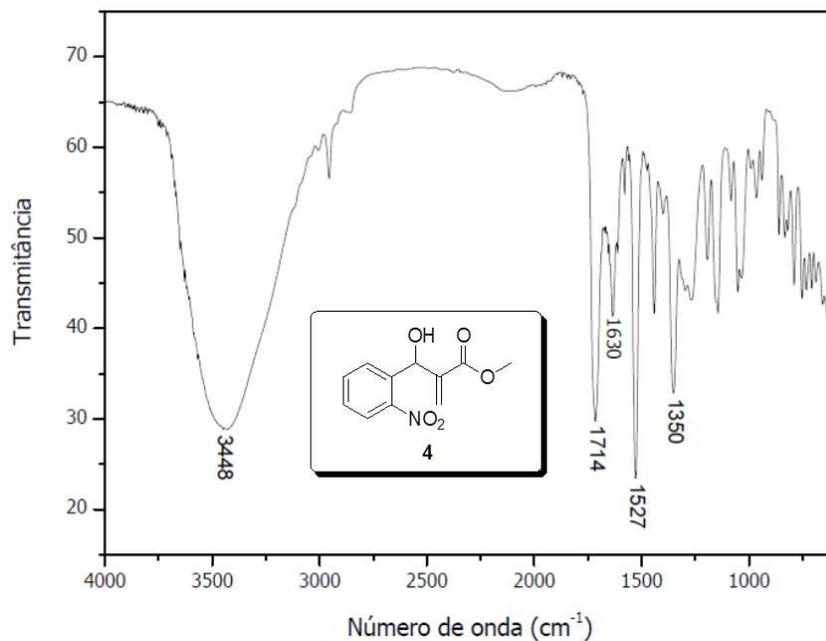


Figura 46: Espectro no infravermelho (filme, ν_{\max}) do 2-[hidroxi-(2-nitro-fenil)-metil] acrilato de metila (4).

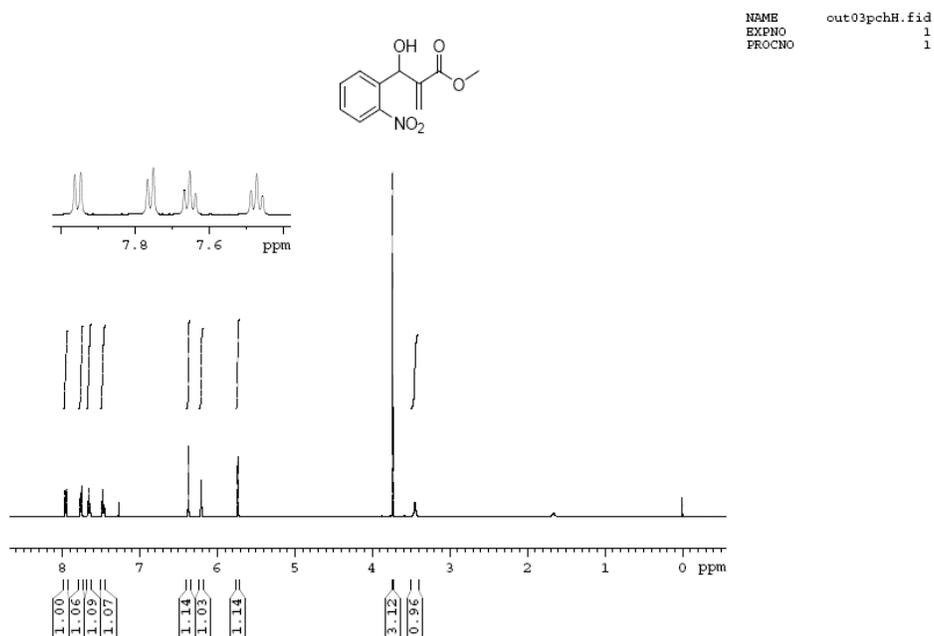


Figura 47: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do 2-[hidroxi-(2-nitro-fenil)-metil] acrilato de metila (4).

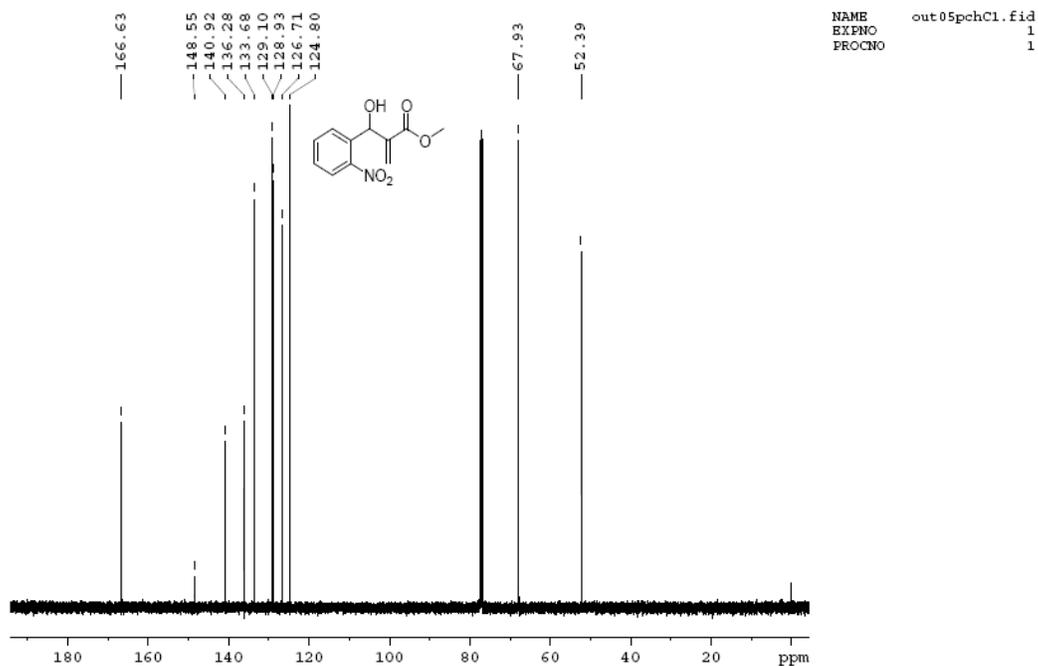
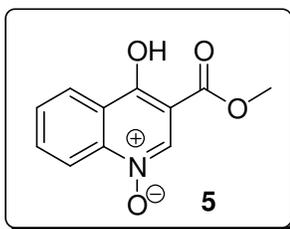


Figura 48: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do 2-[hidroxi-(2-nitro-fenil)-metil] acrilato de metila (4).

5.2.2. Preparação do Óxido de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila (5)



Em um balão de 50 mL, o aduto **4** (1,5 g, 6,8 mmol) e 10 mL de TFA foram mantidos sob agitação e aquecimento a 70-75°C, durante 20 h. A reação foi monitorada por CCD e, quando não mais foi observado o spot do material de partida, verteu-se a mistura reacional em água gelada. O bruto reacional foi então extraído com clorofórmio (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram agrupadas, secas com sulfato de sódio anidro e, o solvente removido à pressão reduzida. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica utilizando gradiente de eluição de

diclorometano:metanol 99:1 até 90:10. Obteve-se 960 mg (70% de rendimento) de um sólido branco (5).

P.F. 209-212°C (decomposição).

IV (KBr, ν_{\max}): 3439, 1714, 1616, 1488, 1363, 1242, 1145, 769 cm^{-1} .

RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 250 MHz), δ 12,68 (s, 1H); 8,71 (s, 1H); 8,21 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H); 7,83 (m, 2H); 7,54-7,47 (m, 1H); 3,74 (s, 3H).

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 62,5 MHz), δ 171,8 (C=O); 164,5; 145,0 (CH); 139,0 (C₀); 133,0 (CH); 127,4 (C₀); 126,1 (CH); 125,4 (CH); 115,3 (CH); 107,4 (C₀); 51,3 (CH₃).

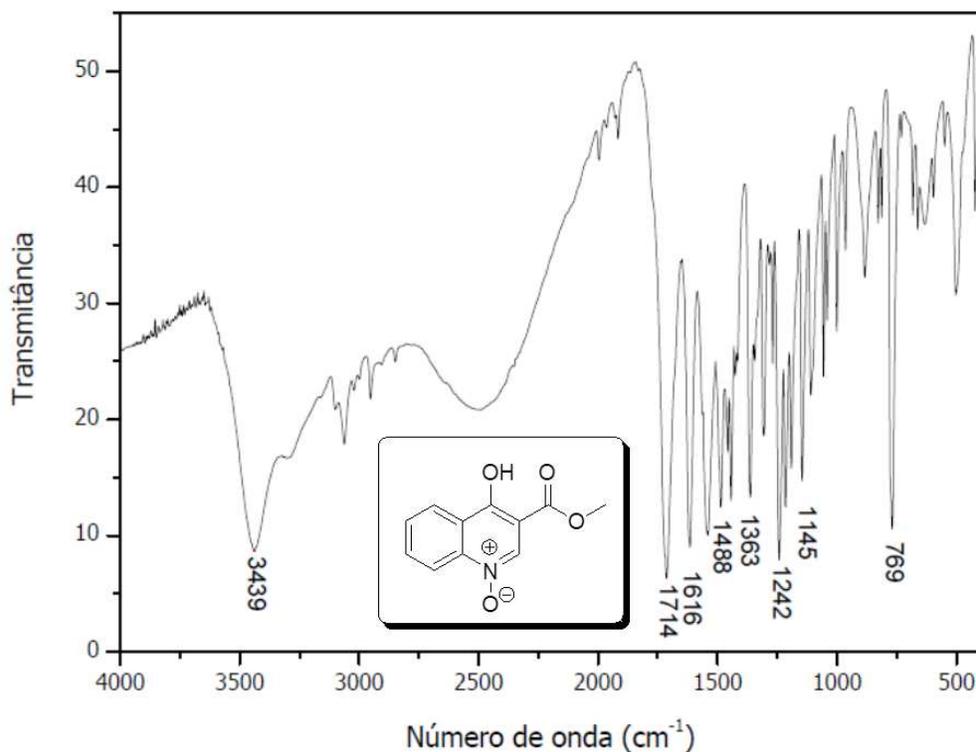


Figura 49: Espectro no Infravermelho (KBr, ν_{\max}) do Óxido de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila.

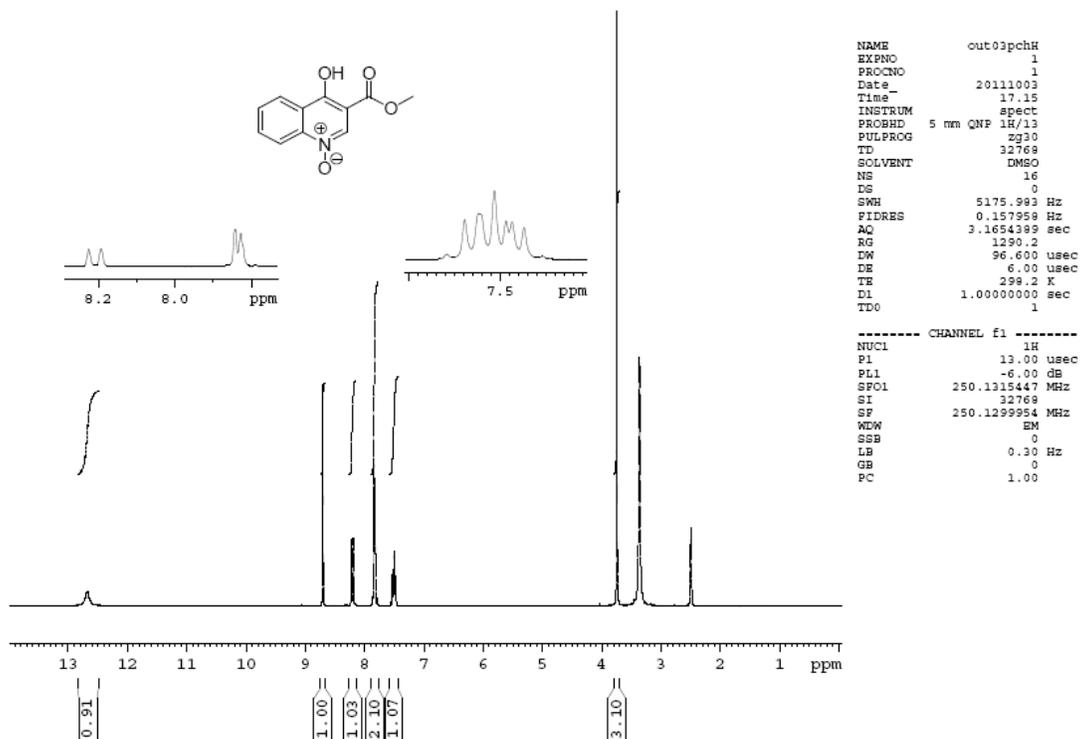


Figura 50: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 250 MHz) do Óxido de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila.

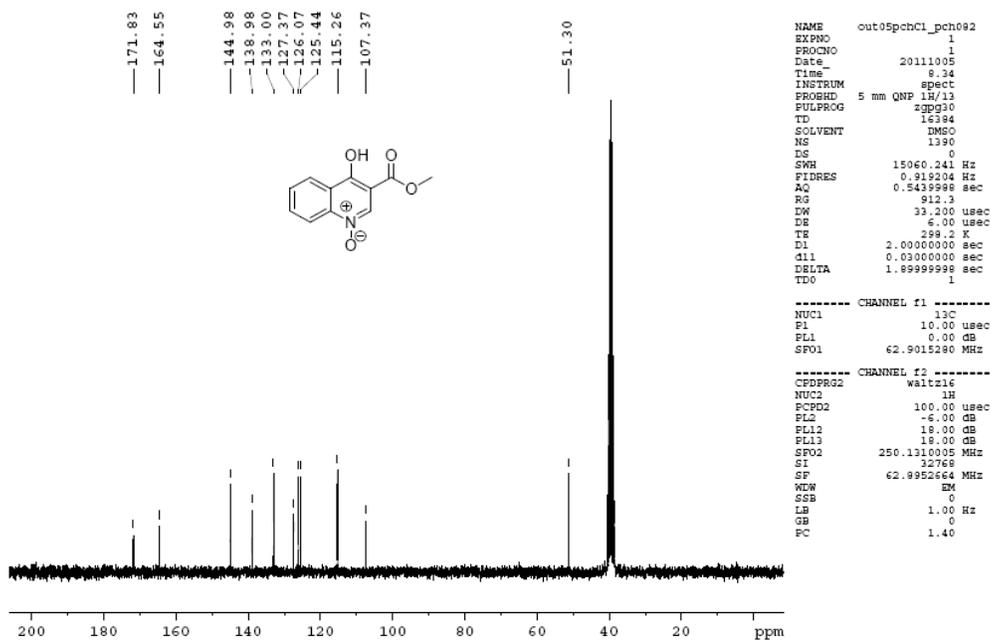
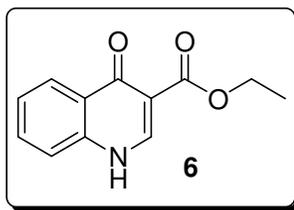


Figura 51: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 62,5 MHz) do Óxido de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila.

5.2.3. Preparação do 4-Oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etila (6)



A um balão de 50 mL contendo 400 mg (1,83 mmol) do N-óxido **5** adicionou-se 10 mL de etanol anidro e 484 mg (1,83 mmol) de hexacarbonilmolibdato (VI), e em atmosfera de nitrogênio. Esta mistura foi mantida em agitação magnética e refluxo por 45 minutos, quando foi evidenciado o término da reação por CCD. A mistura foi resfriada até a temperatura ambiente, filtrada e evaporada, fornecendo o composto reduzido **6** (193 mg) como um sólido branco, em 49% de rendimento.

P.F. 254-258°C (decomposição).

IV (KBr, ν_{\max}): 3425, 3165, 1703, 1624, 1473, 1360, 1290, 1140, 1095, 764 cm^{-1} .

RMH de ^1H ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 250 MHz), δ 9,28 (s, 1H); 8,66 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 8,23-8,09 (m, 2H); 7,96 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); 4,66 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H); 1,51 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 62,5 MHz), δ 176,0 (C=O); 170,0 (C=O); 147,3 (CH); 141,7 (C_0); 140,2 (CH); 132,5 (CH); 127,1 (CH); 122,3 (C_0); 122,1 (CH); 107,2 (C_0); 67,0 (CH_2); 14,5 (CH_3).

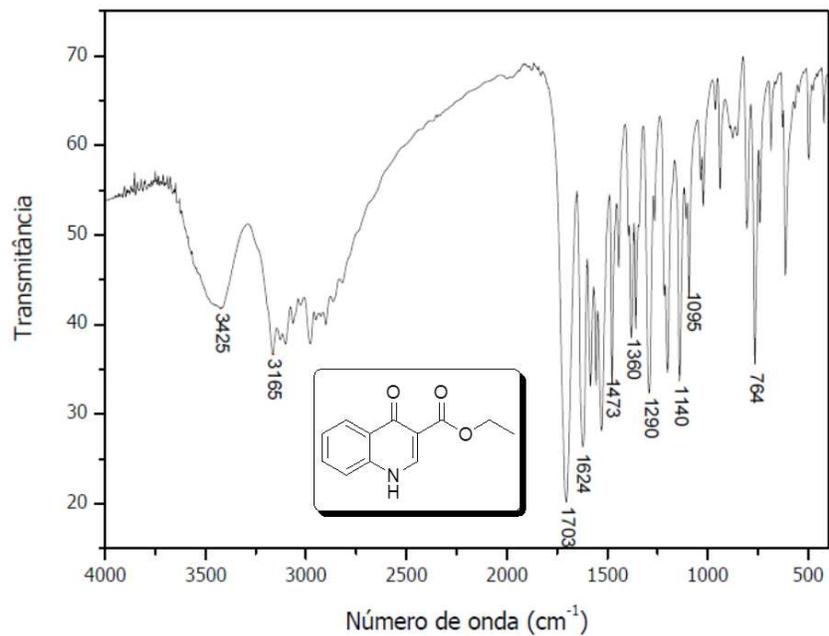


Figura 52: Espectro no Infravermelho (KBr, ν_{\max}) do 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etila.

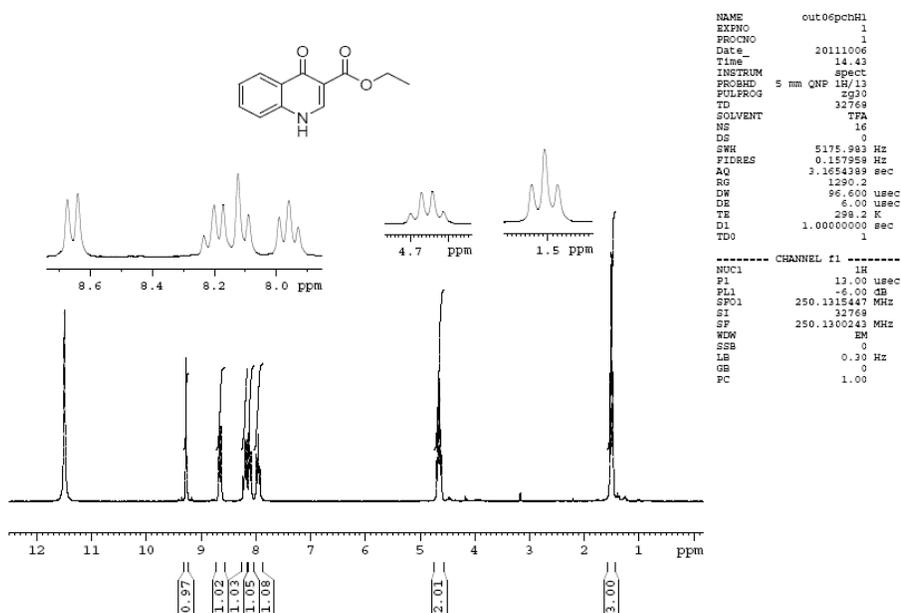


Figura 53: Espectro de RMN ^1H ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 250 MHz) do 4-Oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etila.

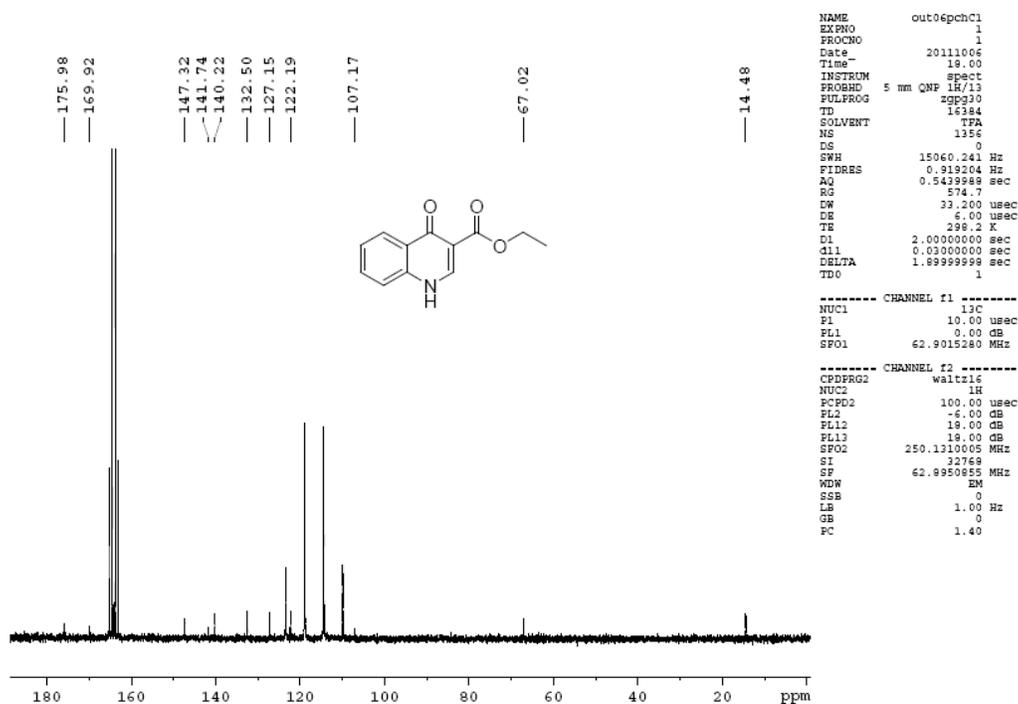


Figura 54: Espectro de RMN ^{13}C ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 62,5 MHz) do 4-Oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etila.

5.2.4. Protocolo para preparação do filme peptídico e estocagem

1 mg (0,2 mmol) do peptídeo $\text{A}\beta_{42}$ foi dissolvido em 275 μL de HFIP. O frasco contendo o peptídeo foi lavado minuciosamente e, em seguida, mantido fechado a temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, o frasco foi colocado no gelo por 5-10 minutos e a solução foi dividida igualmente em seis frascos. Os frascos foram mantidos abertos na capela até que todo o HFIP evaporasse (~ 90 min) e, em seguida, centrifugados à vácuo por 10 min. Os filmes foram armazenados em freezer a -80°C .

5.2.5. Preparação das formas $\text{A}\beta_{42}$ fibrilares

Inicialmente, o filme peptídico preparado como descrito em 5.2.4., contendo 166 μg de peptídeo (0,038 mmol), foi dissolvido em 6 μL DMSO estéril para uma concentração final de 6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A solução foi homogeneizada com uma pipeta e posteriormente sonicada por 10 minutos. Para induzir a formação de fibrilas, adicionou-se 29 μL de uma solução de HCl 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (em água milli-Q). Esta

solução foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos e incubada por 48h a 37°C. Em intervalos de tempo definidos (0, 24 e 48 h), as amostras foram analisadas por fluorescência em ThT, eletroforese em gel de acrilamida e microscopia de força atômica (MFA).

5.2.6. Ensaio de inibição da agregação do peptídeo A β ₄₂

Nos ensaios de inibição, o filme peptídico (item 5.2.4.) foi ressuspenso em 6 μ L de uma solução 0,2 mmol.L⁻¹ do composto teste (levofloxacino ou quinolona **6**) em DMSO estéril. A solução foi homogeneizada com uma pipeta e posteriormente sonicada por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 29 μ L de solução 10 mmol.L⁻¹ de HCl. Esta solução foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos e incubada a 37°C. Em intervalos de tempo definidos (0, 24, 48 h), uma alíquota das amostras foi analisada por fluorescência em ThT, eletroforese em gel de poliacrilamida e microscopia de força atômica (MFA).

5.2.7. Preparação da solução de tioflavina-T

A solução estoque de ThT foi preparada dissolvendo-se cerca de 8 mg (0,02 mmol) da ThT para 10 mL de tampão fosfato (pH 7.4). O conteúdo foi filtrado através de filtro Millipore 0,2 μ m e o filtrado (solução estoque), mantido a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Esta solução é estável por uma semana nestas condições. No dia da análise, a solução estoque foi diluída em tampão fosfato (1:50 v/v), para dar origem à solução teste. Em intervalos de tempo determinados (0, 24, 48 h), alíquotas de 5 μ L foram retiradas das soluções do peptídeo, e misturadas a 1 mL da solução teste de ThT. Após agitação da solução por 1 minuto, a ligação de ThT foi então monitorada por fluorescência com excitação em 450 nm e espectro de emissão a 485 nm. Os espectros foram obtidos a 25°C, na velocidade de 1 nm.s⁻¹ com aberturas de janelas para excitação e emissão de 10 mm e 10 mm, sendo os resultados de cada ponto do espectro a média de 10 leituras.

5.2.8. Análise da fluorescência do levofloxacino

Foram preparadas soluções de diferentes concentrações do levofloxacino. Inicialmente, 50 mg (0,14 mmol) foram dissolvidos em 25 mL de DMSO, gerando uma solução $5,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (solução estoque). A partir da solução estoque, foram preparadas soluções de concentrações $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. A partir destas soluções, avaliou-se a emissão de fluorescência das mesmas. As análises indicaram que o levofloxacino emite fluorescência no comprimento de onda 492 nm, quando excitada em 393 nm. Quando a amostra é excitada em 450 nm, comprimento de excitação da amostra de ThT com peptídeo, não há emissão de fluorescência.

5.2.9. Análise da fluorescência da quinolona 6

Foram preparadas soluções de diferentes concentrações da quinolona **6**. Inicialmente, 16,3 mg (0,07 mmol) foram dissolvidos em 25 mL de DMSO, gerando uma solução $3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (solução estoque). A partir da solução estoque, foram preparadas soluções de concentrações $2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. A partir destas soluções, avaliou-se a emissão de fluorescência das mesmas. As análises indicaram que a quinolona **6** emite fluorescência no comprimento de onda 369 nm quando excitada em 335 nm. Quando a amostra é excitada em 450 nm, comprimento de excitação da amostra de ThT com peptídeo, não há emissão de fluorescência.

5.2.10. Análise de fluorescência do ciprofloxacino

Foram preparadas soluções de diferentes concentrações do cloridrato de ciprofloxacino. Inicialmente, 50 mg (0,13 mmol) foram dissolvidos em 25 mL de DMSO, gerando uma solução $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (solução estoque). A partir da solução estoque, foram feitas soluções de concentrações $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. A partir destas, avaliou-se a emissão de fluorescência. As análises indicaram que o ciprofloxacino emite fluorescência no comprimento de onda 453 nm, quando excitada em 276 nm. Quando a amostra é excitada em 450 nm, comprimento de excitação da amostra de ThT com peptídeo, não há emissão de fluorescência.

5.2.11. Análise de microscopia do peptídeo A β ₄₂

As imagens foram obtidas em um Microscópio de Força Atômica Topometrix TMX 2010 utilizando o modo intermitente (Non-contact). Utilizou-se cantilever de silício com frequência de ressonância na faixa de 180-191 KHz. As amostras foram analisadas nos tempos t_0 e após incubação a 37°C por 24h. Para a análise por MFA, as amostras a 1 mmol.L⁻¹ foram diluídas a 10 μ mol.L⁻¹ imediatamente antes da análise. Quantidades de 10-50 μ L das amostras foram aplicadas sobre mica recém-clivada (clivada pouco antes de pingar), deixadas secar a temperatura ambiente a vácuo, por aproximadamente 3 h, e analisadas.

5.2.12. Procedimento para realização da análise de dicroísmo circular

Os espectros de CD foram medidos utilizando-se um espectropolarímetro J-810™ (JASCO®), cubetas de quartzo de 1 cm, 5 mm e 2 mm de caminho óptico e peptídeo diluído até a condição na qual fornecesse sinal a 222 nm necessariamente entre -20 e -40 miligráus (intervalo no qual a relação sinal/ruído é baixa). Os resultados são a média de 16 espectros de 200-260 nm lidos a uma velocidade de 50 nm/min, 1 s de resposta. O programa utilizado para o registro dos dados foi o Spectra Manager® (JASCO).

O filme peptídico, preparado de acordo com o procedimento já descrito no item 5.2.1, foi retirado do freezer, e após atingida a temperatura ambiente, foram adicionados 700 μ L de HFIP, atingindo-se uma concentração final de 50 μ mol.L⁻¹ com HFIP (154 μ g de peptídeo A β ₄₂). Para efeitos de comparação, o mesmo procedimento foi realizado com outra amostra de filme peptídico, sendo o mesmo incubado durante 24 horas com o HFIP, a temperatura ambiente.

5.2.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise qualitativa da agregação do peptídeo A β ₄₂ foi feita utilizando eletroforese em gel de acrilamida. (**Tabela 9**). As amostras analisadas foram: peptídeo em DMSO, peptídeo em HCl, peptídeo em HCl na presença de levofloxacino e peptídeo em HCl na presença da quinolona **6**. Estas amostras foram analisadas após incubação a 37°C por 24h.

Tabela 9: Composição do Gel de acrilamida para empacotamento e separação (SDS-PAGE 17%).

Gel de empacotamento	Gel de separação
Mix 30% (875 μ L)*	Mix 30% (7,1 mL)
Tris-HCl 1M pH 6,8 (875 μ L)	Tris-HCl 1M pH 8,8 (875 μ L)
SDS 10% (70 μ L)	SDS 10% (70 μ L)
Persulfato de amônio 1,5% (350 μ L)	Persulfato de amônio 1,5% (350 μ L)
TEMED (15 μ L)	TEMED (15 μ L)

*Preparação: 29 g de acrilamida e 1 g de bisacrilamida em 100 mL de solução aquosa.

As amostras a serem analisadas foram diluídas pela metade em tampão pH 6,8 (**Tabela 10**) antes da aplicação no gel. Foram aplicados 10 μ L no gel de empacotamento, e a separação foi realizada no gel de separação pela aplicação de uma diferença de potencial. A eletroforese foi conduzida utilizando o aparato MiniVE Vertical Electrophoresis System (Amershan Biosciences), utilizando 20 mA durante aproximadamente 210 minutos, sendo que neste aparato o gel fica imerso no tampão de corrida (**Tabela 10**).

Tabela 10: Soluções tampão utilizadas no preparo de amostras.

Tampão de amostra (pH 6,8)	Tampão de corrida (pH 8,3)
Tris-HCl (125 mmol.L ⁻¹)	Tris-HCl (0,25 mmol.L ⁻¹)
SDS (4% m/v)	SDS (1% m/v)
Glicerina (50% m/v)	Glicerina (1,92 mol.L ⁻¹)
Azul de bromofenol (0,005 m/v)	

Transcorrido este tempo, o gel foi imerso em solução de fixação, preparada pela mistura etanol/ácido acético/água MilliQ, 3:1:6 v/v e em seguida, revelado em solução de prata com Pierce^R Silver Stain Kit (ThermoScientific). Todas as corridas eletroforéticas foram feitas aplicando um marcador de massa molar para posterior

identificação dos estados de agregação. No caso, foi utilizado PageRuler™ Prestained Protein Ladder contendo proteínas de 10 até 170 KDa.

5.2.14. Ensaio de agregação do peptídeo A β ₄₂ na presença de Zn(II)

Inicialmente, o filme peptídico preparado como descrito em 5.2.4., contendo 166 μ g de peptídeo (0,038 mmol), foi dissolvido em 6 μ L DMSO estéril para uma concentração final de 6 mmol.L⁻¹. A solução foi homogeneizada com uma pipeta e posteriormente sonicada por 10 minutos. Para induzir a formação de fibrilas, adicionou-se 29 μ L de uma solução 1 mmol.L⁻¹ de Zn(NO₃)₂.6H₂O em HCl 10 mmol.L⁻¹. Esta solução foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos e incubada por 48h a 37°C. Em intervalos de tempo definidos (0, 24 e 48 h), as amostras foram analisadas por fluorescência em ThT, eletroforese em gel de acrilamida e microscopia de força atômica (MFA).

5.2.15. Ensaio de inibição da agregação do peptídeo A β ₄₂ na presença de Zn(II)

Imediatamente antes de utilizar os peptídeos nos experimentos, o filme foi ressuspense em uma solução 0,2 mmol.L⁻¹ do composto-teste (levofloxacino ou quinolona **6**) em 6 μ L DMSO estéril. A solução foi homogeneizada com uma pipeta e posteriormente sonicada por 10 minutos. Para induzir a formação de fibrilas, adicionou-se 29 μ L de uma solução 1 mmol.L⁻¹ de Zn(NO₃)₂.6H₂O em HCl 10 mmol.L⁻¹. Esta solução foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos e incubada por 48h a 37°C. Em intervalos de tempo definidos (0, 24 e 48 h), as amostras foram analisadas por fluorescência em ThT, eletroforese em gel de acrilamida e microscopia de força atômica (MFA).

5.3.Procedimentos Experimentais referentes ao Capítulo 2

5.3.1. Cálculos teóricos

Foi utilizado o programa Gaussian03 empregando os métodos DFT/B3LYP e ab initio/MP2 com conjuntos de base aug-cc-pVDZ. Os cálculos teóricos para o levofloxacino, cloridrato de ciprofloxacino e quinolona **6** foram realizados em

comparação com cinco ligantes conhecidos (rever a **Figura 32**) considerando a distância entre os átomos dos sítios de coordenação com os metais. Os resultados obtidos foram apresentados previamente.

5.3.2. Caracterização do cloridrato de ciprofloxacino

IV (KBr): ν_{\max} 3531 (OH), 1711 (COO); 1624 (C=O) cm^{-1} .

RMH de ^1H ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 250 MHz), δ 9,46 (s, 1H); 8,42 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H); 8,10 (d, $J = 6,80$ Hz, 1H); 4,26 (sl, 1H); 4,16 (sl, 4H); 3,94 (sl, 4H); 1,84-1,82 (m, 2H); 1,58 (sl, 2H).

RMN de ^{13}C ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 125 MHz), δ 172,9 (C=O); 172,0 (C=O); 157,3 (d, $J_{CF} = 255,5$ Hz, C_0); 151,1 (CH); 150,2 (d, $J_{CF} = 9,3$ Hz, C_0); 143,2 (2 C_0); 113,8 (d, $J_{CF} = 25,1$ Hz, CH); 107,9 (CH); 105,4 (C_0); 48,2 (CH_2); 46,4 (CH_2); 40,6 (CH); 9,6 (CH_2).

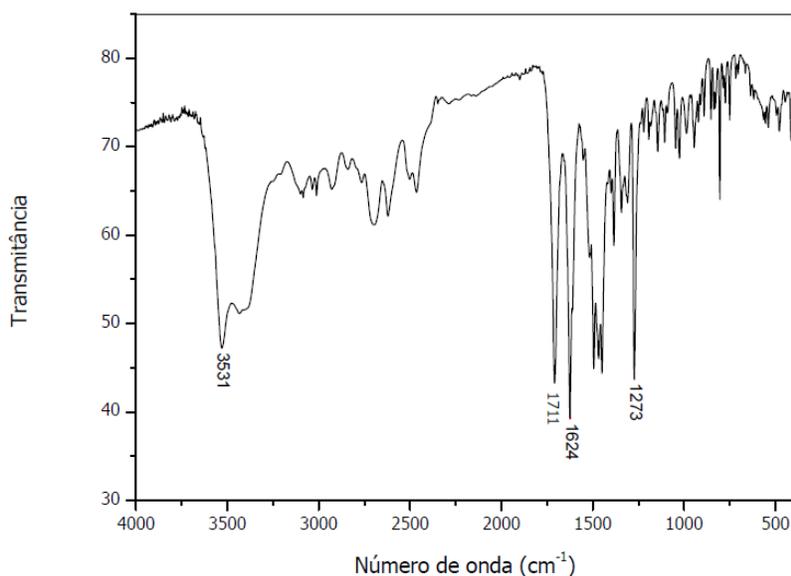


Figura 55: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{\max}) do cloridrato de ciprofloxacino.

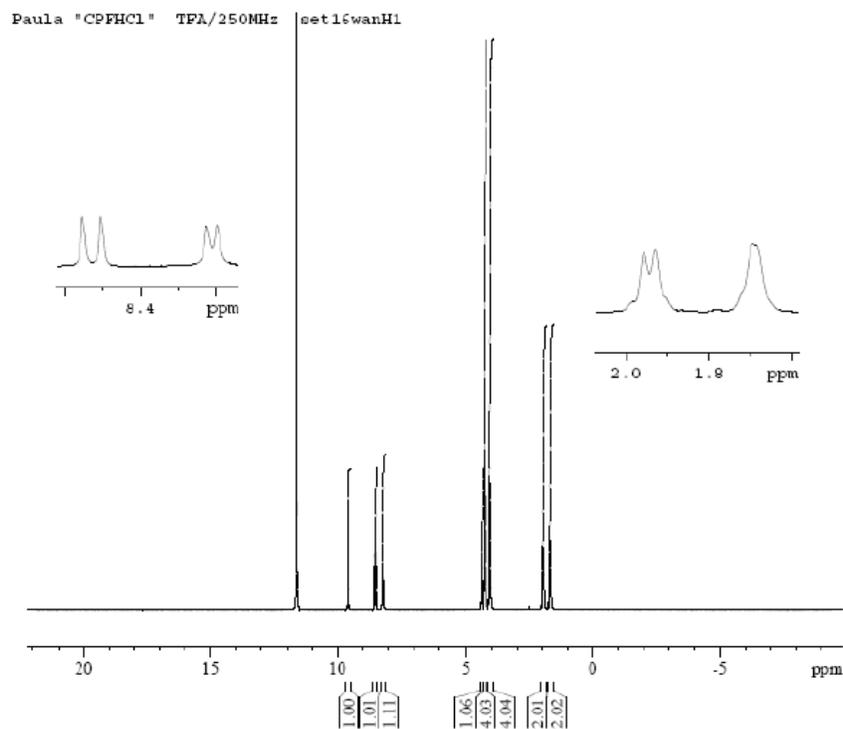


Figura 56: Espectro de RMN ^1H ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 500 MHz) do cloridrato de ciprofloxacino.

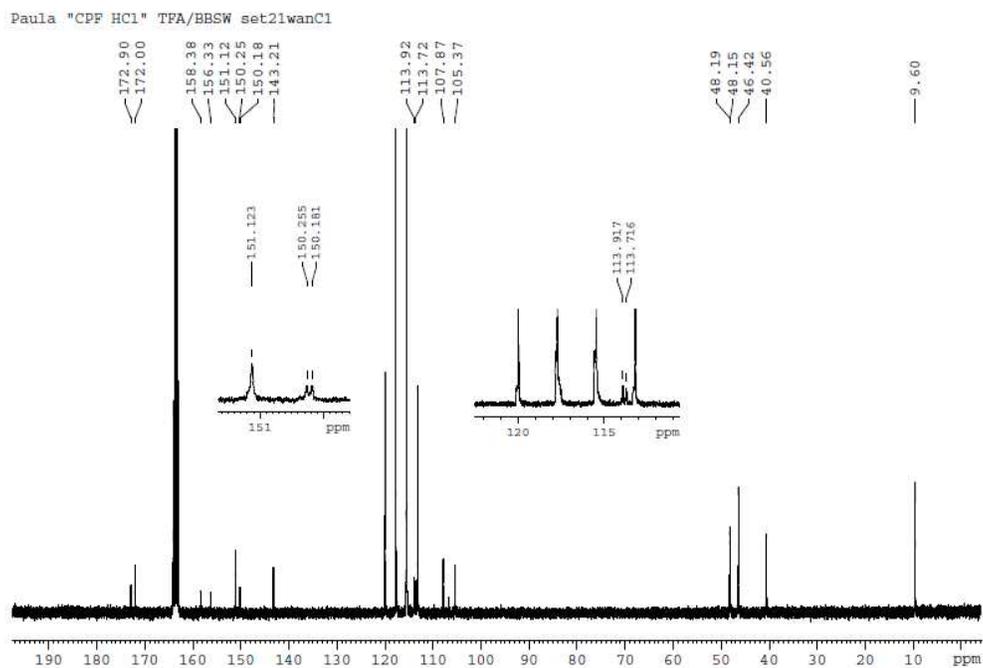


Figura 57: Espectro de RMN ^{13}C ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 125 MHz) do cloridrato de ciprofloxacino.

5.3.3. Obtenção do sal potássico de ciprofloxacino

O ciprofloxacino potássico foi preparado através da adição de KOH (30,3 mg, 0,54 mmol) a uma solução metanólica (20mL) de ciprofloxacino (100 mg, 0,27 mmol). A solução foi filtrada, o solvente foi removido a vácuo e o resíduo, analisado por IV.

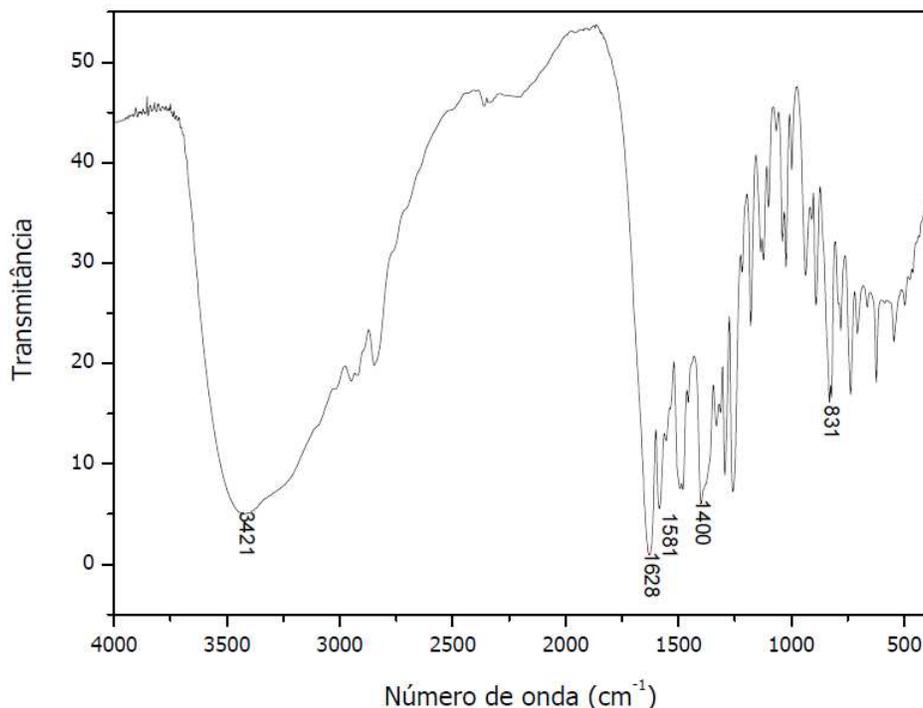


Figura 58: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{max}) do ciprofloxacino potássico.

5.3.4. Síntese do complexo de zinco com ciprofloxacino

A uma solução metanólica (200 mL) de cloridrato de ciprofloxacino (1,0 g, 2,72 mmol), foram adicionados 305,2 mg (5,44 mmol) de KOH e, após total dissolução, a solução resultante foi filtrada. Em seguida, foram adicionados 20 mL de uma solução de Zn(NO₃)₂.6H₂O (404,6 mg; 1,36 mmol) em metanol. A solução foi mantida em agitação por 2 horas (houve a formação de precipitado) e, então, mantida em repouso para lenta evaporação e precipitação dos cristais. O sólido foi filtrado, lavado sequencialmente com etanol absoluto e éter, e seco a vácuo com pentóxido de fósforo, fornecendo 952 mg de um sólido branco que foi caracterizado por IV, MS, TGA, RMN-¹H e RMN-¹³C.

IV (KBr): ν_{\max} 3402 (OH); 1633 (COO); 1579 (C=O) cm^{-1} .

EM (ESI) Calcd para $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{ZnF}_2\text{N}_6\text{O}_6$ ($\text{M} + \text{H}^+$): 725,1877. Encontrado: 725,1834 (Erro: 6 ppm).

RMN- ^1H ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 250 MHz) δ 9,32 (s, 1H); 8,28 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H); 7,93 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H); 4,11-4,06 (m, 1H); 3,99 (sl, 4H); 3,79 (sl, 4H); 1,73-1,65 (m, 2H); 1,43-1,42 (m, 2H).

RMN- ^{13}C ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 125 MHz) δ 173,1 (d, $J_{\text{CF}} = 3,7$ Hz, C=O); 172,0 (C=O); 157,4 (d, $J_{\text{CF}} = 256,7$ Hz, C_0); 151,3 (CH); 150,2 (d, $J_{\text{CF}} = 10,1$ Hz, C_0); 143,3 (2C_0); 114,5 (d, $J_{\text{CF}} = 25,7$ Hz, CH); 107,8 (CH); 105,6 (C_0); 48,3 (CH_2); 46,6 (CH_2); 40,6 (CH); 9,7 (CH_2).

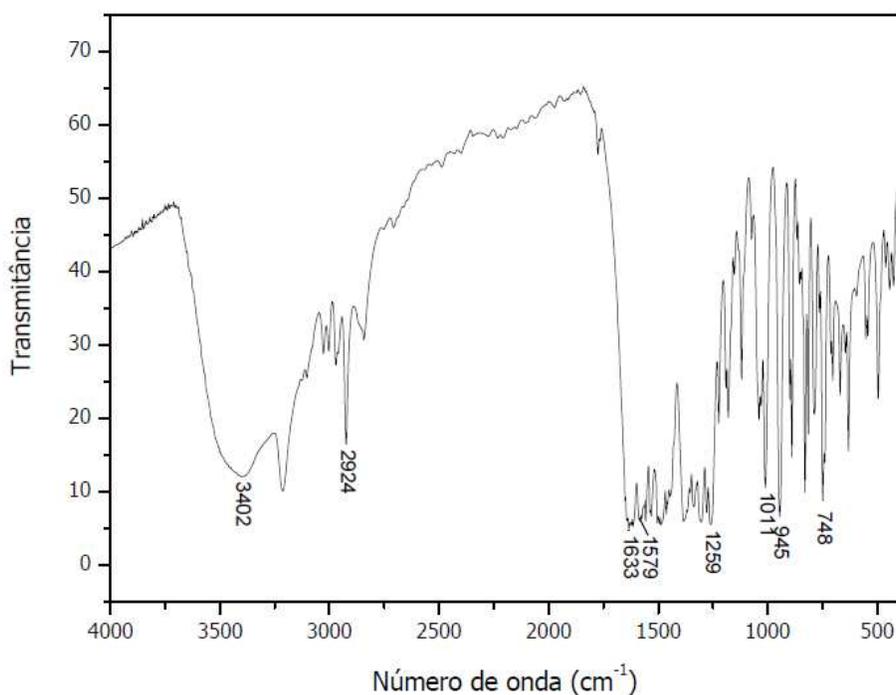


Figura 59: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{\max}) do complexo de zinco-ciprofloxacino.

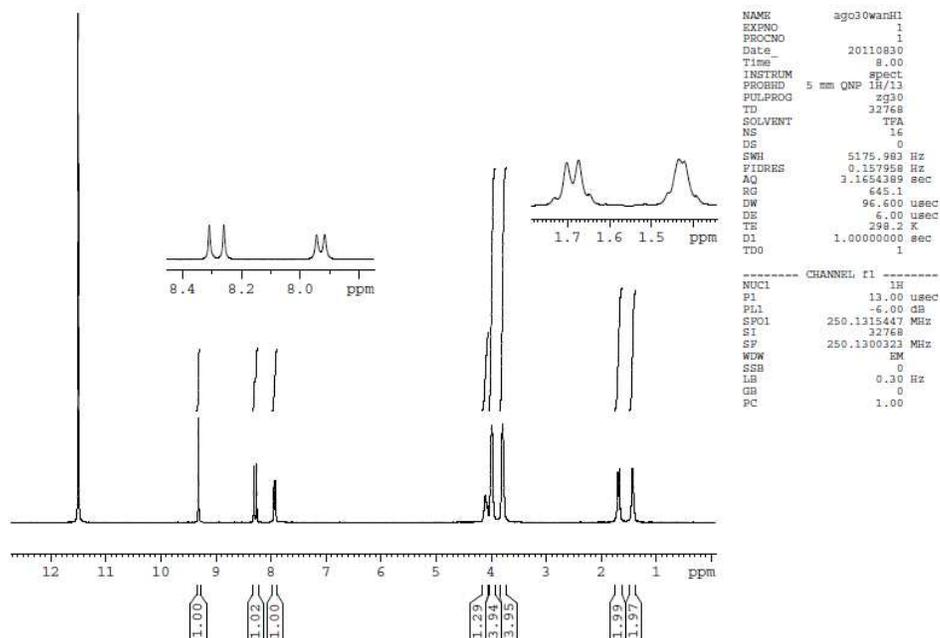


Figura 60: Espectro de RMN ¹H (CF₃CO₂D, 250 MHz) do complexo Zinco-ciprofloxacino.

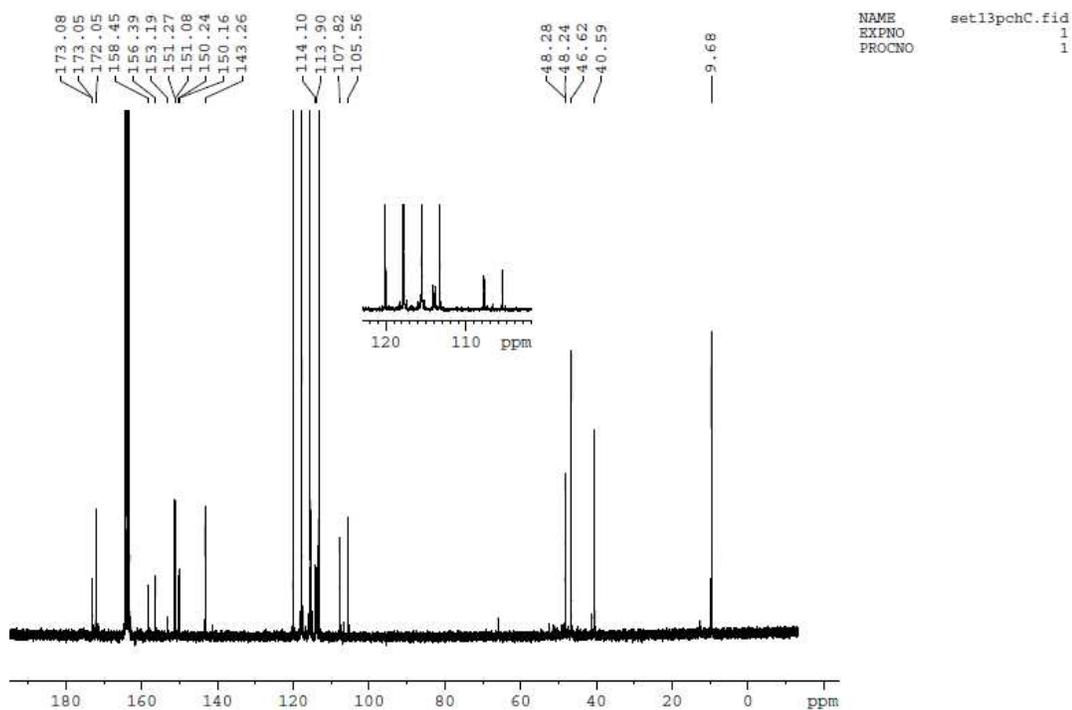


Figura 61: Espectro de RMN ¹³C (CF₃CO₂D, 125 MHz) do complexo Zinco-ciprofloxacino.

5.3.5. Síntese do complexo de cobre com ciprofloxacino

A uma solução de ciprofloxacino (1,0 g, 2,72 mmol) em água ultra pura (40 mL), foi adicionada uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (328,5 mg, 1,36 mmol) em água ultra pura (20 mL). A solução foi mantida em agitação por alguns minutos para completa homegeinização a temperatura ambiente e, então, mantida em repouso para lenta evaporação e precipitação dos cristais. O sólido foi filtrado, lavado com água gelada, éter e seco a vácuo com pentóxido de fósforo, fornecendo 654 mg de um sólido azul que foi caracterizado por IV, MS, TGA.

IV (KBr): ν_{max} 3445 (OH); 1628 (COO); 1574 (C=O) cm^{-1} .

EM (ESI) Calcd para $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{CuF}_2\text{N}_6\text{O}_8$ ($\text{M} + \text{H}^+$): 724,1882. Encontrado: 724,1827 (Erro: 8 ppm).

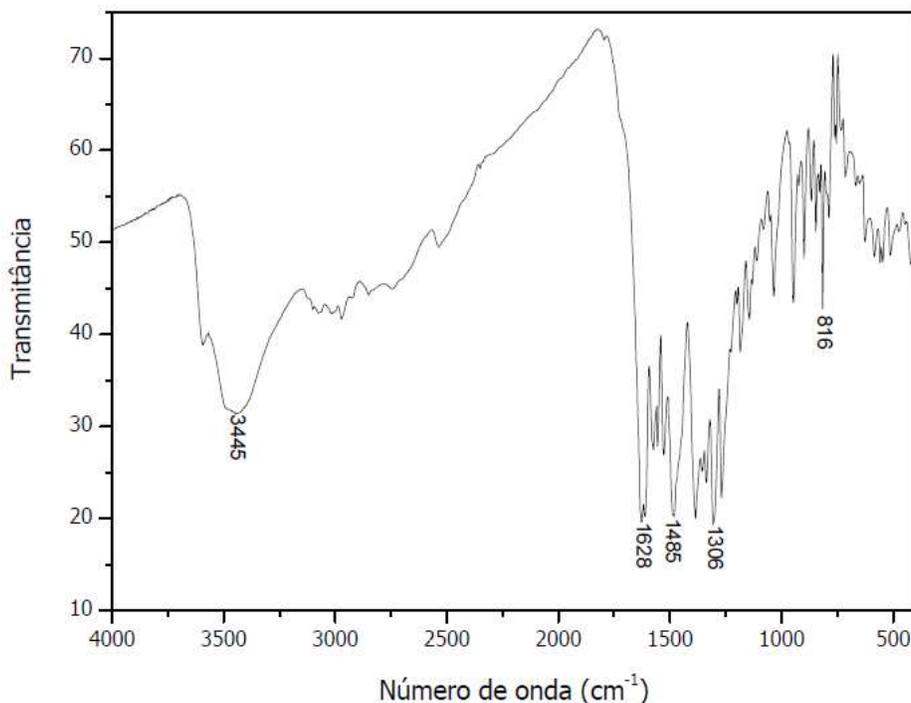


Figura 62: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{max}) do complexo de cobre-ciprofloxacino.

5.3.6. Caracterização do levofloxacin

IV (KBr): ν_{\max} 3269 (OH), 1724 (COO); 1620 (C=O) cm^{-1} .

RMH de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz), δ ppm: 8,94 (s, 1H); 7,54 (d, $J = 12,45$ Hz, 1H); 4,91 (q, $J = 6,75$ Hz, 1H); 4,57 (dd, $J_1 = 1,65$ Hz e $J_2 = 11,45$ Hz, 1H); 4,36 (dd, $J_1 = 2,20$ Hz e $J_2 = 11,43$ Hz, 1H); 3,32-3,25 (m, 4H); 2,43 (sl, 4H); 2,23 (s, 3H); 1,44 (d, $J = 6,75$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz), δ ppm: 176,3 (d, $J_{CF} = 3,3$ H C=O); 166,0 (C=O); 155,4 (d, $J_{CF} = 245,3$ Hz, C_0); 146,1 (CH); 140,1 (d, $J_{CF} = 7,1$ Hz, C_0); 132,0 (d, $J_{CF} = 14,0$ Hz, C_0); 124,8 (C_0); 119,6 (d, $J_{CF} = 9,4$ Hz, C_0); 106,6 (C_0); 103,2 (d, $J_{CF} = 23,8$ Hz, CH); 68,0 (CH_2); 55,2 (CH_2); 54,8 (CH); 50,0 (CH_2); 46,0 (CH_3); 17,9 (CH_3).

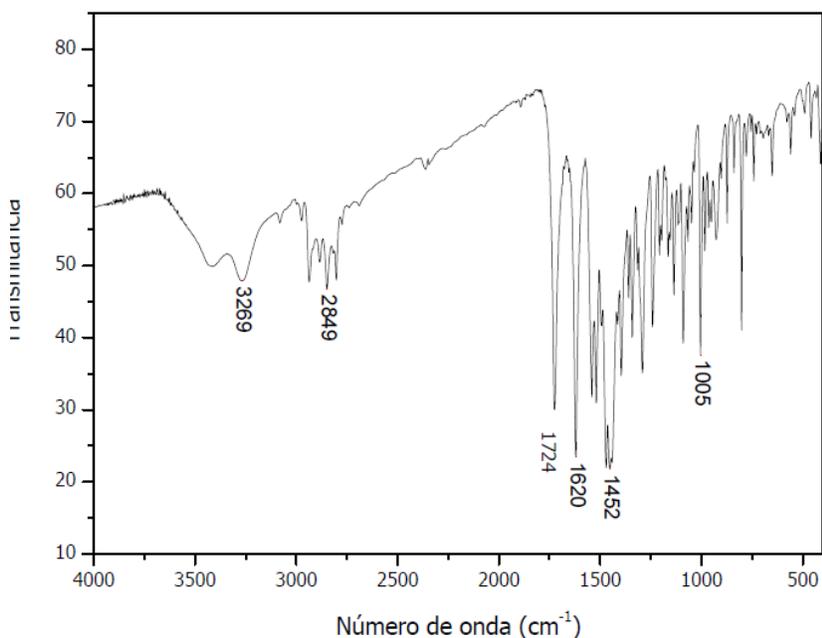


Figura 63: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{\max}) do levofloxacin.

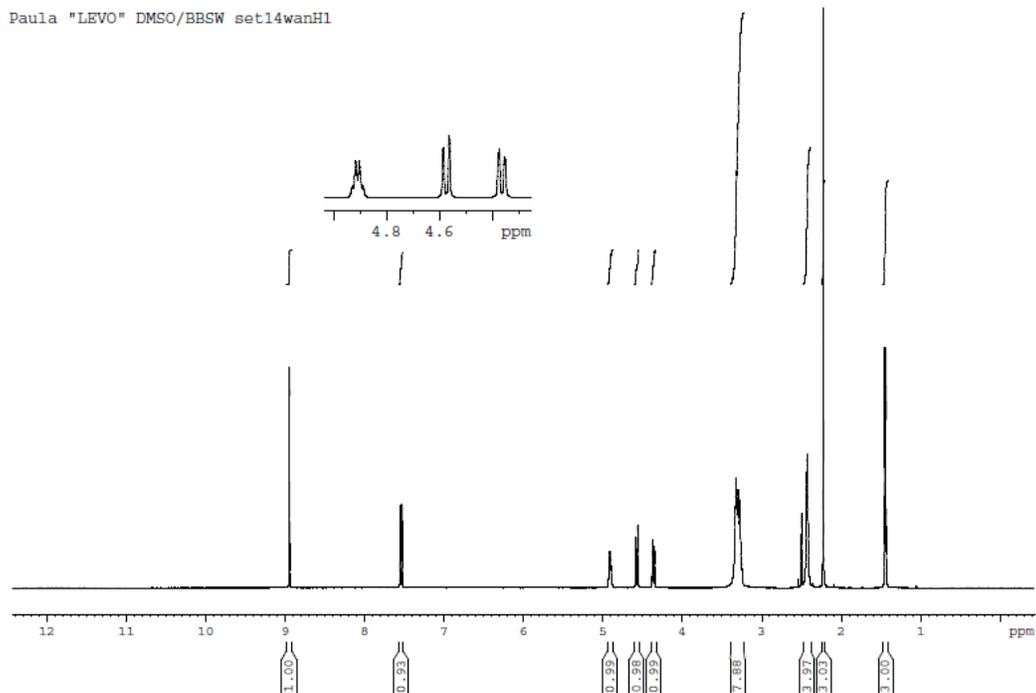


Figura 64: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do levofloxacin.

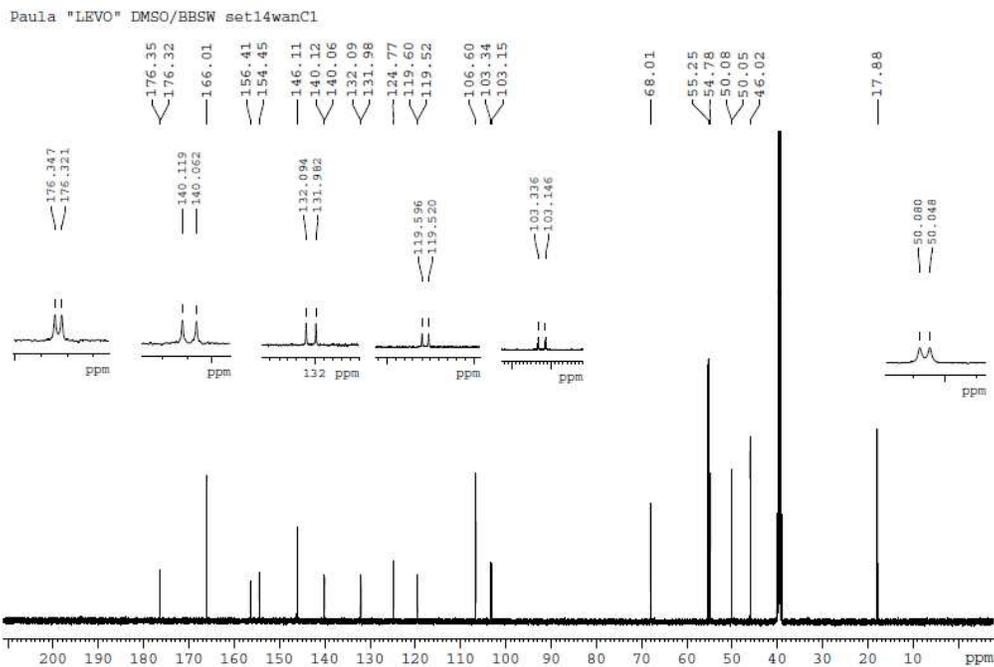


Figura 65: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do levofloxacin.

5.3.7. Obtenção do sal potássico de levofloxacinó

O levofloxacinó potássico foi preparado através da adição de KOH (15,7 mg, 0,28mmol) a uma solução metanólica (10 mL) de levofloxacinó (100 mg, 0,28 mmol). A solução foi filtrada, o solvente removido a vácuo, e o resíduo foi analisado por IV.

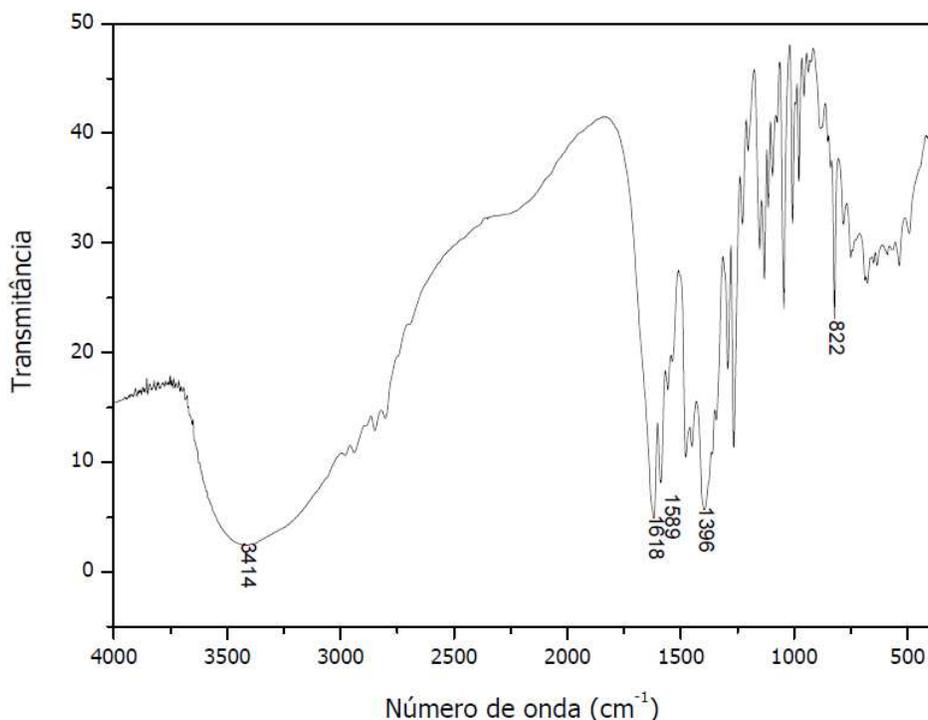


Figura 66: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{\max}) do levofloxacinó potássico.

5.3.8. Síntese do complexo de cobre com levofloxacinó

A uma solução de levofloxacinó (1,0 g, 2,76 mmol) em água ultra pura (75 mL), foi adicionada uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (334,6 mg; 1,38 mmol) em água ultra pura (12 mL). A solução foi mantida em agitação, a 50°C, por 3-4 h e, então, resfriada a temperatura ambiente e mantida em repouso para lenta evaporação e precipitação dos cristais. O sólido foi filtrado, lavado sequencialmente com água gelada e éter, e seco a vácuo com pentóxido de

fósforo fornecendo 536 mg de um sólido azul que foi caracterizado por IV, MS, TGA.

IV (KBr): ν_{\max} 3445 (OH); 1622 (COO); 1590 (C=O) cm^{-1} .

EM (ESI) Calcd para $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{CuF}_2\text{N}_6\text{O}_8$ (M + H^+): 784,2094. Encontrado: 784,2034 (Erro: 8 ppm).

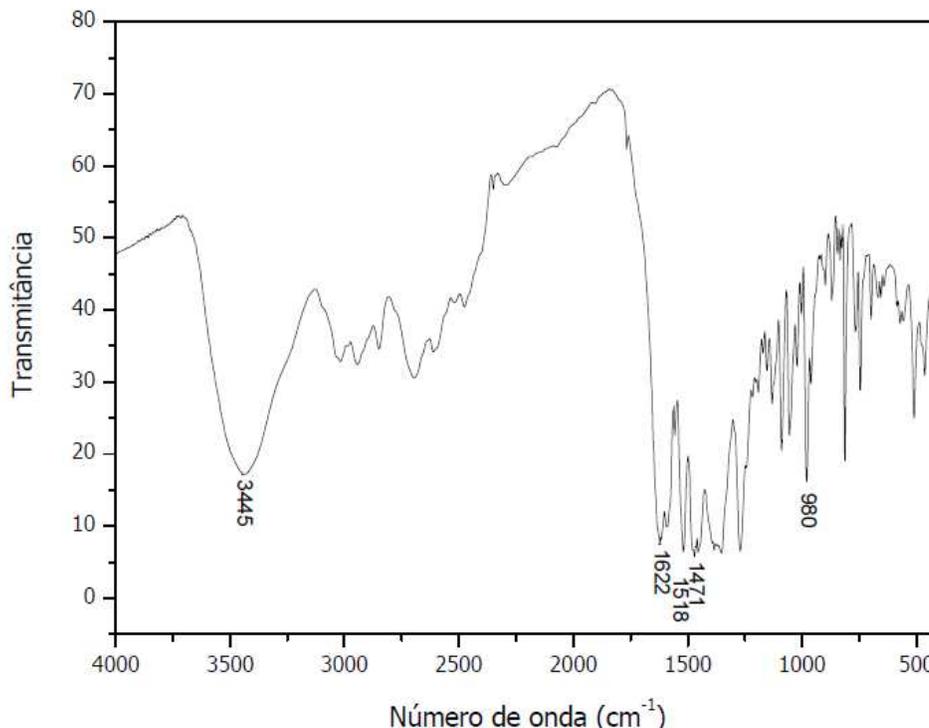


Figura 67: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{\max}) do complexo cobre-levofloxacino.

5.3.9. Síntese do complexo de zinco com levofloxacino

A uma solução metanólica (130 mL) de levofloxacino (1,0 g, 2,76 mmol) sob agitação a t.a., foi adicionada uma solução metanólica (10 mL) de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (410,5 mg, 1,38 mmol). A solução foi mantida em agitação por alguns minutos para completa homogeneização a temperatura ambiente e, então, mantida em repouso para lenta evaporação e precipitação dos cristais. O sólido foi filtrado,

lavado com etanol, éter e seco a vácuo, com pentóxido de fósforo fornecendo 1,2 g de um sólido branco.

IV (KBr): $\nu_{\text{máx}}$ 3429 (OH); 1622 (COO); 1580 (C=O) cm^{-1} .

RMN- ^1H (DMSO- d_6 , 250 MHz) δ 8,98 (s, 1H); 7,55 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H); 4,93-4,90 (m, 1H); 4,58 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H); 4,38 (d, $J = 10,2$ Hz, 1H); 3,44 (sl, 4H); 3,04 (sl, 4H); 2,67 (s, 3H); 1,43 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz), δ ppm: 157,3 (C_0); 153,4 (CH); 140,3 (d, $J_{\text{CF}} = 12,9$ Hz, C_0); 124,6 (C_0); 103,3 (d, $J_{\text{CF}} = 47,2$ Hz, CH); 68,3 (CH_2); 54,6 (CH_2); 54,1(CH); 48,3 (CH_2); 43,8 (CH_3); 18,0 (CH_3).

EM (ESI) Calcd para $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{ZnF}_2\text{N}_6\text{O}_8$ ($\text{M} + \text{H}^+$): 785,2089. Encontrado: 785,2028 (Erro: 8 ppm).

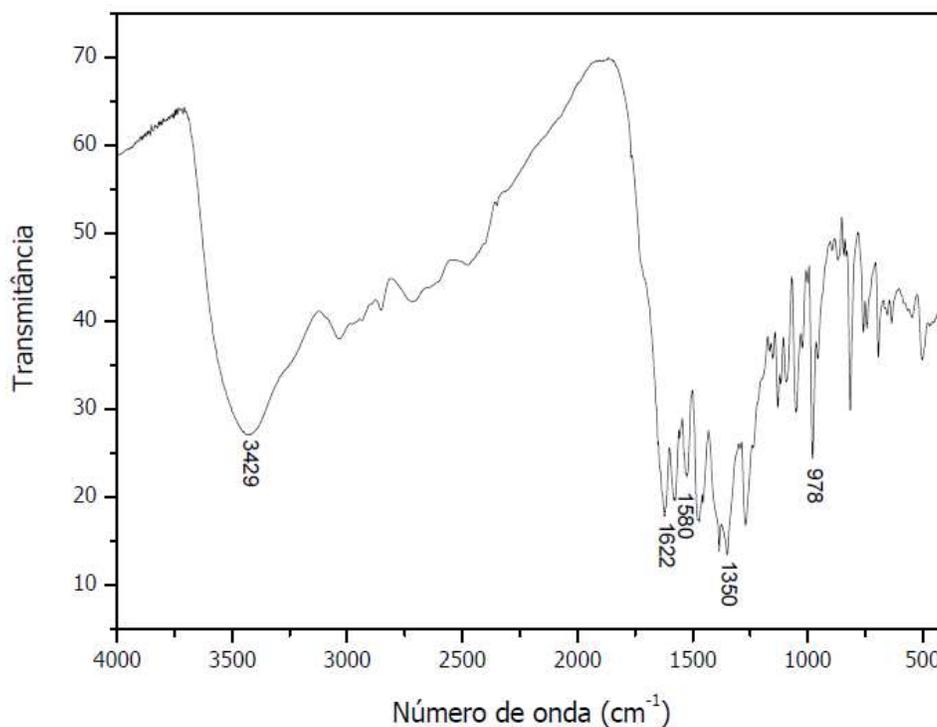


Figura 68: Espectro no infravermelho (KBr, $\nu_{\text{máx}}$) do complexo zinco-levofloxacin.

Paula PCH064 DMSO250mhz ago30wanH2

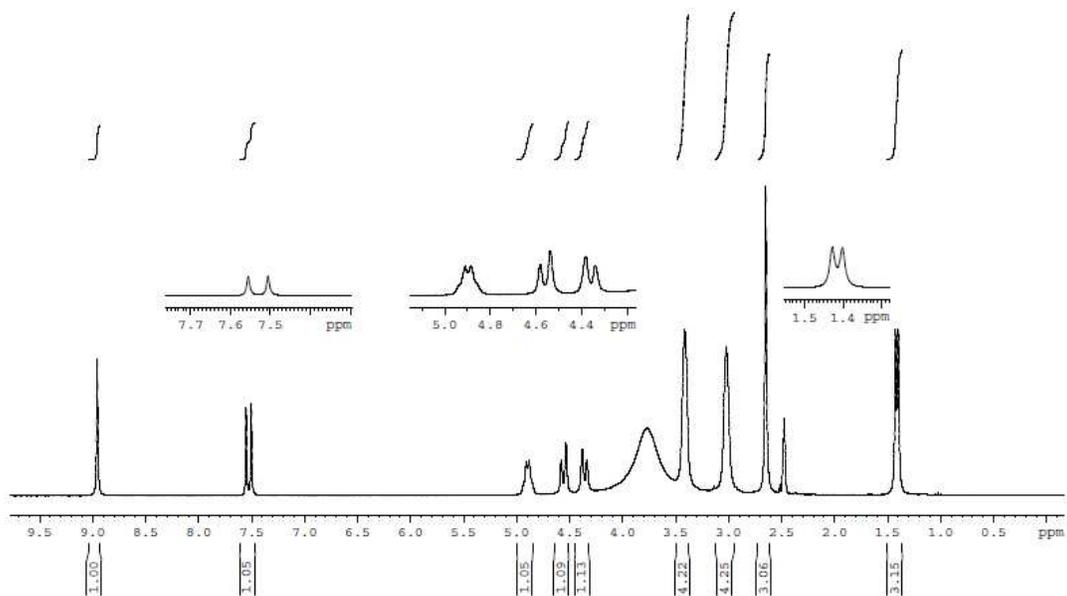


Figura 69: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 250 MHz) do complexo zinco-levofloxacino.

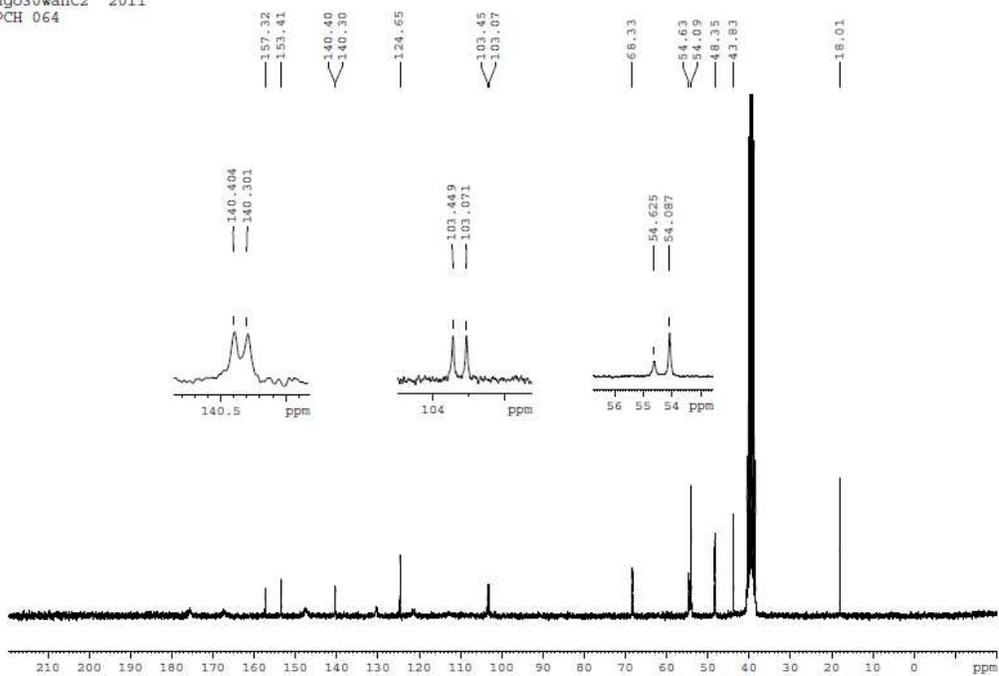
ago30wanC2 2011
PCH 064

Figura 70: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do complexo zinco-levofloxacino.

5.3.10. Determinação do coeficiente de partição do levofloxacino

50 mg (0,14 mmol) do complexo foram particionados entre 10 mL de água Milli-Q e 10 mL de octanol. A mistura resultante foi mantida em agitação por 30 minutos. Após este período, o material foi transferido para um funil de separação e as fases orgânica e aquosa foram separadas. A concentração do composto na fase aquosa foi determinada por ultravioleta. Sabendo-se a quantidade inicial do composto e a concentração do composto na fase aquosa, determinou-se a concentração do composto na fase orgânica. O Log P foi calculado conforme abaixo:

$$\text{Log P} = [\text{Composto}_{\text{FO}}] / [\text{Composto}_{\text{FA}}],$$

Em que FO = fase orgânica e FA = fase aquosa.

5.3.11. Determinação do coeficiente de partição do complexo de zinco-levofloxacino

50 mg (0,06 mmol) do complexo foram particionados entre 10 mL de água Milli-Q e 10 mL de octanol. A mistura resultante foi mantida em agitação por 30 minutos. Após este período, o material foi transferido para um funil de separação e as fases orgânica e aquosa foram separadas. A concentração do complexo na fase aquosa foi determinada por ultravioleta. Sabendo-se a quantidade inicial do composto e a concentração do composto na fase aquosa, determinou-se a concentração do composto na fase orgânica. O Log P foi calculado conforme abaixo:

$$\text{Log P} = [\text{Composto}_{\text{FO}}] / [\text{Composto}_{\text{FA}}],$$

Em que FO = fase orgânica e FA = fase aquosa.

5.3.12. Determinação do coeficiente de partição do complexo de cobre-levofloxacino

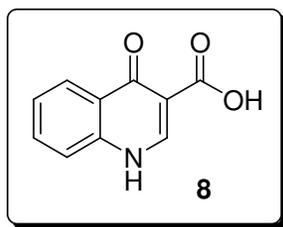
50 mg (0,06 mmol) do complexo foram particionados entre 10 mL de água Milli-Q e 10 mL de octanol. A mistura resultante foi mantida sob agitação por 30

minutos. Após este período, o material foi transferido para um funil de separação e as fases orgânica e aquosa foram separadas. A concentração do complexo na fase aquosa foi determinada por ultravioleta. Sabendo-se a quantidade inicial do composto e a concentração do composto na fase aquosa, determinou-se a concentração do composto na fase orgânica. O Log P foi calculado conforme abaixo:

$$\text{Log P} = [\text{Composto}_{\text{FO}}] / [\text{Composto}_{\text{FA}}],$$

Em que FO = fase orgânica e FA = fase aquosa.

5.3.13. Síntese do ácido 3-carboxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolínico (8)



A uma solução da quinolona **6** (170 mg, 0,78 mmol) adicionou-se uma solução água:metanol (1:4 v/v) contendo KOH (44 mg, 0,78 mmol). A suspensão foi mantida em agitação e refluxo por aproximadamente 1h. Observou-se a completa dissolução do composto. O metanol foi evaporado e observou-se a formação de um sólido. O conteúdo foi acidificado até pH 1-2 e o sólido obtido foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada. Obteve-se um sólido branco (94 mg) correspondendo a 64% de rendimento do ácido **8**.

P.F. 274-276°C (decomposição).

IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} : 3456 (OH), 1670 (COO), 1633 (C=O).

RMN-¹H (CF₃CO₂D, 250 MHz) δ 9,34 (s, 1H); 8,67 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 8,22 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H); 8,12 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 7,97 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H).

RMN de ^{13}C ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 100 MHz), δ : 176,2 (C=O); 172,6 (C=O); 148,1 (CH); 141,9 (C_0); 140,6 (CH); 132,7 (CH); 127,3 (CH); 122,3 (C_0); 122,2 (CH); 106,2 (C_0).

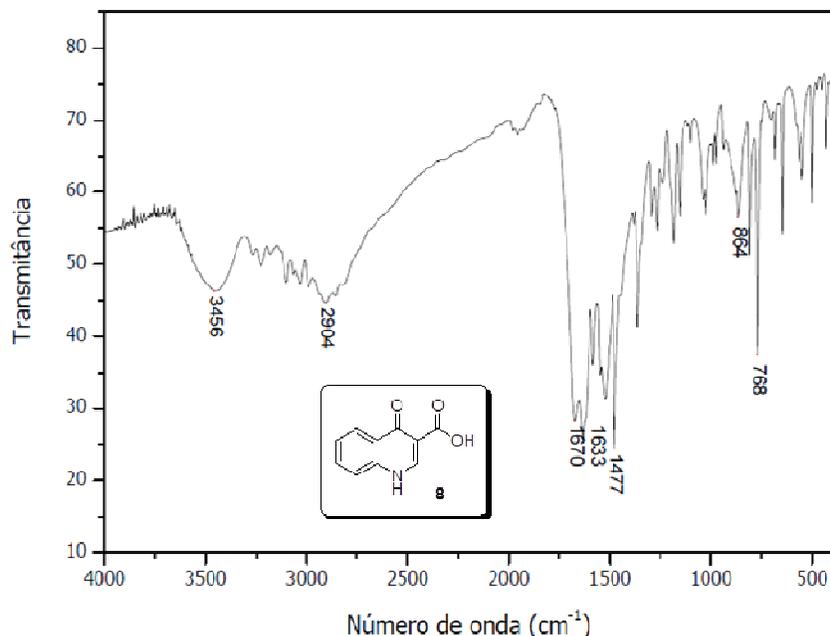
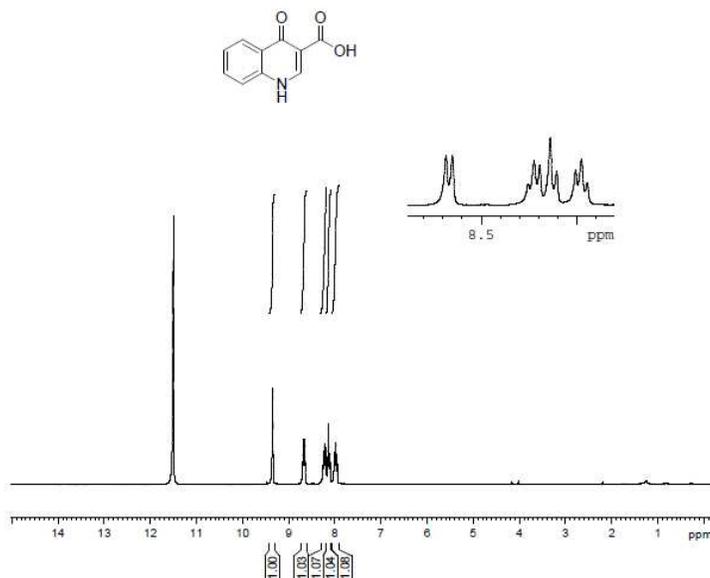


Figura 71: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{max}) do ácido 3-carboxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolínico.

Paula- pcho91- TFA - bruker 250- set08pchH2



```

NAME          set08pch91H2
EXPNO         1
PROCNO        1
Date_         20120908
Time          21.06
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm QNP 1H/13
PULPROG       zg30
TD            32768
SOLVENT       TFA
NS            56
DS            0
SWH           5178.983 Hz
FIDRES        0.157959 Hz
AQ            3.1654389 sec
RG            2048
DM            96.600 usec
DE            6.00 usec
TE            298.2 K
D1            1.0000000 sec
TD0           1
----- CHANNEL f1 -----
NUC1          1H
P1            13.25 usec
PL1           -6.00 dB
SFO1          250.1317509 MHz
SI            32768
SF            250.1300205 MHz
NEWB          RM
SGB           0
LB            0.30 Hz
GB            0
PC            1.00

```

Figura 72: Espectro de RMN ^1H ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 250 MHz) do ácido 3-carboxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolínico.

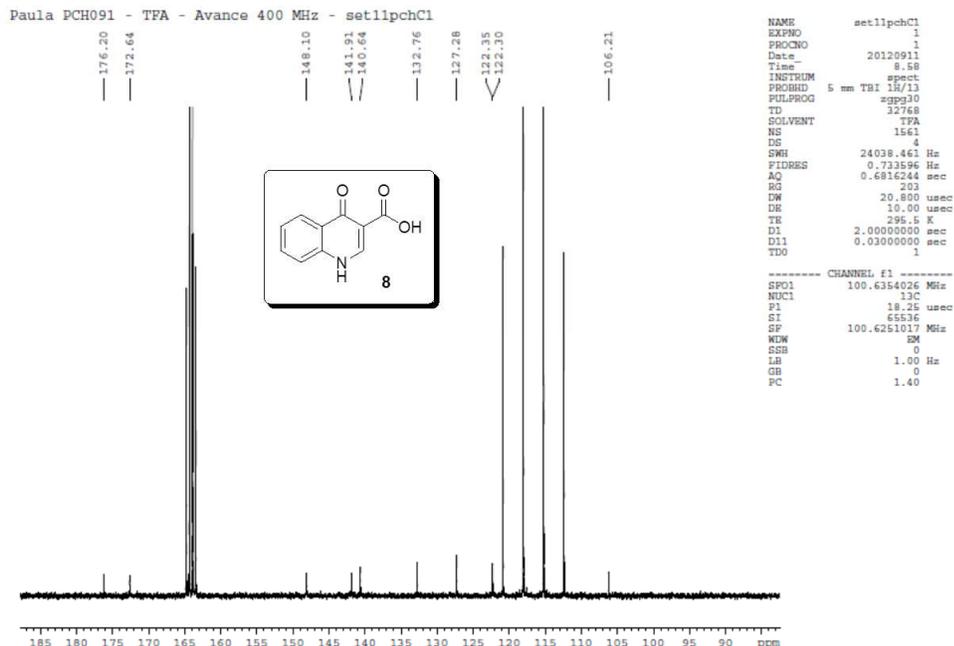


Figura 73: Espectro de RMN ^{13}C ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 100 MHz) do ácido 3-carboxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolínico.

5.3.14. Síntese do complexo de cobre do ácido 3-carboxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolínico

A uma solução do ácido **8** (30 mg; 0,16 mmol) em metanol (3 mL), foi desprotonada com KOH (5 mg; 0,08 mmol) e previamente filtrada, foi adicionado o sal de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (19 mg; 0,08 mmol). A solução foi mantida em agitação por alguns minutos para completa homogeneização a temperatura ambiente e, então, mantida em repouso para lenta evaporação e precipitação dos cristais. O sólido foi filtrado, lavado com etanol, éter e seco a vácuo, com pentóxido de fósforo. Foram obtidos 24 mg de um sólido verde.

IV (KBr): ν_{max} 3419 (OH); 1639 (COO); 1587 (C=O) cm^{-1} .

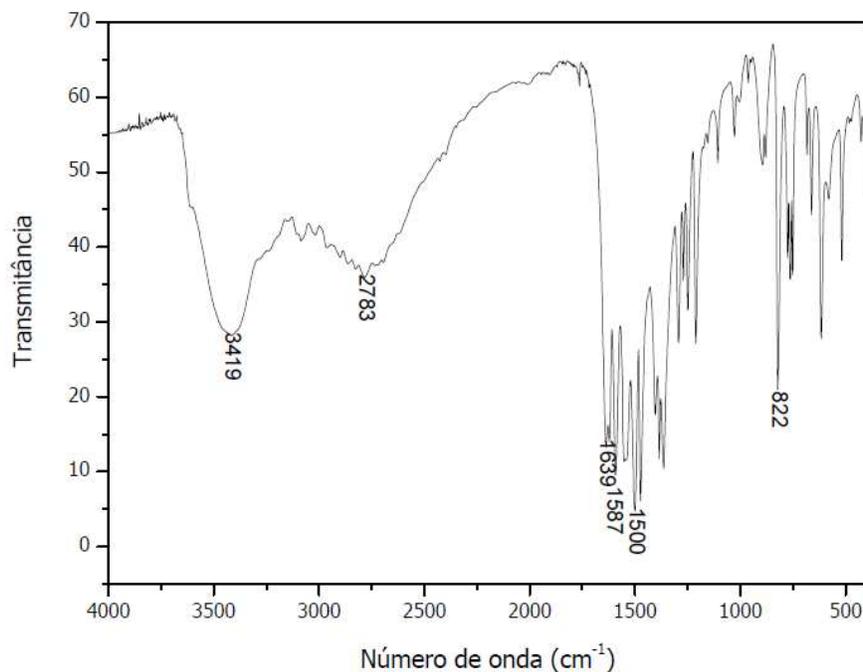


Figura 74: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{\max}) do complexo de cobre-ácido **8**.

5.3.15. Síntese do complexo de zinco com o ácido 3-carboxi-4-oxo-1,4-diidroquinolínico

A uma solução do ácido **8** (30 mg, 0,16 mmol) em metanol (3 mL), foi desprotonado com KOH (5 mg, 0,08 mmol) e previamente filtrada, foi adicionado o sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (24 mg, 0,08 mmol). A solução foi mantida em agitação por alguns minutos para completa homogeneização a temperatura ambiente e, então, mantida em repouso para lenta evaporação e precipitação dos cristais. O sólido foi filtrado, lavado com etanol e éter, e seco a vácuo com pentóxido de fósforo, fornecendo 24 mg de um sólido verde.

IV (KBr): ν_{\max} 3392 (OH); 1624 (COO); 1593 (C=O) cm^{-1} .

RMN-¹H (CF₃CO₂D, 500 MHz) δ 9,36 (s, 1H); 8,69 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 8,25 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H); 8,14 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 8,00 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H).

RMN-¹³C (CF₃CO₂D, 125 MHz), δ ppm: 176,3 (C=O); 172,7, (C=O); 148,2 (CH); 141,9 (C₀); 140,7 (CH); 132,8 (CH); 127,3 (CH); 122,4 (C₀); 122,3 (CH); 106,3 (C₀).

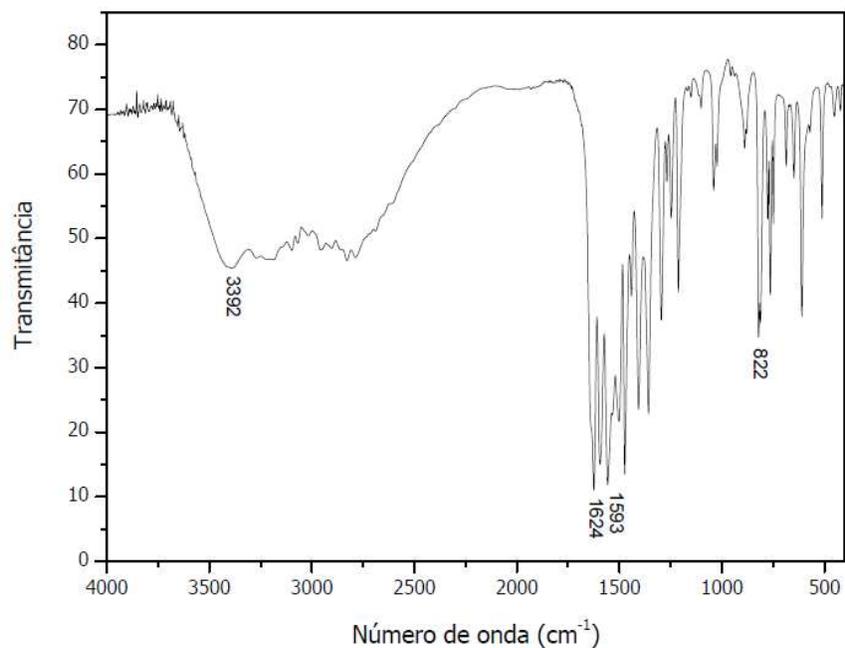


Figura 75: Espectro no infravermelho (KBr, ν_{\max}) do complexo de zinco-ácido **8**.

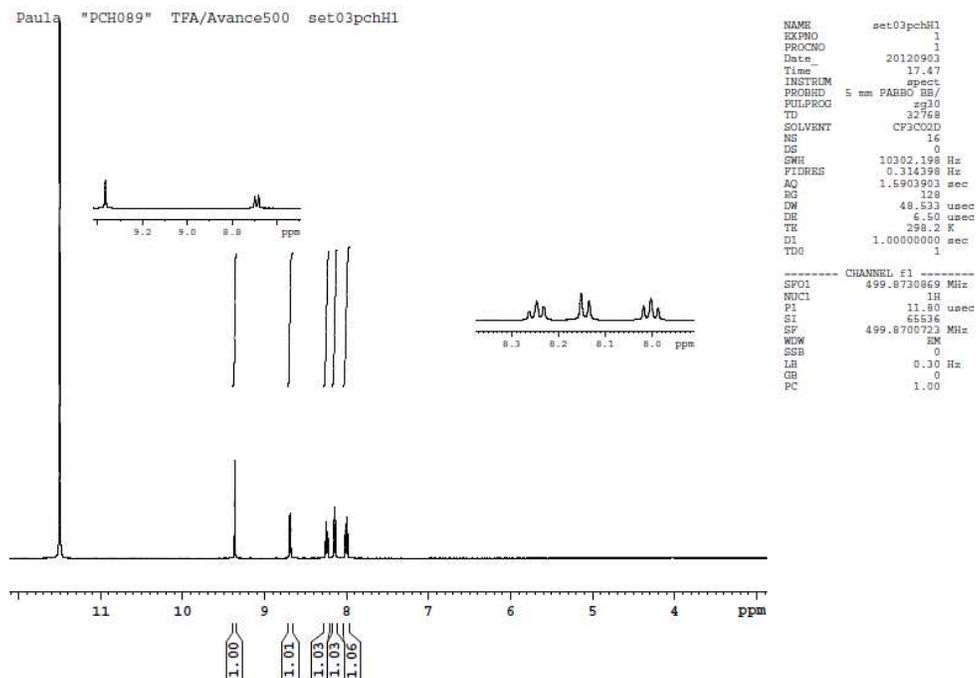


Figura 76: Espectro de RMN ¹H (CF₃CO₂D, 500 MHz) do complexo zinco-ácido **8**.

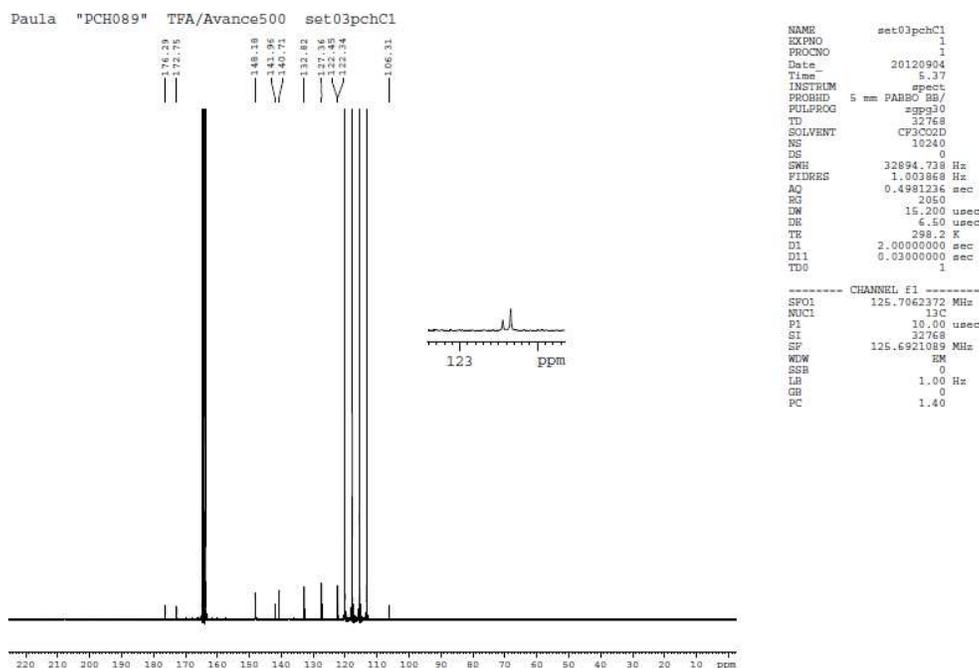


Figura 77: Espectro de RMN ^{13}C ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 125 MHz) do complexo zinco-ácido 8.

5.3.16. Ensaio de citotoxicidade dos complexos de ciprofloxacino e levofloxacino

As linhagens celulares 3T3 (fibroblasto de camundongo albino suíço) e NG97 (glioblastoma) foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C com 5% de CO_2 . O meio foi trocado a cada 48 h, até as células adquirirem confluência. Após a contagem, as células foram diluídas até a sua densidade de inoculação e transferidas para uma microplaca contendo 96 poços, em um volume fixo de 100 $\mu\text{mol/L}$ por poço. A densidade de inoculação das células foi 1×10^5 céls/mL. Esta concentração inicial de células foi determinada a partir de curvas de crescimento, assegurando-se que elas estariam em crescimento logarítmico ao longo do experimento. A microplaca contendo as células foi pré-incubadas a 37 °C por 72 h com 5% de CO_2 para permitir estabilização, antes da adição dos compostos-teste. O composto foi então solubilizado em DMSO, nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,12 $\mu\text{g/mL}$, e adicionado ao meio. Após 3h de incubação no meio livre de soro contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de vermelho neutro, as células foram lavadas rapidamente com PBS e em

seguida, 0,1 mL de uma solução de etanol/ácido acético⁵⁶ (50% vv) e etanol para retirar o corante. Após agitação por 10 min, a absorbância foi lida em 540 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Estes ensaios foram realizados no Laboratório do Prof.Dr. Marcelo Lancellotti (IB/UNICAMP).

5.3.17. Atividade antimicrobiana dos complexos de ciprofloxacino e levofloxacino

As linhagens usadas neste estudo compreendem alguns isolados clínicos e American Type Culture Collection (ATCC). O meio de cultura utilizado foi o Mueller–Hinton agar, para os testes de zona de inibição (0,5 de suspensão do inóculo). As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas pelo método de diluição em caldo (Mueller–Hinton) e a densidade de inoculação foi 5×10^5 UFC/mL. Estes ensaios foram realizados no Laboratório do Prof.Dr. Marcelo Lancellotti (IB/UNICAMP).

⁵⁶Ácido acético previamente diluído em água (1%, vv).