

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL – UCS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

PAULO ROBERTO DOS SANTOS

TESE DE DOUTORADO

**COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO COM ZINCO, ÁCIDO VALPROICO,
DICLOFENACO E IBUPROFENO: UMA NOVA ABORDAGEM PARA A
OBTENÇÃO DE FÁRMACOS**

Orientador: Prof. Dr Sidnei Moura e Silva

**CAXIAS DO SUL
2019**

PAULO ROBERTO DOS SANTOS

**COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO COM ZINCO, ÁCIDO VALPROICO,
DICLOFENACO E IBUPROFENO: UMA NOVA ABORDAGEM PARA A
OBTENÇÃO DE FÁRMACOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul visando à
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.**

**Orientador: Prof^o Dr Sidnei Moura e Silva
Co-orientador: Prof. Dr Claus Tröger Pich**

**CAXIAS DO SUL
2019**

PAULO ROBERTO DOS SANTOS

**COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO COM ZINCO, ÁCIDO VALPROICO,
DICLOFENACO E IBUPROFENO: UMA NOVA ABODAGEM PARA A OBTENÇÃO
DE FÁRMACOS**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul visando à
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Aprovada em 19 de novembro de 2019.

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr Sidnei Moura e Silva (orientador)
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Prof. Dr. Claus Tröger Pich (co-orientador)
Universidade de Caxias do Sul - UCS

Prof. Dr Aloir Antonio Merlo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Profa. Dra. Janaina da Silva Crespo (UCS)
Universidade de Caxias do Sul - UCS

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr Sidnei Moura pela orientação, acompanhamento e tempo destinado à execução deste projeto de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGGIO pelo acolhimento e amparo ao projeto de pesquisa.

À Universidade de Caxias do Sul pela infraestrutura, disponibilidade de equipamentos e professores/funcionários dedicados aos programas de Pós-graduação.

À CAPES-PROSUC pela bolsa de estudos.

Aos coorientadores professores Dr Claus Tröger Pich (UFSC) e Dr^a Françoise Dumas (Université Paris Saclay) pelo acompanhamento e dedicação ao projeto de pesquisa.

À colega e esposa Sidineia Danetti pelo auxílio técnico-científico, compreensão, carinho e parceria para execução deste projeto.

Ao bolsista Franco Smiderle pela ajuda e parceria na execução do projeto.

Aos colegas estudantes, professores e funcionários dos laboratórios LBIOP e central analítica pela colaboração técnico-científica, mão amiga e pelos momentos de alegria.

À equipe do Laboratório de Estresse Oxidativo pela colaboração nos ensaios de sequestro de radical livre.

Ao professor Dr Hernán Terenzi do Centro de Biologia Molecular estrutural – CEBIME-UFSC pela colaboração nos experimentos com DNA.

Ao professor Dr Davi Fernando Back do Programa de Pós-graduação em Química da UFSM pela colaboração nos estudos de cristalografia.

Aos estudantes e professores do Programa de Pós-graduação em Materiais – PPGMAT pela colaboração técnica em análises instrumentais.

Aos colegas Lai Wei, Li Wang, Mohamad Kuzarra, Laith Quteishat e Frank Lebideau da Université Paris Saclay pela amizade e parceria.

Resumo

Fármacos anti-inflamatórios não esteroides ou AINEs representam a maior e mais difundida classe de fármacos e como consequência a maior representação do mercado de medicamentos da história. Os AINEs atuam como inibidores das enzimas ciclooxigenases ou COX responsáveis pela produção de intermediários dos processos inflamatórios responsáveis especialmente pela sensação de dor. Nesta classe destacam-se os fármacos diclofenaco (Diclof) e ibuprofeno (Ibup), dois fármacos AINEs inibidores não específicos das COX 1 e 2 de administração ampla. Outra molécula de ampla utilização é o valproato de sódio ou Valp, um fármaco de primeira linha no tratamento de convulsões parciais e generalizadas, transtornos bipolares e tratamento de enxaquecas. Diferentes dos AINEs, o Valp atua no sistema nervoso central como agonista do neurotransmissor ácido gama amino butírico (GABA). A nicotinamida ou Nic é um dos componentes do complexo vitamínico B3, vitamina com funções de regulação de processos metabólicos de produção de energia a nível celular (nicotinamida dinucleotídeo, NAD), redutor de estresse oxidativo e agente inibidor de processos inflamatórios. Valp, Diclof e Ibup são ácidos carboxílicos e apresentam alta afinidade com metais de transição e produzem compostos de coordenação quimicamente estáveis. O presente estudo teve como objetivos sintetizar três complexos ternários de Zn^{2+} contendo Valp, Diclof e Ibup ligados com a vitamina B3 (Nic), determinar estruturas químicas por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectrometria de massas de alta resolução (ESI-TOF-MS (+)), espectrometria de ressonância magnética nuclear (1H RMN e ^{13}C RMN), Espectrofotometria de UV-Vis e difração de Raios-X de monocristal, avaliar o potencial de captura de radicais livres *in vitro*, capacidade de interação com a dupla hélice do DNA por espectrometria de dicroísmo circular, avaliar a capacidade de quebra de cadeias de DNA plasmidial de *Escherichia coli* com o sem indução luminosa e determinar a DL50 através da toxicidade aguda frente à náuplios de *Artemia salina*. Os complexos foram obtidos por síntese química em dois passos reacionais, obtendo-se os sais binários $Zn_2(Valp)_4$, $Zn(Diclof)_2$ e $Zn(Ibup)_2$ no passo 1 a partir dos sais valproato de sódio, diclofenaco de potássio e ibuprofenato de sódio reagindo com $ZnCl_2$ em solução aquosa. O passo 2 compreende a obtenção dos complexos ternários $Zn(Valp)_2(Nic)_2$ (**1**), $Zn_2(Diclof)_4(Nic)_2$ (**2**) e $Zn_2(Ibup)_4(Nic)_2$ (**3**) pela adição da vitamina B3 (Nic) ao sal binário em dimetilformamida (DMF) e etanol, seguido de cristalização. O complexo **1** foi caracterizado como sendo um composto mononuclear de esfera hexa coordenada octaédrica, enquanto os complexos **2** e **3** são moléculas binucleares com esferas de coordenação penta coordenadas. Todas as estruturas são inéditas, logo suas estruturas foram confirmadas com avaliação criteriosa de dados espectroscópicos. A avaliação da capacidade antioxidante frente ao radical ABTS^{•+} não apresentou atividade antioxidante mensurável para nenhum dos complexos, tampouco para o ligante Nic isolado. Os experimentos de avaliação da interação complexo-CT-DNA por espectrometria de dicroísmo circular indicaram a existência de interações de sulco oriundas de atração eletrostática mútua pela evidência de hipocromismo e deslocamento espectral para o vermelho (red shift) nas bandas espectrais decorrentes do grau de helicidade e do grau de empilhamento dos pares de bases. Todos os complexos foram capazes de interagir com o DNA, porém não produzem intercalações ou quebras de cadeia. Os experimentos de simulação de quebra de DNA plasmidial de *E. coli* com e sem indução luminosa analisadas por separação eletroforética em gel mostraram que todos os complexos não induzem quebras simples (DNA FII) e quebras duplas (DNA FIII) com diferença estatística em relação aos controles negativos para um intervalo de concentração de 0 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O experimento de toxicidade aguda frente à *A. salina* mostrou que os complexos **2** e **3** são tolerados pelos náuplios até para um intervalo

de concentração de 0 a 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com letalidades sem diferença estatística para os controles negativos e para o ligante Nic isolado. O complexo apresentou correlação dose/resposta a partir da concentração de 420 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com DL50 calculada de 3953 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados de toxicidade aguda *in vivo* indicam que os três complexos apresentam toxicidade aguda baixa e corroboram com os resultados de interação com CT-DNA e DNA plasmidial.

Palavras-chave: Complexos ternários, anti-inflamatórios, zinco, dano ao DNA, toxicidade.

Abstract

Non-steroidal anti-inflammatory drugs or NSAIDs are the largest and most widespread class of drugs and as a consequence the largest representation of the drug market in history. NSAIDs act as inhibitors of the cyclooxygenase enzymes or COX responsible for the production of inflammatory process intermediates, especially for pain sensation. Of note in this class are diclofenac (Diclof) and ibuprofen (Ibup), two non-specific COX 1 and COX 2 inhibitor NSAIDs drugs. Another widely used molecule is sodium valproate or Valp, a first-line drug in the treatment of partial and generalized seizures, bipolar disorders and treatment of migraines. Unlike NSAIDs, Valp acts on the central nervous system as a neurotransmitter gamma amino butyric acid (GABA) agonist. Nicotinamide or Nic is one of the components of vitamin B3 complex, a vitamin that regulates metabolic processes of energy production at the cellular level, reducing oxidative stress and inhibiting agent of inflammatory processes. Valp, Diclof and Ibup are carboxylic acids and have high affinity for transition metals and produce chemically stable coordinating compounds. This study aimed to synthesize three Zn^{2+} ternary complexes containing Valp, Diclof and Ibup linked to vitamin B3 (Nic), to determine chemical structures by Fourier transform infrared spectrophotometry (FTIR), high resolution mass spectrometry ESI-TOF-MS (+), nuclear magnetic resonance spectrometry (1H NMR and ^{13}C NMR), UV-Vis spectrophotometry and monocrystal X-ray diffraction, evaluate *in vitro* free radical scavenge capabilities, interactivity with the double helix of the DNA by circular dichroism spectrometry, to evaluate the breaking capacity of plasmid DNA of *Escherichia coli* in dark conditions and UV photo activation and to determine the LD50 through acute toxicity against *Artemia salina* nauplii. The complexes were obtained by chemical synthesis in two reaction steps, obtaining the binary salts $Zn_2(Valp)_4$, $Zn(Diclof)_2$ and $Zn(Ibup)_2$ in step 1 from sodium valproate, potassium diclofenac and sodium ibuprofenate reacting with $ZnCl_2$ in aqueous solution. Step 2 comprises obtaining the ternary complexes $Zn(Valp)_2(Nic)_2$ (**1**), $Zn_2(Diclof)_4(Nic)_2$ (**2**) and $Zn_2(Ibup)_4(Nic)_2$ (**3**) by adding the vitamin B3 (Nic) to the binary salt in dimethylformamide (DMF) and ethanol, followed by crystallization. Complex **1** has been characterized as a mononuclear octahedral compound, while complexes **2** and **3** are binuclear molecules with penta coordinate spheres. All structures are unpublished, so their structures were confirmed with careful evaluation of spectroscopic data. The evaluation of antioxidant capacity against ABTS^{•+} radical showed no measurable antioxidant activity for any of the complexes, nor for Nic ligand alone. The experiments of evaluation of complex-CT-DNA interaction by circular dichroism spectrometry indicated the existence of mutual electrostatic attraction with large groove interactions by the evidence of hypochromism and red shift in the spectral bands due to the helicity and the base pair stacking. All complexes exhibit similar activity in degree and intensity, but do not produce intercalations or chain breaks. Simulation experiments of *E. coli* plasmid breakdown with and without light induction analyzed by gel electrophoretic separation showed that all complexes do not induce single breaks (DNA FII) and double breaks (DNA FIII) without statistical difference in relation to those negative controls for a concentration range from 0 to 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The acute toxicity experiment against *A. salina* showed that complexes **2** and **3** are tolerated by nauplii up to a concentration range of 0 to 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with lethality without statistical difference for negative controls and Nic alone. The complex **1** showed dose/response correlation from the concentration of 420 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with calculated LD50 of 3953 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The results of acute toxicity *in vivo* indicate that the three complexes have low acute toxicity and corroborate the results of interaction with CT-DNA and plasmid DNA.

Keywords: Ternary complexes, anti-inflammatory drugs, zinc, DNA damage, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arranjos espaciais mais comuns da esfera de coordenação metal-ligantes	23
Figura 2. Principais complexos metálicos biológicos derivados do grupo porfirina.....	24
Figura 3. Complexos oncológicos derivados da platina e o ano de aprovação pelo FDA.	26
Figura 4. Esquemas de reações de equilíbrio controlada pela anidrase carbônica.	29
Figura 5. Estruturas de fármacos AINEs mais comuns	31
Figura 6. Concentrações de vários fármacos necessárias para inibir a atividade de COX-1 e COX-2 em 50% (IC50). Os fármacos plotados abaixo da linha diagonal são inibidores mais potentes da COX-2.	32
Figura 7. Esquema da epimerização seletiva do ibuprofeno inativo <i>R</i> para a forma ativa <i>S</i>	33
Figura 8. Esquema para o processo de biotransformação do diclofenaco e a seus metabólitos mais comuns	35
Figura 9. Micro crustáceo <i>A. salina</i>	36
Figura 10. Formas mais comuns de DNA de acordo com o tipo de empacotamento dos pares de bases. Em (a) é representada a dupla hélice do DNA tipo B com os parâmetros de medidas obtidos por difração de raios-X.	39
Figura 11. Estruturas químicas confirmadas dos três complexos ternários de zinco (II) com os códigos de identificação, nomenclaturas simplificadas, nomenclaturas IUPAC, fórmulas químicas as massas moleculares.....	41
Figura 12. Esquema reacional em duas etapas para a obtenção do complexo 1	43
Figura 13. Esquema reacional em duas etapas para a obtenção do complexo 2	45
Figura 14. Esquema reacional em duas etapas para a obtenção do complexo 3	47
Figura 15. Reação de formação e decomposição do radical ABTS ^{•+}	50
Figura 16. Sistema de incubação para <i>A. salina</i> com monitoramento de parâmetros físico-químicos do meio	55
Figura 17. Espectro de transmitância de FTIR para o precursor Zn ₂ (Valp) ₄ obtido em estado sólido em pastilha de KBr	58
Figura 18. Espectro de transmitância de FTIR para o complexo 1 obtido em estado sólido em pastilha de KBr	59
Figura 19. Esquema de correlações dos valores de $\Delta\nu$ dos grupos carboxilato em complexos de Zn com as respectivas categorias de ligação química.	60

Figura 20. Espectro de $^1\text{HRMN}$ para o precursor $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$ (a) com expansão (b) obtido em CDCl_3 a 300,18 MHz.	62
Figura 21. Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ para o precursor $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$ obtido em CDCl_3 a 75, 48 MHz 63	63
Figura 22. Espectro de $^1\text{HRMN}$ para o complexo 1 (a) com expansões (b) (c) obtido em Acetona D_6 a 300,18 MHz.....	65
Figura 23. Variações de conformação da ligação C-N do grupo amida.....	67
Figura 24. Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ para o complexo 1 obtido em Acetona D_6 a 75,48 MHz	68
Figura 25. Espectro de ESI-MS do precursor $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$ em modo <i>fullscan</i>	69
Figura 26. Espectro de MS2 para o íon m/z 719,3019 obtido à 15 eV com a distribuição isotópica em destaque.	70
Figura 27. Espectro de ESI-MS do complexo 1 em modo <i>fullscan</i>	71
Figura 28. Espectro de MS2 do íon m/z 595,2415 obtido à 10 eV.....	71
Figura 29. ORTEP do complexo 1 apresentando a distribuição espacial dos ligantes e a esfera de coordenação do com o átomo de Zn centralizado.....	73
Figura 30. Representações da célula unitária e das ligações de hidrogênio intermoleculares do complexo 1	74
Figura 31. Micrografias do pó do complexo 2 obtidas em microscópio de varredura com emissor FEG com magnitudes de aumento de 5.000 vezes (esquerda) e 10.000 vezes (direita).....	76
Figura 32. Espectro de transmitância de FTIR para o precursor $\text{Zn}(\text{Diclof})_2$ obtido em estado sólido em pastilha de KBr	77
Figura 33. Espectro de transmitância de FTIR para o complexo 2 obtido em estado sólido em pastilha de KBr.....	77
Figura 34. Espectro de $^1\text{HRMN}$ para o precursor $\text{Zn}(\text{Diclof})_2$ (a) com expansões (b) obtido em CDCl_3 a 300,18 MHz	79
Figura 35. Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ para o precursor $\text{Zn}(\text{Diclof})_2$ obtido em CDCl_3 a 75,48 MHz 81	81
Figura 36. Espectro de $^1\text{HRMN}$ para o complexo 2 (a) com expansões (b) (c) em DMSO-D_6 a 300,18 MHz.....	82
Figura 37. Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ para o complexo 2 obtido em DMSO-D_6 a 75,48 MHz.....	85
Figura 38. Espectro de ESI-MS do precursor $\text{Zn}(\text{diclof})_2$ em modo <i>fullscan</i>	86
Figura 39. Espectro de MS2 em 15 eV para o íon m/z monoisotópica 652,9533 com o padrão de distribuição isotópica em destaque.	86
Figura 40. Espectro de ESI-MS do complexo 2 em modo <i>fullscan</i>	87

Figura 41. Espectro de MS2 para o íon m/z 1259,9591 obtido à 15 eV com a distribuição isotópica para o íon precursor.....	88
Figura 42. Mecanismo de fragmentação do íon molecular m/z 1259,9635 por eliminações subsequentes dos ligantes Nic.	88
Figura 43. ORTEP do complexo 2 com a omissão dos átomos de hidrogênio.	90
Figura 44. Representação do sistema de interação intra e intermolecular do complexo 2	91
Figura 45. Representação da célula unitária para o complexo 2 . O arranjo monoclinico comporta duas lamelas ao longo do eixo c com 31 Å.	92
Figura 46. Espectro de transmitância de FTIR para o precursor Zn(Ibup) ₂ obtido em estado sólido em pastilha de KBr	94
Figura 47. Espectro de transmitância de FTIR para o complexo 3 obtido em estado sólido em pastilha de KBr.	95
Figura 48. Espectro de ¹ HMRN para o precursor Zn(Ibup) ₂ (a) com expansões (b) obtido em CDCl ₃ a 300,18 MHz.	97
Figura 49. Espectro de ¹³ CRMN para o precursor Zn(Ibup) ₂ obtido em CDCl ₃ a 75,48 MHz	98
Figura 50. Espectro de ¹ HMRN para o complexo 3 (a) com expansões (b) (c) obtido em CDCl ₃ a 300,18 MHz	100
Figura 51. Espectro de ¹³ CRMN para o complexo 3 obtido em CDCl ₃ a 75,48 MHz	102
Figura 52. Espectro de ESI-MS do precursor Zn(Ibup) ₂ em modo <i>fullscan</i>	103
Figura 53. Espectro MS-MS do íon molecular [Zn(Ibup) ₂ +H] ⁺ m/z 475,1918.....	104
Figura 54. Espectro de ESI-MS do complexo 3 em modo <i>fullscan</i>	105
Figura 55. Espectro de MS2 para o íon m/z 987,3175 obtido à 15 eV. O destaque corresponde à distribuição monoisotópica do íon precursor.....	105
Figura 56. ORTEP para o complexo 3 com omissão dos átomos de hidrogênio.	107
Figura 57. Célula unitária triclinica para o complexo 3 e a representação das principais interações intermoleculares.	109
Figura 58. Espectros de UV-Vis para os complexos precursores obtidos em THF	110
Figura 59. Espectros de UV-Vis para os complexos ternários em THF.....	110
Figura 60. Método de determinação da absorvidade molar do composto Zn ₂ (Valp) ₄ em THF.	111
Figura 61. Estudo de estabilidade química dos complexos 1 , 2 e 3 (B) e seus precursores (A) em solução por condutividade elétrica.	114
Figura 62. Determinação da atividade redox dos complexos frente ao radical livre ABTS ^{•+} com dados estatísticos.	116

Figura 63. Esquema de interconversão redox do cofator nicotinamida dinucleotídeo (NAD)	117
Figura 64. Modos de interação DNA-pequenas moléculas: 1(ligante de sulco grande), 2 (ligante de sulco pequeno), 3 (ligante eletrostático/alostérico), 4 (intercalador).....	118
Figura 65. Sobreposição de espectros de dicroísmo circular de CT-DNA com adições crescentes de H ₂ O:DMF 80:20%	119
Figura 66. Sobreposição de espectros de dicroísmo circular de CT-DNA com adições crescentes de nicotinamida.	120
Figura 67. Sobreposição de espectros de dicroísmo circular de CT-DNA com adições crescentes de complexo 1	121
Figura 68. Sobreposição de espectros de dicroísmo circular de CT-DNA com adições crescentes de complexo 2	122
Figura 69. Sobreposição de espectros de dicroísmo circular de CT-DNA com adições crescentes de complexo 3	123
Figura 70. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pela nicotinamida induzida por radiação UV. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.....	125
Figura 71. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo complexo 1 induzida por radiação UV. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.....	126
Figura 72. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo complexo Zn ₂ (Diclof) ₄ (Nic) ₂ induzida por radiação UV. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.	127
Figura 73. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo complexo 3 induzida por radiação UV. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.....	128
Figura 74. Gráficos de ANOVA com aplicação do teste de Tukey para as médias inter-experimentais para cada tipo de forma de DNA produzido nos ensaios de foto ativação. Os gráficos são relativos às médias das formas de DNA I e II, respectivamente.	130
Figura 75. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo ligante Nic em ausência de luz. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.....	132

Figura 76. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo o complexo $Zn(Valp)_2(Nic)_2$ em ausência de luz. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.....	133
Figura 77. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo o complexo $Zn_2(Diclof)_4(Nic)_2$ em ausência de luz. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.....	134
Figura 78. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo o complexo $Zn_2(Ibup)_4(Nic)_2$ em ausência de luz. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.....	136
Figura 79. Gráficos de ANOVA com aplicação do teste de Tukey para as médias inter-experimentais para cada tipo de forma de DNA produzido nos ensaios realizados em escuro. Os gráficos são relativos às médias das formas de DNA 1, 2 e 3, respectivamente.	137
Figura 80. Gráficos de dispersão para determinação das doses letais para 50 % da população (DL50) para todos os complexos 1, 2 e 3 e o ligante Nic frente à <i>A. salina</i> . (*) Variação significativa em relação ao ponto 0 para $p \leq 0,05$	139
Figura 81. Relatórios das análises de variância ANOVA das médias intra-experimentais para as atividades citotóxicas dos complexos frente à <i>A. salina</i> . Utilizou-se o teste de Tukey com significância de 95%.....	140
Figura 82. Análises de ANOVA inter experimentais para identificar as diferenças de toxicidade entre os complexos na concentração de $1200 \mu g mL^{-1}$. Cor vermelha significa variação significativa $P \leq 0,05$	141
Figura 83. Espectro de correlação $^1H-^{13}C$ HMBC para o complexo 2.....	157
Figura 84. Espectro de correlação $^1H-^{13}C$ HMBC para o complexo 3.....	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições experimentais para as análises de interação complexo-DNA por difração circular.....	51
Tabela 2. Condições experimentais para avaliação das interações DNA plasmidial:complexos	53
Tabela 3. Variações dos intervalos entre as bandas de vibrações mais características entre o complexo e seus precursores.	61
Tabela 4. Dados obtidos do espectro de ¹ HRMN para o precursor Zn ₂ (Valp) ₄ obtido em CDCl ₃ à 300,18 MHz.	62
Tabela 5. Dados obtidos do espectro de ¹ HRMN para o complexo Zn(Valp) ₄ (Nic) ₂ obtido em Acetona D ₆ à 300,18 MHz.....	66
Tabela 6. Dados de ESI-MS para o precursor Zn ₂ (Valp) ₄	70
Tabela 7. Dados de ESI-MS para o complexo 1.....	71
Tabela 8. Dados do cristal e refinamento da estrutura do complexo 1	72
Tabela 9. Ligações e ângulos selecionados para representar a estrutura do complexo 1	73
Tabela 10. Variações dos intervalos entre as bandas de vibrações mais características entre o complexo 2 e seus precursores.	78
Tabela 11. Dados obtidos do espectro de ¹ HRMN para o precursor Zn(Diclof) ₂ obtido em CDCl ₃ à 300,18 MHz.	80
Tabela 12. Dados obtidos do espectro de ¹ HRMN para o complexo 2 obtido em DMSO D ₆ à 300,18 MHz.....	83
Tabela 13. Dados de ESI-MS para o composto precursor Zn(diclof) ₂ em análise <i>fullscan</i>	86
Tabela 14. Dados de ESI-MS para o complexo 2 . Os valores de m/z correspondem ao pico de massa monoisotópica.....	88
Tabela 15. Dados do cristal e refinamento da estrutura do complexo 2	89
Tabela 16. Ligações e ângulos selecionados para representar a estrutura do complexo 2	90
Tabela 17. Variações dos intervalos entre as bandas de vibrações mais características entre o complexo Zn(Ibup) ₂ Nic e seus precursores.....	96
Tabela 18. Dados obtidos do espectro de ¹ HRMN para o precursor Zn(Diclof) ₂ obtido em CDCl ₃ à 300,18 MHz.	97
Tabela 19. Dados obtidos do espectro de ¹ HRMN para o complexo 3 obtido em CDCl ₃ à 300,18 MHz.....	101
Tabela 20. Dados de ESI-MS para o precursor Zn(Ibup) ₂ para íons positivos	104

Tabela 21. Dados de ESI-MS para o complexo 3. Os dados de m/z correspondem ao pico de massa monoisotópica.....	105
Tabela 22. Dados do cristal e refinamento da estrutura do complexo 3	106
Tabela 23. Principais distâncias entre átomos e medidas de ângulos dos principais sistemas para o complexo 3	108
Tabela 24. Coeficientes de absorvidade ou extinção molar para os complexos ternários e os precursores.....	111
Tabela 25. Condutividades molares dos complexos e seus sais precursores.....	112
Tabela 26. Pontos de fusão para os complexos ternários e os precursores.	115

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	OBJETIVOS.....	20
1.1	OBJETIVO GERAL.....	20
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
1.3	Compostos de coordenação.....	21
1.4	As funções dos compostos de coordenação nos sistemas biológicos.....	23
1.5	Fármacos produzidos com metais de transição.....	25
1.6	Zinco.....	28
1.7	Nicotinamida.....	30
1.8	Fármacos anti-inflamatórios não-esteroides.....	31
1.8.1	<i>Ibuprofeno</i>	33
1.8.2	<i>Diclofenaco</i>	34
1.9	Ensaio biológico de toxicidade.....	36
1.9.1	<i>Artemia salina</i>	36
1.10	Ensaio de interação com DNA <i>in vitro</i>	37
4.	METODOLOGIA.....	40
1.11	Reagentes para síntese.....	40
1.12	Equipamentos analíticos.....	40
1.13	Síntese e caracterização química dos complexos de zinco.....	41
1.13.1	<i>Síntese e obtenção do complexo Zn(Valp)₂(Nic)₂ (1)</i>	41
1.13.2	<i>Síntese e obtenção do complexo Zn₂(Diclof)₄(Nic)₂ (2)</i>	43
1.13.3	<i>Síntese e caracterização do complexo Zn₂(Ibup)₄(Nic)₂ (3)</i>	45
1.13.4	<i>Obtenção de monocristais e análise cristalográfica dos complexos 1, 2 e 3</i>	47

1.13.5	<i>Estudo de estabilidade dos complexos em solução</i>	48
1.13.6	<i>Estudo de atividade redox dos complexos frente ao radical livre ABTS^{•+}</i>	49
1.13.6.1	<i>Preparo das soluções reagentes e análise espectrofotométrica</i>	49
1.14	<i>Estudos de interação com DNA in vitro</i>	50
1.14.1	<i>Interação complexo-DNA por Dicroísmo circular</i>	50
1.14.2	<i>Indução de fragmentação de DNA plasmidial</i>	51
1.14.2.1	<i>Preparação das amostras de complexos e DNA plasmidial</i>	52
1.14.2.2	<i>Procedimentos de separação por eletroforese em gel e coleta de dados</i>	53
1.15	<i>Estudo de toxicidade in vitro frente à Artemia salina</i>	54
1.15.1	<i>Preparo das amostras de complexos</i>	55
1.15.2	<i>Incubação dos náuplios</i>	55
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
1.16	<i>Processos de obtenção dos complexos de Zn e análise espectroscópicas</i>	57
1.16.1	<i>Recuperação do complexo Zn(Valp)₂(Nic)₂ (1) e seu sal precursor Zn₂(Valp)₄</i>	57
1.16.2	<i>Elucidação estrutural do complexo 1</i>	57
1.16.2.1	<i>Análises dos espectros de FTIR do complexo 1 e o precursor Zn₂(Valp)₄</i>	58
1.16.2.2	<i>Análises de ¹H e ¹³CNMR do complexo 1 e do precursor Zn₂(Valp)₄</i>	61
1.16.2.3	<i>Análise de Espectrometria de Massas de Alta Resolução para os complexos 1 e seu precursor Zn₂(Valp)₄</i>	68
1.16.2.4	<i>Análise cristalográfica do complexo 1</i>	72
1.16.3	<i>Recuperação do complexo Zn₂(Diclof)₄(Nic)₂ (2) e seu sal precursor Zn(Diclof)₂</i> .	75
1.16.3.1	<i>Elucidação estrutural do complexo 2</i>	76
1.16.3.2	<i>Análise dos espectros de ¹HRMN e ¹³CRMN do complexo Zn₂(Diclof)₄(Nic)₂ e seu precursor Zn(Diclof)₂</i>	79
1.16.3.3	<i>Análise de ESI-MS em modo íons positivos para o complexo 2 e seu precursor</i> .	85

1.16.3.4	<i>Análise de difração de Raios X do complexo 2</i>	89
1.16.4	<i>Recuperação do complexo $Zn_2(Ibup)_4(Nic)_2$ (3) e seu sal precursor $Zn(Ibup)_2$</i>	92
1.16.4.1	<i>Análises dos complexo 3 e do precursor $Zn(Ibup)_2$</i>	93
1.16.4.2	<i>Análise de 1HRMN e ^{13}CNMR do complexo 3 e seu precursor $Zn(Ibup)_2$</i>	96
1.16.4.3	<i>Análise de ESI-MS para o complexo 3</i>	103
1.16.4.4	<i>Análise de difração de Raios-X do complexo 3</i>	106
1.16.5	<i>Análises espectrofotométricas dos perfis de absorção por UV-Vis e determinação das absortividades molares para os complexos 1, 2 e 3 e seus precursores</i>	109
1.16.5.1	<i>Análises dos coeficientes de absortividade molar para os complexos ternários e seus precursores</i>	111
1.16.6	<i>Determinação das condutividades molares dos complexos e as estabilidades químicas em solução ao decorrer do tempo</i>	112
1.16.6.1	<i>Determinação das estabilidades químicas dos complexos em solução</i>	113
1.16.7	<i>Determinação dos pontos de fusão dos complexos</i>	115
1.16.8	<i>Determinação das atividades antioxidantes via radical ABTS^{•+}</i>	116
1.16.9	<i>Análise das interações complexo metálico-DNA por dicroísmo circular</i>	118
1.16.10	<i>Análise da habilidade de quebra de DNA plasmidial de E. coli in vitro</i>	124
1.16.10.1	<i>Análise estatística dos testes de quebra de DNA induzida por radiação UV</i>	124
1.16.10.2	<i>Análise estatística para os experimentos de quebra de DNA plasmidial em ausência de luz</i>	131
1.16.11	<i>Análise das atividades toxicológicas in vitro frente à A. salina</i>	138
6.	CONCLUSÕES	142
	REFERÊNCIAS	144
	ANEXOS	154

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um medicamento novo demanda aproximadamente 15 anos e envolve investimentos na ordem de um bilhão de dólares. A principal razão que contribui para o alto custo está relacionado a toxicidade que a maioria das moléculas candidatas a fármacos apresenta, sendo descartadas durante as fases de testes I e II. Estatísticas mostram que apenas 0,1% das moléculas sintetizadas ou obtidas de fontes naturais testadas possuem potencial para se tornar um fármaco. Desta forma, dentre as abordagens modernas na busca de compostos ativos, está a estratégia de modificar quimicamente moléculas ativas, em modelos como bioisosterismo e hibridação molecular. Assim, existem muitos exemplos de melhoramentos significativos na eficácia terapêutica, do qual pode-se citar a acetilação do ácido salicílico (AS) para obtenção do ácido acetilsalicílico (AAS), onde obteve-se um fármaco mais tolerável ao trato gastrointestinal.

A síntese de complexos metálicos é abordagem recente para a obtenção de bioisómeros e fármacos hibridados. Os compostos de coordenação são moléculas com função química mista, os quais são compostos de moléculas orgânicas ligadas com um átomo metálico em um arranjo geométrico conhecido como esfera de coordenação. Uma justificativa para essa abordagem está no fato de compostos e coordenação serem importantes para a manutenção da vida. Entre os exemplos, podemos citar que organometálicos são utilizados como cofatores enzimáticos, em sítios ativos de enzimas, no transporte de oxigênio e nas metaloproteínas em sistemas biológicos. Os elementos ferro, manganês, cobre, molibdênio, zinco, cobalto e níquel são alguns dos mais presentes nos complexos biológicos.

A grande maioria dos fármacos possuem características polares afins para formação de complexos, com destaque para as moléculas com a função carboxilato como grupo farmacofórico. O ácido valproico ou AVP é um fármaco utilizado para controle da epilepsia, o qual tem sido modificado em sistemas bioisómeros nos últimos anos. Desde o seu lançamento

em 1978, o AVP tem sido um fármaco muito usado no tratamento de convulsões parciais e generalizadas em pacientes, atuando também como estabilizador do humor no tratamento de distúrbios bipolares e como moderador da enxaqueca. Esta molécula atua através de um mecanismo potencializador da atividade do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA). Apesar de bastante eficaz, o AVP possui apresenta efeitos adversos decorrentes das altas doses diárias na ordem de $60 \text{ mg kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ são bastante comuns. A taxa de metabolização do fármaco pelo fígado pode representar 80% da dose administrada, a qual induz a distúrbios hepáticos produzidos por metabólitos citotóxicos.

Outra classe de moléculas com características favoráveis à formação de complexos metálicos são os anti-inflamatórios não esteroides, ou AINEs. Os AINEs compreendem a mais extensa e disseminada classe de fármacos da história da indústria farmacêutica, destacando-se o diclofenaco na família dos acetatos e o ibuprofeno na família dos propionatos. O diclofenaco é um AINE potente não seletivo desenvolvido na década de 1970 como um medicamento de alta tolerância destinado ao tratamento de sintomas de processos inflamatórios crônicos como a artrite reumatoide. Na forma farmacêutica sólida para via oral, o diclofenaco é administrado em doses que variam de 20 à 50 mg com rápida absorção pelo trato gastrointestinal caso não esteja solubilizado em comprimido de liberação controlada, com uma taxa de metabolização de primeira passagem podendo atingir 50% da dose na primeira hora.

O ibuprofeno é um AINE menos potente que o diclofenaco, porém é mais tolerável e eficaz para o tratamento de enxaquecas e dores musculares sem produzir os efeitos adversos gástricos comuns do ácido acetilsalicílico. Foi introduzido no mercado no final da década de 1960 e atualmente é listado como um medicamento essencial pela Organização Mundial da Saúde, sendo comercializado em doses de até 600 mg para via oral. Tal qual o diclofenaco, o ibuprofeno também é biotransformado pelo efeito de primeira passagem resultando em uma série de metabólitos que são excretáveis pela urina.

A propriedade farmacológica e físico-química destes fármacos torna-os ótimos candidatos para a pesquisa e o desenvolvimento de bioisósteros pela habilidade em produzir complexos com metais de transição. A produção de fármacos sob a forma de complexos com metais de transição apresenta algumas vantagens sobre o bioisosterismo clássico porque não demanda modificações na estrutura molecular básica, valendo-se apenas das propriedades químicas de base de Lewis da função carboxilato como um ligante de valência capaz de formar interações covalentes altamente polarizadas com o metal, porém não é facilmente dissociável. Além disso, a natureza de um metal como o Zn^{2+} proporciona a expansão da esfera de coordenação para acomodar outros ligantes neutros por coordenação, abrindo possibilidades para desenvolver complexos ternários com duas espécies bioativas na mesma estrutura molecular. Neste contexto, a nicotinamida é uma ótima opção a ser usada como ligante extra ao complexo com AINEs e o valproato por tratar-se de uma vitamina essencial de segurança comprovada, além de apresentar capacidade de captação de radicais livres e atividade anti-inflamatória comprovada pela literatura.

No entanto o desenvolvimento de bioisósteros derivados de metais de transição é um desafio, para que o complexo formado não apresente toxicidade com boa biodisponibilidade e estabilidade. Desta forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de novos complexos metálicos do zinco II com moléculas AINES, valproato e vitamina B3 pelos princípios de bioisosterismo e hibridação molecular e testar a capacidade de interação com DNA e a toxicidade aguda frente à *Artemia salina* a fim de obter-se moléculas com potencial de tornar-se novos fármacos.

2. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

- O presente trabalho teve como objetivo obter compostos de coordenação de zinco II com moléculas anti-inflamatórias não esteroides, valproato e nicotinamida, caracterizá-los quimicamente, além de verificar as propriedades de interação com DNA e toxicológicas *in vitro*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter complexos ternários de zinco II com as bases dos fármacos diclofenaco, valproato e ibuprofeno e o ligante nicotinamida a partir de reações de complexação em solução;
- Determinar as estruturas químicas dos compostos por diferentes ferramentas analíticas: Espectrofotometria de ultravioleta e visível (UV-Vis), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia de ¹H RMN e ¹³C RMN, Espectrometria de Massas (MS) por ESI-TOF-MS (+), Difractometria de Raios X de monocristal;
- Avaliar a estabilidade química dos complexos em solução por condutimetria;
- Avaliar a capacidade redutora dos complexos pelo método do radical ABTS^{•+};
- Avaliar as habilidades de quebra de DNA plasmidial e *in vitro* pela técnica de eletroforese em gel;
- Avaliar a capacidade de interação DNA-complexo pela metodologia de Espectroscopia de Dicroísmo Circular.
- Avaliar a atividade tóxica *in vitro* dos complexos pelo Teste de *Artemia salina* (TAS).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

1.3 Compostos de coordenação

Um composto de coordenação pode ser descrito como um sistema coordenado contendo um átomo metálico e um ligante, que pode ser de natureza orgânica ou inorgânica (SHRIVER, 2008). A definição clássica representa os complexos ou compostos de coordenação como resultado de um mecanismo doador-aceptor de elétrons, ou de uma reação ácido-base de Lewis entre dois ou mais compostos químicos diferentes que mantem-se ligados por ligações de valência e ligações de coordenação (SINKO, 2008). A propriedade de coordenação é resultado da alta energia de ligação dos orbitais do subnível *d*-vazios dos metais de transição (deficientes de elétrons) na presença de espécies eletronegativas (oxigênio, nitrogênio) dotadas de orbitais híbridos *sp* ou *p*-ligantes com pares de elétrons livres ou desemparelhados disponíveis para ligação. Deste modo, os elementos eletronegativos das famílias 14, 15, 16 e 17 ligam-se com a maioria dos metais da tabela periódica (famílias 3-12) para formarem arranjos iônicos e moleculares com inúmeras propriedades (SHRIVER, 2008).

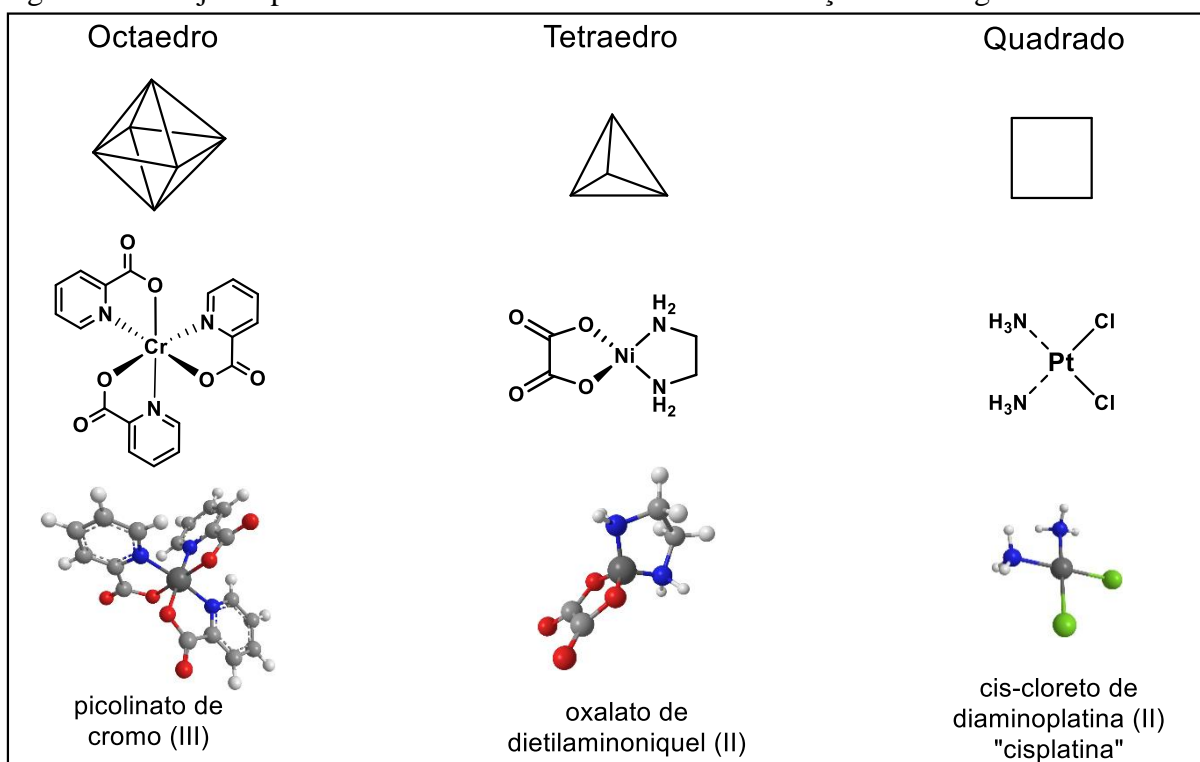
A teoria de Werner postula que as ligações coordenadas são formadas entre os ligantes e o íon metálico central do complexo, isto é, o ligante doa um par de elétrons ao íon metálico. Compostos de coordenação podem ser formados facilmente com os metais de transição, pois estes possuem orbitais *d* vazios que podem acomodar os pares de elétrons doados pelos ligantes. O número máximo de ligações coordenadas que um átomo metálico comportará vai depender do número de orbitais vazios de energia mínima adequada para a ligação ocorrer. A regra do Número Atômico Efetivo (NAE) diz que quando se forma um complexo, há adição de ligantes até que o número de elétrons do átomo metálico central mais o número de elétrons cedidos pelos ligantes sejam iguais ao número de elétrons do gás nobre seguinte. Embora a regra do NAE possa prever corretamente o número de ligantes de um grande número de complexos, há um número considerável de exceções, nas quais o NAE não é o número de elétrons de um gás

nobre. A tendência em adquirir a configuração do gás nobre é um fator importante, mas não uma condição necessária para a formação de um complexo, pois é necessária também a formação de uma estrutura simétrica qualquer que seja o número de elétrons envolvidos (AYALA, 2014).

Compostos moleculares neutros ou ânions livres coordenam o átomo metálico em um sistema denominado esfera de coordenação, no qual o átomo metálico ocupa o centro geométrico da esfera com os grupos ligantes ocupando a periferia em um posicionamento ordenado de modo a produzir o arranjo espacial mais estável (Figura 1). A conformação do arranjo espacial depende do nox do íon metálico, do nível da camada de valência e da natureza do ligante (MÜLLER, 2006).

O arranjo dos ligantes ao redor do íon central é influenciado também pelo tamanho do ligante, da natureza do ânion e em alguns casos do procedimento de síntese utilizado. Os principais fatores que influem na distribuição dos ligantes ao redor do átomo central são a repulsão mútua entre os ligantes e os impedimentos estéricos dos ligantes polidentados. Estes fatores revestem-se de importância especial devido à natureza da ligação átomo central-ligante. O poliedro de coordenação ao redor de um íon central pode ser estudado calculando-se a configuração de equilíbrio de qualquer número de partículas idênticas (átomos doadores) a uma mesma distância do íon central, ou seja, restritas a uma superfície esférica de raio unitário e interagindo com forças deriváveis de um potencial interpartículas, ou seja, a energia de repulsão ligante-ligante (JOHN DAVID LEE, 1999).

Figura 1. Arranjos espaciais mais comuns da esfera de coordenação metal-ligantes



Fonte: Adaptado de MÜLLER, 2006.

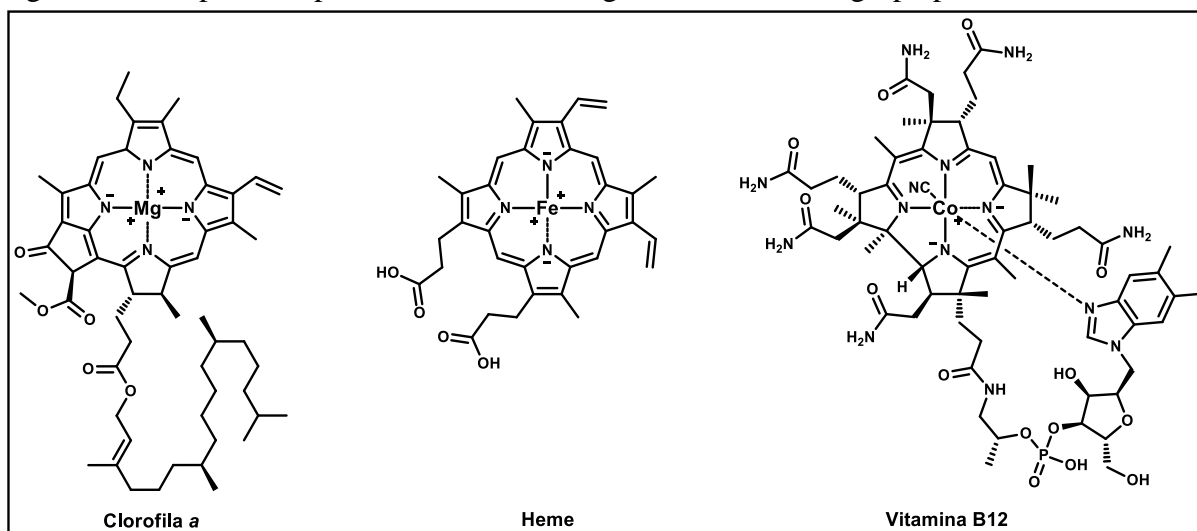
1.4 As funções dos compostos de coordenação nos sistemas biológicos

Uma grande parcela de todos os metais existentes na litosfera ocorre na forma de minerais. Os minerais em sua maioria são complexos inorgânicos cristalinos geralmente compostos por óxidos, sulfetos, carbonatos e silicatos de metal oxidado (MÜLLER, 2006). À medida que ocorre a mobilização dos metais a partir dos minerais por lixiviação, os sistemas biológicos os assimilam como nutriente. Os metais de transição são integrados aos sistemas biológicos por assimilação na forma inorgânica e os empregam na biossíntese de organocomplexos para o desempenho de funções metabólicas (ATKINS, 2012).

Os complexos com funções biológicas mais conhecidos são as moléculas de metal-porfirina (ZHANG & LASH, 2003). As clorofilas (Figura 2) compreendem os pigmentos fotossintetizantes dos seres autotróficos dotadas de um grupo porfirina funcionalizado por um centro reativo de Mg^{2+} (WOODWARD, 1960) ativável por radiação visível. As reações fotossintéticas de $CO_2 + \text{clorofila} + H_2O$ produzem toda a reserva energética basal da biosfera

pela biossíntese dos carboidratos, além de todo o O_2 atmosférico. Nos vertebrados ocorrem as metaloproteínas carreadoras hemoglobina e mioglobina, que são complexos de Fe^{2+} -porfirina responsáveis pelo transporte de O_2 às células e pela remoção do CO_2 produzido pela respiração (WEED; REED; BERG, 1963). A cianocobalamina, ou vitamina B12 é uma enzima com o centro ativo composto por uma estrutura complexada de Co^{3+} -porfirina. Esta vitamina é produzida por microrganismos e transferida através da cadeia alimentar, sendo essencial para eritropoiese, ou gênese de células sanguíneas na medula óssea de mamíferos (WICKRAMASINGHE, 1995).

Figura 2. Principais complexos metálicos biológicos derivados do grupo porfirina.



Fonte: Adaptado de WOODWARD, 1960.

A maior diversidade de elementos do bloco *d* com função biológica está nas metaloproteínas. Estas macromoléculas possuem ao menos um átomo metálico como cofator e desempenham funções variadas que vão desde a transferência de elétrons para complexos enzimáticos vizinhos à atividade catalítica pura (MATSUMOTO & JASANOFF, 2013). A atividade catalítica de uma metaloenzima está relacionada à natureza do metal e à labilidade dos complexos ativados do mecanismo catalítico. O metal mais abundante das metaloproteínas é o ferro, seja pela abundância deste elemento no planeta ou pelas propriedades físico químicas

favoráveis às reações catalíticas. O baixo potencial redox entre as espécies Fe^{2+} e Fe^{3+} (-0,77 V) (HAYNES; LIDE; BRUNO, 2016) é uma propriedade intrínseca deste elemento, a qual é responsável pela função de transferência eletrônica da rubredoxina (bactérias) (SANTOS et al., 2010) e da atividade redox dos citocromos. Por ser um nutriente de alta demanda para os vertebrados, uma grande parcela do ferro é reciclado e armazenado na ferritina, uma metaloproteína responsável pela reserva de ferro no fígado, do qual disponibiliza para a síntese de hemoglobina e mioglobina (DUBIEL et al., 2014).

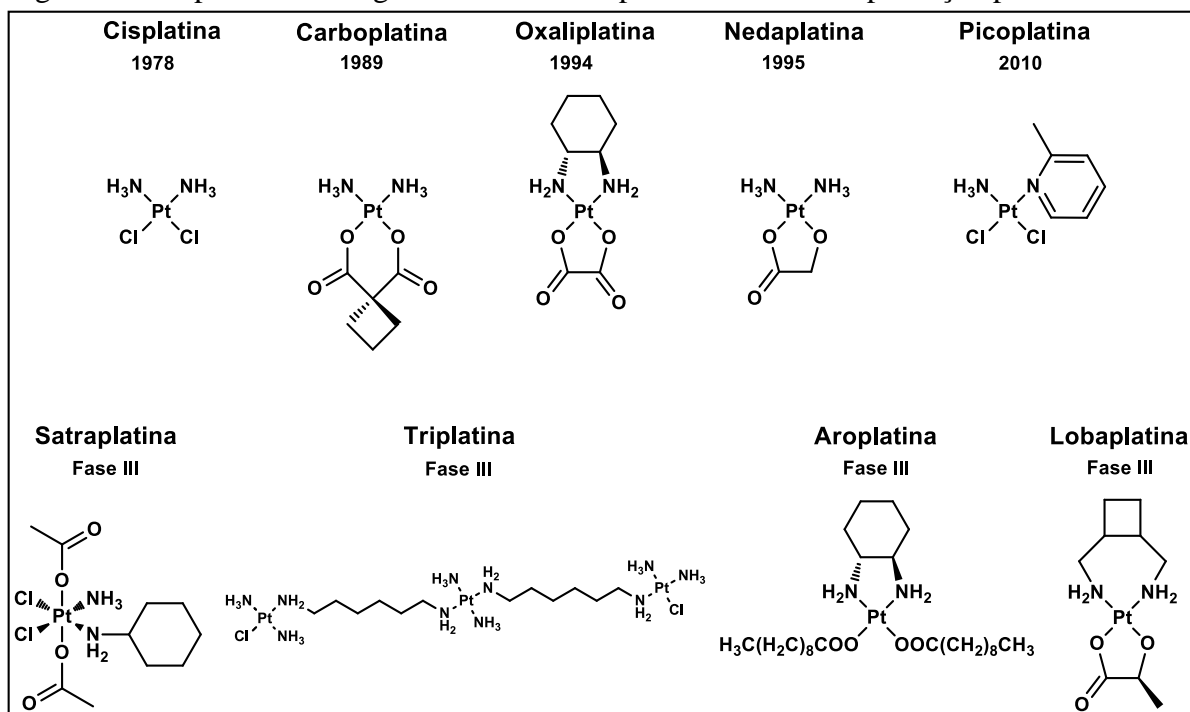
O cobre é outro elemento presente em metaloproteínas de transferência eletrônica. A plastocianina é um componente da cadeia de transferência de elétrons capturados pela clorofila na fotossíntese. A ligação do Cu (II) com átomos de enxofre de aminoácidos cisteína compreende o centro catalítico da plastocianina (FARKAS & HANSSON, 2011). Os animais possuem a ceruloplasmina como transportador sérico de Cu^{2+} como complexo proteico (VASSILIEV; HARRIS; ZATTA, 2005). O molibdênio está presente no centro catalítico de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio. A xantina oxidase, uma enzima ativa na oxidação de xantinas e purinas para produção do ácido úrico no metabolismo do final do nitrogênio (SOKOLOVSKA et al., 2013). Outros elementos, como Zinco, Cobalto, Níquel, Cádmio, Manganês e Vanádio compreendem centros catalíticos de inúmeras metaloenzimas com atividade redox (MATSUMOTO & JASANOFF, 2013).

1.5 Fármacos produzidos com metais de transição

No contexto histórico, a cisplatina (Cloreto de cis-diaminoplatina II) foi a primeira molécula puramente inorgânica a ser utilizada como fármaco no tratamento do câncer. Hoje, é um medicamento oncológico de primeira linha para o tratamento de câncer de ovário e esôfago. Seu mecanismo de ação ocorre por intercalação à α -hélice do DNA por complexação, geralmente às bases de guanina, induzindo às quebras duplas de cadeia e consequente apoptose da célula (LORUSSO et al., 2014). Após o advento da cisplatina em 1978, muitas pesquisas

foram desenvolvidas com o intuito de obterem-se novos complexos análogos à cisplatina para o tratamento de outros tipos de câncer. A Figura 3 destaca algumas moléculas derivadas da cisplatina, bem como o ano da aprovação do Food and Drug Administration (FDA) ou o estágio de desenvolvimento da pesquisa (MONNERET, 2011). A versatilidade química da cisplatina permite estudos variados, como no caso da Lipoplatina (cisplatina lipossomal), uma mistura derivatizada com 8,9% cisplatina e 91,1% de uma combinação de lipídios (dipalmitoil-fosfatidil-glicerol, cloridrato de soyfosfatidil-colesterol e metóxi-poliestilenoglicol-distreatoil-fosfatidil-etanolamina) com o intuito de melhorar a lipossolubilidade do fármaco no tratamento de tumores resistentes à cisplatina (FROUDARAKIS et al., 2011). A lipoplatina, uma nanopartícula lipossomal de cisplatina encontra-se em fase I e II de desenvolvimento (BOULIKAS, 2009). O caso dos complexos da platina é um exemplo clássico de pesquisas de melhoramento de medicamentos conhecidos (KALUĐEROVIĆ et al., 2012).

Figura 3. Complexos oncológicos derivados da platina e o ano de aprovação pelo FDA.



Fonte: Adaptado de MONNERET, (2011).

Hoje muitos compostos de coordenação são usados como suplementos dietético para reposição do nível basal de alguns metais considerados essenciais. O complexo repositivo de

metal mais utilizado é o sulfato de ferro II heptahidratado para o tratamento da anemia tipo ferropriva, seja por casos de desnutrição ou por hemorragias. O gluconato de ferro II e o succinato de ferro II são também utilizados com o mesmo propósito (VIETH & LANE, 2014). Os complexos nicotinato de cromo III e picolinato de cromo III são suplementos alimentares do elemento-traço Cr (III) para tratamento de diabetes tipo II. O suplemento deste elemento produz efeitos positivos para o plasma, aumentando os níveis das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e reduzindo os níveis de colesterol e triglicérides livres. Também induz ao incremento de massa corporal, sendo indicado apenas para praticantes de exercícios físicos regulares (BROADHURST et al., 1997).

Os complexos de vanádio têm sido objeto de pesquisas para o desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento do diabetes. Os primeiros relatos do uso de sais de vanádio IV com resultados positivos frente à diabetes datam do ano de 1899, porém após 100 anos ainda não existe um fármaco comercial disponível (THOMPSON & ORVIG, 2006). As pesquisas atuais apresentam resultados positivos para alguns complexos de vanádio IV com atividade mimética à insulina, como o Bis(Maltolato)-Oxovanádio IV e o (VO)₂-EDTA (BARBOSA, 2004). O desenvolvimento destes complexos representa alternativa à insulina e agregam qualidade de vida do paciente, uma vez que se reduz o desconforto das aplicações injetáveis de insulina.

No âmbito dos antibióticos, a citotoxicidade dos metais pesados é bastante explorada. O principal exemplo é o Timerosal (Etil(2-mercaptopbenzoato-(2)-)-O,S)mercurato (I) de sódio) um complexo organometálico de mercúrio que foi utilizado por muitos anos como princípio ativo do antisséptico Merthiolate[®] e como conservante de vacinas, lançado em 1927. O uso do Timerosal está sendo substituído pela criopreservação das vacinas, porém ainda é um conservante viável para os sistemas de saúde de países sem infraestrutura que garanta a conservação das doses (IDA-ETO et al., 2013).

Um campo de aplicação de complexos organometálicos é o uso como contraste para exames de diagnóstico de imagem. Muitas ferramentas avançadas para diagnóstico dependem de elementos metálicos com características especiais, contudo a forma mais eficiente para reduzir a toxicidade destes metais está na formação de complexos que reduzem a interação química do elemento. O complexo de Gadolínio (elemento terra-rara paramagnético da série dos lantanídeos) $\text{Gd}(\text{DTPA})\cdot\text{H}_2\text{O}$ é muito utilizado em exames de Ressonância Magnética de imagem na forma de solução injetável intravenosa (ZHOU et al., 2012). A eventual toxicidade do elemento é mascarada pelo ligante DTPA, um quelante poli dentado que mantém o metal quimicamente isolado e permite a excreção sem metabolização (ZOLAL et al., 2012). Os exames de cintilografia usam os complexos de tecnécio metaestável. O ^{99}Tc é complexado a uma molécula característica do metabolismo do órgão a ser examinado e é administrado ao paciente. O complexo metálico inocula-se no órgão e o metal produz emissões de raios γ por decaimento nuclear, onde a densidade de emissões é capturada e traduzida como imagem. O complexo $^{99\text{m}}\text{Tecnécio}$ Sestamibi (Hexakis(2-metóxi-2-metilproplisonitrila) $^{99\text{m}}\text{Tc}$) comercializado como Cardiolite® é utilizado na forma de solução intravenosa para exames de imagem do músculo cardíaco (MUJTABA et al., 2007).

1.6 Zinco

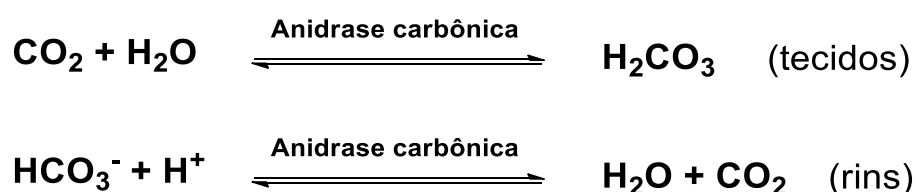
O zinco é classificado como metal de transição e ocorre naturalmente na forma oxidada Zn^{+2} . Existem cinco isótopos naturais estáveis: ^{64}Zn (48,63%), ^{66}Zn (27,90%), ^{67}Zn (4,10%), ^{68}Zn (18,75%) e ^{40}Zn (0,62%) o que dá ao zinco a massa atômica média de 65,409 Da (HAYNES; LIDE; BRUNO, 2016). A espécie oxidada Zn^{+2} é predominante tanto para as funções metabólicas nos sistemas biológicos como para aplicações como reagente em química. Assim como o cobre, o zinco é um ácido de Lewis forte ligando-se preferencialmente com bases de Lewis fortes, como óxido, sulfeto e bases nitrogenadas (ATKINS, 2012). Este elemento

possui características químicas que o tornam altamente suscetível à formação de complexos com até seis ligantes diferentes.

O zinco é um elemento dietético essencial para os animais. A concentração média de zinco em humanos adultos é de 32,86 mg Kg⁻¹, colocando-o como o segundo metal de transição mais abundante, inferior apenas ao ferro, que representa 60 mg Kg⁻¹(HAYNES; LIDE; BRUNO, 2016).

Após o cobre, o zinco é o ácido de Lewis intracelular mais forte, coordenando-se principalmente a grupos tióis de cisteína e resíduos nitrogenados de imidazol em proteínas (BLENCOWE; MORBY, 2003). O Zn⁺² é um dos íons mais importantes para os sistemas biológicos sendo essencial para a atividade de mais de 300 enzimas presentes em mais de 50 reações celulares (HIJAZI; DARAWSHEH; RAPPOCCIOLO, 2013). As anidrases carbônicas são metaloenzimas de zinco presentes nos músculos, sangue, fígado, rins e secreções dos mamíferos. A função básica deste grupo de enzimas é regular a concentração de prótons (acidez) do citosol, mitocôndrias, membranas celulares e fluidos pela captura de prótons via reação de equilíbrio ácido-base (STILLEBROER et al., 2010). A reação de equilíbrio (Figura 4) entre o ácido carbônico, o bicarbonato e o dióxido de carbono na presença de água é controlada pela anidrase carbônica para manter o pH do meio equilibrado.

Figura 4. Esquemas de reações de equilíbrio controlada pela anidrase carbônica.



As carboxipeptidases são metaloenzimas de zinco com função de hidrólise proteica com ação nos terminais carboxilatos do peptídeo. Estão presentes no trato gastrointestinal para digestão da proteína do alimento e também no citosol para o catabolismo proteico. Estas reações

catalíticas são utilizadas pela célula como fator de crescimento (mudança de fase G0 para G1) e na biossíntese de peptídeos de função hormonal, como a insulina (JAUREGUI et al., 1988). Nos demais casos, o Zn (II) atua como cofator para ativação enzimática.

1.7 Nicotinamida

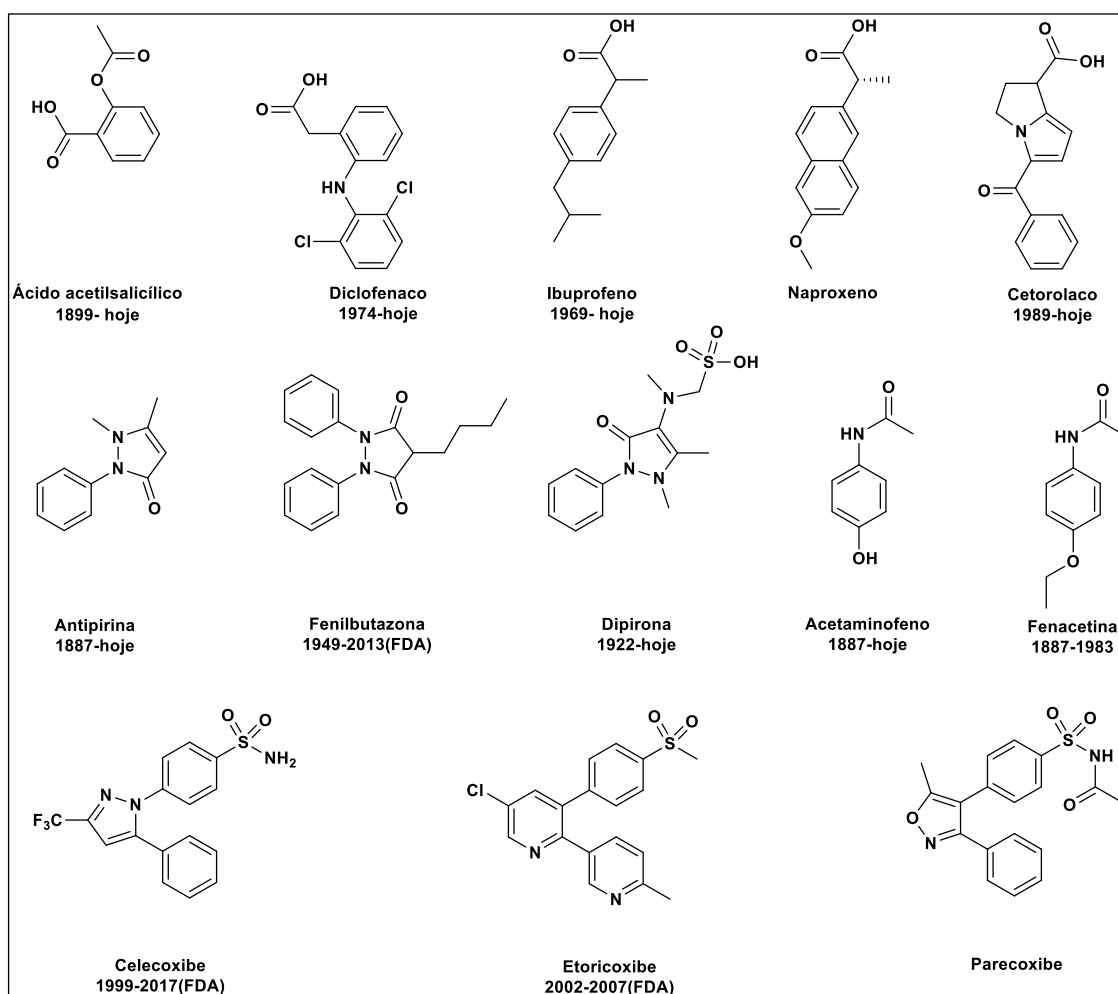
A nicotinamida (niacinamida, Nic) é um composto essencial componente do complexo vitamínico B3 (nicotinamida + ácido nicotínico). Na lista dos medicamentos essenciais da organização mundial da saúde (OMS), a nicotinamida está ranqueada como um dos medicamentos mais seguros e efetivos do sistema de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). É um composto essencial produzido endogenamente pelo catabolismo do triptofano, porém os níveis basais precisam serem supridos dieteticamente com o consumo de alimentos de origem animal, com uma contribuição menor dos vegetais (ROLFE, 2014). A nicotinamida é essencial na forma das coenzimas NAD^+/NADH e $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, na qual a parcela representada pela nicotinamida funciona como um acceptor de hidreto em reações catabólicas ou, como um doador de hidreto em reações anabólicas (DE MARIA; MOREIRA, 2011). A deficiência no complexo vitamínico B3 leva à enfermidades como a pelagra (HEGYI; SCHWARTZ; HEGYI, 2004).

Na classificação química, a Nic é uma molécula derivada da piridina com características de base de Lewis, ou seja, possui propriedades de ligante frente à cátions metálicos (ácidos de Lewis) para formação de compostos de coordenação. O átomo de nitrogênio imínico (hibridização sp^2) da função piridina coordena-se facilmente à ácidos de Lewis fortes como zinco II (SHRIVER, 2008) para produzir espécies químicas mistas mono coordenadas com ligação metal-ligante com comprimento médio de 2,06 Å (ÍDE; ATAÇ; YURDAKUL, 2002).

1.8 Fármacos anti-inflamatórios não-esteroides

Os fármacos anti-inflamatórios não-esteroides ou AINEs (NSAIDs do inglês) compreendem uma família de moléculas inibidoras das enzimas ciclooxigenases (COX) mediadoras de processos inflamatórios (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2012). O mecanismo de ação desta classe de fármacos baseia-se na inibição competitiva das COX e bloqueia a conversão do ácido araquidônico em mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas. Esta classe de fármacos representa a maior porção do mercado farmacêutico, sendo os medicamentos sintéticos mais consumidos da história (LONAPPAR et al., 2016).

Figura 5. Estruturas de fármacos AINEs mais comuns

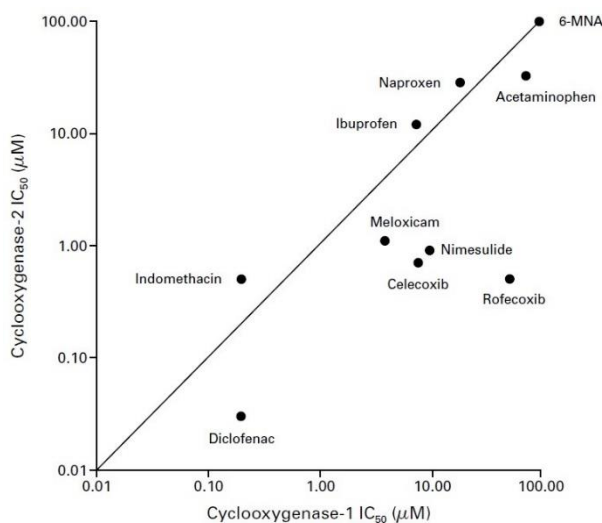


Fonte: (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011; SWEETMAN; BLAKE, 2009)

A

Figura 5 mostra as classes mais comuns de AINEs de ação não-específica composta pelos derivados do ácido acético e ácido propiônico, pirazolonas e acetanilidas, além dos coxibes com ação específica para COX-2 dentre as quais os fármacos de ação não-específica são os mais difundidos no mercado, como o AAS, o paracetamol, o diclofenaco e o ibuprofeno (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Os AINEs de ação não específica são considerados fármacos de primeira geração e apresentam efeitos adversos produzidos especialmente pela inibição da COX-1, também responsável pela produção de muco estomacal e dos tromboxanos de agregação plaquetária. Estes efeitos são observados na administração do AAS, cuja a redução do tromboxano produz efeitos na reologia do sangue pela diminuição da viscosidade e produzindo efeito terapêutico no tratamento de quadros de trombozes (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011). Os coxibes são inibidores seletivos da COX-2 (Figura 6) e considerados AINEs de segunda geração, porém estudos recentes apontam para o aumento do risco de doença cardíaca em razão do uso desta classe de fármacos, sendo estes submetidos à controle de comércio pela FDA e ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2000).

Figura 6. Concentrações de vários fármacos necessárias para inibir a atividade de COX-1 e COX-2 em 50% (IC₅₀). Os fármacos plotados abaixo da linha diagonal são inibidores mais potentes da COX-2.

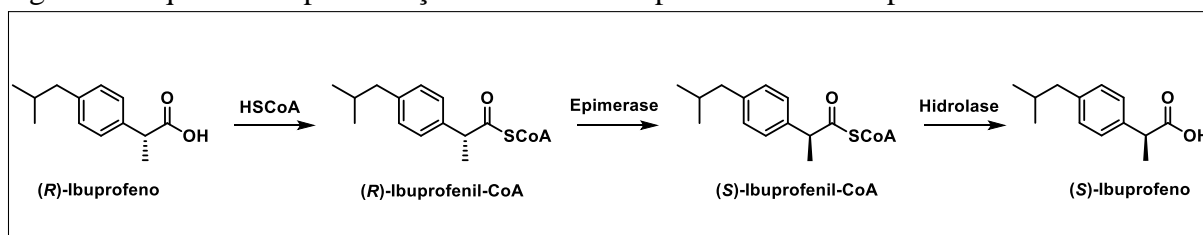


Fonte:(GARRET; FITZGERALG; CARLO PATRONO, 2001)

1.8.1 Ibuprofeno

O ibuprofeno ou ácido (*R,S*)-2-(4'-isobutilfenil)propanoico é conhecido como um dos fármacos mais seguros utilizados no momento para tratamento da dor, inflamação e febre. O desenvolvimento molecular e o extensivo uso clínico deste fármaco é considerada uma das histórias de sucesso da indústria farmacêutica (RAINSFORD, 1999). Trata-se de um AINE de uso extensivo administrado preferencialmente por via oral em composição sólida ou intravenosa. A forma enteral é absorvida pelo trato gastrointestinal com pico de concentração no plasma vindo a ocorrer entre 60 e 120 min, com uma proporção de ligação às proteínas do plasma variando de 90 à 99% e com meia-vida de 120 min. É rapidamente excretado pela urina na forma de metabólitos e seus conjugados, com 1% sendo excretado sem metabolização e 14% como metabólito conjugado como éster glicosilado (SWEETMAN; BLAKE, 2009). Sabe-se que apenas o enantiômero *S* é ativo e corresponde à 50% da dose, porém o enantiômero *R* sofre conversão seletiva à forma *S* no metabolismo hepático. Um processo enzimático produz um intermediário *R* tioéster com a Coenzima A (CoA), vindo a sofrer epimerização do carbono 2 com inversão absoluta do centro quiral por indução enzimática seguida de hidrólise à ácido carboxílico (Figura 7) (CHEN et al., 1991). Este mecanismo metabólico é seletivo apenas à forma *R* do ibuprofeno, porém não é exclusivo à este, sendo observado para todos os derivados ácidos de (*R*)-2-arylpropionato em mamíferos (TRACY; HALL, 1992). O ibuprofeno é comercializado na forma *S* enantiomericamente pura com o nome dexibuprofeno (SWEETMAN; BLAKE, 2009).

Figura 7. Esquema da epimerização seletiva do ibuprofeno inativo *R* para a forma ativa *S*



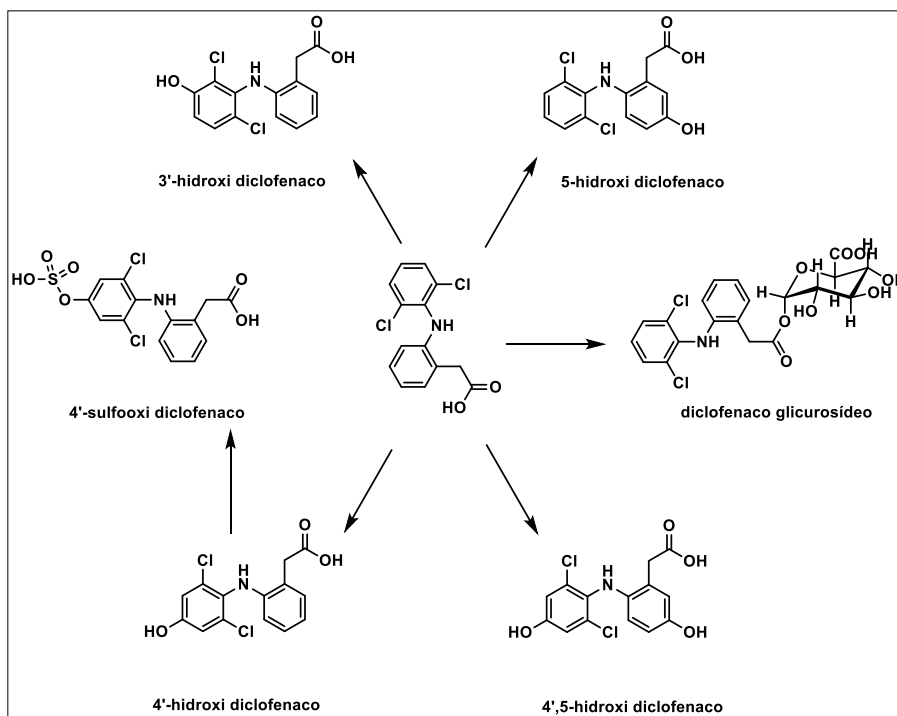
Fonte:(CHEN et al., 1991; TRACY; HALL, 1992).

1.8.2 Diclofenaco

O 2-(2-((2,6-diclotofenil)amino)fenil)acetato ou Diclofenaco é um fármaco AINE da família dos acetatos com larga aplicação por via oral sólida ou líquida, geralmente sob a forma de sal de Na^+ , K^+ , dietilamina e epolamina além de compor preparações injetáveis via intramuscular sendo um dos mais potentes AINEs de uso não controlado (Figura 6) (USP 32, 2008). É difícil estimar com precisão o consumo global anual de medicamentos à base de diclofenaco por muitas razões, destacando-se as diferentes denominações oficiais do fármaco, o uso humano e veterinário e o consumo não-registrado. Contudo, o Intercontinental Marketing Service (IMS) para dados de saúde calcula que em torno de 940 toneladas de diclofenaco são consumidas anualmente com base nos dados de 2007, dentre as quais 96% foram destinadas à indústria farmacêutica (LONAPPAR et al., 2016). Em 2012 o diclofenaco foi listado como a 12ª melhor molécula genérica do mercado mundial (ZHANG; GEISSEN; GAL, 2008).

Em termos farmacocinéticos, o diclofenaco é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal quando administrado pela via oral sendo parcialmente modificado pelo metabolismo de primeira passagem, porém em torno de 50% da concentração permanece inalterada na circulação sistêmica com 99% da dose mantendo-se ligada às proteínas plasmáticas com meias vidas em torno de 60 a 120 min. O diclofenaco é metabolizado principalmente em compostos oxidados, além do éster glicorusilado (Figura 8) (SWEETMAN; BLAKE, 2009).

Figura 8. Esquema para o processo de biotransformação do diclofenaco e a seus metabólitos mais comuns



Fonte: (SWEETMAN; BLAKE, 2009)

O ibuprofeno e o diclofenaco são AINEs derivados dos ácidos acético e propiônico respectivamente, com a função carboxilato como grupo farmacofórico em comum. A função química carboxilato é de grande interesse para a produção de bioisómeros por ser quimicamente ativa e permitir a obtenção de derivados incluindo os compostos de coordenação com íons metálicos por ligação de valência. A literatura apresenta uma série de publicações no início do século XXI onde o diclofenaco é utilizado como modelo para obtenção de complexos com íons metálicos do bloco *d*. Dois estudos de síntese publicados por KOVALA-DEMERTZI, (1998, 2000) apresentam uma série de complexos binários do diclofenaco com cátions divalentes de Mn, Co, Ni, Cu, Fe e Pd, onde verifica-se a formação de clusters binucleares com o carboxilato coordenando-se com ligações em ponte. Os autores destacam o aumento da atividade inibitória da COX com a adição de metal com características de ácido de Lewis. Em um estudo recente, HAMAMCI ALISIR et al., (2017) produziram complexos binários e ternários do diclofenaco com Ag^+ e ligantes nitrogenados com estruturas oligoméricas mono e binucleares com atividade antimicrobiana comprovada por ensaios *in vitro*.

1.9 Ensaios biológicos de toxicidade

1.9.1 *Artemia salina*

A. salina é um invertebrado da ordem Crustácea (Figura 9) que ocorrem em ambientes aquáticos salinos das regiões tropicais (JAYASEKARA; DROWN; SHARMA, 1986). Este organismo apresenta tolerância extrema às variações de salinidade do meio aquático, ocorrendo em lagunas salobras, mares e lagos altamente salino. É um elo na fauna destes ambientes, no qual é um núcleo no fluxo energético da cadeia alimentar. Em condições adversas (períodos de seca e alta salinidade) a *A. salina* reproduz-se produzindo ovos de casca grossa na forma de cistos. Os cistos desidratados permanecem dormentes por vários anos em ambiente seco, mantendo o embrião em estado completamente ametabólico. O metabolismo é ativado logo após a reidratação em solução salina, seguida dos eventos de eclosão do cisto e maturação do náuplio (MORRIS, 1971). Em média, o microcrustáceo atinge o estágio final de desenvolvimento de 36 a 48 h após a hidratação do cisto.

Figura 9. Micro crustáceo *A. salina*.



Fonte: (<http://www.warrenphotographic.co.uk/16392-brine-shrimp>, acesso em 04/03/2014).

A *A. salina* é altamente sensível à toxicidade do meio aquático. A poluição do meio por xenobióticos e metais pesados produz respostas imediatas nas populações do ecossistema. JAYASEKARA *et al.*, (1986) avaliaram o grau de tolerância bde *A. salina* quando exposta a concentrações elevadas de cádmio no meio, o que indicou intoxicação por incorporação e

metabolização do metal pesado. BROWNE (1979) avaliou a resposta da exposição aguda versus o desempenho reprodutivo de cinco cepas diferentes de *A. salina* frente às concentrações crescentes de CuSO_4 . A presença do íon metálico Cu^{2+} durante a fase reprodutiva das fêmeas reduziu a viabilidade dos cistos frente aos controles. Em todos os casos, o grau de intoxicação manifesta-se pelo grau de letalidade da população de *A. salina* por exposição aguda ao agente tóxico, o qual pode ser correlacionado com a concentração do agente. Esta sensibilidade é muito usada em laboratórios de pesquisa e controle como modelo confiável para estimar a toxicidade (CL50) de xenobiótico em águas, medicamentos e efluentes (LOGARTO PARRA et al., 2001). O teste de toxicidade com *A. salina* (TAS) é um ensaio biológico aplicado como ferramenta preliminar de avaliação de toxicidade aguda de xenobióticos com grandes vantagens sobre outros métodos por ser rápido, robusto, barato, fácil de reproduzir e por não demandar instrumentação sofisticada ou ambiente controlado (AMARANTE et al., 2011).

O ensaio TAS é muito aplicado na avaliação da toxicidade de produtos da matriz vegetais em geral, como óleos essenciais e extratos concentrados. MEYER et al., (1982) testaram a toxicidade aguda de extratos concentrados das sementes de 41 espécies de plantas e obtiveram correlações significativas entre a letalidade e as concentrações dos extratos. A CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental Paulista) utiliza o ensaio TAS padronizado pela ABNT como ensaio de citotoxicidade aguda para avaliação da toxicidade de efluentes e águas residuais (COSTA et al., 2008).

1.10 Ensaios de interação com DNA *in vitro*

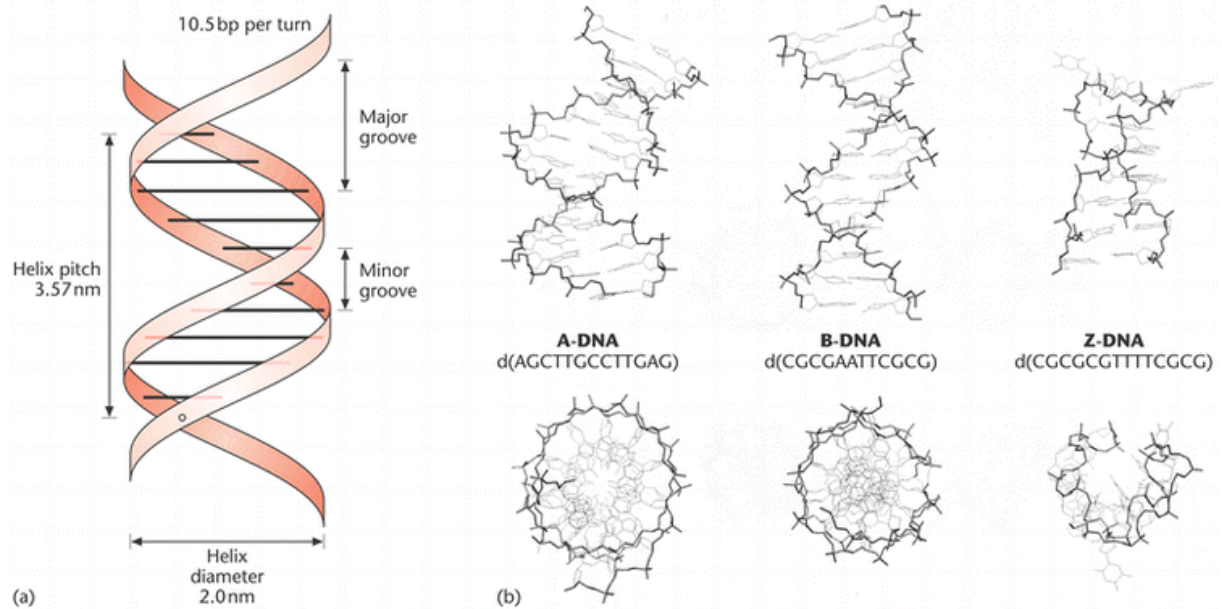
A genotoxicidade é um parâmetro primordial no desenvolvimento de um fármaco e está compreendida ainda na fase I da pesquisa (ANVISA, 2015). Os experimentos de genotoxicidade *in vitro* visam expor extratos biológicos ou microrganismos à molécula ou composto em estudo para categorizar o tipo de interação que possa ocorrer entre o composto e a hélice do DNA e extrapolar os resultados para o modelo animal. Mesmo que os modelos *in vitro* não possam

representar diretamente a escala ou a complexidade de um organismo pluricelular, estes testes são essenciais, pois indicam o provável grau de toxicidade do composto sem demandar o uso de animais. Os testes de genotoxicidade mais comuns que visam avaliar dano direto ao DNA utilizam alguns microrganismos como o teste de cometa e teste de Ames (formação de micronúcleo) (HALLING-SORENSEN et al., 1998). Outros testes de interação direta utilizam o DNA livre obtidos de organismos biológicos ou amplificado por PCR onde avaliam-se variações de propriedades físico-químicas da hélice exposta diretamente ao agente químico em estudo, tais como as propriedades ópticas de absorção de radiação ultravioleta e radiação plano-polarizada por dicroísmo circular.

O dicroísmo circular ou CD é uma técnica espectrofotométrica que utiliza a radiação UV com polarização circular capaz de interagir seletivamente com moléculas com alta taxa de quiralidade, como a dupla-hélice do DNA ou a α -hélice de proteínas (BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000). As interações xenobiótico-DNA ocorrem em diferentes modos e graus de agressividade, sendo as interações mais simples de atração eletrostática recíproca, seguidas pelas interações de sulco e as mais danosas sendo intercalações entre os pares de bases (BORTOLOTTI et al., 2011). A intercalação induz a formação de quebras na dupla-hélice, sendo o efeito genotóxico observado em estudos com moléculas planares eletropositivas como o benzeno, benzo-a-pireno e *o*-fenantrolina. Este mecanismo genotóxico é explorado por agentes quimioterápicos como a cisplatina para induzir à morte celular (KELLETT et al., 2012). O tipo de interação DNA-complexo é bem observável ao utilizar-se CT-DNA (Calt Thymus DNA), um polipeptídeo do tipo B-DNA com rotação à direita e com alta taxa de repetição G-C (Figura 10). Esta forma isolada de DNA interage fortemente com a luz plano polarizada para produzir uma banda negativa em λ 245 nm decorrente do grau de helicidade e uma banda positiva em λ 276 nm decorrente do grau de empilhamento dos pares de bases (BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000). As interações poderão então serem medidas pela variação

destas duas bandas de absorção, bem como pelo aparecimento de novas bandas de a partir de adições seriadas de solução de complexo.

Figura 10. Formas mais comuns de DNA de acordo com o tipo de empacotamento dos pares de bases. Em (a) é representada a dupla hélice do DNA tipo B com os parâmetros de medidas obtidos por difração de raios-X.



Fonte: (USSERY, 2002)

4. METODOLOGIA

1.11 Reagentes para síntese

Os processos de síntese demandaram o uso de insumos farmacêuticos, sais inorgânicos e solventes com purezas certificadas. Os fármacos diclofenaco de potássio, (*R,S*)-ibuprofeno e nicotinamida foram compradas da Sigma-Aldrich® com purezas $\geq 98\%$. O composto valproato de sódio foi obtido do fabricante AK Scientific® (USA). Os reagentes inorgânicos $ZnCl_2$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ e NaOH e os solvente etanol absoluto e dimetilformamida (DMF) foram obtidos de Sigma-Aldrich Vetec®. A água desmineralizada foi obtida de um purificador marca MilliQ® com condutividade basal de $0,055 \mu S \text{ cm}^{-1}$.

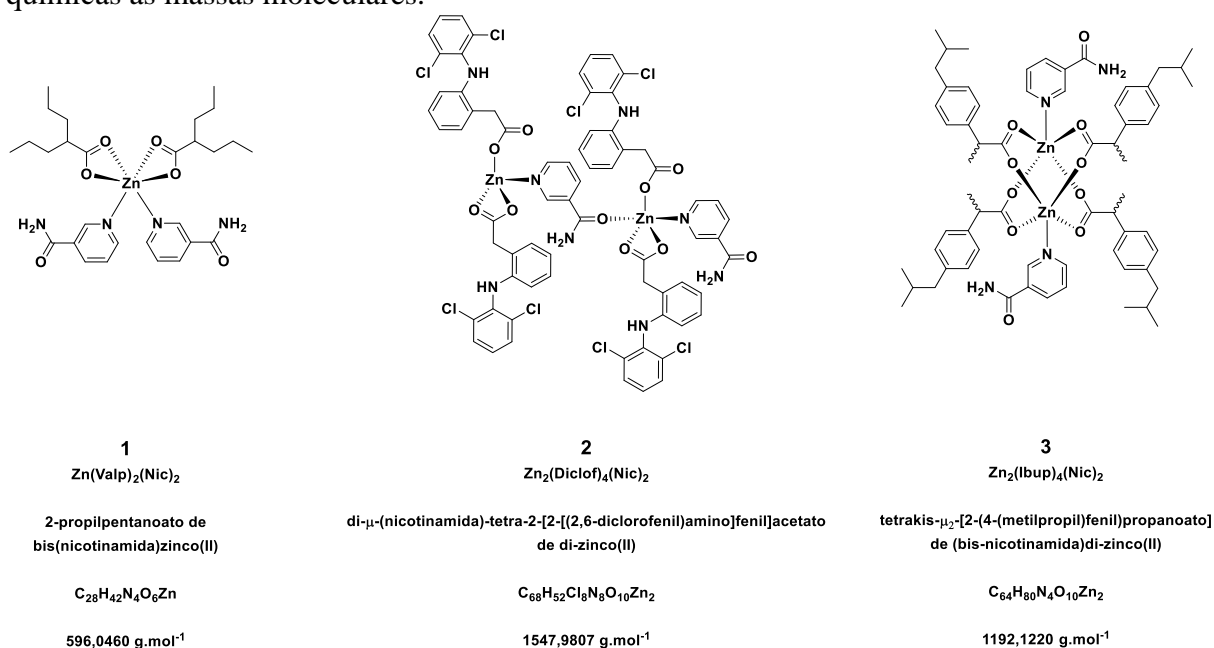
1.12 Equipamentos analíticos

Todos os reagentes orgânicos foram analisados por espectrometria de massas de alta resolução MicroTof QII (Bruker Daltonics) equipado com uma fonte de electrospray em modo positivo e negativo para verificação de impurezas. As estruturas foram confirmadas por análise de 1H e ^{13}C RMN em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear marca Bruker, modelo Fourier 300 equipado com probe para os núcleos de próton e ^{13}C operando à temperatura ambiente. Confirmaram-se também os pontos de fusão dos referidos compostos em fusiômetro capilar marca Fisatom® modelo 431. Os materiais de partida também foram analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em um espectrômetro Perkin-Elmer®, modelo Specrum 400 com amostra no estado sólido pelo método de pastilha de KBr. Análises de UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro Beckman DU 530 de feixe simples, com uso de cubetas de quartzo com caminho óptico de 10,0 mm em solvente THF.

1.13 Síntese e caracterização química dos complexos de zinco

Este capítulo apresenta as metodologias de síntese, purificação e caracterização estrutural dos três complexos ternários de zinco (Figura 11). As nomenclaturas dos complexos foram aplicadas de acordo com as recomendações de EISI et al., 2014, adaptadas das regras da IUPAC.

Figura 11. Estruturas químicas confirmadas dos três complexos ternários de zinco (II) com os códigos de identificação, nomenclaturas simplificadas, nomenclaturas IUPAC, fórmulas químicas e as massas moleculares.



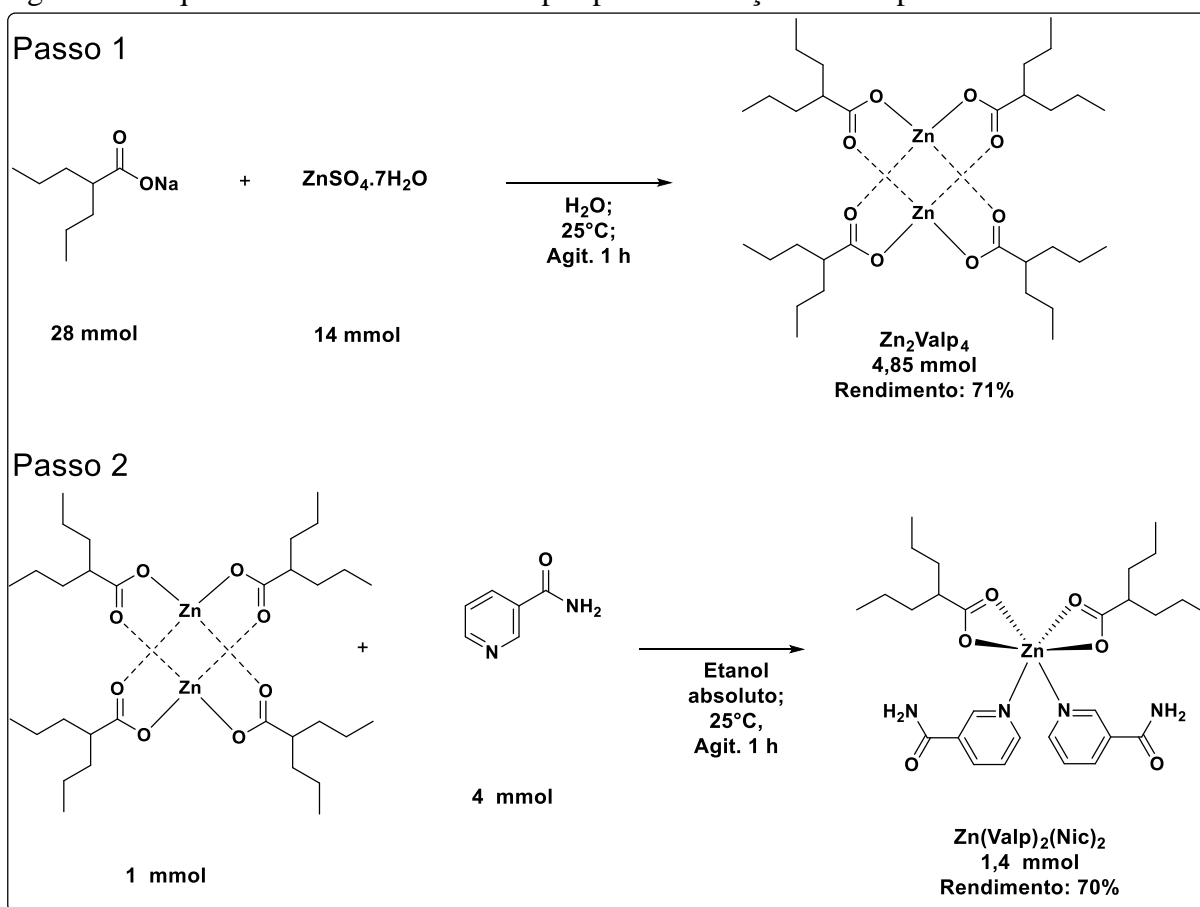
1.13.1 Síntese e obtenção do complexo $\text{Zn}(\text{Valp})_2(\text{Nic})_2$ (**1**)

A obtenção do complexo **1** deu-se em uma síntese de dois passos conforme descrito na Figura 12. O passo 1 foi realizado de acordo com a metodologia descrita por SANTOS, DOS et al., (2015) para a obtenção do precursor $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$, em uma reação de dupla-troca $\text{A} + \text{B} \rightarrow \text{C} + \text{D}$. Para tal, uma massa de 4,6508g de 2-propilpentanoato de sódio (valproato) (28 mmol) foi transferido para um frasco erlenmeyer de 500 mL de capacidade e dissolveu-se em 100 mL de H_2O Milli-Q. Uma segunda solução preparada com 4,0255 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (14 mmol) e 100 mL de H_2O Milli-Q foi adicionada gota a gota sobre a primeira sob agitação

magnética constante à temperatura ambiente. Um sólido branco finamente dividido formou-se em suspensão imediatamente após a adição do sal de zinco, com aumento de intensidade com o passar do tempo. Após 24 h de agitação, o produto sólido foi recuperado por filtração a vácuo, lavado com H₂O Milli-Q repetidas vezes para remoção de impurezas solúveis seguido de secagem forçada em liofilizador por 24 h. Ao final obtiveram-se 3,4124 g de massa seca, com rendimento estequiométrico de 71%.

O complexo ternário **1** foi obtido no passo 2 por reação de síntese do tipo $A+B\rightarrow C$. Uma massa de 0,7036 g de precursor Zn₂(Valp)₄ (1 mmol) foi solubilizada em 50 mL de etanol absoluto e filtrada em membrana filtrante de 0,45 micras para frasco erlenmeyer de 125 mL. Uma solução contendo 0,4885 g de nicotinamida (4 mmol) em 50 mL de etanol absoluto foi adicionada gota a gota sobre a solução do precursor sob agitação magnética constante. A agitação foi mantida por 2 h, na sequência foi concentrada à 25% do volume inicial em evaporador rotativo à 50 °C e reservada para cristalização. A solução foi mantida em repouso à temperatura ambiente com o frasco fechado, com a formação de cristais transparentes sendo observada após 1 h. Uma massa cristalina foi obtida após 60 h de repouso, a qual foi recuperada por filtração à vácuo, lavada duas vezes com etanol absoluto para remoção de material não reagido e secados em liofilizador por 24 h. Obtiveram-se 0,8345 g de massa seca, com rendimento estequiométrico de 70%.

Figura 12. Esquema reacional em duas etapas para a obtenção do complexo **1**.



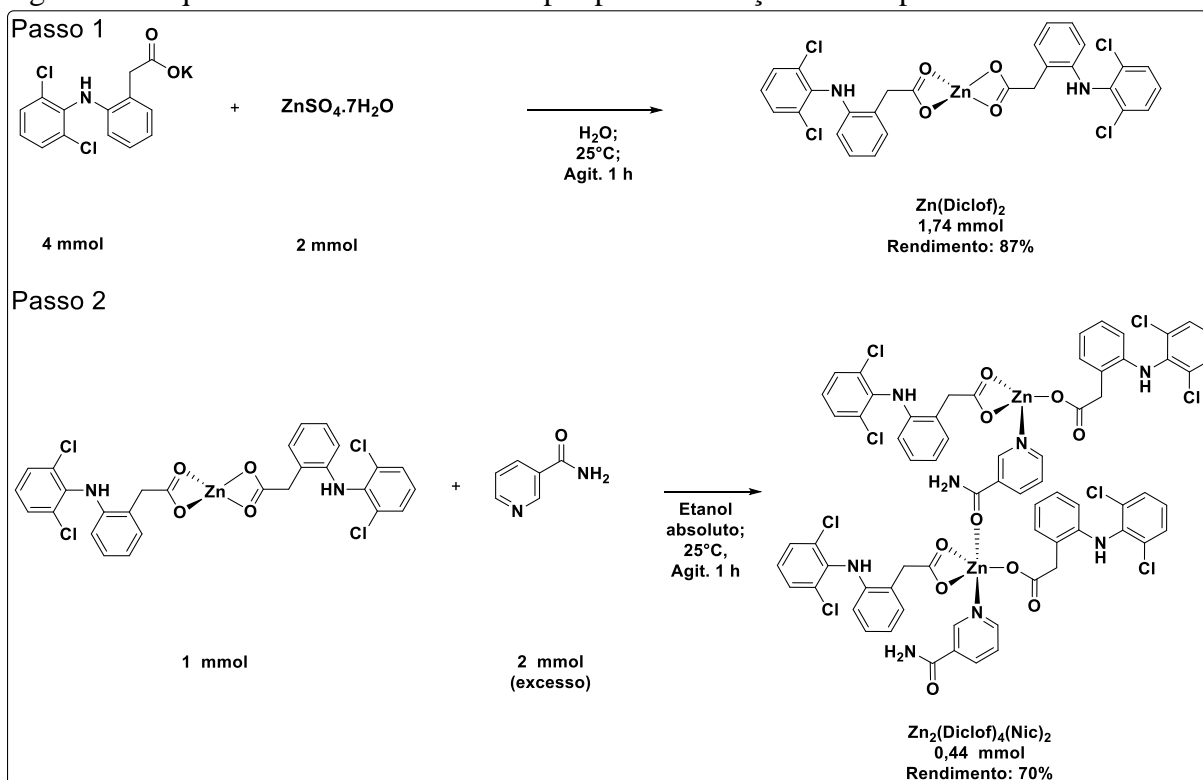
1.13.2 Síntese e obtenção do complexo $\text{Zn}_2(\text{Diclof})_4(\text{Nic})_2$ (**2**).

A obtenção do complexo **2** deu-se em uma síntese de dois passos conforme descrito na Figura 13. O passo 1 foi realizado de acordo com a metodologia descrita por ABU ALI & JABALI, 2016 para a obtenção do precursor $\text{Zn}(\text{Diclof})_2$, em uma reação de dupla-troca $\text{A} + \text{B} \rightarrow \text{C} + \text{D}$. Para tal, uma massa de 1,3368 g de 2-[2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil]acetato de potássio (diclofenaco) (4 mmol) foi transferida para um frasco erlenmeyer de 250 mL de capacidade e dissolveu-se em 100 mL de H_2O Milli-Q. Uma segunda solução preparada com 0,5758 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol) e 100 mL de H_2O Milli-Q foi adicionada gota a gota sobre a primeira sob agitação magnética constante à temperatura ambiente. Um sólido branco finamente dividido formou-se em suspensão imediatamente após a adição do sal de zinco, com

aumento de intensidade com o passar do tempo. Após 24 h de agitação, o produto sólido foi recuperado por filtração a vácuo, lavado com H₂O Milli-Q repetidas vezes para remoção de impurezas solúveis seguido de secagem forçada em liofilizador por 24 h. Ao final obtiveram-se 1,1408 g de massa seca, com rendimento estequiométrico de 87%.

O complexo ternário **2** foi obtido no passo 2 por reação de síntese do tipo $A+B\rightarrow C$. Uma massa de 0,6556 g de precursor Zn(Diclof)₂ (1 mmol) foi solubilizada em 50 mL de etanol absoluto e filtrada em membrana filtrante de 0,45 micras para frasco erlenmeyer de 125 mL. Uma solução contendo 0,2443 g de nicotinamida (2 mmol) em 50 mL de etanol absoluto foi adicionada gota a gota sobre a solução do precursor sob agitação magnética constante. A agitação foi mantida por 2 h, na sequência foi concentrada à 25% do volume inicial em evaporador rotativo à 50 °C e reservada para cristalização. A solução foi mantida em repouso à temperatura ambiente com o frasco fechado, com a formação de cristais transparentes sendo observada após 1 h. Uma massa cristalina foi obtida após 60 h de repouso, a qual foi recuperada por filtração à vácuo, lavada duas vezes com etanol absoluto para remoção de material não reagido e seca em liofilizador por 24 h. Obtiveram-se 0,5444 g de massa seca, com rendimento estequiométrico de 70%.

Figura 13. Esquema reacional em duas etapas para a obtenção do complexo **2**



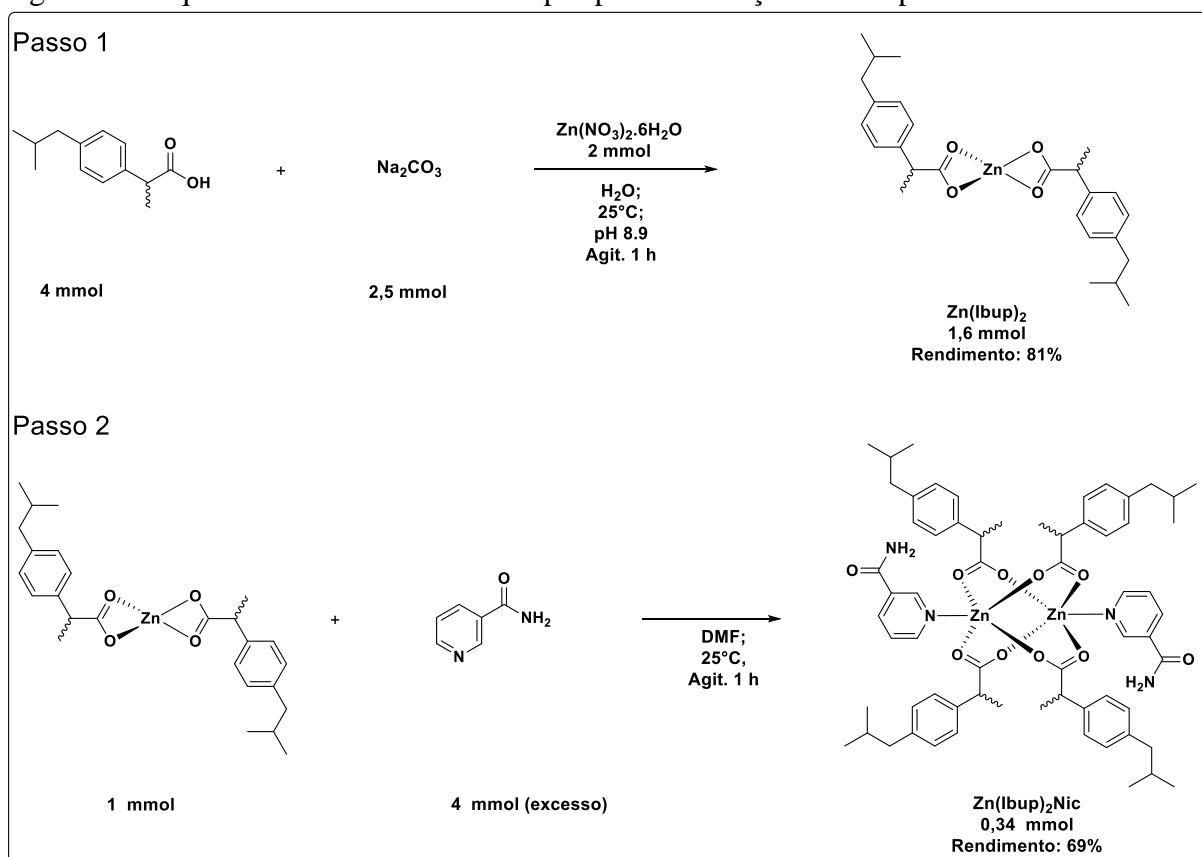
1.13.3 Síntese e caracterização do complexo $\text{Zn}_2(\text{Ibup})_4(\text{Nic})_2$ (**3**).

A obtenção do complexo **3** deu-se em uma síntese de dois passos conforme descrito na Figura 14. O passo reacional 1 foi desenvolvido para a obtenção do precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$, em uma reação de dupla-troca $\text{A}+\text{B}\rightarrow\text{C}+\text{D}$. Para tal, uma massa de 0,8251 g de *R,S*-ibuprofeno (4 mmol) foi transferida para um frasco erlenmeyer de 250 mL de capacidade juntamente com 100 mL de H_2O Milli-Q. A suspensão foi basificada com uma solução saturada de Na_2CO_3 adicionada gota a gota sob agitação magnética até a solubilização completa da massa do material de partida e o pH estabilizar-se em 8,90. Uma segunda solução contendo 2 mmol de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5949 g) em 50 mL de H_2O Milli-Q foi adicionada gota a gota sobre a solução de ibuprofenato de sódio sob agitação magnética constante. Após 1 h de agitação, um sólido branco suspenso foi removido por filtração em papel e lavado com 3 porções de 100 mL de H_2O para remoção dos subprodutos hidrossolúveis. As impurezas inorgânicas insolúveis como

ZnO, Zn(OH)₂ e ZnCO₃ foram removidas de acordo com procedimentos seguintes: a massa sólida foi transferida para um frasco erlenmeyer de 125 mL e suspensa em um volume de 50 mL de etanol absoluto e levada ao banho ultrassônico por 5 min. A suspensão foi centrifugada à 5000 RPM por 10 min e o sobrenadante foi filtrado em membrana de náilon com porosidade de 0,45 micras. O produto foi precipitado por adição de 100 mL de H₂O ao filtrado mantido sob agitação por 1 h e recuperado por filtração em papel. O sólido foi seco em liofilizador por 24 h, do qual obtiveram-se 0,7615 g do precursor (1,6 mmol), com rendimento estequiométrico correspondente à 81%.

O complexo ternário **3** foi obtido no passo 2 por reação de síntese do tipo A+B→C. Uma massa de 0,4750 g de precursor Zn(Ibup)₂ (1 mmol) foi solubilizada em 10 mL de *N,N'*-dimetilformamida (DMF) 99% e filtrada em membrana filtrante de 0,45 micras para frasco erlenmeyer de 125 mL. Uma solução contendo 0,2443 g de nicotinamida (2 mmol) em 15 mL de DMF foi adicionada gota a gota sobre a solução do precursor sob agitação magnética constante. A agitação foi mantida por 2 h, na sequência foi concentrada à 25% do volume inicial em evaporador rotativo à 50 °C e reservada para cristalização. A solução foi mantida em repouso à temperatura ambiente com o frasco fechado ao abrigo da luz. Uma massa cristalina foi obtida após 30 dias de repouso, a qual foi recuperada por filtração à vácuo, lavada duas vezes com porções de 5 mL de DMF para remoção de material não reagido e secados em liofilizador por 24 h. Obtiveram-se 0,4126 g de massa seca, com rendimento estequiométrico de 69%.

Figura 14. Esquema reacional em duas etapas para a obtenção do complexo **3**



1.13.4 Obtenção de monocristais e análise cristalográfica dos complexos 1, 2 e 3

Os monocristais do complexo **1** foram obtidos a partir de uma solução saturada reparada em etanol absoluto (5 mL) e 0,1 g do complexo amorfo aquecida à 50 °C e filtrada em membrana de poliamida 0,45 µm de porosidade e acondicionada em um tubo de ensaio de 10 mL de capacidade coberto com papel filtro para propiciar a evaporação do solvente. Os monocristais cresceram nas paredes do tubo após 7 dias de acondicionamento ao abrigo da luz e temperatura de trabalho (18-25°C). Os monocristais dos complexos **2** e **3** foram obtidos de forma similar ao complexo **1**, porém em solvente DMF. Os monocristais cresceram nas paredes dos tubos após 30 dias.

As análises dos monocristais foram realizadas em um difratômetro Bruker, modelo D8 Venture Photon 100 equipado com um tubo de raios-X Mo-K α de alto brilho Incoatec I μ S com

óptica de microfoco bidimensional Montel (120 (2) K usando uma unidade de baixa temperatura Oxford Cryosystems Cryostream 800 para complexo **3**). As estruturas foram resolvidas por métodos diretos usando o pacote SHELXS. As análises subsequentes do mapa de diferenças de Fourier produziram as posições dos átomos não-hidrogênios, com os refinamentos realizados também com o pacote SHELXS (SHELDRICK, 2007). Todos os refinamentos foram feitos por mínimos quadrados de matriz completa em F2 com parâmetros de deslocamento anisotrópico para todos os átomos não-hidrogênio. Átomos de hidrogênio foram incluídos no refinamento em posições calculadas, mas os átomos de hidrogênios que realizam ligações especiais foram localizados no mapa de Fourier. Os desenhos foram feitos usando ORTEP-3.1 (FARRUGIA, 1999) para Windows e Mercury 4.1.0.

1.13.5 Estudo de estabilidade dos complexos em solução

A condutividade molar Λ_m é um parâmetro indicativo do grau de ionização do complexo metálico em solução (EL-MEGHARBEL; HAMZA; REFAT, 2015). O método tem como princípio a determinação da condutividade de uma solução com concentração conhecida em intervalos regulares de tempo. Variações crônicas da condutividade da solução indicam alterações físico-químicas do analito e podem ser utilizadas para estimar a estabilidade do complexo para ser armazenado ou formulado em soluções líquidas. Fenômenos de dissociação por solvólise, ionização, oxirredução e polimerização variam a condutividade do meio.

Para a realização dos estudos de estabilidade foram preparadas soluções dos complexos à $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em dimetilformamida (DMF). As soluções foram homogeneizadas em banho ultrassônico à temperatura ambiente por 10 min, filtradas em membrana filtrante de nylon 0,45 micras e armazenadas em frascos Schott® de 10 mL com enchimento total. Uma amostra de solvente puro (controle) foi preparada e mantida nas mesmas condições do experimento. O equipamento utilizado neste experimento foi um condutivímetro (Hydraulis®, modelo MCA-

150) equipado com uma célula de condutividade com constante condutimétrica K de valor igual a $1,00 \text{ cm}^{-1}$ especificado pelo fabricante ($K = \frac{\text{distância (cm)}}{\text{Área (cm}^2\text{)}}$) calibrada em uma solução-padrão de $1408 \mu\text{S cm}^{-1}$ (KCl $0,01 \text{ mol kg}^{-1}$). As leituras foram obtidas nos tempos de 0,5, 24, 48 e 96 h. Os valores basais de condutividade κ da amostra controle foram subtraídos dos valores das leituras das amostras e aplicados na equação 1 para determinação da condutividade molar do complexo.

$$\Lambda(\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}) = \frac{\kappa(\text{S cm}^{-1})}{c(\text{mol cm}^{-3})} \quad (1)$$

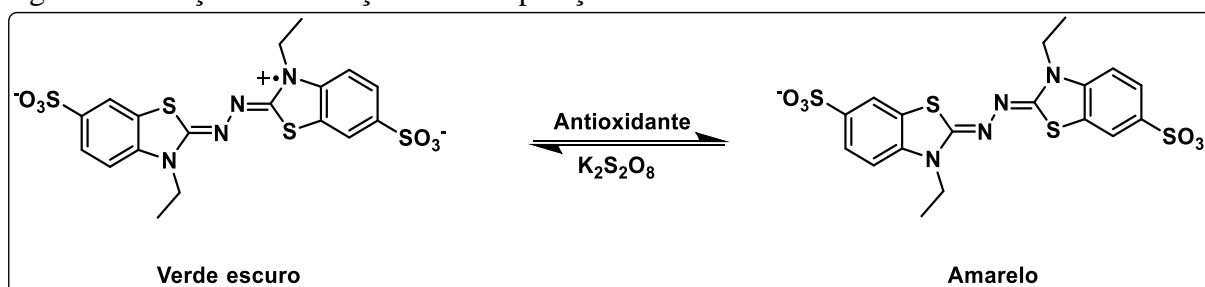
1.13.6 Estudo de atividade redox dos complexos frente ao radical livre ABTS^{•+}

A atividade antioxidante dos complexos foi determinada pela reação do complexo com o radical livre 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS^{•+} pela metodologia descrita por RUFINO et al., 2007. Esta molécula possui vantagens sobre o outros métodos tais como o DPPH^{•+}, pois reage com compostos hidrofílicos quanto lipofílicos, além de poder ser monitorado na região do vermelho do espectro eletromagnético com menor interferência espectral do analito.

1.13.6.1 Preparo das soluções reagentes e análise espectrofotométrica

O experimento foi iniciado com o preparo da espécie radicalar ABTS^{•+} *in situ*, no qual 5,0 mL de uma solução aquosa de ABTS à $7,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi juntada à 0,088 mL de uma solução aquosa de K₂S₂O₈ (persulfato de potássio) à $1,4 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ (razão molar ABTS: K₂S₂O₈ de 3:1), mantida sob abrigo da luz por 16 h. O radical ABTS^{•+} é gerado em solução pela reação de equilíbrio esquematizada na Figura 15.

Figura 15. Reação de formação e decomposição do radical ABTS^{•+}



A padronização da solução deu-se pela diluição empírica de uma alíquota de 1,0 mL da solução-estoque com etanol absoluto até obter-se uma absorbância com intensidade de $0,70 \pm 0,05$ AU em λ 734 nm. Para tal utilizaram-se cubetas de vidro com caminho óptico de 10,0 mm e um espectrofotômetro Shimadzu[®], modelo UV-1700. Soluções etanólicas dos complexos ternários **1**, **2**, **3** e o ligante nicotinamida foram preparadas à $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹. Destas, 0,030 mL foram juntados à 3,0 mL de solução padronizada de radical ABTS^{•+}, homogeneizadas em agitador tipo vortex e as leituras de absorbância obtidas após cronometrados 6 min de reação. Cada experimento foi repetido três vezes no mesmo dia.

As atividades redutoras foram avaliadas pelo consumo da espécie radicalar do meio através da redução da absorbância no pico máximo de λ 734 nm. Os resultados foram avaliados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) cruzada e não-parametrizada pelo Teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%. A ferramenta gráfica e estatística utilizada no estudo foi o pacote OriginPro 2016 (OriginLab Corporation), versão b9.3.226 (licença de teste) para sistema operacional Windows 10.

1.14 Estudos de interação com DNA in vitro

1.14.1 Interação complexo-DNA por Dicroísmo circular

O desenho experimental demandou o uso dos complexos **1**, **2**, **3** e o ligante nitrogenado Nic livre. Os complexos precursores não foram utilizados no teste por não apresentarem solubilidade nas condições experimentais propostas. Os experimentos de dicroísmo circular

foram realizados em um espectrômetro de CD marca JAS.CO[®], modelo J-815. As reações foram preparadas diretamente na cubeta de leitura (2 mm com adições de soluções pré-preparadas dos compostos Zn(Valp)₂(Nic)₂, Zn₂(Diclof)₄(Nic)₂, Zn₂(Ibup)₄(Nic)₂ e Nicotinamida à 2000 μmol L⁻¹ em H₂O:DMF 80:20, tampão Hepes (Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-etanosulfônico) 10 μmol L⁻¹ à pH 7,00 em H₂O e CT-DNA à 100 μmol L⁻¹ em H₂O. As concentrações dos reagentes para cada corrida estão na Tabela 1. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 2 mm, com três escaneamentos por amostra para uma janela espectral de λ 240-400 nm.

Tabela 1. Condições experimentais para as análises de interação complexo-DNA por dicroísmo circular.

Corrida	Composto (μmol L ⁻¹)	Volume total (μL)	DNA (μmol L ⁻¹)	Razão Comp/DNA
1	0,00	400	200,00	0,00
2	24,69	405	197,53	0,13
3	48,78	410	195,12	0,25
4	72,29	415	192,77	0,38
5	95,24	420	190,48	0,50
6	117,65	425	188,24	0,63
7	139,53	430	186,05	0,75
8	160,92	435	183,91	0,88
9	181,82	440	181,82	1,00
10	202,25	445	179,78	1,13

Os dados espectrais foram plotados e analisados pelo software OriginPro 2016 (OriginLab Corporation), versão b9.3.226 (licença de teste) para sistema operacional Windows 10.

1.14.2 Indução de fragmentação de DNA plasmidial

Este estudo de genotoxicidade *in vitro* tem por objetivo estimar a capacidade de uma molécula ou uma nanopartícula em interagir com a dupla-hélice de cadeias longas de DNA livre e produzir rupturas simples ou duplas. Parâmetros como o tipo principal de quebra induzida e a intensidade das quebras indicam o grau de genotoxicidade do composto, um parâmetro importante para determinar se uma molécula tem potencial de induzir à carcinogênese.

O experimento tem como base a separação de moléculas de DNA Plasmidial intacto (super enovelado – F1), fragmentado por quebras simples de cadeia (circular aberto – F2) e fragmentado por quebra dupla de cadeia (Linear – F3) por eletroforese em gel de agarose e a captura de imagem das bandas eletroforéticas sob luz UV. O composto fluorescente brometo de etídio presente na matriz do gel intercala-se à estrutura de DNA e emite luz fluorescente sob radiação UV λ 360 nm, luminescência esta que pode ser capturada como imagem digital e analisada por softwares de análise de intensidade de pixels. A intensidade de pixels das bandas eletroforéticas são quantificáveis e então analisadas estatisticamente com o uso dos softwares GelAnalyzer 2010a e OriginPro 2016, versão b9.3.226.

1.14.2.1 Preparação das amostras de complexos e DNA plasmidial

O estudo demandou o uso de DNA plasmidial (pBSK II) obtido e purificado a partir de cultura microbiológica de *Escherichia coli* de acordo com as técnicas padrão descritas por F.M. AUSUBEL, R. BRENT, R.E. KINGSTON, 2002.

Os complexos **1**, **2**, **3** e o ligante Nic foram solubilizados em uma mistura de H₂O:dimetilformamida 80:20% v/v em concentrações de 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Esta mistura de solvente proporcionou a solubilização dos complexos sem prejudicar a solubilidade e estrutura do DNA no meio reacional. Os complexos precursores não foram testados porque não apresentaram solubilidade nas condições experimentais propostas. Para o experimento de indução de quebra de DNA foram utilizados dois modelos experimentais: 1) quebra de DNA em ausência de luz; 2) quebra de DNA induzida por radiação UV. Os parâmetros experimentais estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Condições experimentais para avaliação das interações DNA plasmidial:complexos

Experimento/condição	Concentração do complexo ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Tempo de exposição
Escuro/ 36 ± 1 °C	0	24 h
	25	24 h
	50	24 h
	100	24 h
	200	24 h
	400	24 h
Luz UV λ_{max} 300-312 nm/ 20 °C	0	30 s
	25	30 s
	50	30 s
	100	30 s
	200	30 s
	400	30 s

Ambos os experimentos demandaram preparos experimentais similares. Preparou-se uma solução aquosa de uma mistura de DNA + tampão Hepes (ácido 2-[4-(2-(hidroxietil-piperazin-1-il] etanosulfônico) na concentração final de 20 mmol L^{-1} em pH 7,0, da qual foram transferidos alíquotas de $10 \mu\text{L}$ (volume equivalente à 300 ng de DNA) para tubos de centrífuga contendo $400 \mu\text{L}$ de solução de complexo nas concentrações descritas na Tabela 2. Os experimentos em ausência de luz foram mantidos em estufa termostática à 36 ± 1 °C por 24 h, enquanto os experimentos de indução luminosa de quebra de DNA foram expostos à luz UV λ 300 nm por 30 s imediatamente após a mistura. Decorrido o tempo de exposição, as reações foram cessadas pela adição de $4 \mu\text{L}$ de solução extintora composta por 50% v/v de uma mistura composta por tampão Tris/HCl pH 7,5 a $0,05 \text{ molL}^{-1}$, azul de bromofenol à 0,01% m/v, EDTA a $0,250 \text{ mol L}^{-1}$ e 50 % v/v de glicerol.

1.14.2.2 Procedimentos de separação por eletroforese em gel e coleta de dados

As separações das formas de DNA 1, 2 e 3 foram realizadas por eletroforese em gel de agarose. Os géis foram produzidos em formas de 6 poços, seguindo as recomendações do fabricante: 0,24g de gel de agarose base seca, 30 mL de solução tampão TBE

(Tris/Borato/EDTA) em diluição 0,5x e 4 μL de solução de brometo de etídeo à 0,3 mg mL^{-1} . As amostras foram incubadas nos poços dos géis e separadas por eletroforese. As separações foram realizadas em uma cuba eletroforéticas padrão acoplada à uma fonte de corrente contínua marca PWSys[®], modelo PW300, com tempo de corrida de 90 min.

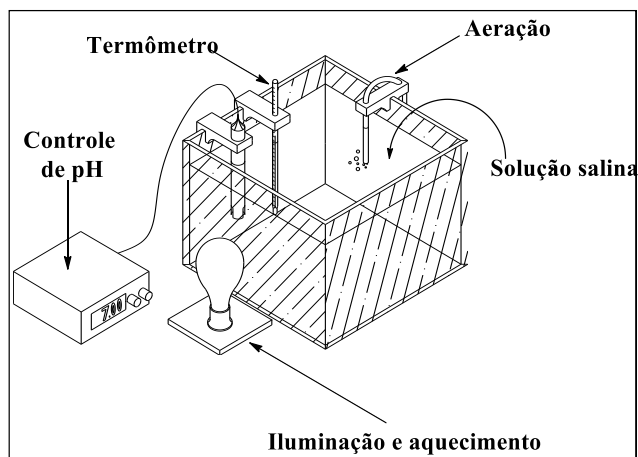
Os géis foram analisados em um transluminador marca BioAgency[®], modelo T26M com filtro de λ 302 nm, no qual capturara-se imagens dos géis iluminados com uso de câmera fotográfica digital. As imagens (extensão .png) foram analisadas com auxílio do software GelAnalyzer 2010, (versão 2010^a freeware), desenvolvedor Istvan Lazar, onde as luminescências das bandas eletroforéticas foram quantificadas pela técnica de análise de densidade pixels e convertidas em dados numéricos. As bandas correspondentes às formas de DNA 1, 2 e 3 foram plotados e analisados pelo software OriginPro 2016 (OriginLab Corporation), versão b9.3.226 (licença de teste) para sistema operacional Windows 10.

1.15 Estudo de toxicidade *in vitro* frente à *Artemia salina*

O teste de *A. salina* ou TAS tem como finalidade determinar a ação tóxica aguda de um composto xenobiótico por acumulação frente à um organismo filtrador de nado livre e de alta atividade metabólica. Os ensaios TAS foram aplicado de acordo com a metodologia descrita por DOS SANTOS et al., 2015. O meio de cultura consistiu de 2,0 L de solução salina preparada com água Milli-Q e sal marinho sintético (isento de nitrato e fosfato) à uma concentração de 18,25 g L^{-1} . A solução foi filtrada e acondicionada em um aquário de vidro (25x15x20 cm), onde se adicionaram 0,2 g de ovos de *A. salina* para incubação. O sistema foi mantido com aeração constante, a temperatura mantida no intervalo de 27 a 30 °C e pH controlado no intervalo de 7,0 a 9,0 (Figura 16). O aquecimento e a iluminação foram fornecidos por uma lâmpada incandescente alógena de 60 W mantida à 5 cm de distância da parede do aquário.

Instalou-se um sistema borbulhador para saturação do oxigênio do meio durante todo o processo de incubação o intervalo de 48 h de incubação.

Figura 16. Sistema de incubação para *A. salina* com monitoramento de parâmetros físico-químicos do meio



1.15.1 Preparo das amostras de complexos

Alíquotas cristalinas de 60,0 mg dos complexos **1**, **2**, **3** e o ligante Nic foram juntadas à alíquotas de 180 mg de sal marinho sintético e trituradas ao pó fino com uso de gral e pistilo de ágata. Este procedimento facilita a dispersão e solubilização parcial dos complexos em água. As misturas foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL, completados os volumes com água Milli-Q e submetidas à banho ultrassônico por 30 min. O processo produziu suspensões coloidais estáveis, as quais foram imediatamente utilizadas nos experimentos. O controle negativo utilizado foi uma solução salina em branco. Os complexos precursores não foram utilizados para o teste por não apresentarem qualquer solubilidade ao meio e não formarem coloides estáveis com solução salina.

1.15.2 Incubação dos náuplios

O procedimento de transferência foi iniciado após 48 h de incubação, com uso de placas de poliestireno transparente para cultura celular de 24 poços com tampa. Uma média de 18 a 22 náuplios foram transferidos para cada poço com uso de micropipetador automático,

juntamente com 800 μL da solução salina. Na sequência, adicionaram-se combinações de 200 μL das soluções de amostra + solução salina de modo a obter as concentrações de 1200,0, 960,0, 720,0, 480,0, 240,0 e 0,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os compostos, com quatro replicatas para cada concentração. Os experimentos foram mantidos incubados por 24 h nas mesmas condições de temperatura de eclosão, porém sem iluminação direta. A contagem do número de mortos foi realizada em microscópio estereoscópico marca Zeiss® com transluminador, no qual se considerou morto o náuplio imóvel ao estímulo luminoso. O experimento foi repetido três vezes e em dias diferentes.

Os resultados foram avaliados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) cruzada e não-parametrizada pelo Teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%. A ferramenta gráfica e estatística utilizada no estudo foi o pacote OriginPro 2016 (OriginLab Corporation), versão b9.3.226 (licença de teste) para sistema operacional Windows 10.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.16 Processos de obtenção dos complexos de Zn e análise espectroscópicas

1.16.1 Recuperação do complexo $Zn(Valp)_2(Nic)_2$ (**1**) e seu sal precursor $Zn_2(Valp)_4$

Para o complexo binário $Zn_2(Valp)_4$, o rendimento estequiométrico obtido foi de 71%, valor inferior ao rendimento de 88% descrito por ABU; DARAWSHEH; RAPPOCCIOLO, (2013). Esta diferença pode ser atribuída às perdas nos processos de recuperação, uma vez que o produto se apresenta como uma massa amorfa semissólida e hidrofóbica com alto grau de agregação em suspensão aquosa. O produto seco à vácuo apresenta-se como um sólido branco de consistência saponácea ao tato, com solubilidade à frio $\geq 10\%$ m/v em etanol, acetona, éter, clorofórmio, tetraidrofurano (THF), dimetilsulfóxido (DMSO) e *N,N'*-dimetilformamida (DMF).

O complexo ternário $Zn(Valp)_2(Nic)_2$ (**1**) apresentou rendimento estequiométrico de 70%. O produto inicia a cristalização em solução etanólica concentrada à $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ à temperatura ambiente, a qual produz cristais finamente divididos nas primeiras horas de repouso. Por outro lado, a solução de partida diluída estocada em frasco aberto para evaporação espontânea do solvente produziu cristais com dimensões maiores de 1 mm após 60 dias, com cristais vítreos e aparência lamelar. Os cristais apresentaram solubilidade à frio $\geq 10\%$ m/v apenas em DMF.

1.16.2 Elucidação estrutural do complexo **1**

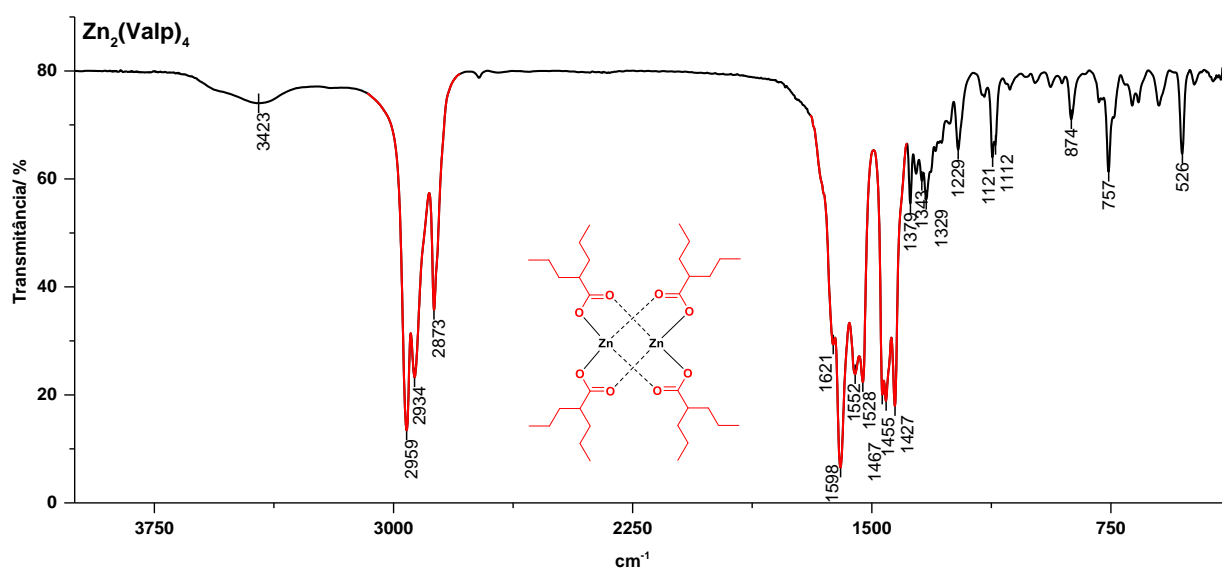
O complexo metálico **1** e seu sal precursor foram analisados pelas técnicas de FTIR, $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$, ESI-TOF-MS e UV-Visível e comparados com os dados da literatura. A análise por difração de Raios-X de monocristal foi aplicada apenas para o complexo ternário

por tratar-se de composto inédito. Neste capítulo serão analisados os individualmente todos os espectros.

1.16.2.1 Análises dos espectros de FTIR do complexo **1** e o precursor $Zn_2(Valp)_4$

As análises comparativas dos espectros de FTIR do complexo ternário **1** e seu precursor foram utilizadas para identificação das ligações químicas, de acordo com suas características de estiramento ou deformações, entre o ligante Nic e o átomo de zinco. As variações nas posições das bandas do espectro do complexo ternário em relação ao precursor indicam a ocorrência de ligação química, enquanto a repetição das posições destas pode indicar co-precipitação dos reagentes em mistura física.

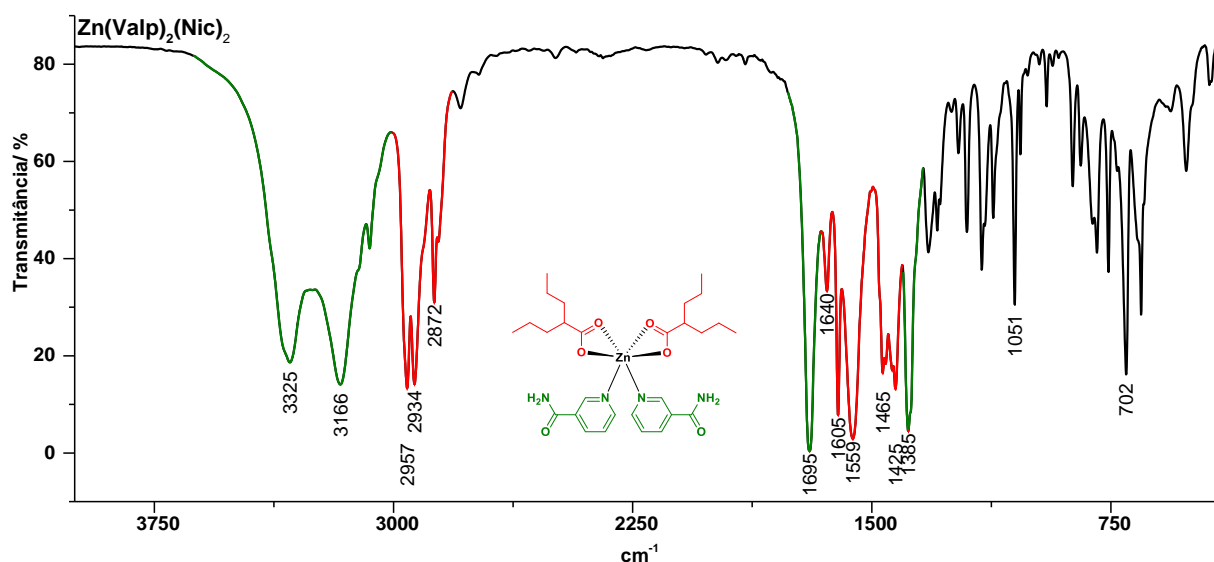
Figura 17. Espectro de transmitância de FTIR para o precursor $Zn_2(Valp)_4$ obtido em estado sólido em pastilha de KBr



O espectro de FTIR para o complexo binário $Zn_2(Valp)_4$ (Figura 17) apresenta as mesmas bandas principais descritas por ABU, *et al* (2013) utilizando a mesma técnica analítica. As bandas fortes em 2959, 2934 e 2873 cm^{-1} correspondem respectivamente aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ dos grupos metila do valproato, a estiramentos antissimétricos dos hidrogênios metilênicos das cadeias alquílicas e aos estiramentos simétricos

das ligações $H-Csp^3$ de grupos metil e metileno do valproato. A banda correspondente ao estiramento da ligação $O=C$ sp^2 do carboxilato aparece em 1598 cm^{-1} . Em 1427 cm^{-1} corresponde à contração/alongamento do segmento $O-Csp^2-Csp^3$ do grupo carboxilato com o carbono vicinal (posição 2). As bandas entre 1400 e 400 cm^{-1} compreendem ao intervalo de impressão digital da molécula. A banda arredondada presente em 3423 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação $O-H$ sp^3 de moléculas de H_2O residual do processo de síntese e hidratação do diluente KBr no processo de mistura e prensagem.

Figura 18. Espectro de transmitância de FTIR para o complexo **1** obtido em estado sólido em pastilha de KBr

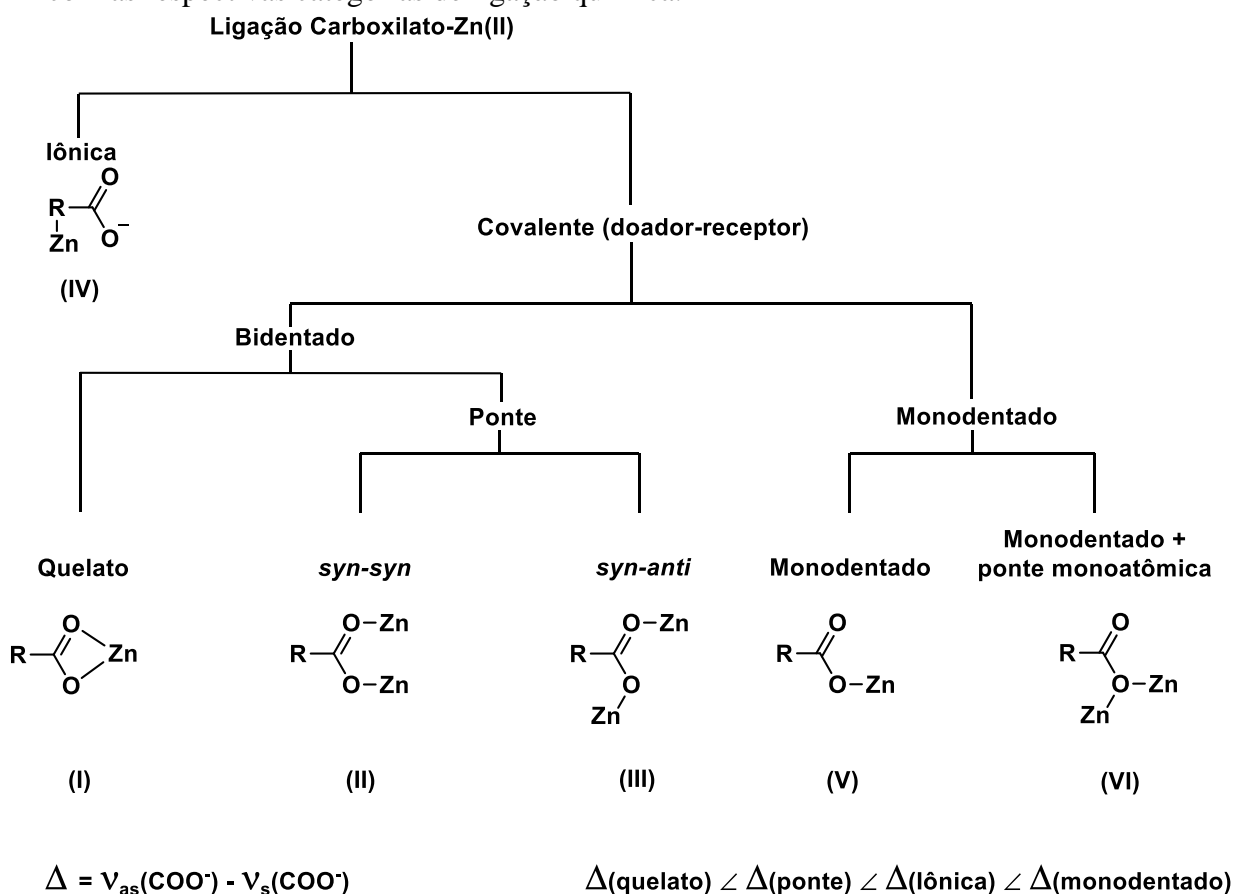


O espectro de FTIR para o complexo **1** (Figura 18) apresenta bandas fortes em 3325 e 3166 cm^{-1} correspondentes às deformações axiais assimétrica (δ_{as}) e simétrica (δ_s), respectivamente, de ligações $N-H$ sp^3 de amina primária livre presente na função amida. A banda forte em 1695 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação $O=C$ sp^2 da função carbonila de amida. A banda curta em 3070 cm^{-1} corresponde à deformação axial $C-H$ de carbono sp^2 do anel piridínico. As cadeias alquílicas dos ligantes valproato podem ser identificadas nos estiramentos fortes em 2957 e 2872 cm^{-1} , correspondentes às vibrações assimétricas e simétricas de grupos CH_3 terminais, e o estiramento forte em 2934 cm^{-1} corresponde às vibrações assimétricas de grupos CH_2 internos das cadeias alquílicas dos grupos valproato. Os

estiramentos fortes em 1640, 1607 e 1559 cm^{-1} correspondem às deformações axiais normais (δ) das funções carboxilato do valproato.

As variações nas posições das bandas principais entre os espectros do complexo 2 e seu precursor indicam a formação do complexo ternário com ligações Zn-N pela função piridina da nicotinamida, uma vez que há evidências do grupo R-NH₂ da função amida livre no complexo tal qual o espectro de FTIR da nicotinamida pura (ANEXO 1). Outra informação relevante do estudo comparativo de espectros de FTIR é a determinação do tipo de ligação química dos grupos carboxilato R-COO⁻ em relação ao núcleo metálico de Zn⁺².

Figura 19. Esquema de correlações dos valores de $\Delta\nu$ dos grupos carboxilato em complexos de Zn com as respectivas categorias de ligação química.



Fonte: ZELENÁK; VARGOVÁ; GYÖRYOVÁ, (2007a)

Segundo ZELENÁK (2007) os valores de Δ (cm^{-1}) entre as vibrações assimétricas e simétricas ($\nu_{\text{assim}} - \nu_{\text{sim}} = \Delta\nu_{\text{a-s}}$) do grupo carboxilato variam de acordo com a categoria de ligação metal-ligante. Os resultados calculados na Tabela 3 mostram o caráter monodentado do sal

valproato de sódio, enquanto o precursor $Zn_2(Valp)_4$ tem características de ligação em ponte Zn-O-C-O-Zn do tipo *Syn-Syn* confirmada por análise cristalográfica. O complexo ternário **1** têm caráter quelato do tipo quelato simples.

Tabela 3. Variações dos intervalos entre as bandas de vibrações mais características entre o complexo e seus precursores.

Composto	Vibrações ν de R-COO ⁻ (cm ⁻¹)			
	ν_{assim}	ν_{sim}	$\Delta\nu$	$\Delta\nu_{\text{ref}}$
Valproato de sódio*	1554	1417	137	137 ^(a)
$Zn_2(Valp)_4$	1598	1427	171	168 ^(b)
1	1559	1425	134	-

*Espectro de FTIR disposto no ANEXO 1

^(a) HIJAZI, *et al.*, (2013); ^(b) DARAWSHEH, *et al.*, (2014)

1.16.2.2 Análises de ¹H e ¹³CNMR do complexo **1** e do precursor $Zn_2(Valp)_4$

O espectro de ¹HRMN para o precursor $Zn_2(Valp)_4$ (Figura 20, Tabela 4) foi calibrado em relação ao padrão interno tetrametilsilano (TMS) com deslocamento químico δ 0,00 ppm. Os hidrogênios do grupo valproato foram marcados seguindo a posição do carbono geminal ao longo da cadeia em relação ao grupo carboxilato (grupo principal), com atribuição de letras gregas (α , β , γ , δ). As nomenclaturas atribuídas aos sinais e suas multiplicidades são descritas em língua portuguesa de acordo com GARRIDO, 2011. Evidenciaram-se apenas sinais entre δ 0,8 e 2,4 ppm característicos para hidrogênios de cadeias alquílicas (SILVERSTEIN & WEBSTER, 1998).

Figura 20. Espectro de $^1\text{HRMN}$ para o precursor $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$ (a) com expansão (b) obtido em CDCl_3 a 300,18 MHz.

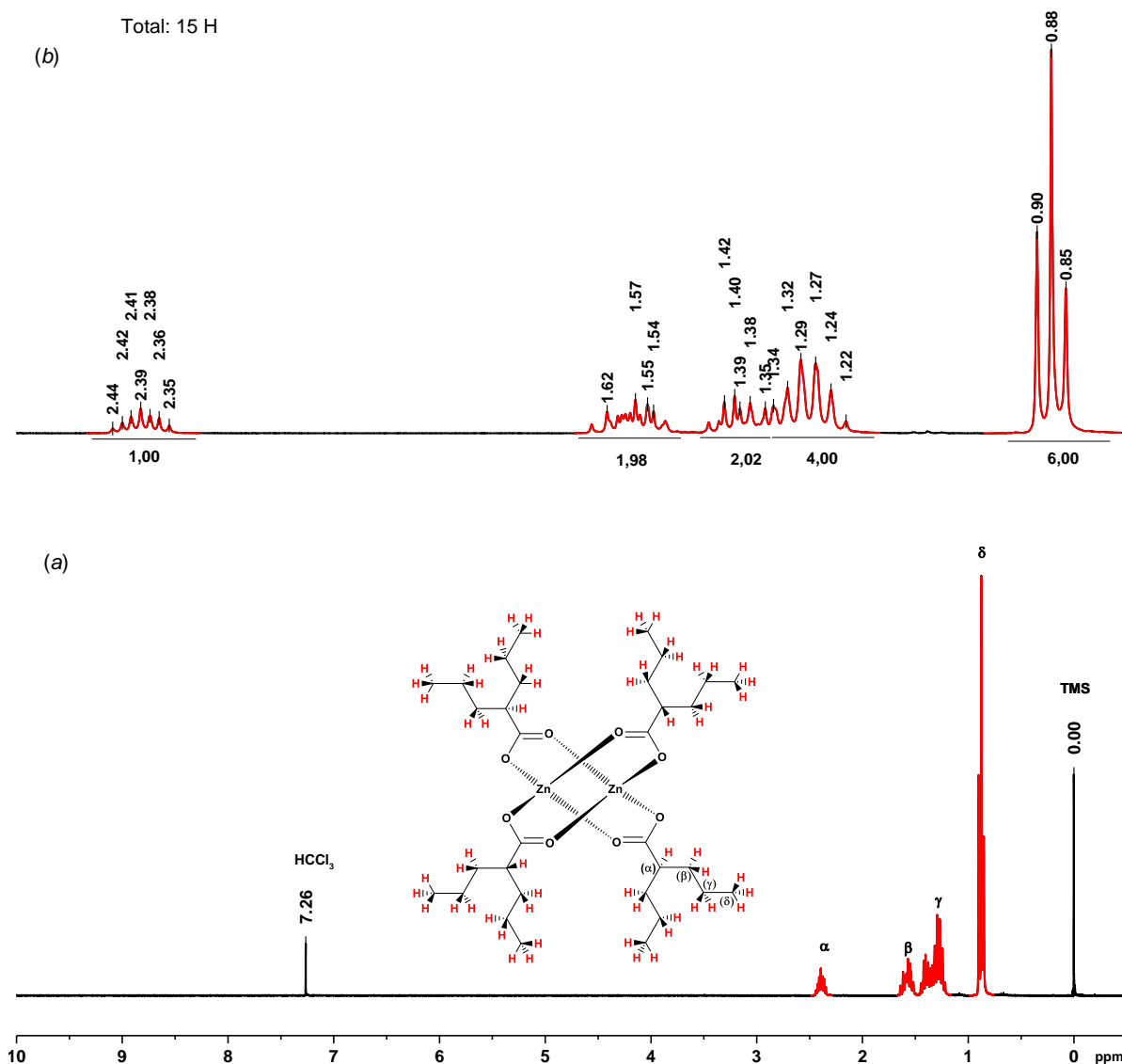


Tabela 4. Dados obtidos do espectro de $^1\text{HRMN}$ para o precursor $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$ obtido em CDCl_3 à 300,18 MHz.

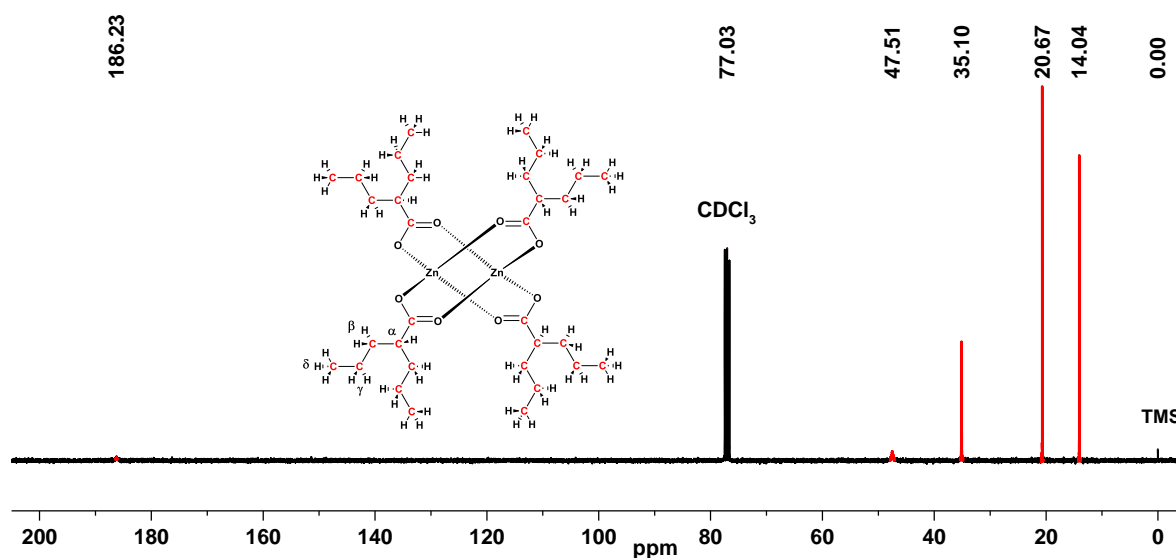
Sinal δ (ppm)	Multiplicidade	Integral relativa	Constante de acoplamento J (Hz)
0,876	Tripleto	6,00	6,90 (δ - γ)
1,268	Sextupeto	4,00	6,60 (γ - δ , γ - β)
1,378	Multipeto	2,02	Indefinida
1,569	Multipeto	1,98	Indefinida
2,393	Tripleto de tripletos	1,00*	4,80 (α - β)

*Integral de referência com atribuição relativa = 1H

O tripleto posicionado em δ 0,876 ppm $J = 6,90$ Hz é correspondente aos seis hidrogênios metílicos terminais δ -carbonílicos do grupo valproato acoplados aos hidrogênios

γ -carbonílicos. O sextupletto presente em δ 1,268 ppm ($J = 6,60$ Hz) corresponde aos quatro hidrogênios metilênicos simétricos γ -carbonílicos do grupo valproato acoplados aos hidrogênios metílicos δ -carbonílicos e os hidrogênios metilênicos β -carbonílicos. Os quatro hidrogênios β -carbonílicos são atribuídos aos dois multipletos em δ 1,378 e δ 1,569 ppm. Estes acoplam com os hidrogênios metilênicos γ -carbonílicos e o hidrogênio metínico α -carbonílico. O desdobramento do sinal pode ser atribuído ao fato de que os grupos metilênicos β -carbonílicos encontram-se distribuídos espacialmente em ambientes químicos diferentes, embora o grupo valproato possua um plano de simetria. O tripleto de tripletos posicionado em δ 2,393 ppm ($J = 4,80$ Hz) corresponde ao hidrogênio α -carbonílico acoplado aos hidrogênios β -carbonílicos. Os A contagem total de hidrogênios por integração das áreas dos picos corresponde ao número total de hidrogênios presentes no grupo valproato. O espectro de $^1\text{HRMN}$ para o precursor $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$ apresentou deslocamentos químicos δ , desdobramentos de sinal e constantes de acoplamento J que corroboram com a descrição de ABU et al., (2013) para síntese e análise similar.

Figura 21. Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ para o precursor $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$ obtido em CDCl_3 a 75, 48 MHz



O espectro de $^{13}\text{CRMN}$ para o $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$ (Figura 21) evidencia a presença de planos de simetria entre os dois grupos n-propil da molécula de valproato, no qual podem-se atribuir os três sinais de carbonos alquílicos equivalentes. Os dois carbonos δ -carbonílicos aparecem deslocados em δ 14,04 ppm. Em caso similar, os pares simétricos de carbonos γ e β -carbonílicos aparecem deslocados em δ 20,67 e δ 35,10 ppm, respectivamente. O carbono α -carbonílico aparece em δ 47,49 ppm. O sinal para o carbono do carboxilato aparece em δ 186, 23 ppm, porém com baixa intensidade. A ausência de duplicidade nos sinais do carbono da carboxilato e do carbono α -carbonílico evidencia a presença de um elemento de simetria de ligação dos grupos carboxilato com o átomo de zinco central, visto que a estequiometria do complexo tem razão metal:ligante 1:2.

Figura 22. Espectro de ^1H RMN para o complexo **1** (a) com expansões (b) (c) obtido em Acetona D_6 a 300,18 MHz

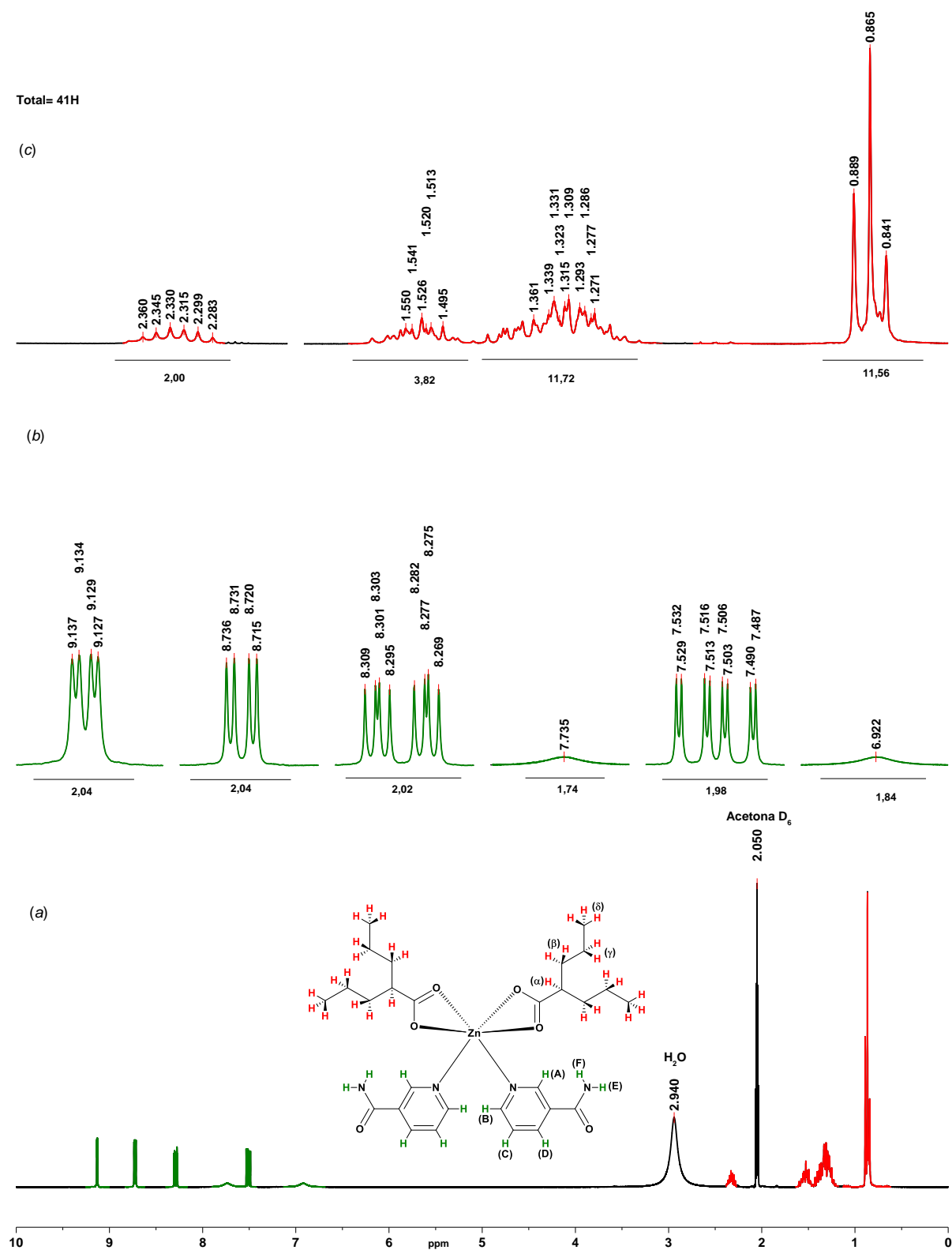


Tabela 5. Dados obtidos do espectro de $^1\text{HRMN}$ para o complexo $\text{Zn}(\text{Valp})_4(\text{Nic})_2$ obtido em Acetona D_6 à 300,18 MHz.

Sinal (ppm)	Multiplicidade	Integral relativa	Constante de acoplamento J (Hz)
0,865	Tripleto	11,56	7,20 ($\delta-\gamma$)
1,309	Multiplete	11,72	Indefinido
1,526	Multiplete	3,82	Indefinido
2,300	Tripleto de triplete	2,00*	4,50 ($\alpha-\beta$)
6,922**	Simpleto	1,84	-
7,487	Duplo-duplete	1,98	4,80 (C-B, C-D); 0,90 (C-A)
7,735**	Simpleto	1,74	-
8,275	Duplo-duplete	2,02	7,80 (D-C); 1,80; (D-A)
8,715	Duplo-duplete	2,04	4,80 (B-C); 1,50 (B-D)
9,127	Duplo-duplete	2,04	2,40 (A-D); 0,9 (A-C)

*Integral de referência com atribuição relativa = 2H

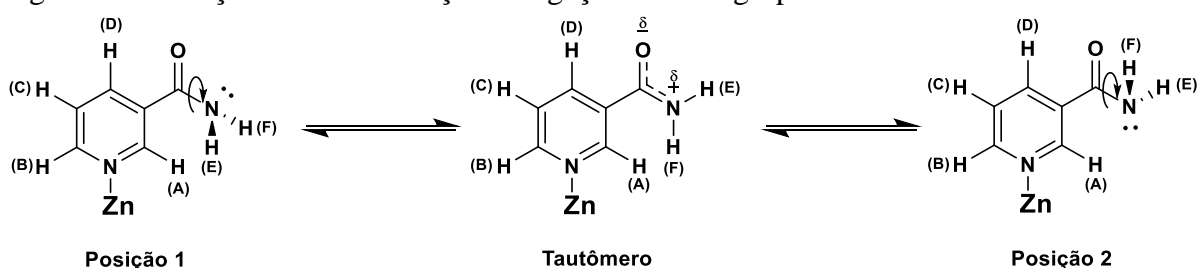
**Simpletos dos átomos de H diastereotópicos do grupo amida

O espectro de $^1\text{HRMN}$ para o complexo **1** (Figura 22) foi calibrado em relação ao pico residual do solvente deuterado acetona D_6 , um quinteto em δ 2,050 ppm. O sinal alargado em δ 2,940 ppm é atribuído à moléculas de água livre presentes no solvente. Os hidrogênios do grupo valproato receberam atribuições de posição das letras gregas α , β , γ e δ conforme o precursor $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$ e os hidrogênios do ligante nicotinamida receberam atribuições de alfabética A, B, C, D, E, F.

Os hidrogênios dos grupos metílicos (δ) do valproato aparecem como um triplete δ 0,865 ppm ($J = 7,20$ Hz) resultante do acoplamento de spins com os hidrogênios γ . O multiplete em δ 1,309 ppm corresponde à sobreposições de sinais dos hidrogênios metilênicos γ acoplados aos hidrogênios β e δ , além de 50% do desdobramento de sinal dos hidrogênios diastereotópicos em β . O multiplete em δ 1,526 ppm corresponde à outra parcela de 50% do sinal dos hidrogênios diastereotópicos β acoplados aos hidrogênios α e γ . O hidrogênio α é atribuído ao triplete de tripletos em δ 2,330 ppm com $J=4,70$ Hz resultante do acoplamento com os hidrogênios β diastereotópicos.

Os sinais dos hidrogênios da amida primária (E, F) são detectados como simpletos alargados em δ 6,922 e 7,735 ppm. O efeito diastereotópicos dos hidrogênios da amida primária indica que o grupo possui liberdade de conformação por não estar coordenado ao metal. SILVERSTEIN (1998) mostra que “a não equivalência dos hidrogênios ligados ao nitrogênio no caso de amidas primárias é causada pela rotação lenta da ligação O=C-N provocada pela forma tautomérica $^-O-C=N^+$, resultando em uma ligação dupla parcial”, conforme a Figura 23.

Figura 23. Variações de conformação da ligação C-N do grupo amida.

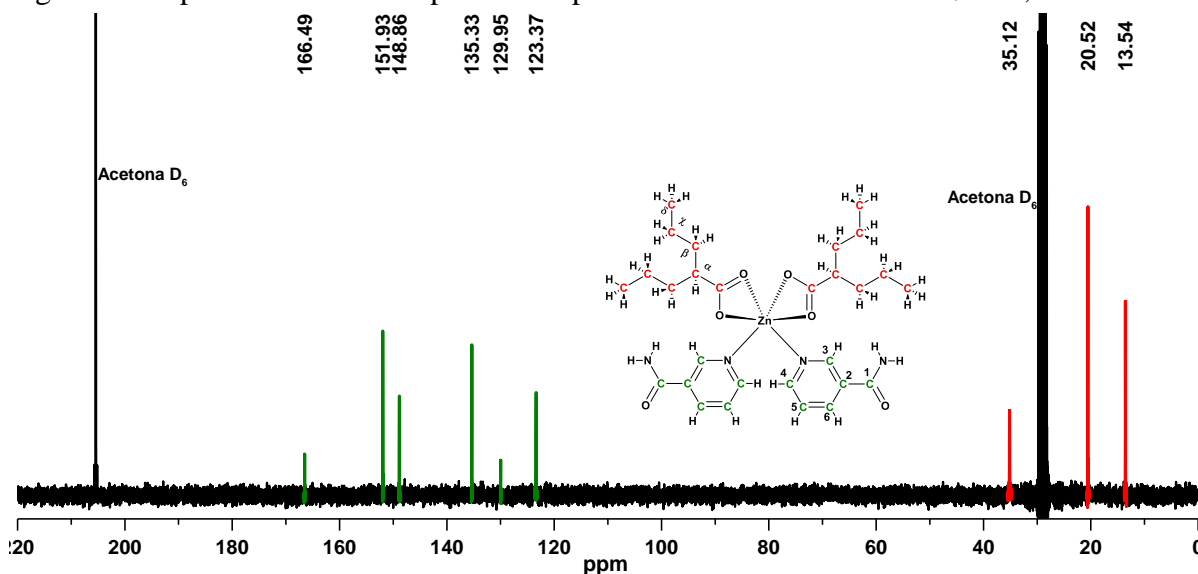


Adaptado de SILVERSTEIN (1998), pg 156.

O sinal em δ 7,487 ppm corresponde à um duplo duplete correspondente ao hidrogênio C acoplado aos vizinhos B e D, com $J=4,80$ Hz além de ocorrerem desdobramentos de todos os picos em dupletos com $J=0,90$ Hz atribuídos ao acoplamento de longa distância C-A pelas deformações fora do plano do anel piridínico. O sinal em δ 8,275 ppm é um duplo duplete de $J=7,80$ Hz do hidrogênio D acoplado ao hidrogênio C, com acoplamento à longa distância de $J=1,80$ Hz com o hidrogênio A. O duplo duplete em δ 8,715 ppm corresponde ao sinal do hidrogênio B acoplado ao hidrogênio C com $J=4,80$ Hz, apresentando acoplamento à longa distância com o hidrogênio D com $J=1,50$ Hz. O duplo duplete em δ 9,127 ppm corresponde ao hidrogênio A acoplado à longa distância com o hidrogênio D com $J=2,40$ Hz e com o hidrogênio C com $J=0,9$ Hz.

Os dados obtidos nas análises de $^1\text{HRMN}$ (Figura 22, Tabela 5) para o complexo **1** confirmam que a fórmula química mínima a ser atribuída pela valência do Zn^{+2} em esfera de coordenação octaédrica típica deve ser de 1:2:2 na ordem “metal:ligante de valência:ligante neutro”.

Figura 24. Espectro de ^{13}C RMN para o complexo **1** obtido em Acetona D_6 a 75,48 MHz



O espectro de ^{13}C RMN para o complexo **1** (Figura 24) apresenta a simetria esperada entre os dois grupos propil da molécula de valproato. Os carbonos δ -carbonílicos aparecem deslocados em δ 13,54 ppm. Em caso similar, os pares simétricos de carbonos γ e β -carbonílicos aparecem deslocados em δ 20,52 e δ 35,12 ppm, respectivamente. Os carbonos α -carbonílico e dos grupos carboxilatos não são detectados em razão da baixa concentração da amostra pela baixa solubilidade em Acetona D_6 . Os sinais dos carbonos dos ligantes nicotinamida estão atribuídos na sequência: carbonila de amida (C1) δ 166,49 ppm; C2 δ 129,70 ppm; C3 δ 151,78 ppm; C4 δ 148,65 ppm; C5 δ 123,29 ppm; C6 δ 135,07 ppm.

1.16.2.3 Análise de Espectrometria de Massas de Alta Resolução para os complexos **1** e seu precursor $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$

Os espectros de massas foram obtidos através de análise de solução do complexo a $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ em $\text{H}_2\text{O} : \text{metanol } 1:1$ sem indutor de aduto ácido fórmico ou formiato de amônio porque os complexos tendem a ionizarem-se facilmente por cisão das ligações de valência metal-carboxilato para produzir íons com carga residual contida no metal. Os espectros foram obtidos pela técnica de electrospray (ESI) em modo íons positivos em análises de fullscan com

janela espectral de m/z 100 a 1600 em modo MRM (Multiple Reaction Monitoring) à 5 eV. Íons mais intensos foram fragmentados com energia de colisão de 10-15 eV a facilitar a atribuição da composição química. As composições dos íons principais foram atribuídas através de cálculo do erro entre o valor de m/z experimental e o valor de m/z teórico para o pico monoisotópico e pela comparação das distribuições isotópicas experimentais e teóricas.

O espectro de MS do precursor $Zn_2(Valp)_4$ (Figura 25) apresentou o íon molecular como um aduto de próton e uma molécula de H_2O com massa monoisotópica em m/z 719,3019. Os demais íons identificados estão dispostos na Tabela 6. O íon foi isolado e fragmentado por MS2 (Figura 26), onde identificaram-se dois íons filhos com massas monoisotópicas em m/z 741,2833 e 701,3076 correspondentes aos adutos $[M+H_2O+Na]^+$ e $[M+H]^+$ respectivamente. A distribuição isotópica para o íon precursor apresentou 11 picos de massa monoisotópica e corresponde ao padrão de distribuição simulado para a combinação de átomos da estrutura molecular esperada para o composto em estudo. A molécula em estudo apresentou baixo poder de ionização nas condições experimentais, onde predominaram íons de m/z superiores à massa esperada para o composto. Estes íons foram identificados como clusters moleculares produzidos pela perda de ligantes de valência (valp) e adutos de próton e Na^+ .

Figura 25. Espectro de ESI-MS do precursor $Zn_2(Valp)_4$ em modo *fullscan*

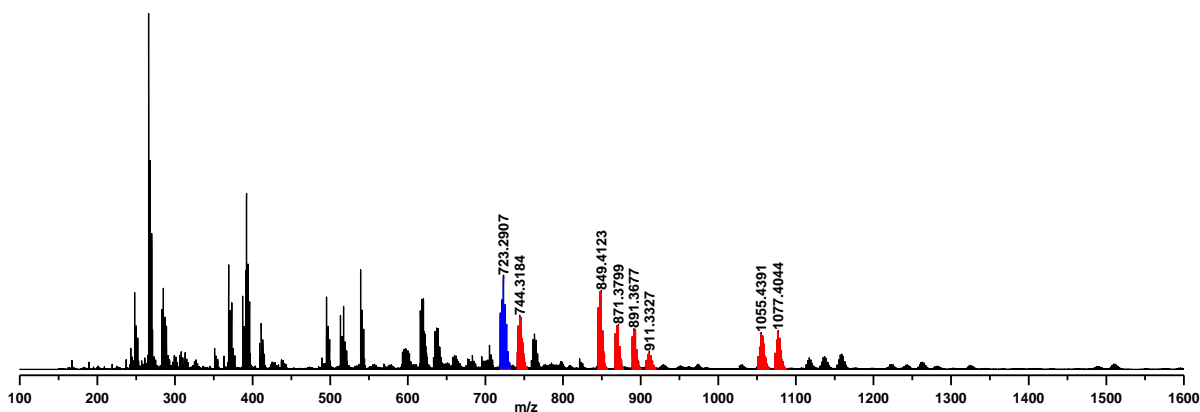


Figura 26. Espectro de MS2 para o íon m/z 719,3019 obtido à 15 eV com a distribuição isotópica em destaque.

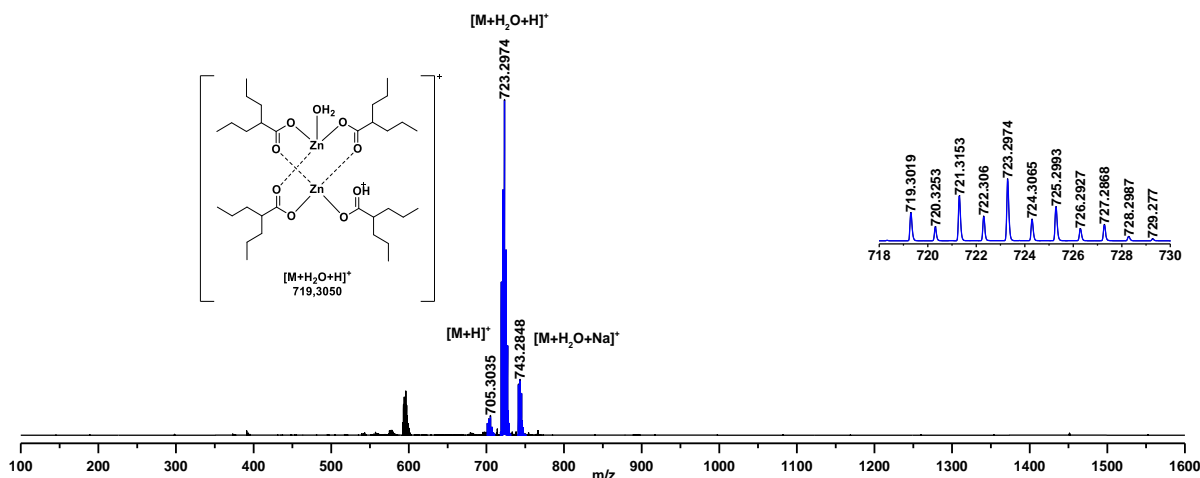


Tabela 6. Dados de ESI-MS para o precursor $Zn_2(Valp)_4$

m/z monoisotópica*	Calculado	Erro (ppm)	Fórmula	Íon
1073,4111	1073,4199	8,8	$C_{48}H_{90}NaO_{12}Zn_3$	$[Zn_3(Valp)_6+Na]^+$
1051,4353	1051,4379	2,5	$C_{48}H_{91}O_{12}Zn_3$	$[Zn_3(Valp)_6+H]^+$
907,3246	907,3235	1,8	$C_{40}H_{75}O_{10}Zn_3$	$[Zn_3(Valp)_5]^+$
889,3701	889,3733	8,6	$C_{40}H_{75}Na_2O_{10}Zn_2$	$[Zn_2(Valp)_5+2Na]^+$
867,3868	867,3914	5,3	$C_{40}H_{76}NaO_{10}Zn_2$	$[Zn_2(Valp)_5Na+H]^+$
845,4068	845,4094	3,1	$C_{40}H_{77}O_{10}Zn_2$	$[Zn_2(Valp)_5+2H]^+$
741,2833	741,2869	4,8	$C_{32}H_{62}NaO_9Zn_2$	$[Zn_2(Valp)_4+H_2O+Na]^+$
719,3019	719,3050	4,2	$C_{32}H_{63}O_9Zn_2$	$[Zn_2(Valp)_4+H_2O+H]^+$

*pico dos isótopos ^{12}C , 1H , ^{16}O , ^{64}Zn e ^{23}Na

O espectro de ESI-MS para o complexo 1 (Figura 27) apresentou picos de cluster molecular, rearranjo molecular e adutos de próton e Na^+ . O pico base com m/z monoisotópica 801,2759 corresponde ao cluster $[Zn_2(Valp)_3(Nic)_2]^+$ oriundo da fusão de duas unidades moleculares com perda de um ligante de valência (valp). O íon molecular foi identificado com baixa intensidade em m/z 595,2414 e 617,2344 na forma de adutos de próton e Na^+ respectivamente. A fragmentação do aduto de próton à 10 eV (Figura 28) produz um íon derivado em m/z 451,1335 correspondente à perda de um ligante de valência. A distribuição isotópica do íon m/z 595,2414 apresenta seis picos com intensidades correspondentes ao padrão de distribuição simulado para a fórmula molecular idealizada para o complexo 1.

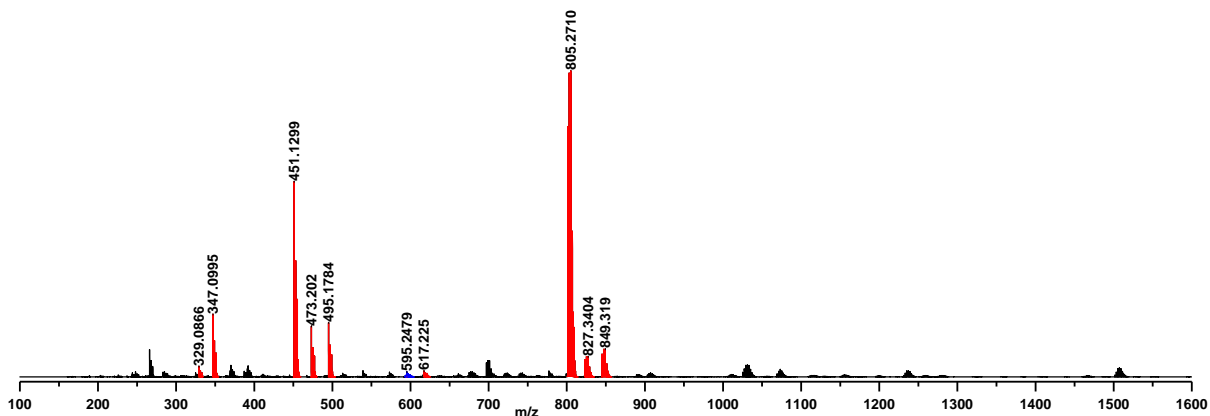
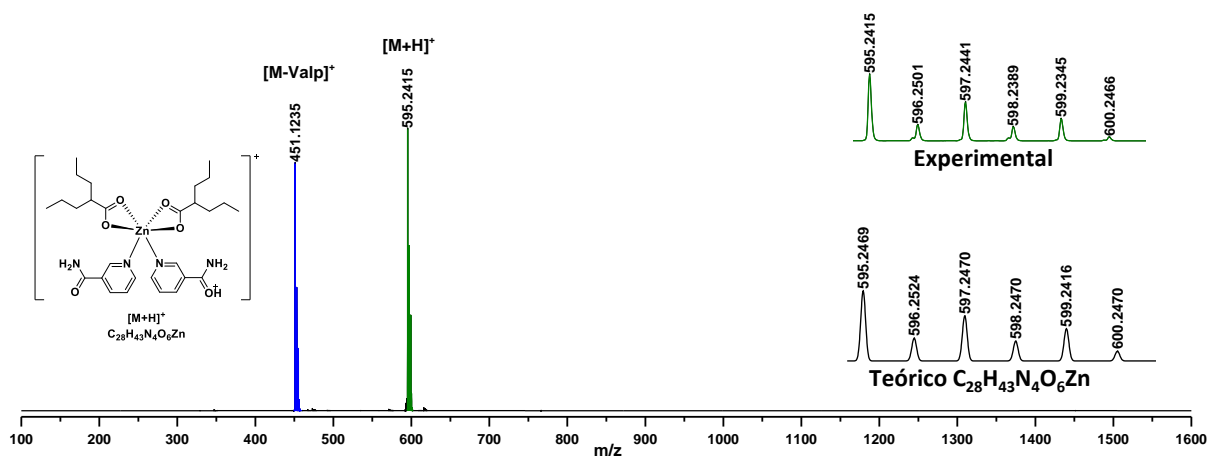
Figura 27. Espectro de ESI-MS do complexo 1 em modo *fullscan*Figura 28. Espectro de MS2 do íon m/z 595,2415 obtido à 10 eV.

Tabela 7. Dados de ESI-MS para o complexo 1

m/z monoisotópica*	Calculado	Erro (ppm)	Fórmula	Íon
845,3258	845,3243	2,5	$C_{38}H_{66}N_2NaO_9Zn_2$	$[Zn_2(Valp)_5Nic+Na]^+$
823,3417	823,3424	0,9	$C_{38}H_{67}N_2O_9Zn_2$	$[Zn_2(Valp)_4Nic+H]^+$
801,2759	801,2759	0,0	$C_{36}H_{57}N_4O_8Zn_2$	$[Zn_2(Valp)_3(Nic)_2]^+$
617,2344	617,2288	9,1	$C_{28}H_{42}N_4NaO_6Zn$	$[Zn(Valp)_2(Nic)_2+Na]^+$
595,2414	595,2469	9,1	$C_{28}H_{43}N_4O_6Zn$	$[Zn(Valp)_2(Nic)_2+H]^+$
495,1831	495,1808	4,7	$C_{22}H_{36}N_2NaO_5Zn$	$[Zn(Valp)_2Nic+Na]^+$
473,1995	473,1988	1,3	$C_{22}H_{37}N_2O_5Zn$	$[Zn(Valp)_2Nic+H]^+$
451,1335	451,1324	3,6	$C_{20}H_{27}N_4O_4Zn$	$[Zn(Valp)(Nic)_2]^+$
347,0950	347,0944	1,7	$C_{14}H_{23}N_2O_4Zn$	$[Zn(Valp)(Nic)+H_2O]^+$
329,0821	329,0844	5,3	$C_{14}H_{21}N_2O_3Zn$	$[Zn(Valp)(Nic)]^+$

*pico dos isótopos ^{12}C , 1H , ^{14}N , ^{16}O , ^{64}Zn e ^{23}Na

1.16.2.4 Análise cristalográfica do complexo 1

A análise de difração de raios X de monocristal para o complexo **1** foi realizada de acordo com o método descrito no item 4.3.4. Os resultados dos parâmetros do cristal estão na Tabela 8.

Tabela 8. Dados do cristal e refinamento da estrutura do complexo **1**

Parâmetros	Resultados
Fórmula empírica	C ₂₈ H ₄₂ N ₄ O ₆ Zn
Massa molar (g.mol ⁻¹)	596,03
T/K	293(2)
Radiação, λ/Å	Mo Kα; 0.71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, C2/c
Dimensões da célula unitária (Å)	
A	14,4173(5)
B	10,4246(4)
C	20,7978(8)
α(°)	90,0
β(°)	98,2030(10)
γ(°)	90,0
Volume (Å ³)	3093,8(2)
Z	4
Densidade calculada (g.cm ⁻³)	1,280
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,838
F (000)	1264
Tamanho do cristal (mm)	0,20 x 0,12 x 0,11
Intervalo Theta (θ) para coleta de dados	3,25 até 30,60 graus de ângulo
Intervalos de índice	-17 ≤ h ≤ 20 -14 ≤ k ≤ 14 -29 ≤ l ≤ 22
Reflexões coletadas / exclusivas	11878/4757 [R _{int} = 0,0151]
Totalização ao θ máximo (30,60 graus de ângulo)	99,8 %
Correção de absorção	Equivalentes semi-empíricos
Transmissão máxima e mínima	0,9235 e 0,8703
Método de refinamento	Quadrados mínimos de matriz completa em F ²
Dados/restrições/parâmetros	4757/20/171
Refinamento de ajuste em F ²	1,032
Índice de R final [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0564, wR ₂ = 0,1539
Índices de R	R ₁ = 0,0710, wR ₂ = 0,1627
Maior diferença de pico e buraco (e.Å ⁻³)	1,146 e -1,137

A cristalização do complexo **1** ocorre em sistema monoclínico e com grupo espacial (simetria) do tipo C2/c, um empacotamento molecular comum para complexos de Zn contendo

valproato e ligantes de natureza piridínica descrito ABU, *et al* (2013) na análise de monocristais de $\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Phen} \cdot \text{H}_2\text{O}$. A Figura 29 mostra a estrutura (ORTEP) do complexo 1 contemplando o átomo de Zn II central ligado com quatro átomos de oxigênio de dois grupos valproato e dois átomos de nitrogênio de dois grupos Nic. A esfera de coordenação é formada por um octaedro distorcido com as duas moléculas de Nic dispostas em um ângulo de $96,08^\circ$ (Tabela 9) entre si em oposição à duas moléculas de valproato bidentadas. Os átomos de oxigênio do grupo carboxilato ligam-se de assimetricamente ao metal através do oxigênio de valência formando uma ligação de $2,090 \text{ \AA}$ e o oxigênio da carbonila com $2,3108 \text{ \AA}$ de distância.

Figura 29. ORTEP do complexo 1 apresentando a distribuição espacial dos ligantes e a esfera de coordenação do com o átomo de Zn centralizado.

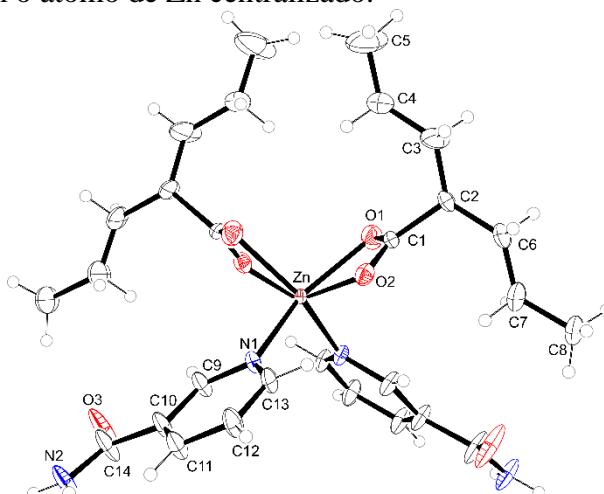
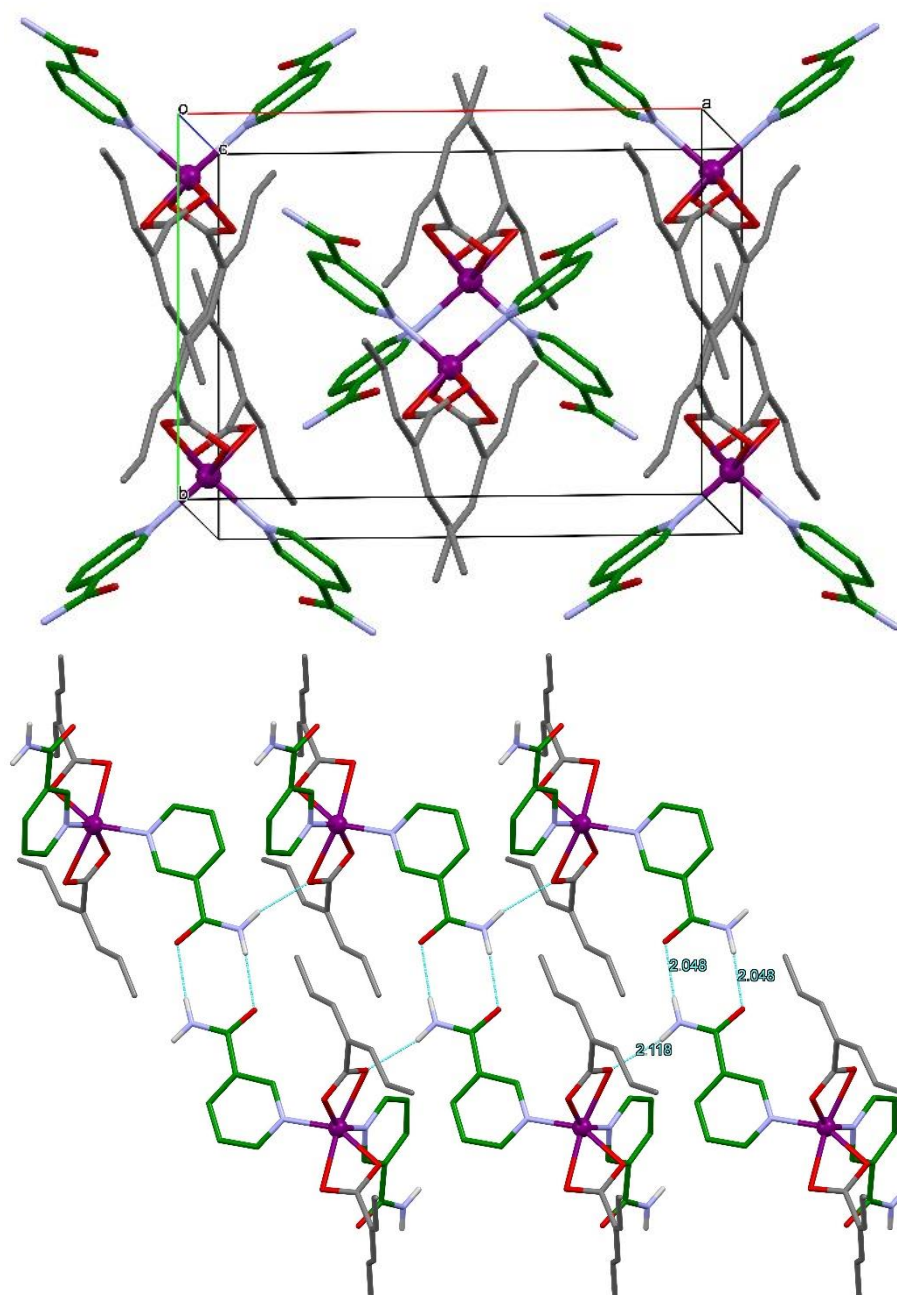


Tabela 9. Ligações e ângulos selecionados para representar a estrutura do complexo 1.

Ligação	Distância (Å)	Sistema	Ângulo (°)
Zn-N(1)	2,086(2)	N(1)-Zn-N(1)#1	96,08(12)
Zn-N(1)#1	2,086(2)	N(1)-Zn-O(1)	149,55(9)
Zn-O(1)	2,090(2)	N(1)#1-Zn-O(1)	90,67(9)
Zn-O(1)#1	2,090(2)	N(1)-Zn-O(1)#1	90,67(9)
Zn-O(2)	2,3108(18)	N(1)#1-Zn-O(1)#1	149,55(9)
Zn-O(2)#1	2,3108(19)	O(1)-Zn-O(1)#1	98,39(12)
Zn-C(1)	2,543(2)	N(1)-Zn-O(2)	90,91(8)
Zn-C(1)#1	2,543(2)	N(1)#1-Zn-O(2)	110,26(7)
		O(1)-Zn-O(2)	59,03(8)
		O(1)#1-Zn-O(2)	99,24(8)
		N(1)-Zn-O(2)#1	110,26(7)
		O(3)-C(14)-N(2)	123,1(3)

A representação da célula unitária apresentada na Figura 30 mostra o empacotamento molecular coeso através de ligações de hidrogênio. Cada ligante Nic produz três ligações de hidrogênio intermoleculares, das quais duas são simétricas dos grupos amida (2,048 Å) (N-H...O) e a terceira ocorrendo entre o hidrogênio do grupo amida com o oxigênio da carbonila de um grupo valproato da molécula vizinha, à 2,118 Å de distância.

Figura 30. Representações da célula unitária e das ligações de hidrogênio intermoleculares do complexo **1**.

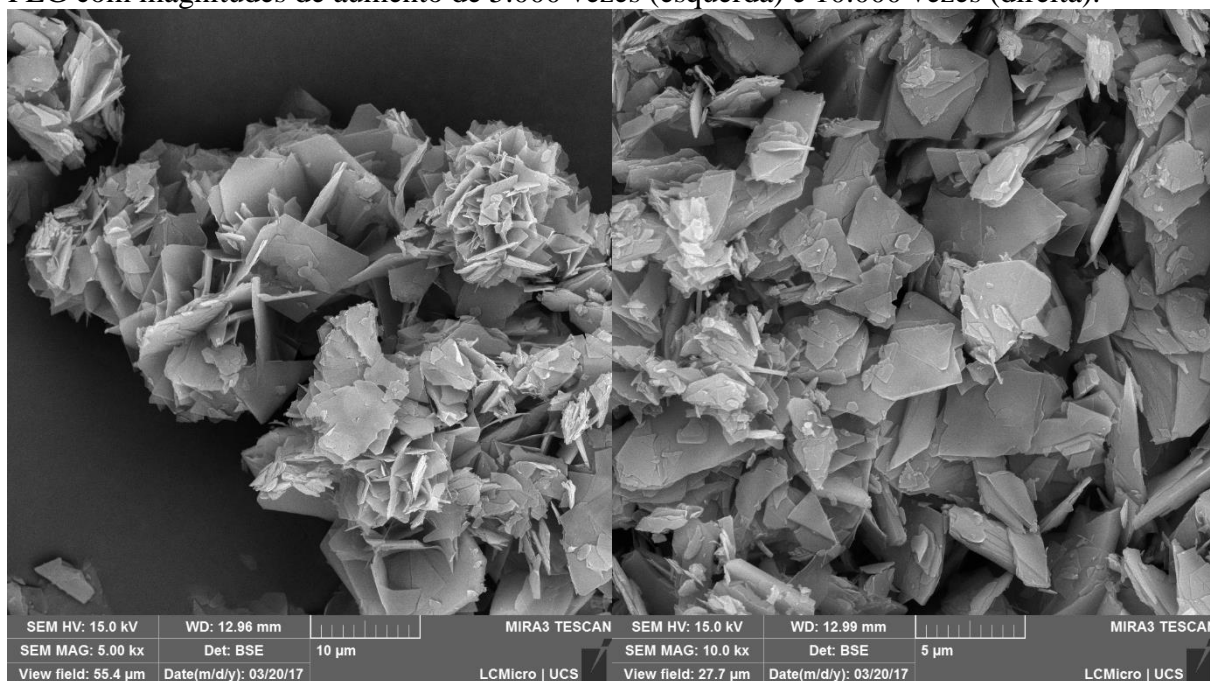


1.16.3 Recuperação do complexo $Zn_2(Diclof)_4(Nic)_2$ (**2**) e seu sal precursor $Zn(Diclof)_2$

Para o complexo binário $Zn(Diclof)_2$, o rendimento estequiométrico de 87% está de acordo com a descrição de ABU ALI & JABALI, (2016), os quais obtiveram rendimento de 86% para uma reação de diclofenaco de sódio com $ZnCl_2$ em condições similares de concentração e temperatura. O resultado mostra que o equilíbrio reacional reagentes \rightleftharpoons produtos não é afetado quando os contra íons Na^+ e Cl^- são substituídos na reação por K^+ e SO_4^{2-} em meio aquoso, denotando que o equilíbrio depende apenas da constante do produto de solubilidade (kPs) do complexo. O produto seco à vácuo apresenta-se como um sólido branco finamente dividido, com solubilidade à frio $\geq 10\%$ m/v em etanol, acetona, éter etílico, clorofórmio, tetraidrofurano (THF), dimetilsulfóxido (DMSO) e *N,N'*-dimetilformamida (DMF).

O complexo ternário $Zn_2(Diclof)_4(Nic)_2$ (**2**) apresentou rendimento estequiométrico de 70 %. O produto seco à vácuo apresenta-se como um sólido branco finamente dividido, não higroscópico e com solubilidade à frio em DMSO, DMF e THF. Este sólido produzido por cristalização rápida em etanol tem uma aparência amorfa, porém a microestrutura apresenta um ordenamento cristalino regular sob a forma de lâminas empilhadas em análise ao microscópio eletrônico (Figura 31). A micrografia com magnitude de aumento de 5.000 vezes mostra aglomerados de lâminas de cristal oriundos de pontos de nucleação do composto com dimensões aproximadas de 50 μm . A micrografia com magnitude de aumento de 10.000 vezes apresenta as estruturas individuais das lâminas.

Figura 31. Micrografias do pó do complexo **2** obtidas em microscópio de varredura com emissor FEG com magnitudes de aumento de 5.000 vezes (esquerda) e 10.000 vezes (direita).



1.16.3.1 Elucidação estrutural do complexo **2**

O complexo **2** e seu sal precursor foram analisados pelas técnicas de FTIR, ¹HRMN, ¹³CRMN, ESI-TOF-MS e UV-Visível e comparados com os dados da literatura. A análise por difração de Raios-X de monocristal foi aplicada apenas para o complexo ternário por tratar-se de composto inédito. Neste capítulo serão analisados os individualmente todos os espectros.

O espectro de FTIR para o complexo binário Zn(Diclof)₂ apresenta as mesmas bandas descritas por ABU ALI; JABALI, (2016) utilizando as mesmas técnicas analíticas.

Figura 32. Espectro de transmitância de FTIR para o precursor $\text{Zn}(\text{Diclof})_2$ obtido em estado sólido em pastilha de KBr

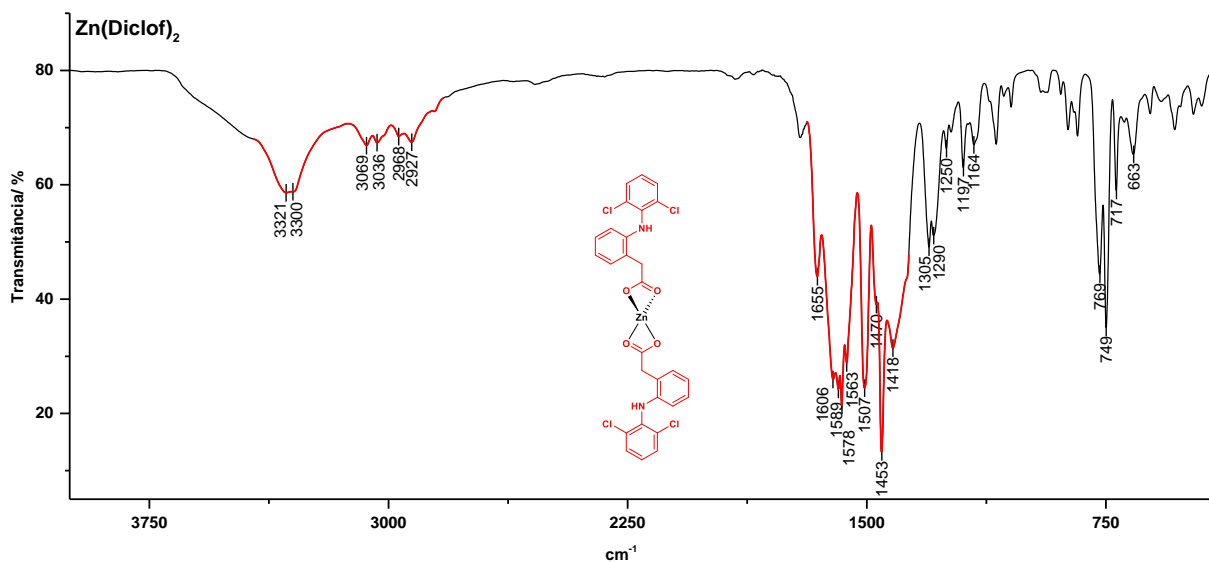
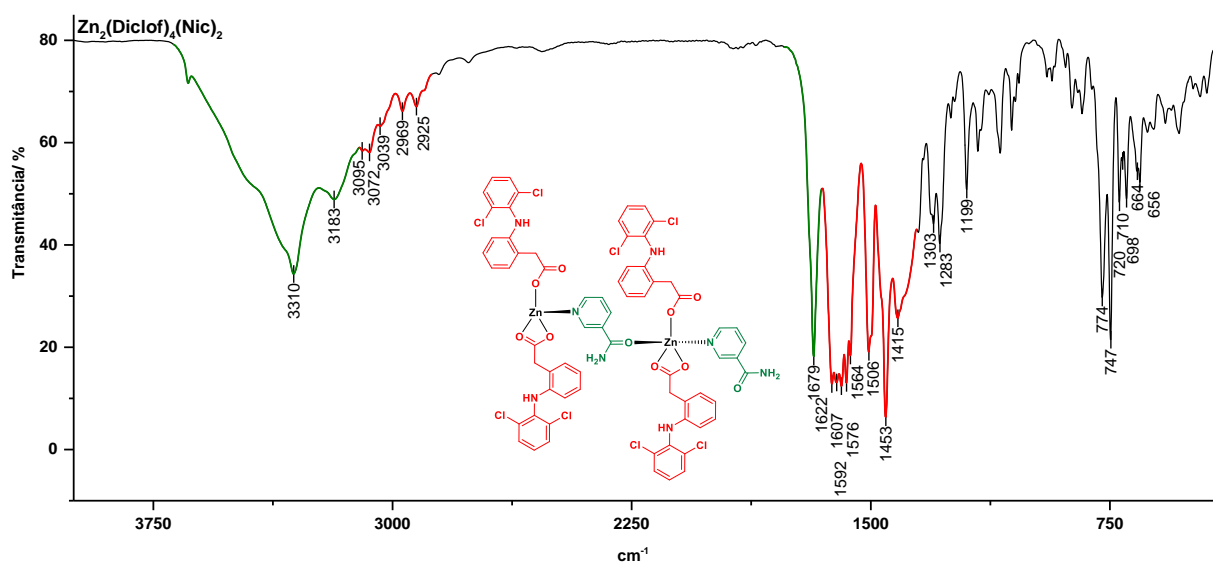


Figura 33. Espectro de transmitância de FTIR para o complexo **2** obtido em estado sólido em pastilha de KBr



O espectro de FTIR para o complexo **2** apresenta uma banda forte em 3310 cm^{-1} correspondente à deformação axial assimétrica (vas) da amina secundária do diclofenaco. Observa-se a banda de deformação axial simétrica (vs) da amina primária da nicotinamida em 3183 cm^{-1} , com a banda vas de amina primária provavelmente sobreposta pela banda vas da amina secundária do diclofenaco. A banda forte em 1679 cm^{-1} corresponde ao estiramento da

ligação CO sp² da função carbonila de amida da nicotinamida. A banda curta em 3072 cm⁻¹ corresponde à deformação axial C-H de carbono sp² do anel piridínico da nicotinamida. As duas bandas fracas em 2969 e 2925 cm⁻¹ correspondem às vas e vs dos grupos metileno (CH₂) α-carbonílicos do diclofenaco. As bandas fortes entre 1622 e 1592 cm⁻¹ correspondem às deformações axiais normais (δ) das funções carboxilato do diclofenaco ligado ao Zn, enquanto as bandas em 1576 e 1564 cm⁻¹ correspondem à duas vibrações assimétricas (*v_{assim}*) diferentes para a mesma função. A banda média em 1415 cm⁻¹ corresponde à vibração simétrica (*v_{sim}*) da função carboxilato. A banda forte em 747 cm⁻¹ corresponde à vas dos átomos de Cl do anel aromático do diclofenaco. A partir dos parâmetros de ZELEŇÁK, *et al.*, (2007a), (Figura 19) calcularam-se os valores de Δ*v* para o complexo **2** e o respectivo sal precursor. Os resultados calculados na Tabela 10 mostram o caráter monodentado do sal diclofenaco de potássio, enquanto o precursor Zn(Diclof)₂ tem características de quelato. O complexo ternário **2** apresenta duas bandas de *v_{assim}* e indica a presença de ligações O-Zn em configurações dos tipos quelato bidentado e quelato monodentado.

Tabela 10. Variações dos intervalos entre as bandas de vibrações mais características entre o complexo **2** e seus precursores.

Composto	Vibrações <i>v</i> de R-COO ⁻ (cm ⁻¹)			
	<i>v_{assim}</i>	<i>v_{sim}</i>	Δ <i>v</i>	Δ <i>v_{ref}</i>
Diclofenaco de potássio*	1578	1451	127	-
Zn(Diclof) ₂	1578	1418	160	173 ^(a)
2	1564 ⁽¹⁾	1415	149⁽¹⁾	-
	1576 ⁽²⁾	1415	161⁽²⁾	-

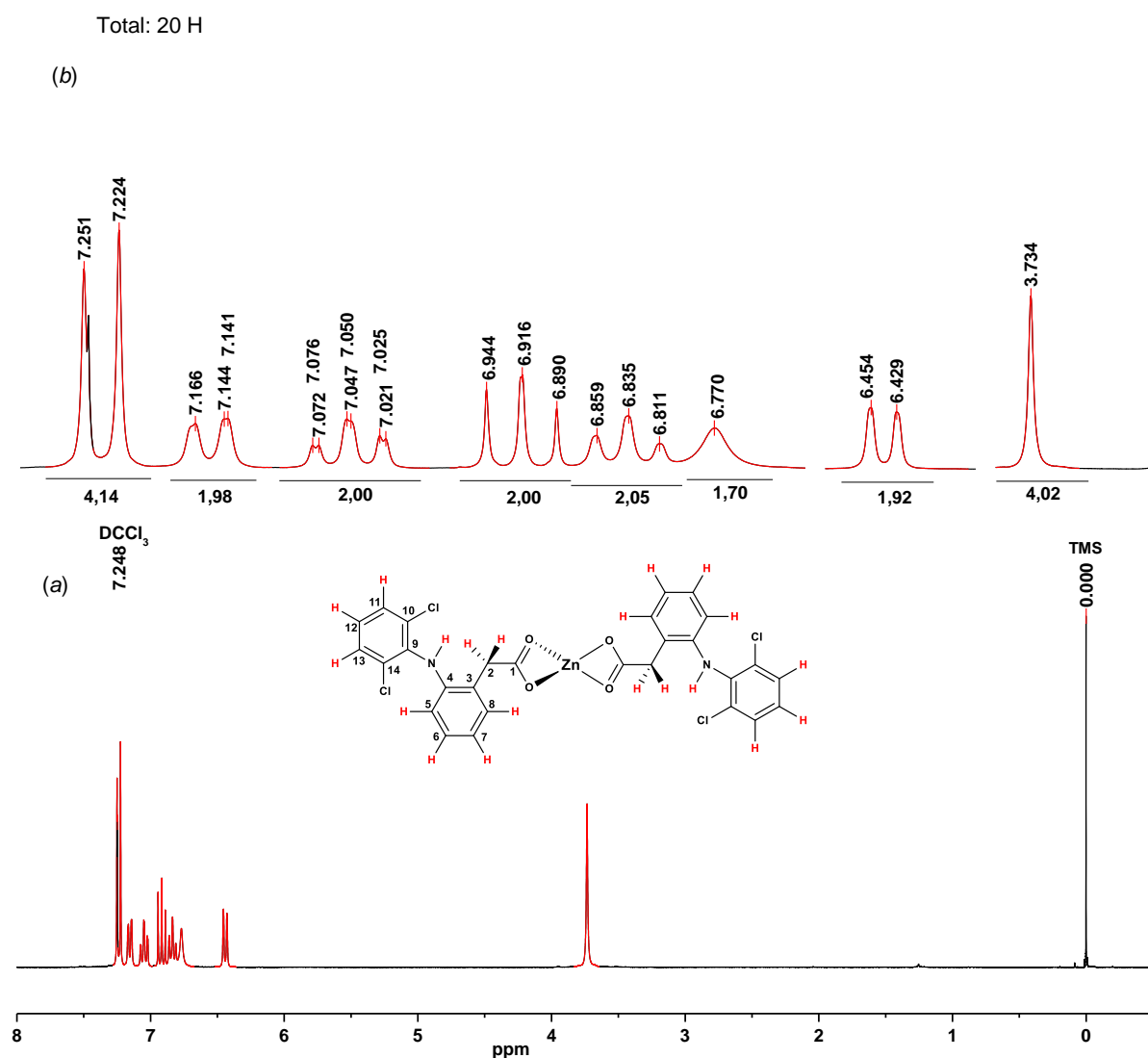
*Espectro de FTIR dispostos no ANEXO 1

^(a)ABU ALI; JABALI, (2016), para um complexo diidratado.

1.16.3.2 Análise dos espectros de $^1\text{HRMN}$ e $^{13}\text{CRMN}$ do complexo $\text{Zn}_2(\text{Diclof})_4(\text{Nic})_2$ e seu precursor $\text{Zn}(\text{Diclof})_2$.

O espectro de $^1\text{HRMN}$ para o complexo $\text{Zn}(\text{Diclof})_2$ (Figura 34) foi calibrado em relação ao pico simples do padrão interno TMS em δ 0,00 ppm. Os hidrogênios do grupo diclofenaco receberam atribuições numéricas relativas aos números dos átomos de carbono aos quais estão ligados.

Figura 34. Espectro de $^1\text{HRMN}$ para o precursor $\text{Zn}(\text{Diclof})_2$ (a) com expansões (b) obtido em CDCl_3 a 300,18 MHz



Todos os dados obtidos da análise dos sinais do espectro estão dispostos na Tabela 11. O

simpleto em δ 3,734 ppm corresponde aos hidrogênios do grupo metilênico da posição 2, em condição de spin isolado.

Tabela 11. Dados obtidos do espectro de $^1\text{HRMN}$ para o precursor $\text{Zn}(\text{Diclof})_2$ obtido em CDCl_3 à 300,18 MHz.

Sinal (ppm)	Multiplicidade	Integral relativa	Constante de acoplamento J (Hz)
3,734	Simpleto	4,02	-
6,429	Dupleto	1,92	7,50 (5-6)
6,770	Simpleto	1,70	-
6,835	Tripleto	2,05	7,20 (7-6, 7-8)
6,890	Duplo-dupleto	2,00*	8,40 (12-11,13)
7,050	Duplo-triplete	2,00	7,80 (6-5, 6-7), 0,90 (6-8)
7,141	Duplo-dupleto	1,98	7,50 (8-7); 0,90 (8-6)
7,224	Dupleto	4,14**	8,10 (11,13-12)

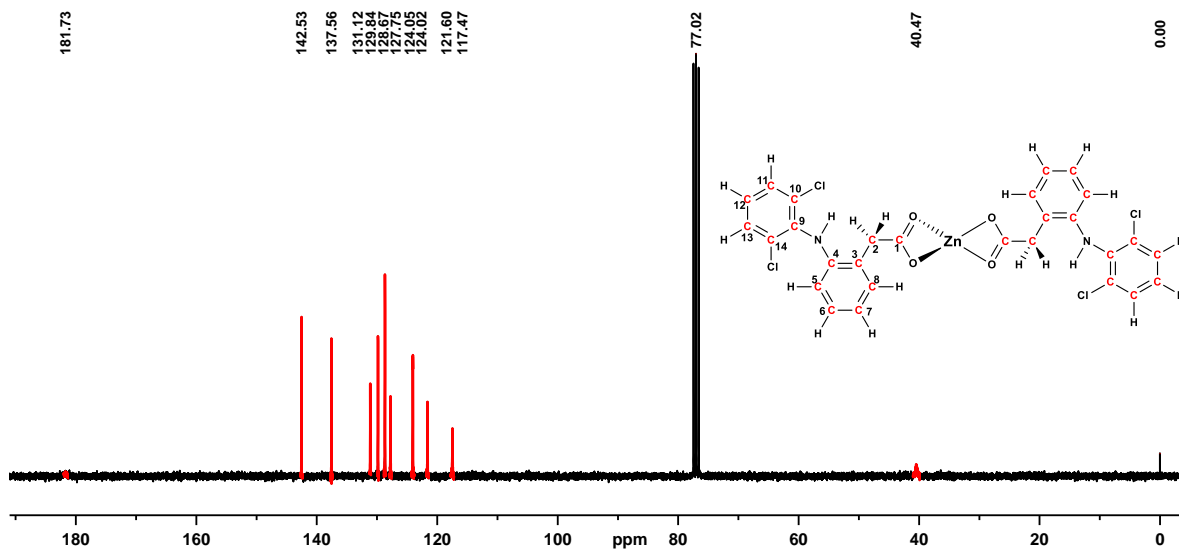
*Integral de referência com atribuição relativa = 2H

** A área integrada inclui o pico residual do solvente CDCl_3 sobreposto pelo sinal dos prótons da amostra.

O dupleto em δ 6,429 ppm corresponde ao hidrogênio da posição 5 acoplado ao hidrogênio da posição 6 com $J=7,50$ Hz. O simpleto em δ 6,770 ppm corresponde ao hidrogênio da amina secundária que une os dois anéis aromáticos. O tripleto em δ 6,835 ppm corresponde ao hidrogênio da posição 7 acoplado com os hidrogênios das posições 6 e 8 com $J=7,20$ Hz. O duplo dupleto em δ 6,890 ppm corresponde ao hidrogênio da posição 12 acoplado aos hidrogênios das posições 11 e 13, com $J=8,40$ Hz. O duplo tripleto em δ 7,050 ppm corresponde ao hidrogênio da posição 6 acoplado aos hidrogênios das posições 5 e 7 com $J=7,80$ Hz, além de um acoplamento à longa distância com o hidrogênio da posição 8 com $J=0,90$ Hz. O duplo dupleto em δ 7,141 ppm corresponde ao hidrogênio da posição 8 acoplado com o hidrogênio da posição 7 com $J=7,50$ Hz com acoplamento à longa distância com o hidrogênio da posição 6 com $J=0,90$ Hz. O dupleto em δ 7,224 ppm corresponde aos hidrogênios simétricos das posições 11 e 13 acoplados com o hidrogênio da posição 12 com $J=8,10$ Hz.

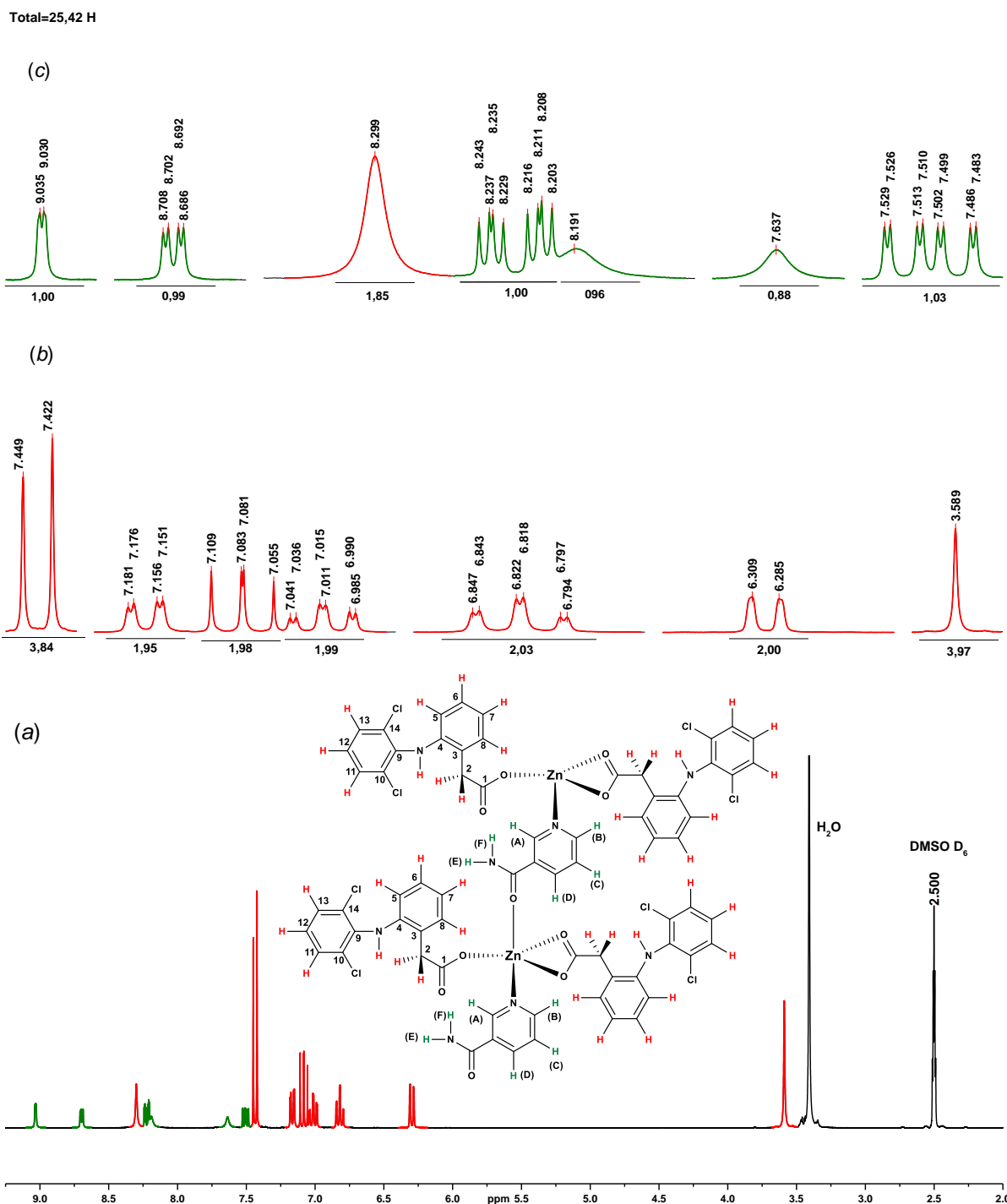
A análise do espectro permitiu detectar a presença de todos os hidrogênios presentes no ligante diclofenaco, porém não detectou-se a presença de moléculas de H₂O coordenadas ao metal como descrito por ABU ALI; JABALI, (2016).

Figura 35. Espectro de ¹³CRMN para o precursor Zn(Diclof)₂ obtido em CDCl₃ a 75,48 MHz



O espectro de ¹³CRMN para o precursor Zn(Diclof)₂ (Figura 35) foi calibrado pelo pico do padrão interno TMS em δ 0,00 ppm em CDCl₃. Os carbonos foram enumerados de acordo com a posição na cadeia, conforme o método utilizado para o espectro de ¹HRMN. O carbono do carboxilato (C1) foi detectado em δ 181,73 ppm com baixa intensidade. O carbono metilênico (C2) foi detectado em δ 40,47 ppm em baixa intensidade. Todos os carbonos sp² dos dois anéis aromáticos foram detectados 117 e 142 ppm e estão dispostos em ordem crescente: δ 117,47 ppm (C7); 121,60 ppm (C6); 124,02 (C5); 124,05 (desidrogenado C4), 127,75(C12); 128,67 (simétricos C11, C13), 129,84 (desidrogenado C9), 131,12 (C8), 137,56 (simétricos clorados C10 e C14); 142,53 (desidrogenado C3).

Figura 36. Espectro de $^1\text{HRMN}$ para o complexo **2** (a) com expansões (b) (c) em DMSO D_6 a 300,18 MHz.



O espectro de $^1\text{HRMN}$ para o complexo **2** (Figura 36) foi calibrado em relação ao pico quinteto residual do solvente DMSO D_6 em δ 2,500 ppm. Os hidrogênios do grupo diclofenaco receberam atribuições numéricas relativas aos números dos átomos de carbono aos quais estão

ligados, enquanto os hidrogênios do ligante foram atribuídos como letras maiúsculas em ordem alfabética. Todos os dados obtidos do espectro estão expressos na Tabela 12.

Tabela 12. Dados obtidos do espectro de $^1\text{HRMN}$ para o complexo **2** obtido em DMSO D_6 à 300,18 MHz.

Sinal (ppm)	Multiplicidade	Integral relativa	Constante de acoplamento J (Hz)
3,589	Simpleto	3,97	-
6,285	Dupleto	2,00*	7,20 (5-6)
6,818	Duplo-triplete	2,03	7,50 (6-5,7); 1,20 (6-8)
7,011	Duplo-triplete	1,99	7,80 (7-6,8); 1,20 (7-5)
7,055	Duplo-dupleto	1,98	7,80 (12-11,13)
7,151	Duplo-dupleto	1,95	7,50 (8-7); 1,50 (8-6)
7,422	Dupleto	3,84	8,10 (11,13-12)
7,483	Duplo-dupleto	1,03	4,80 (C-B,D); 0,90 (C-A)
7,637	Simpleto	0,88	-
8,191	Simpleto	0,90	-
8,203	Duplo-dupleto	1,06	8,10 (D-C); 1,80 (D-A)
8,299	Simpleto	1,85	-
8,686	Duplo-dupleto	0,99	4,80 (B-C); 1,80 (B-D)
9,030	Dupleto	1,00	1,50 (A-D)

*Integral de referência com atribuição relativa = 2H

O simpleto em δ 3,589 ppm corresponde aos dois hidrogênios metilênicos da posição 2 em isolamento de spin. O dupleto em δ 6,285 ppm corresponde ao hidrogênio da posição 5 acoplado ao hidrogênio da posição 6 com $J=7,20$ Hz. O duplo triplete em δ 6,818 ppm corresponde ao hidrogênio da posição 6 acoplado com os hidrogênios das posições 5 e 7 com $J=7,50$ Hz, com acoplamento a longa distância com o hidrogênio na posição 8 à $J=1,20$ Hz. O triplete em δ 7,011 ppm corresponde ao hidrogênio da posição 7 acoplado aos hidrogênios das posições 6 e 8, com $J=7,80$ Hz. Observa-se acoplamento à longa distância com o hidrogênio da posição 5 com $J=1,20$ Hz. O duplo dupleto em δ 7,055 ppm corresponde ao hidrogênio da posição 12 acoplado aos hidrogênios das posições 11 e 13 com $J=7,80$ Hz. O duplo dupleto em δ 7,151 ppm corresponde ao hidrogênio da posição 8 acoplado com o hidrogênio da posição 7 com $J=7,50$ Hz com acoplamento à longa distância com o hidrogênio da posição 6 com $J=0,90$

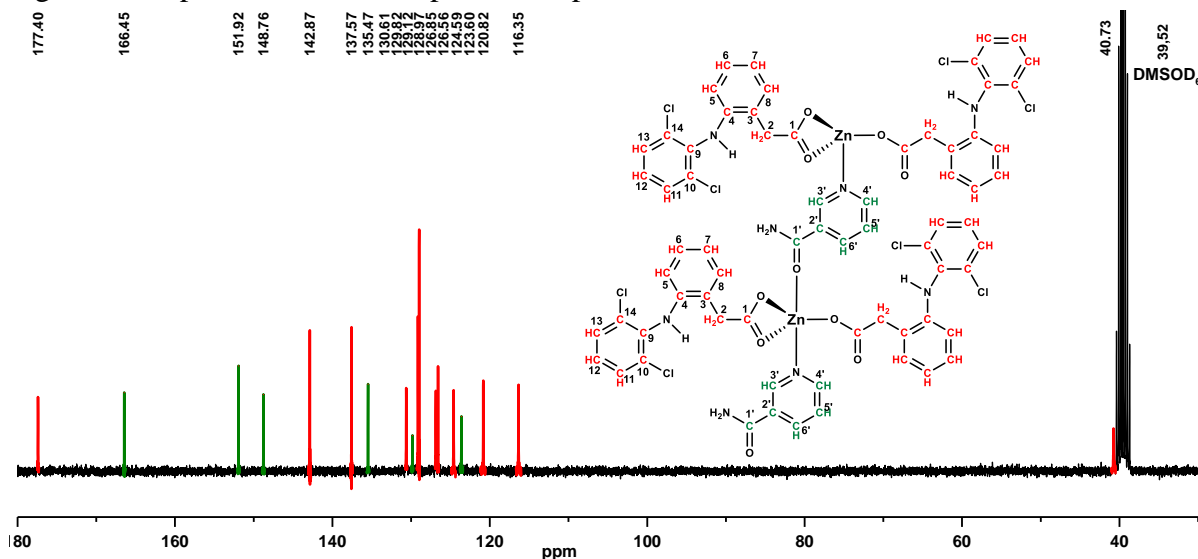
Hz. O duplete em δ 7,224 ppm corresponde aos hidrogênios simétricos das posições 11 e 13 acoplados com o hidrogênio da posição 12 com $J=8,10$ Hz. O simpleto em δ 8,299 ppm corresponde aos hidrogênios das aminas secundárias do diclofenaco.

O sinal em δ 7,483 ppm corresponde à um duplo duplete correspondente ao hidrogênio C acoplado aos vizinhos B e D, com $J=4,80$ Hz além de ocorrerem desdobramentos de todos os picos em dupletos com $J=0,90$ Hz atribuídos ao acoplamento de longa distância C-A pelas deformações fora do plano do anel piridínico. O sinal em δ 8,203 ppm é um duplo duplete de $J=8,10$ Hz do hidrogênio D acoplado ao hidrogênio C, com acoplamento à longa distância de $J=1,80$ Hz com o hidrogênio A. O duplo duplete em δ 8,686 ppm corresponde ao sinal do hidrogênio B acoplado ao hidrogênio C com $J=4,80$ Hz, apresentando acoplamento à longa distância com o hidrogênio D com $J=1,80$ Hz. O duplo duplete em δ 9,030 ppm corresponde ao hidrogênio A acoplado à longa distância com o hidrogênio D com $J=1,50$ Hz. Os sinais dos hidrogênios da amida primária (E, F) são detectados como simpletos alargados em δ 7,637 e 8,191 ppm. O efeito diasterotópico dos hidrogênios da amida primária indica que o grupo possui liberdade de conformação (epimerização) por não estar coordenado ao metal, conforme as ilustrações na Figura 23.

O espectro de $^{13}\text{CRMN}$ para o complexo **2** (Figura 37) foi calibrado pelo pico septeto do solvente DMSO-d_6 em δ 39,52 ppm. Os carbonos foram enumerados de acordo com a posição na cadeia, conforme o método utilizado para o espectro de $^1\text{HRMN}$. O carbono do carboxilato (C1) foi detectado em δ 177 ppm. O carbono metilênico (C2) foi detectado em δ 40,73 ppm. Todos os carbonos sp^2 dos dois anéis aromáticos foram detectados 116 e 143 ppm e estão dispostos em ordem crescente: δ 116,35 ppm (C7); 120,82 ppm (C6); 126,85 (C12); 124,59 (C5); 126,51 (desidrogenado C4), 128,97 (simétricos C11, C13), 129,12 (desidrogenado C9), 130,61 (C8), 137,57 (simétricos clorados C10 e C14); 142,87 (desidrogenado C3). Os carbonos do anel piridínico da nicotinamida foram detectados em um intervalo de δ 123 à 166

ppm e foram atribuídos de acordo com a posição em relação ao grupo principal. O carbono do grupo amida C1' foi detectado em δ 166,45 ppm, C2' 129,82 ppm, C3' 148,76 ppm, C4' 151,78 ppm, C5' 123,60 ppm e C6' 135,47 ppm.

Figura 37. Espectro de ^{13}C RMN para o complexo **2** obtido em DMSO-d_6 a 75,48 MHz



As análises dos espectros de ^1H e ^{13}C RMN para o complexo **2** e seu precursor revelam alguns efeitos do metal sobre os ligantes. Observa-se um efeito de blindagem dos spins dos núcleos de ^1H e ^{13}C à medida em que o número de coordenação do metal aumenta, indicando transferência de carga do metal em direção ao ligante e produzindo aumento da densidade das nuvens eletrônicas.

1.16.3.3 Análise de ESI-MS em modo íons positivos para o complexo **2** e seu precursor

O espectro de MS do precursor $\text{Zn}(\text{Diclof})_2$ (Figura 38) apresentou o íon molecular como um aduto de próton com massa monoisotópica em m/z 652,9533. Foram identificados sete íons derivados do dímero $\text{Zn}_2(\text{Diclof})_4$ o que denota que a deste precursor seja um oligômero com fórmula molecular mínima $\text{Zn}(\text{R-COO}^-)_2$. Todos os íons identificados estão dispostos na Tabela 13. O íon molecular m/z 652,9533 foi isolado e fragmentado com energia de colisão de 15 eV (Figura 39) e produziu quatro íons derivados em m/z 636,9530 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 377,9516 $[\text{M}-\text{Diclof}+\text{H}_2\text{O}]^+$, 359,0494 $[\text{M}-\text{Diclof}]^+$ e 278,0154 $[\text{Diclof}-\text{H}_2\text{O}]^+$ como sendo o íon

acílio do diclofenaco ($R-C\equiv O^+$) (SILVERSTEIN, 1998). A expansão da escala entre m/z 652 e 662 mostra o padrão da distribuição isotópica em alta resolução coincidente com a fórmula molecular $C_{28}H_{21}Cl_4N_2O_4Zn$.

Figura 38. Espectro de ESI-MS do precursor $Zn(diclof)_2$ em modo *fullscan*

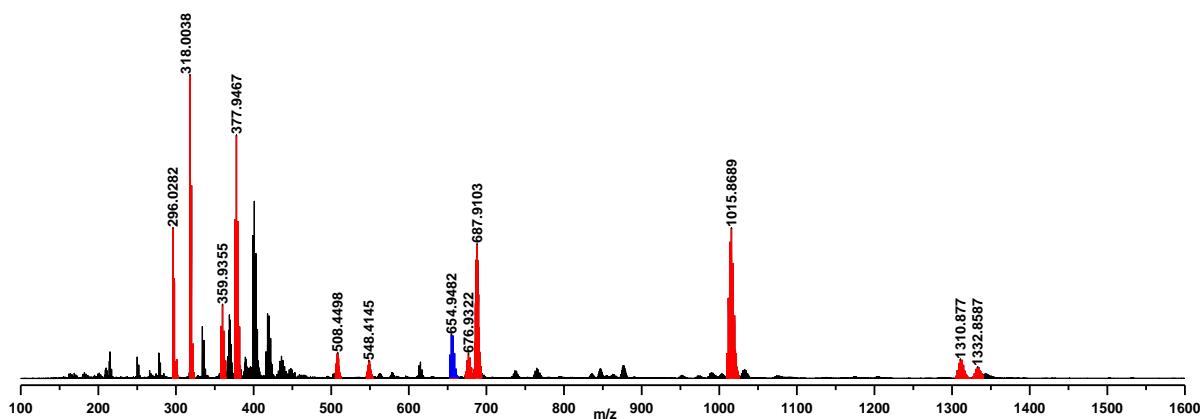


Figura 39. Espectro de MS2 em 15 eV para o íon m/z monoisotópica 652,9533 com o padrão de distribuição isotópica em destaque.

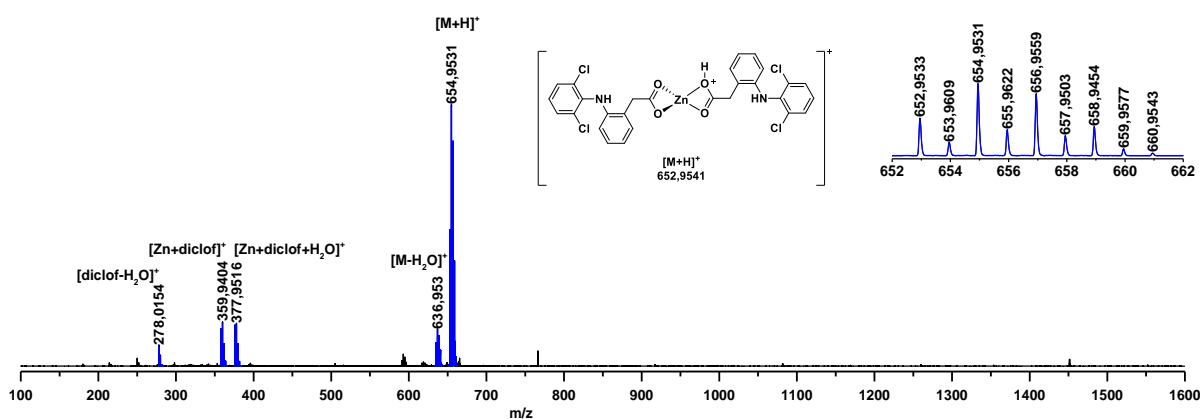


Tabela 13. Dados de ESI-MS para o composto precursor $Zn(diclof)_2$ em análise *fullscan*

m/z monoisotópica*	Calculado	Erro (ppm)	Fórmula	Íon
1326,8945	1326,8830	8,7	$C_{56}H_{40}Cl_8N_4NaO_8Zn_2$	$[Zn_2(diclof)_4+Na]^+$
1304,8890	1304,9010	7,4	$C_{56}H_{41}Cl_8N_4O_8Zn_2$	$[Zn_2(diclof)_4+H]^+$
1009,8808	1009,8843	3,5	$C_{42}H_{30}Cl_6N_3O_6Zn_2$	$[Zn_2(diclof)_3]^+$
683,9134	683,9114	3,7	$C_{56}H_{40}Cl_8N_4O_8Zn_3$	$[Zn_2(diclof)_4+Zn]^{2+}$
671,9417	671,9428	1,2	$C_{56}H_{41}Cl_8N_4NaO_9Zn_2$	$[Zn_2(diclof)_4+Na+OH]^{2+}$
652,9533	652,9541	1,3	$C_{28}H_{21}Cl_4N_2O_4Zn$	$[Zn(diclof)_2+H]^+$
545,4074	545,4081	0,8	$C_{42}H_{31}Cl_6N_3O_7Zn_3$	$[Zn_2(diclof)_3+ZnOH]^{2+}$
505,4474	505,4458	2,8	$C_{42}H_{31}Cl_6N_3O_6Zn_2$	$[Zn_2(diclof)_3+H]^{2+}$
375,9477	375,9480	0,8	$C_{14}H_{12}Cl_2NO_3Zn$	$[Zn(diclof)+H_2O]^+$
357,9375	357,9375	0,0	$C_{14}H_{10}Cl_2NO_2Zn$	$[Zn(diclof)]^+$

318,0055	318,0059	1,4	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NNaO ₂	[diclof +Na+H] ⁺
296,0233	296,0240	2,3	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ NO ₂	[diclof+2H] ⁺

*pico dos isótopos ¹²C, ¹H, ¹⁴N, ¹⁶O, ³⁵Cl, ⁶⁴Zn e ²³Na

O espectro de ESI-MS (+) para o complexo **2** (Figura 40) em uma janela espectral de m/z 100-1600 Da mostra um pico base em m/z 318,0144 correspondente ao aduto de Na⁺ do diclofenaco na forma ácida (R-COOH+Na⁺). Os picos identificados com m/z inferiores à 800 Da são arranjos de Zn e Diclof similares aos íons obtidos para o precursor Zn(Diclof)₂, com exceção aos sinais em m/z 604,0426 e 481,9810, os quais correspondem aos arranjos ternários [Zn(Diclof)(Nic)₂]⁺ e [Zn(Diclof)(Nic)]⁺. Um grupo de sinais com pico central em m/z 1259,9653 foi atribuído ao sistema iônico [Zn₂(Diclof)₃(Nic)₂]⁺ correspondente à um complexo binuclear com carga positiva resultante da perda de um ligante de valência (R-COO⁻). O isolamento do e fragmentação do íon m/z 1259,9635 à 15 eV (Figura 41) levou à formação dos íons m/z 1137,9108 e 1013,8629 correspondentes à duas eliminações subseqüentes dos ligantes Nic (Figura 42). O resultados indicam que o complexo **2** pode ser um complexo binuclear de fórmula geral Zn₂(R-COO⁻)₄(L)₂ e corroboram com os resultados de ¹HRMN, os quais mostram o complexo **2** com uma proporção Diclof:Nic de 2:1 pelas somas áreas integradas dos sinais dos hidrogênios.

Figura 40. Espectro de ESI-MS do complexo **2** em modo *fullscan*.

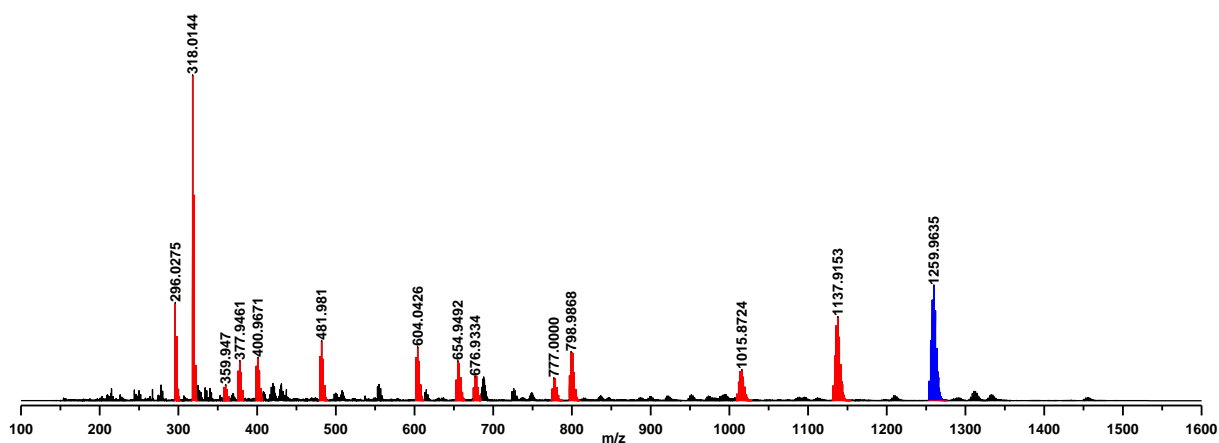


Figura 41. Espectro de MS2 para o íon m/z 1259,9591 obtido à 15 eV com a distribuição isotópica para o íon precursor.

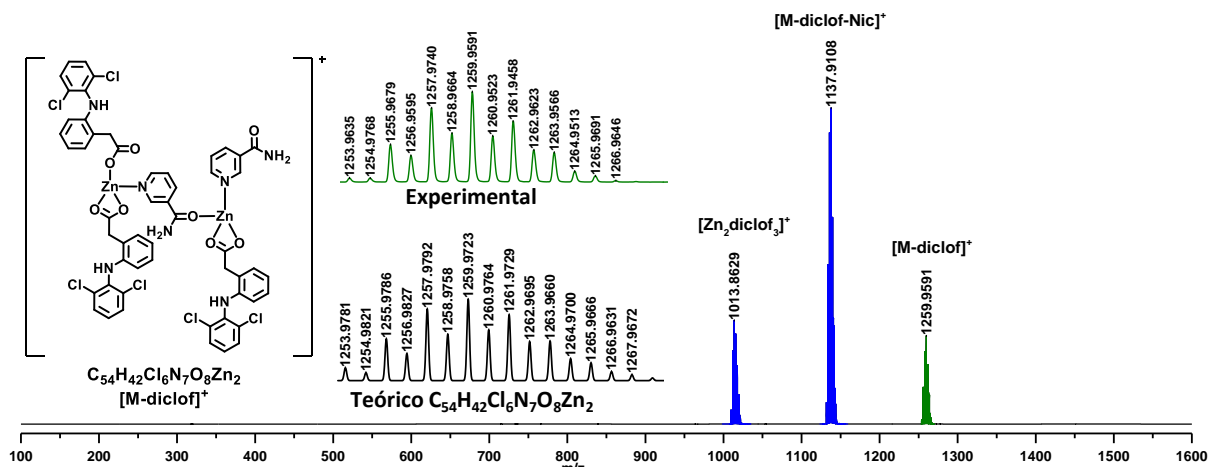


Figura 42. Mecanismo de fragmentação do íon molecular m/z 1259,9635 por eliminações subsequentes dos ligantes Nic.

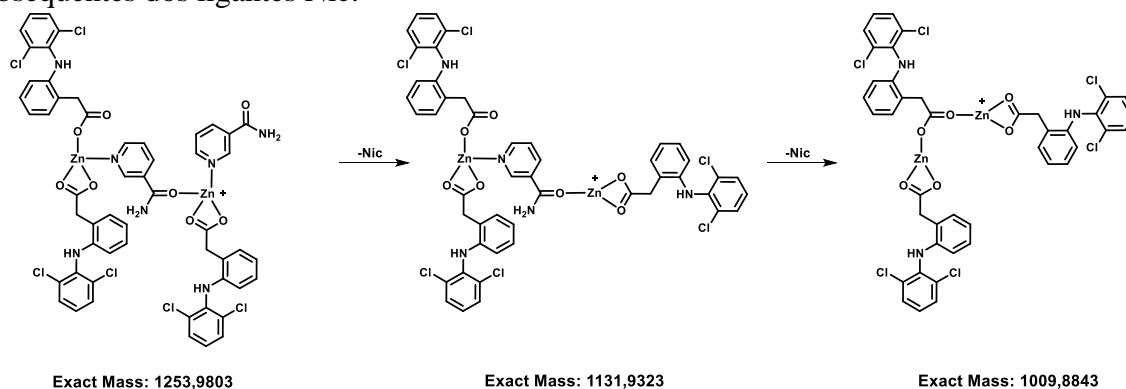


Tabela 14. Dados de ESI-MS para o complexo **2**. Os valores de m/z correspondem ao pico de massa monoisotópica.

m/z monoisotópica*	Calculado	Erro (ppm)	Fórmula	Íon
1253,9655	1253,9803	11,8	$C_{54}H_{42}Cl_6N_7O_8Zn_2$	$[M-diclof]^+$
1131,9225	1131,9323	8,7	$C_{48}H_{36}Cl_6N_5O_7Zn_2$	$[M-diclof-Nic]^+$
1009,8929	1009,8843	7,6	$C_{42}H_{30}Cl_6N_3O_6Zn_2$	$[Zn_2(diclof)_3]^+$
796,9771	796,9841	7,5	$C_{34}H_{26}Cl_4N_4NaO_5Zn$	$[Zn(diclof)_2Nic+Na]^+$
774,9993	775,0022	3,6	$C_{34}H_{27}Cl_4N_4O_5Zn$	$[Zn(diclof)_2Nic+H]^+$
674,9318	674,9361	6,3	$C_{28}H_{20}Cl_4N_2NaO_4Zn$	$[Zn(diclof)_2+Na]^+$
652,9525	652,9541	2,5	$C_{28}H_{21}Cl_4N_2O_4Zn$	$[Zn(diclof)_2+H]^+$
602,0314	602,0335	3,5	$C_{26}H_{22}Cl_2N_5O_4Zn$	$[Zn(diclof)(Nic)_2]^+$
479,9849	479,9855	4,5	$C_{20}H_{16}Cl_2N_3O_3Zn$	$[Zn(diclof)(Nic)]^+$
398,9627	398,9621	2,8	$C_{14}H_{14}Cl_2N_2NaO_2Zn$	$[Zn(diclof)+NH_4+Na]^+$
375,9478	375,9480	0,7	$C_{14}H_{12}Cl_2NO_3Zn$	$[Zn(diclof)+H_2O]^+$
357,9379	357,9375	0,4	$C_{14}H_{10}Cl_2NO_2Zn$	$[Zn(diclof)]^+$
318,0053	318,0059	1,8	$C_{14}H_{11}Cl_2NNaO_2$	$[diclof+H+Na]^+$
296,0233	296,0240	2,2	$C_{14}H_{12}Cl_2NO_2$	$[diclof+2H]^+$

*pico dos isótopos ^{12}C , 1H , ^{14}N , ^{16}O , ^{35}Cl , ^{64}Zn e ^{23}Na

1.16.3.4 Análise de difração de Raios X do complexo 2

A análise cristalográfica dos dados de monocristal para o complexo **2** indica tratar-se de uma molécula binuclear com fórmula molecular $C_{68}H_{52}Cl_8N_8O_{10}Zn_2$ (Tabela 15).

Tabela 15. Dados do cristal e refinamento da estrutura do complexo **2**

Parâmetros	Resultados
Fórmula empírica	$C_{68}H_{52}Cl_8N_8O_{10}Zn_2$
Massa molar ($g \cdot mol^{-1}$)	1555,52
T/K	120(2)
Radiação, $\lambda/\text{Å}$	Mo $K\alpha$; 0,71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, $C2/c$
Dimensões da célula unitária (Å)	
A	12,4146(6)
B	17,4369(8)
C	31,1732(12)
$\alpha(^{\circ})$	90
$\beta(^{\circ})$	97,722
$\gamma(^{\circ})$	90
Volume (Å^3)	6686,9(5)
Z	4
Densidade calculada ($g \cdot cm^{-3}$)	1,545
Coeficiente de absorção (mm^{-1})	1,103
$F(000)$	3168
Tamanho do cristal (mm)	0,304 x 0,170 x 0,075
Intervalo Theta (θ) para coleta de dados	2,30 a 30,51
Intervalos de índice	$-17 \leq h \leq 9$ $-21 \leq k \leq 19$ $-35 \leq l \leq 43$
Reflexões coletadas / exclusivas	22333/20343
Totalização ao θ máximo (30,60 graus de ângulo)	99,6%
Correção de absorção	Multiscan
Transmissão máxima e mínima	0,740 e 0,862
Método de refinamento	Quadrados mínimos de matriz completa em F^2
Dados/restrições/parâmetros	20343/0/865
Refinamento de ajuste em F^2	1,087
Índice de R final [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0647$, $wR_2 = 0,1525$
Índices de R	$R_1 = 0,0947$, $wR_2 = 0,1670$
Maior diferença de pico e buraco ($e \cdot \text{Å}^{-3}$)	1,135 e -0,787

A estrutura molecular (Figura 43) possui dois átomos de Zn coordenados individualmente por duas unidades de diclofenaco. Uma unidade de diclofenaco é monodentada (ligação de valência com distância Zn-O de 1,992 Å) com a segunda sendo bidentada (quelato

com ligação de valência Zn-O de 2,084 Å e coordenação Zn-O de 2,291 Å). Uma unidade de nicotinamida está coordenada ao Zn pelo nitrogênio *sp*² do anel piridínico (Zn-N de 2,042 Å), com o átomo de oxigênio *sp*² da função amida ligando-se ao segundo átomo Zn (Zn-O de 2,031Å) para formar uma ponte molecular. As distâncias entre os átomos e os ângulos dos principais sistemas ligantes estão na Tabela 16.

Figura 43. ORTEP do complexo **2** com a omissão dos átomos de hidrogênio.

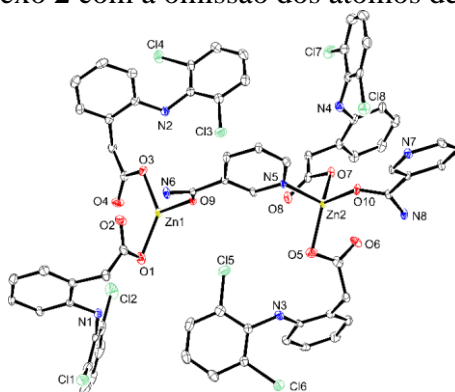
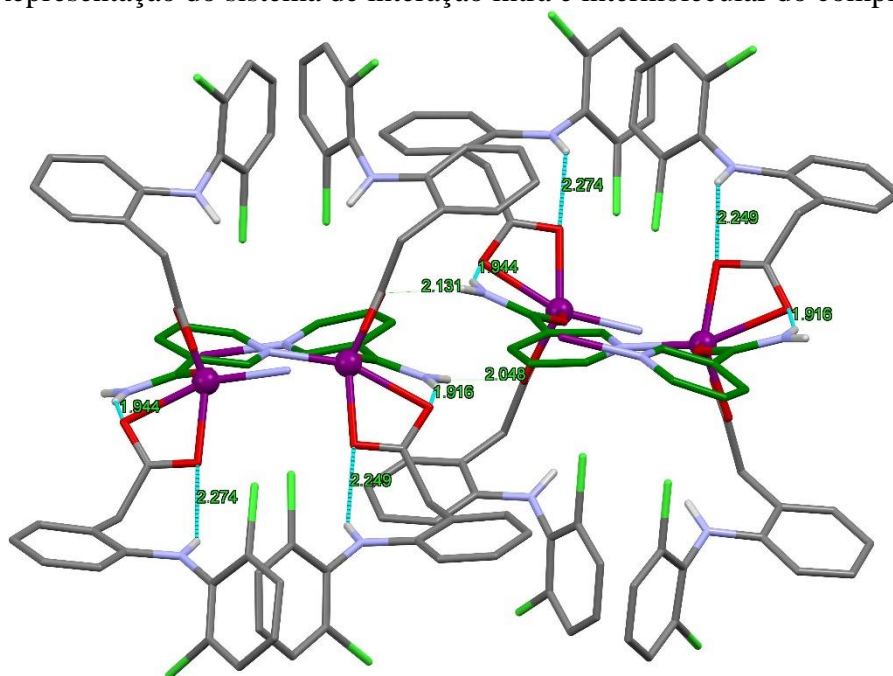


Tabela 16. Ligações e ângulos selecionados para representar a estrutura do complexo **2**.

Ligação	Distância (Å)	Sistema	Ângulo (°)
Zn(2)-O(7)	1,992(3)	O(7)-Zn(2)-O(10)	102,33(13)
Zn(2)-O(10)	2,030(3)	O(7)-Zn(2)-N(5)	103,93(15)
Zn(2)-N(5)	2,042(4)	O(10)-Zn(2)-N(5)	94,82(13)
Zn(2)-O(5)	2,084(3)	O(7)-Zn(2)-O(5)	138,29(14)
Zn(2)-O(6)	2,291(4)	O(10)-Zn(2)-O(5)	109,78(14)
Zn(2)-C(42)	2,511(5)	N(5)-Zn(2)-O(5)	99,25(14)
Zn(1)-O(3)	1,989(3)	O(7)-Zn(2)-O(6)	93,75(13)
Zn(1)-O(9)	2,030(3)	O(10)-Zn(2)-O(6)	92,25(12)
Zn(1)-N(7)#1	2,045(4)	N(5)-Zn(2)-O(6)	159,05(13)
Zn(1)-O(1)	2,097(3)	O(5)-Zn(2)-O(6)	59,80(13)
Zn(1)-O(2)	2,270(4)	O(3)-Zn(1)-O(9)	101,36(12)
Zn(1)-C(14)	2,515(5)	O(3)-Zn(1)-N(7)#1	100,75(15)
		O(9)-Zn(1)-N(7)#1	94,74(13)
		O(3)-Zn(1)-O(1)	138,18(13)
		O(9)-Zn(1)-O(1)	112,17(14)
		N(7)#1-Zn(1)-O(1)	100,63(14)
		O(3)-Zn(1)-O(2)	95,28(13)
		O(9)-Zn(1)-O(2)	93,01(12)
		N(7)#1-Zn(1)-O(2)	160,43(13)
		O(1)-Zn(1)-O(2)	59,81(13)

A Figura 44 apresenta o ambiente intramolecular com ligações de hidrogênio (2,274 e 2,248 Å) entre a amina secundária e o oxigênio da carbonila dos grupos diclofenaco unidos ao Zn por ligação de quelato, enquanto o oxigênio de valência do diclofenaco faz ligação de hidrogênio com o grupo NH₂ da nicotinamida (1,944 e 1,918 Å). O segundo hidrogênio do grupo NH₂ da nicotinamida faz ligação com o oxigênio da valência (2,048 e 2,131 Å) do ligante diclofenaco monodentado da molécula vizinha, as quais proporcionam quatro ligações de hidrogênio intermoleculares por unidade binuclear do complexo.

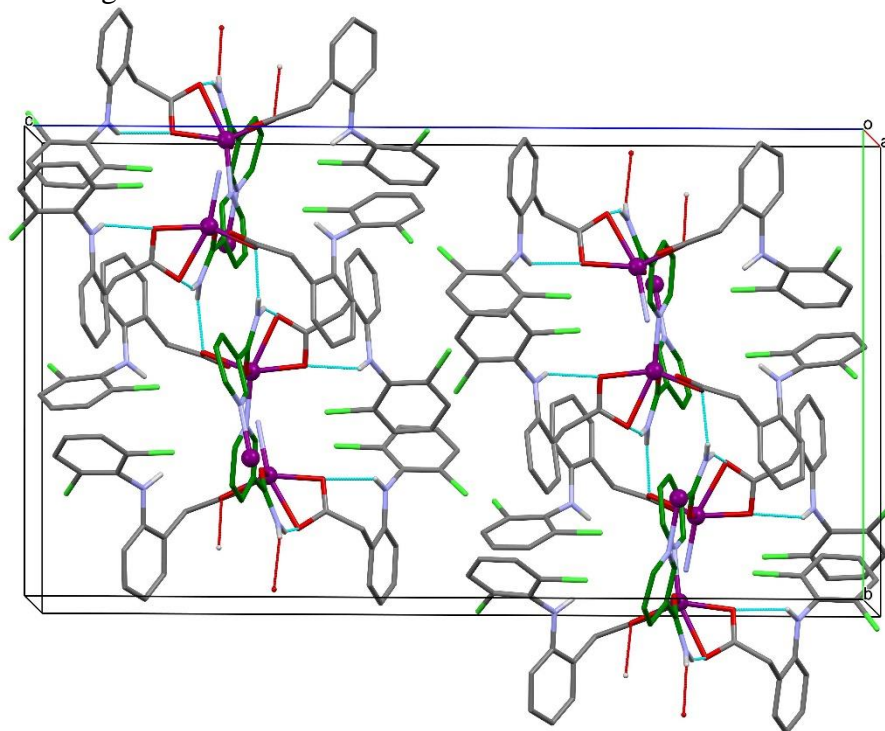
Figura 44. Representação do sistema de interação intra e intermolecular do complexo 2.



O arranjo molecular apresentado na Figura 45 mostra um empacotamento lamelar de camadas moleculares sucessivas com espessura aproximada de 15 Å. A porção central da lamela é polar, composta pelas esferas de coordenação do Zn e os ligantes Nic unidas às moléculas laterais por ligações de hidrogênio, enquanto as duas interfaces externas das lamelas são compostas pelas cadeias laterais dos grupos diclofenaco posicionadas em um plano ortogonal ao plano da lamela. As interfaces lamelares unem-se por interação de Van Der Waals, entre os radicais 2,5-diclorofenil posicionados nos terminais das cadeias dos grupos

diclofenaco. O ordenamento lamelar detectado nesta análise cristalográfica está de acordo com as micrografias obtidas ao microscópio eletrônico para o produto de cristalização rápida (Figura 31), onde o empilhamento lamelar pode ser visualizado em magnitude de aumento de 10.000 vezes.

Figura 45. Representação da célula unitária para o complexo **2**. O arranjo monoclinico comporta duas lamelas ao longo do eixo *c* com 31 Å.



1.16.4 Recuperação do complexo $Zn_2(Ibup)_4(Nic)_2$ (**3**) e seu sal precursor $Zn(Ibup)_2$

O complexo binário $Zn(Ibup)_2$ foi obtido através de uma reação ácido-base com dois equivalentes de ibuprofeno e um equivalente de Na_2CO_3 em meio aquoso, seguido pela adição de 1 equivalente de $Zn(NO_3)_2$ (Figura 14), da qual obteve-se um rendimento estequiométrico em massa seca de 81%. A opção pelo uso da base Na_2CO_3 como agente de desprotonação do ibuprofeno deu-se pelo fato que o ácido se degrada em soluções alcalinas de $NaOH$ e KOH . A análise de 1H RMN do complexo inicial apresentou um pico simpleto em δ 1,25 ppm atribuído à um produto de degradação não identificado. A opção pela síntese do sal com monitoramento de pH em 8,9 (valor calculado para o *pKa* do sal $NaIbup$) com adição lenta da solução da base

sobre a suspensão aquosa do ácido não produziu produtos de degradação e foi adotada como técnica padrão. Entretanto uma etapa de purificação precisou ser adicionada ao processo para remoção de produtos inorgânicos secundários como ZnO , $ZnCO_3$ e $Zn(OH)_2$ realizada por solubilização seletiva do complexo em etanol absoluto e remoção subsequente da massa insolúvel por centrifugação e microfiltração. Recupera-se o complexo vertendo-se lentamente a solução etanólica sobre água vindo o complexo a precipitar instantaneamente. A nova técnica mostrou-se superior à metodologia descrita por NÚÑEZ et al., (2014), na qual obteve-se uma forma pentaidratada deste complexo binário sintetizado por reação ácido-base em solução aquosa, porém com uso de uma solução tamponada de $Zn(BF_4)_2$ e KOH com rendimento estequiométrico de 65%. Uma técnica simplificada descrita por ABU ALI, et al., (2016) descreve a obtenção do complexo $Zn(Ibup)_2 \cdot 2H_2O$ através de uma solução diluída de $NaOH$ ($0,3 \text{ mol.L}^{-1}$) e precipitação do sal com adição de solução diluída de $ZnCl_2$, com rendimento estequiométrico de ~90% sem recristalização.

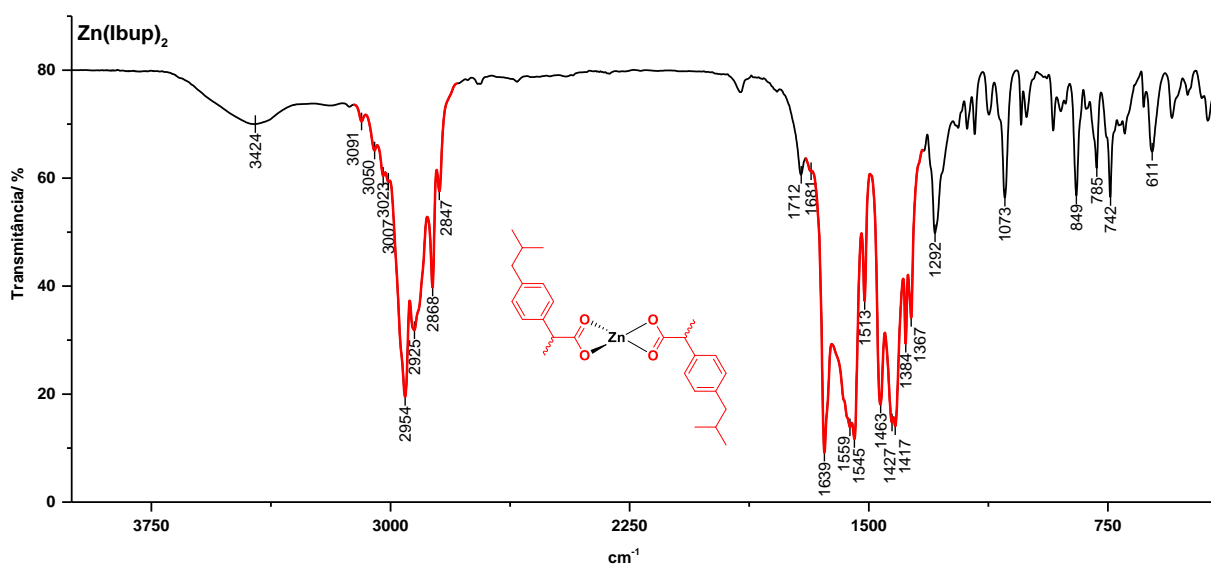
O complexo ternário **3** foi obtido por reação de síntese do tipo $A+B \rightarrow C$, com rendimento estequiométrico de 69%. Trata-se de um sólido branco não-higroscópico na forma de um pó finamente dividido, com alta solubilidade em etanol, acetona, clorofórmio, DMSO, DMF e THF. A forma liofilizada foi utilizada para as medidas dos parâmetros físico-químicos e medidas espectroscópicas.

1.16.4.1 Análises dos complexo **3** e do precursor $Zn(Ibup)_2$.

O espectro de FTIR para o complexo binário $Zn(Ibup)_2$ (Figura 46) apresenta as bandas características de grupos alquílicos e insaturações. As bandas fortes em 2954, 2925 e 2868 cm^{-1} correspondem respectivamente aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ dos três grupos metila do ibuprofeno, a estiramentos antissimétricos dos hidrogênios metilênicos das cadeias alquílicas e aos estiramentos simétricos das ligações $H-C sp^3$ de grupos metil e metileno. A banda correspondente ao estiramento da ligação $O=C sp^2$ do carboxilato aparece

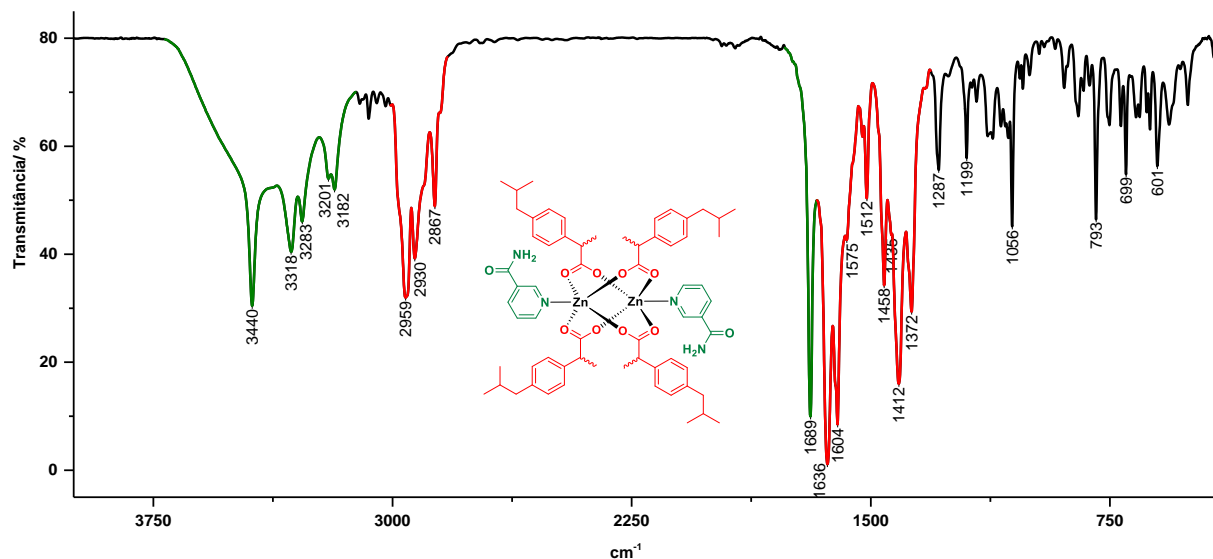
em 1639 cm^{-1} . A formação do complexo binário com ligações de valência pode ser verificado pelo desaparecimento do estiramento forte da carbonila de ácido carboxílico em 1727 cm^{-1} detectado no material departida (Anexo A: Espectros de FTIR para os reagentes precursores).

Figura 46. Espectro de transmitância de FTIR para o precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$ obtido em estado sólido em pastilha de KBr



A banda em 1417 cm^{-1} corresponde à contração/alongamento do segmento $\text{O-Csp}^2\text{-Csp}^3$ do grupo carboxilato com o carbono vicinal. As bandas entre 1400 e 400 cm^{-1} compreendem ao intervalo de impressão digital da molécula. A banda em 3424 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação O-H sp^3 de moléculas de H_2O residual do processo de síntese.

Figura 47. Espectro de transmitância de FTIR para o complexo **3** obtido em estado sólido em pastilha de KBr.



O espectro de FTIR para o complexo **3** (Figura 47) apresenta um grupo de seis bandas fortes no intervalo de 3440 à 3182 cm^{-1} correspondentes às duas diferentes formas de deformações axiais assimétricas (vas) e duas simétrica (vs) de amina primária livre presente na função amida. O grupo de bandas curta em 3103 e 3006 cm^{-1} correspondem às deformações axiais C-H δ de carbono sp^2 dos anéis aromáticos de piridina e benzeno. As cadeias alquílicas de ibuprofeno podem ser identificadas nos estiramentos fortes em 2959 e 2867 cm^{-1} , correspondentes às vibrações assimétricas e simétricas de grupos CH_3 terminais, e o estiramento forte em 2930 cm^{-1} corresponde às vibrações assimétricas do grupos CH_2 e CH internos. A banda forte em 1689 cm^{-1} corresponde ao estiramento da $\text{O}=\text{C}$ sp^2 da carbonila de amida. Os estiramentos fortes em 1636 e 1604 cm^{-1} correspondem às deformações axiais normais (δ) das funções carboxilato do ibuprofeno. A banda de vibração simétrica da carbonila de COO^- é detectada em 1412 cm^{-1} .

Segundo ZELEŇÁK; VARGOVÁ; GYÖRYOVÁ, (2007), as diferenças Δ (cm^{-1}) entre as vibrações assimétricas e simétricas ($\nu_{\text{assim}} - \nu_{\text{sim}} = \Delta\nu_{\text{a-s}}$) do grupo carboxilato variam de acordo com a categoria de ligação metal-ligante na seguinte ordem: Δ quelato $<$ Δ ponte $<$ Δ iônico $<$

Δ monodentado. Os resultados calculados na Tabela 17 mostram a existência de ligação bidentada de caráter quelato estão presentes tanto no precursor como no complexo **3**.

Tabela 17. Variações dos intervalos entre as bandas de vibrações mais características entre o complexo $\text{Zn}(\text{Ibup})_2\text{Nic}$ e seus precursores.

Composto	Vibrações ν de R-COO^- (cm^{-1})		
	ν_{assim}	ν_{sim}	$\Delta\nu_{\text{a-s}}$
Ibuprofeno*	1721	1421	300
$\text{Zn}(\text{Ibup})_2$	1639	1417	222
3	1636	1412	224

*Espectro de FTIR dispostos no ANEXO 1

1.16.4.2 Análise de $^1\text{HRMN}$ e $^{13}\text{CNMR}$ do complexo **3** e seu precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$.

O espectro de $^1\text{HRMN}$ para o precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$ (Figura 48) foi calibrado em relação ao pico simpleto residual do solvente CDCl_3 em δ 7,260 ppm. Os hidrogênios do grupo Ibuprofeno receberam atribuições numéricas relativas aos números dos átomos de carbono aos quais estão ligados. Os dados quantitativos dos espectros estão dispostos na Tabela 18.

O duplete em δ 0,882 ppm corresponde aos hidrogênios dos grupos metila simétricos das posições 12 e 13 acoplados ao hidrogênio da posição 11, com constante de acoplamento de $J=6,60$ Hz. O duplete em δ 1,351 ppm corresponde aos hidrogênios metílicos da posição 3 acoplados ao hidrogênio do carbono assimétrico da posição 2, com $J=6,90$ Hz. O Septeto em δ 1,831 ppm corresponde ao sinal do hidrogênio da posição 11 acoplado com os hidrogênios metílicos vicinais das posições 12 e 13 e com os hidrogênios metilênicos da posição 10 acoplado à $J=6,90$ Hz. O duplete em δ 2,414 ppm corresponde aos hidrogênios metilênicos da posição 10 acoplados com o hidrogênio da posição 11 com $J=7,20$ Hz.

Figura 48. Espectro de $^1\text{HMRN}$ para o precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$ (a) com expansões (b) obtido em CDCl_3 a 300,18 MHz.

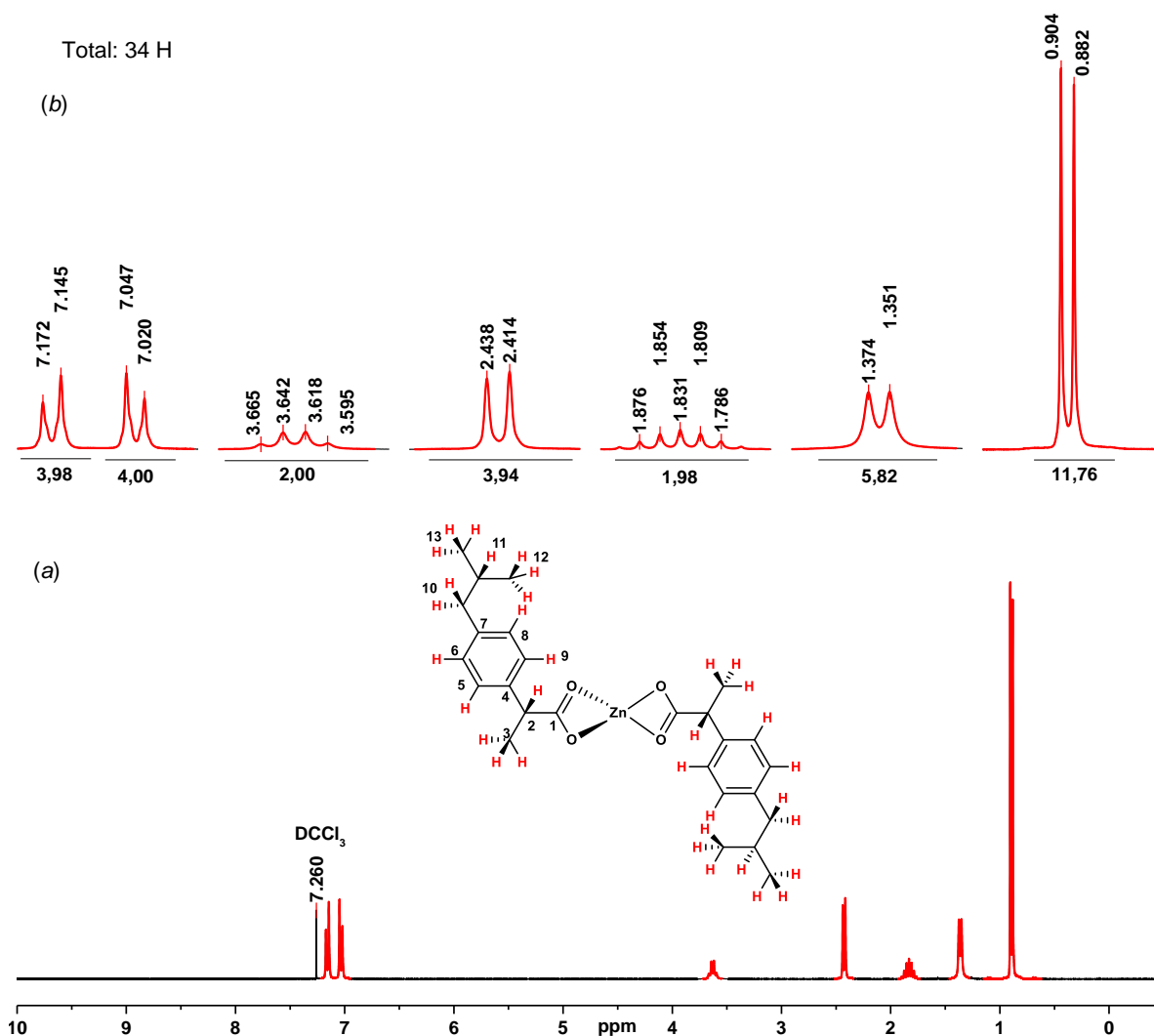


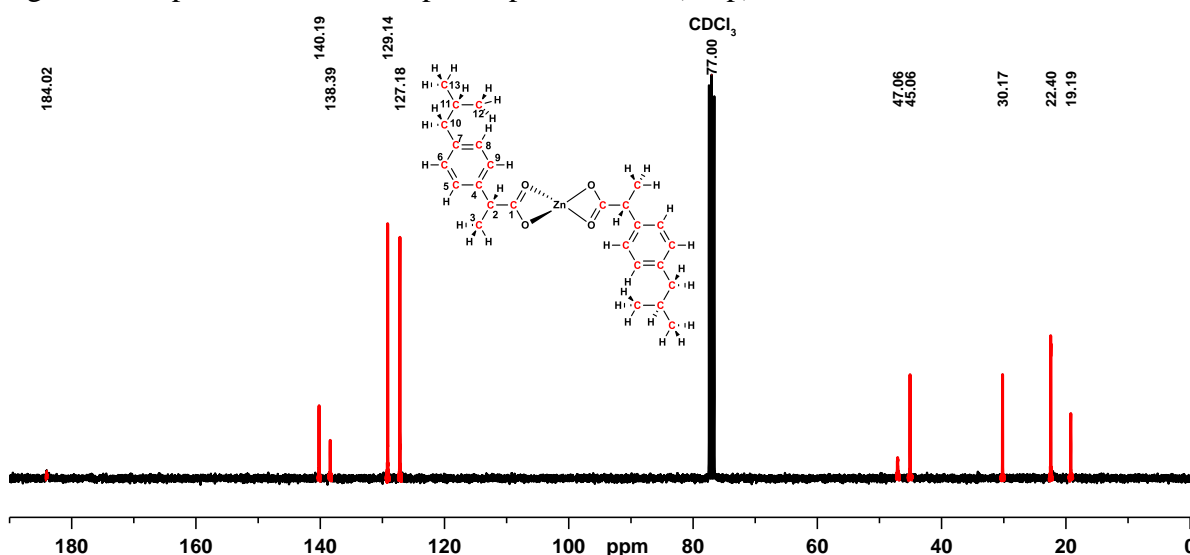
Tabela 18. Dados obtidos do espectro de $^1\text{HMRN}$ para o precursor $\text{Zn}(\text{Diclof})_2$ obtido em CDCl_3 à 300,18 MHz.

Sinal (ppm)	Multiplicidade	Integral relativa	Constante de acoplamento J (Hz)
0,882	Dupleto	11,76	6,60 (12,13-11)
1,351	Dupleto	5,82	6,90 (3-2)
1,831	Septeto	1,98	6,90 (11-10,12,13)
2,414	Dupleto	3,94	7,20 (10-11)
3,618	Quarteto	2,00*	6,90 (2-3)
7,047	Dupleto	4,00	8,10 (6,8-5,9)
7,145	Dupleto	3,98	8,10 (5,9-6,8)

*Integral de referência com atribuição relativa = 2H

O quarteto em δ 3,618 ppm corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono assimétrico da posição 2 acoplado aos hidrogênios metílicos da posição 3 com $J=6,90$ Hz. O duplete em δ 7,047 ppm corresponde aos hidrogênios simétricos das posições 6 e 8 do anel aromático acoplados aos hidrogênios simétricos das posições 5 e 9 com $J=8,10$ Hz. O duplete em δ 7,145 ppm corresponde aos hidrogênios simétricos das posições 5 e 9 do anel aromático acoplados aos hidrogênios simétricos das posições 6 e 8 com $J=8,10$ Hz.

Figura 49. Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ para o precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$ obtido em CDCl_3 a 75,48 MHz



O espectro de $^{13}\text{CRMN}$ para o precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$ (Figura 49) foi calibrado em relação ao pico tripleto do carbono do solvente CDCl_3 em δ 77,00 ppm. O sinal em δ 19,19 ppm corresponde ao carbono metílico da posição C3. O sinal em δ 22,40 ppm corresponde aos carbonos dos grupos metila simétricos das posições C12 e C13. Em δ 30,17 ppm encontra-se o sinal do carbono C11 no grupo isobutil. Em δ 45,06 ppm encontra-se o sinal do carbono quiral da posição C2 vicinal ao grupo carboxilato. Em δ 47,06 ppm observa-se o sinal do carbono C10 do grupo isobutil ligado ao anel aromático. O sinal em δ 127,18 ppm corresponde aos carbonos simétricos do anel aromático nas posições C6 e C8, enquanto os carbonos simétricos C5 e C9 correspondem ao sinal em δ 129,14 ppm. Os sinais dos carbonos desidrogenados das posições

C4 e C7 do anel aromático aparecem em δ 138,39 e 140,19 ppm, respectivamente. O sinal do carbono do grupo carboxilato (C1) aparece em baixa intensidade em δ 184,02 ppm.

Os espectros de ^1H e ^{13}C RMN para o precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$ confirmam a presença do grupo ibuprofenato na estrutura sem a evidência de água de hidratação. Ambos os espectros mostram coordenação simétrica dos ligantes ao íon metálico por ligação de valência evidenciada na ausência de duplicidade entre os sinais.

As análises para os espectros de ^1H e ^{13}C RMN para os complexo **3** seguem os mesmos parâmetros atribuídos na análise de seu precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$. O sinais foram atribuídos de acordo com a numeração das posições dos átomos nas cadeias carbônicas para o ligante de valência ibuprofenato, enquanto as posições da cadeia carbônica do ligante nitrogenado Nic receberam atribuições de letras em ordem alfabética. O espectro de ^1H RMN (Figura 50) foi calibrado em relação ao pico simpleto residual do solvente CDCl_3 em δ 7,260 ppm. Os dados quantitativos dos espectro estão dispostos na Tabela 19.

O duplete em δ 0,819 ppm corresponde à 12 hidrogênios metílicos dos grupos isobutil nas posições simétricas 12 e 13 acoplados aos hidrogênios da posição 11 com $J=6,60$ Hz. O duplete em δ 1,361 ppm corresponde aos hidrogênios metílicos da posição 3 acoplados com os hidrogênios da posição 2 com $J=7,20$ Hz. O Septeto em δ 1,737 ppm corresponde ao sinal do hidrogênio da posição 11 acoplado com os hidrogênios metílicos vicinais das posições 12 e 13 e com os hidrogênios metilênicos da posição 10, com $J=6,60$ Hz. O duplete em δ 2,275 ppm corresponde aos hidrogênios metilênicos da posição 10 acoplados com o hidrogênio da posição 11 com $J=7,20$ Hz. O quarteto em δ 3,614 ppm corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono assimétrico da posição 2 acoplado aos hidrogênios metílicos da posição 3 com $J=6,90$ Hz.

Figura 50. Espectro de ^1H RMN para o complexo **3** (a) com expansões (b) (c) obtido em CDCl_3 a 300,18 MHz

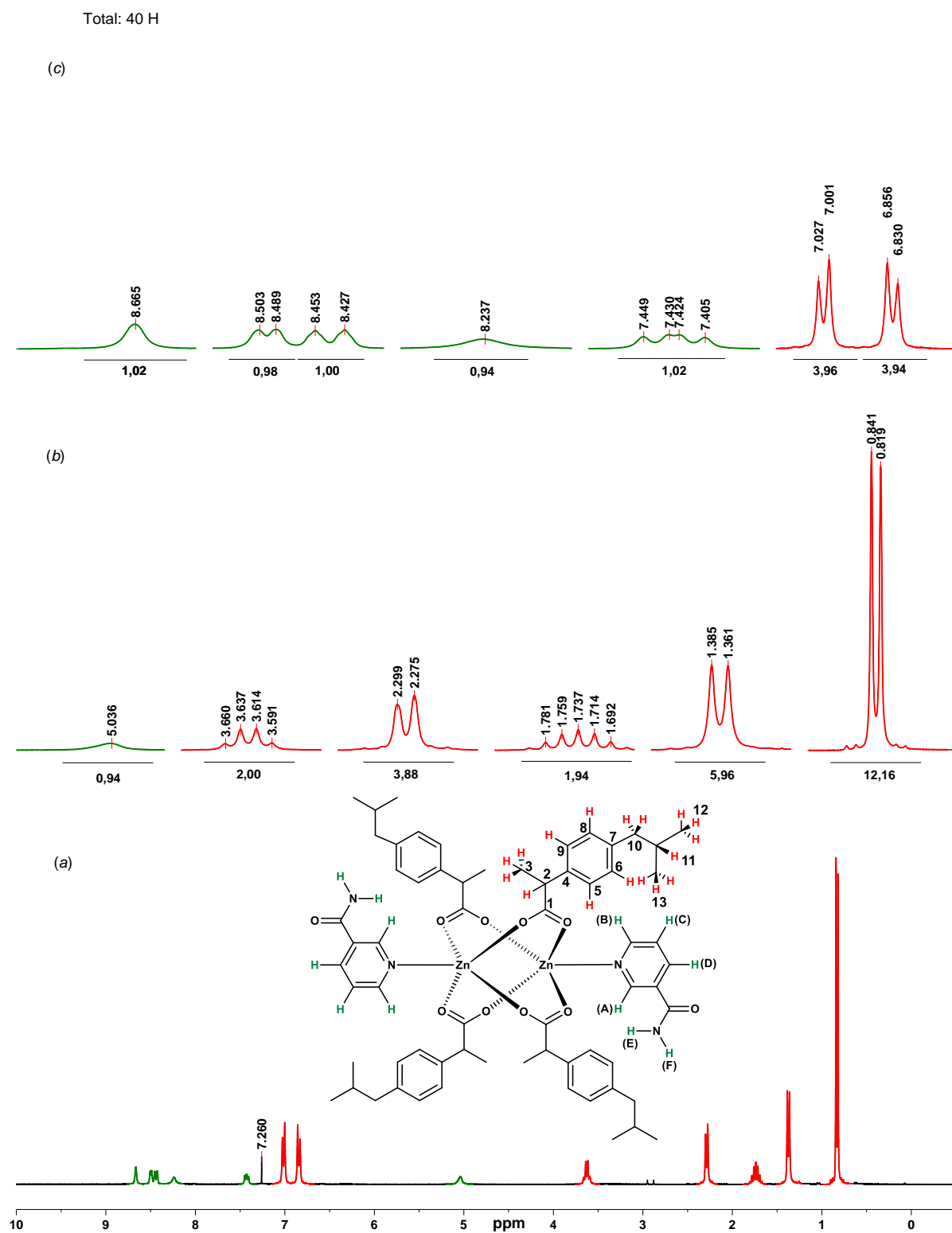


Tabela 19. Dados obtidos do espectro de $^1\text{HRMN}$ para o complexo **3** obtido em CDCl_3 à 300,18 MHz.

Sinal (ppm)	Multiplicidade	Integral relativa	Constante de acoplamento J (Hz)
0,819	Dupleto	12,16	6,60 (12,13-11)
1,361	Dupleto	5,96	7,20 (3-2)
1,737	Septeto	1,94	6,60 (11-10,12,13)
2,275	Dupleto	3,88	7,20 (10-11)
3,614	Quarteto	2,00*	6,90 (2-3)
5,036	Simpleto	0,94	-
6,856	Dupleto	3,94	7,80 (6,8-5,9)
7,001	Dupleto	3,96	7,80 (5,9-6,8)
7,405	Duplo-dupleto	1,02	5,70 (B-D)
8,237	Simpleto	0,94	-
8,427	Dupleto	1,00	7,80 (D-C)
8,489	Dupleto	0,98	4,20 (B-C)
8,665	Simpleto	1,02	-

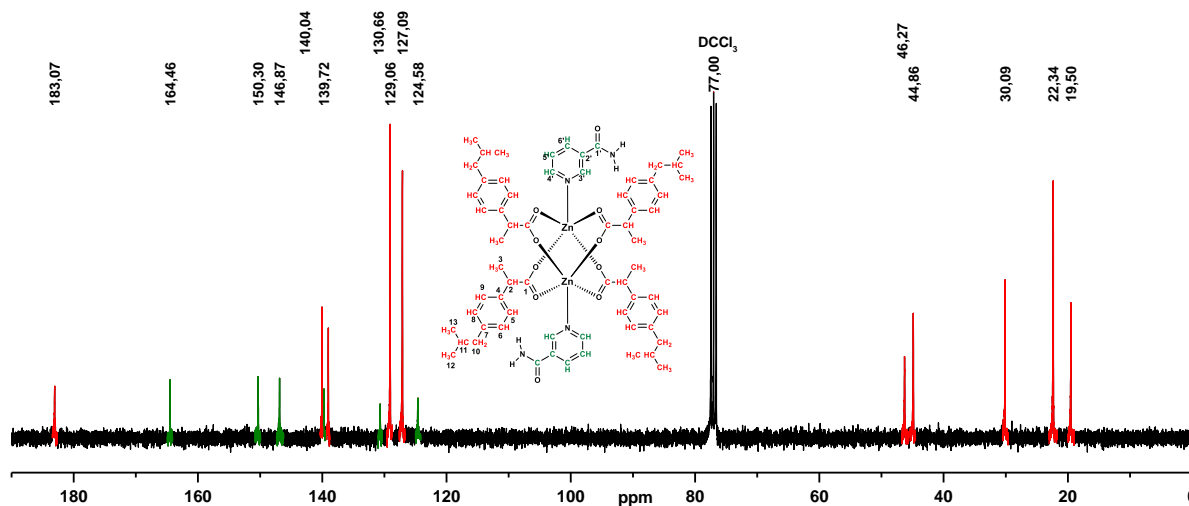
*Integral de referência com atribuição relativa = 2H

Os simpletos alargados em δ 5,036 e 8,237 ppm correspondem aos hidrogênios do grupo amida. O efeito diasterotópico dos hidrogênios da amida primária indica que o grupo possui liberdade de conformação (epimerização) por não estar coordenado ao metal, conforme as ilustrações na Figura 23. O dupleto em δ 6,856 ppm corresponde aos hidrogênios simétricos das posições 6 e 8 do anel aromático acoplados aos hidrogênios simétricos das posições 5 e 9 com $J=7,80$ Hz. O dupleto em δ 7,001 ppm corresponde aos hidrogênios simétricos das posições 5 e 9 do anel aromático acoplados aos hidrogênios simétricos das posições 6 e 8 com $J=7,80$ Hz.

O sinal em δ 7,405 ppm corresponde à um duplo dupleto correspondente ao hidrogênio C acoplado aos vizinhos B e D, com $J=5,70$ Hz. O sinal em δ 8,427 ppm é um dupleto de $J=7,80$ Hz do hidrogênio D acoplado ao hidrogênio C. O dupleto em δ 8,489 ppm corresponde ao sinal do hidrogênio B acoplado ao hidrogênio C com $J=4,20$ Hz. O simpleto em δ 8,665 ppm corresponde ao hidrogênio A. Os acoplamentos à longa distância para os hidrogênios do grupo

nicotinamida não puderam ser determinados em razão da baixa resolução do sinal obtida neste caso.

Figura 51. Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ para o complexo **3** obtido em CDCl_3 a 75,48 MHz



O espectro de $^{13}\text{CRMN}$ para o complexo **3** (Figura 51) foi calibrado em relação ao pico tripleto do carbono do solvente CDCl_3 em δ 77,00 ppm. O sinal em δ 19,50 ppm corresponde ao carbono metílico da posição C3. O sinal em δ 22,34 ppm corresponde aos carbonos dos grupos metila simétricos das posições C12 e C13. Em δ 30,09 ppm encontra-se o sinal do carbono C11 no grupo isobutil. Em δ 44,86 ppm encontra-se o sinal do carbono assimétrico da posição C2 vicinal ao grupo carboxilato. Em δ 46,27 ppm observa-se o sinal do carbono C10 do grupo isobutil ligado ao anel aromático. O sinal em δ 127,09 ppm corresponde aos carbonos simétricos do anel aromático nas posições C6 e C8, enquanto os carbonos simétricos C5 e C9 correspondem ao sinal em δ 129,06 ppm. Os sinais dos carbonos desidrogenados das posições C4 e C7 do anel aromático aparecem em δ 139,01 e 140,04 ppm, respectivamente. O sinal do carbono do grupo carboxilato (C1) aparece em δ 183,07 ppm. Os sinais dos carbonos dos ligantes nicotinamida estão atribuídos na sequência: carbonila de amida (C1') δ 164,46 ppm; C2' δ 130,66 ppm; C3' δ 150,30 ppm; C4' δ 146,87 ppm; C5' δ 124,58 ppm; C6' δ 139,72 ppm.

As análises dos espectros de ^1H e ^{13}C RMN para o complexo 3 e seu precursor revelam alguns efeitos do metal sobre os ligantes. Observa-se um efeito de blindagem dos spins dos núcleos de ^1H e ^{13}C à medida em que o número de coordenação do metal aumenta, indicando transferência de carga do metal em direção ao ligante e produzindo aumento da densidade das nuvens eletrônicas.

1.16.4.3 Análise de ESI-MS para o complexo 3

O espectro do precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$ (Figura 52) apresenta íons identificados em janela espectral de m/z 100 até 1600 Da (Tabela 20). O íon molecular é detectado na forma de um aduto de próton $[\text{Zn}(\text{Ibup})_2+\text{H}]^+$ em m/z 475,1918. Várias formas oligoméricas do complexo são detectadas, com o íon dímero $[\text{Zn}_2(\text{Ibup})_4+\text{H}]^+$ em m/z 953,3538, clusters moleculares como $[\text{Zn}_2(\text{Ibup})_5+2\text{H}]^+$ em m/z 1159,4779 e os íons duplos $[\text{Zn}_4(\text{Ibup})_6]^{2+}$ em m/z 746,2230 e $[\text{Zn}_2(\text{Ibup})_4+\text{Zn}]^{2+}$. O íon molecular foi isolado e fragmentado à 15 eV (Figura 53), com a formação de fragmentos oriundos de eliminação de ligante de valência $[\text{Zn}(\text{Ibup})+\text{H}_2\text{O}]^+$ em m/z 278,0645 e três fragmentos oriundos da descarboxilação do ligante em m/z 477,1828 $[\text{M}-\text{CO}]^+$, m/z $[\text{M}-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}]^+$ e m/z 161,1341 $[\text{Ibup}-\text{CO}_2]^+$.

Figura 52. Espectro de ESI-MS do precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$ em modo *fullscan*.

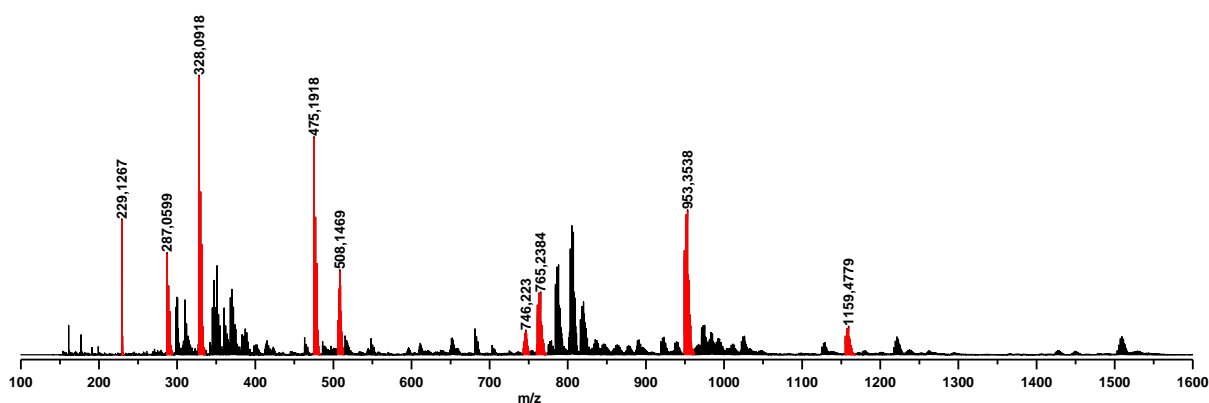
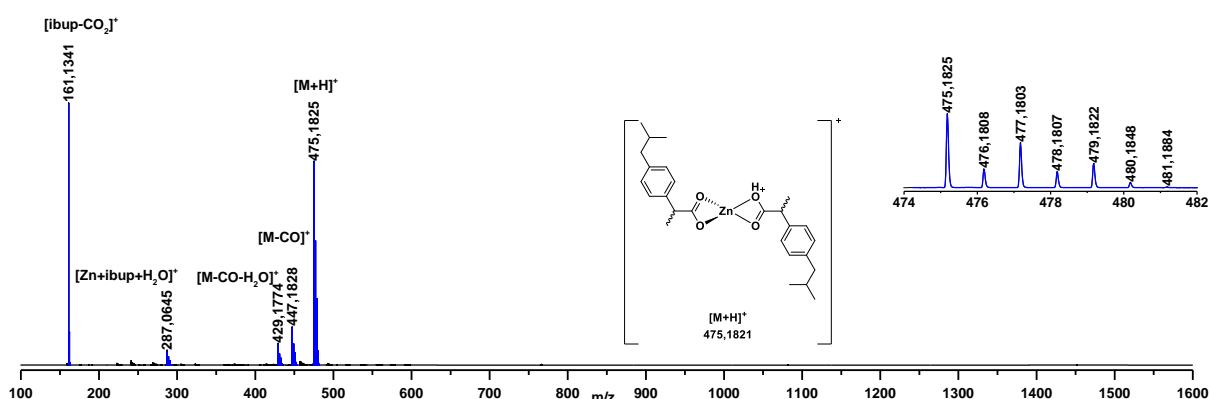


Figura 53. Espectro MS-MS do íon molecular $[\text{Zn}(\text{Ibup})_2+\text{H}]^+$ m/z 475,1918Tabela 20. Dados de ESI-MS para o precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$ para íons positivos

m/z experimental	Calculado	Erro (ppm)	Fórmula	Íon
1155,4811	1155,4877	5,7	$\text{C}_{65}\text{H}_{87}\text{O}_{10}\text{Zn}_2$	$[\text{Zn}_2(\text{ibup})_5+2\text{H}]^+$
949,3534	949,3570	3,8	$\text{C}_{52}\text{H}_{69}\text{O}_8\text{Zn}_2$	$[\text{Zn}_2(\text{ibup})_4+\text{H}]^+$
761,2359	761,2369	0,9	$\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{O}_7\text{Zn}_2$	$[\text{Zn}_2(\text{ibup})_3+\text{H}_2\text{O}]^+$
743,2323	743,2268	1,7	$\text{C}_{78}\text{H}_{102}\text{O}_{12}\text{Zn}_4$	$[\text{Zn}_4(\text{ibup})_6]^{2+}$
506,1439	506,1394	5,8	$\text{C}_{52}\text{H}_{68}\text{O}_8\text{Zn}_3$	$[\text{Zn}_2(\text{ibup})_4+\text{Zn}]^{2+}$
475,1825	475,1821	0,8	$\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{Zn}$	$[\text{Zn}(\text{ibup})_2+\text{H}]^+$
328,0891	328,0856	9,1	$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NNaO}_3\text{Zn}$	$[\text{Zn}(\text{ibup})+\text{H}_2\text{O}+\text{Na}+\text{NH}_4]^+$
287,0620	287,0620	0,2	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{Zn}$	$[\text{Zn}(\text{ibup})+\text{H}_2\text{O}]^+$
229,1201	229,1199	0,9	$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NaO}_2$	$[\text{Ibup}+\text{Na}+\text{H}]^+$

A análise do espectro do complexo 3 (Figura 54) apresenta o pico base em m/z 991,3168 identificado como $[\text{Zn}_2(\text{Ibup})_3(\text{Nic})_2]^+$ e atribuído à um íon molecular binuclear estabilizado pela eliminação de um ligante de valência, tal qual avaliado no padrão de fragmentação do complexo 2. A hipótese do complexo binuclear é reforçada pela presença dos íons m/z 1075,3979 e 1097,3793 atribuídos à adutos de H^+ e Na^+ estabilizados com a eliminação de um ligante neutro Nic (Tabela 21). A forma mononuclear $\text{Zn}(\text{Ibup})_2\text{Nic}$ também é observada como adutos de H^+ e Na^+ m/z 597,2330 e 619,2147 e pode ser atribuída à cisão da estrutura binuclear para formar duas moléculas com esferas de coordenação penta valentes. Todos os picos identificados abaixo de 500 Da são arranjos moleculares sem o ligante Nic e também foram identificados na análise do precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$. O pico do íon molecular m/z 991,3168 foi isolado e fragmentado à 15 eV, com a formação de dois picos em m/z 869,2734 e 887,2856

atribuídos à eliminação de um ligante Nic $[M\text{-Ibup-Nic}]^+$, seguido pela captura de uma molécula de H_2O $[M\text{-Ibup-Nic}+H_2O]^+$. As evidências obtidas nos espectros de MS e MS2 indicam que o complexo **3** trata-se de uma estrutura binuclear de fórmula geral $Zn_2(R\text{-COO}^-)_4(L)_2$ (ABU ALI et al., 2016) tal qual o complexo **2** e corrobora com as áreas integradas dos picos de $^1\text{HRMN}$, onde obtiveram-se proporcionalidades Ibup:Nic de 2:1.

Figura 54. Espectro de ESI-MS do complexo **3** em modo *fullscan*.

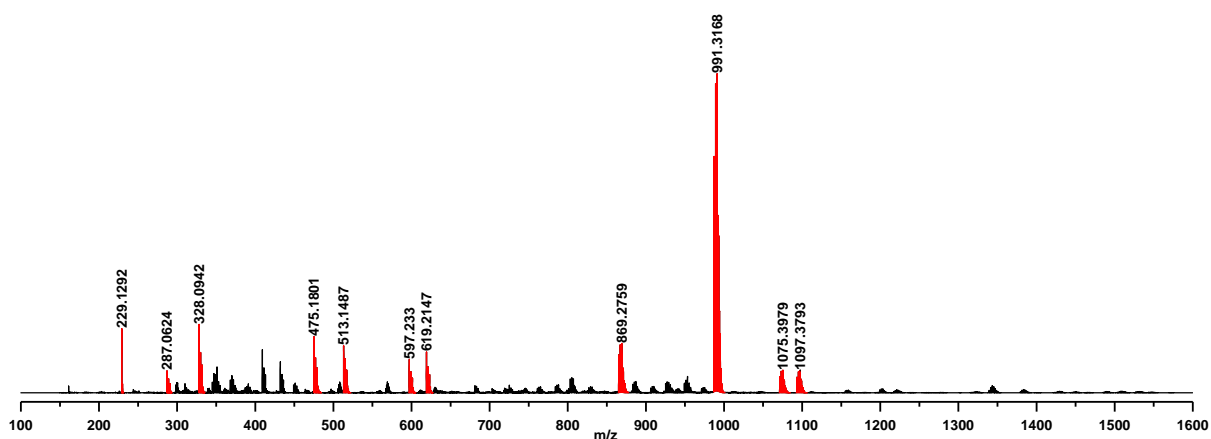


Figura 55. Espectro de MS2 para o íon m/z 987,3175 obtido à 15 eV. O destaque corresponde à distribuição monoisotópica do íon precursor.

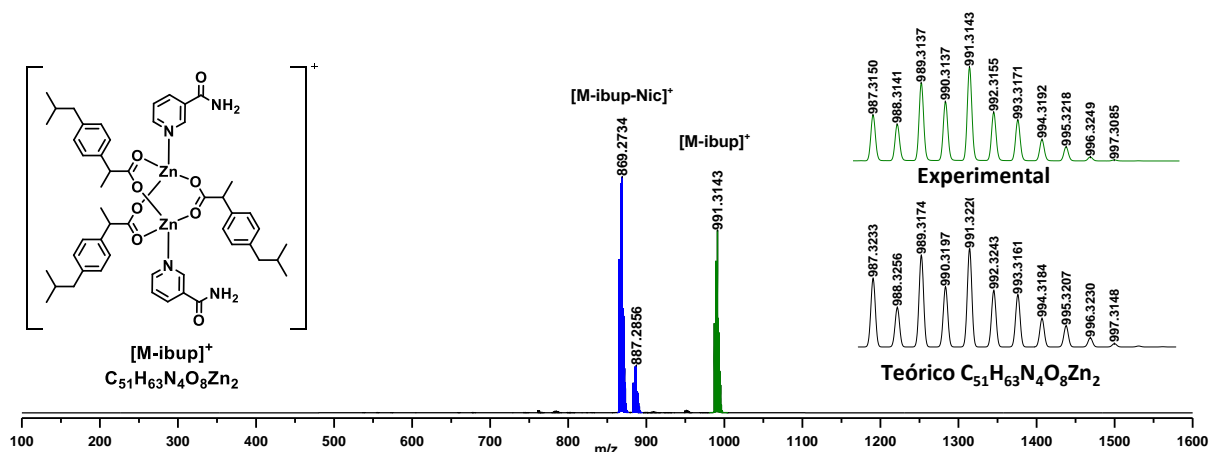


Tabela 21. Dados de ESI-MS para o complexo **3**. Os dados de m/z correspondem ao pico de massa monoisotópica.

m/z experimental	m/z calculado	Erro (ppm)	Fórmula	Íon
1093,3807	1093,3869	5,7	$C_{58}H_{74}N_2NaO_9Zn_2$	$[M\text{-Nic}+Na]^+$
1071,3983	1071,4050	6,2	$C_{58}H_{75}N_2O_9Zn_2$	$[M\text{-Nic}+H]^+$
987,3175	987,3223	4,9	$C_{51}H_{63}N_4O_8Zn_2$	$[M\text{-ibup}]^+$
865,2731	865,2743	1,3	$C_{45}H_{57}N_2O_7Zn_2$	$[Zn_2(ibup)_3(Nic)]^+$
619,2110	619,2121	1,7	$C_{32}H_{40}N_2NaO_5Zn$	$[Zn(ibup)_2(Nic)+Na]^+$
597,2296	597,2301	1,0	$C_{32}H_{41}N_2O_5Zn$	$[Zn(ibup)_2(Nic)+H]^+$

513,1469	513,1480	1,1	C ₂₅ H ₂₉ N ₄ O ₄ Zn	[Zn(ibup)(Nic) ₂] ⁺
475,1813	475,1821	1,7	C ₂₆ H ₃₅ O ₄ Zn	[Zn(ibup) ₂ +H] ⁺
328,0889	328,0856	8,3	C ₁₃ H ₂₃ NNaO ₃ Zn	[Zn(ibup)+H ₂ O+NH ₄ +Na] ⁺
287,0620	287,0615	0,1	C ₁₃ H ₁₉ O ₃ Zn	[Zn(ibup)+H ₂ O] ⁺
229,1201	229,1199	0,9	C ₁₃ H ₁₈ NaO ₂	[ibup+Na+H] ⁺

1.16.4.4 Análise de difração de Raios-X do complexo 3.

A análise cristalográfica dos dados de monocristal para o complexo **3** indica tratar-se de uma molécula binuclear com fórmula molecular C₆₄H₈₀N₄O₁₀Zn₂ (Tabela 22).

Tabela 22. Dados do cristal e refinamento da estrutura do complexo **3**

Parâmetros	Resultados
Fórmula empírica	C ₆₄ H ₈₀ N ₄ O ₁₀ Zn ₂
Massa molar (g.mol ⁻¹)	1196,06
T/K	294(2)
Radiação, λ/Å	Mo Kα; 0,71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Triclínico, <i>P</i> -1
Dimensões da célula unitária (Å)	
A	10,8397(5)
B	11,1735(5)
C	15,6644(7)
α(°)	109,941(2)
β(°)	95,604(2)
γ(°)	111,251(2)
Volume (Å ³)	1608,32(13)
Z	1
Densidade calculada (g.cm ⁻³)	1,235
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,803
F (000)	632
Tamanho do cristal (mm)	0,30 x 0,17 x 0,08
Intervalo Theta (θ) para coleta de dados	2,27 a 29,60
Intervalos de índice	-15 ≤ h ≤ 11 -14 ≤ k ≤ 15 -19 ≤ l ≤ 21
Reflexões coletadas / exclusivas	24445/9001
Totalização ao θ máximo (30,60 graus de ângulo)	99,5%
Correção de absorção	Multi-scan
Transmissão máxima e mínima	0,9486 e 0,7847
Método de refinamento	Quadrados mínimos de matriz completa em F ²
Dados/restrições/parâmetros	9001/0/369
Refinamento de ajuste em F ²	0,996
Índice de R final [I > 2σ(I)]	R _I = 0,0508, wR ₂ = 0,1195
Índices de R	R _I = 0,0891, wR ₂ = 0,1341
Maior diferença de pico e buraco (e.Å ⁻³)	0,666 e -0,578

A estrutura binuclear do complexo **3** (Figura 56) apresenta quatro unidades de ibuprofeno ligadas à dois átomos de Zn com ligação do tipo quelato em ponte do tipo *syn-syn* em arranjo do tipo *tetrakis- μ_2* , similar à descrição de ABU ALI, *et al.*, (2016) para um complexo de $Zn_2(Ibup)_4(\text{aminopiridina})_2$. Os dados da Tabela 23 mostram que a ponte *syn-syn* Zn-O(1)-C(1)-O(2)-Zn# não está simetricamente distribuída entre os dois átomos de Zn. A ligação Zn-O(1) tem comprimento de 2,0484 Å, o qual indica ser a ligação de valência, enquanto a ligação Zn-O(2) tem comprimento de 2,0700 Å, mais longa, indica ser a ligação de coordenação. As esferas de coordenação dos átomos de Zn possuem a forma de uma pirâmide de base quadrada com os cantos formados pelos átomos de oxigênio dos grupos ibuprofeno (duas ligações de valência e duas ligações de coordenação) e o ápice sendo formado pela ligação Zn-N(1) (2,0385 Å) do ligante nicotinamida. Os ápices das pirâmides estão em posições opostas e voltados para o exterior da estrutura ao longo de um eixo de rotação com simetria de grupo D_{4h} , segundo a descrição de SHRIVER, (2008). As moléculas de ibuprofeno carboxilato estão dispostas à normal do eixo de rotação afastadas à 90° com uma forma geométrica descrita como “roda de pás” (DARAWSHEH *et al.*, 2014).

Figura 56. ORTEP para o complexo **3** com omissão dos átomos de hidrogênio.

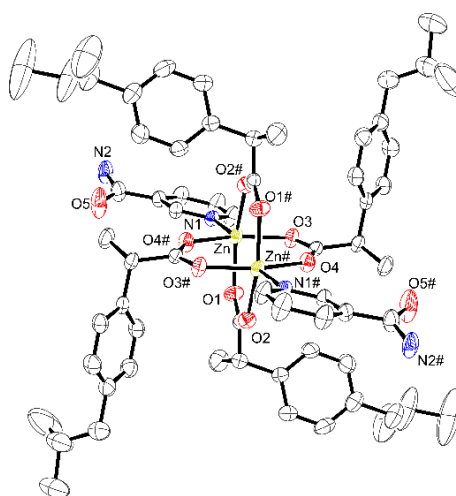


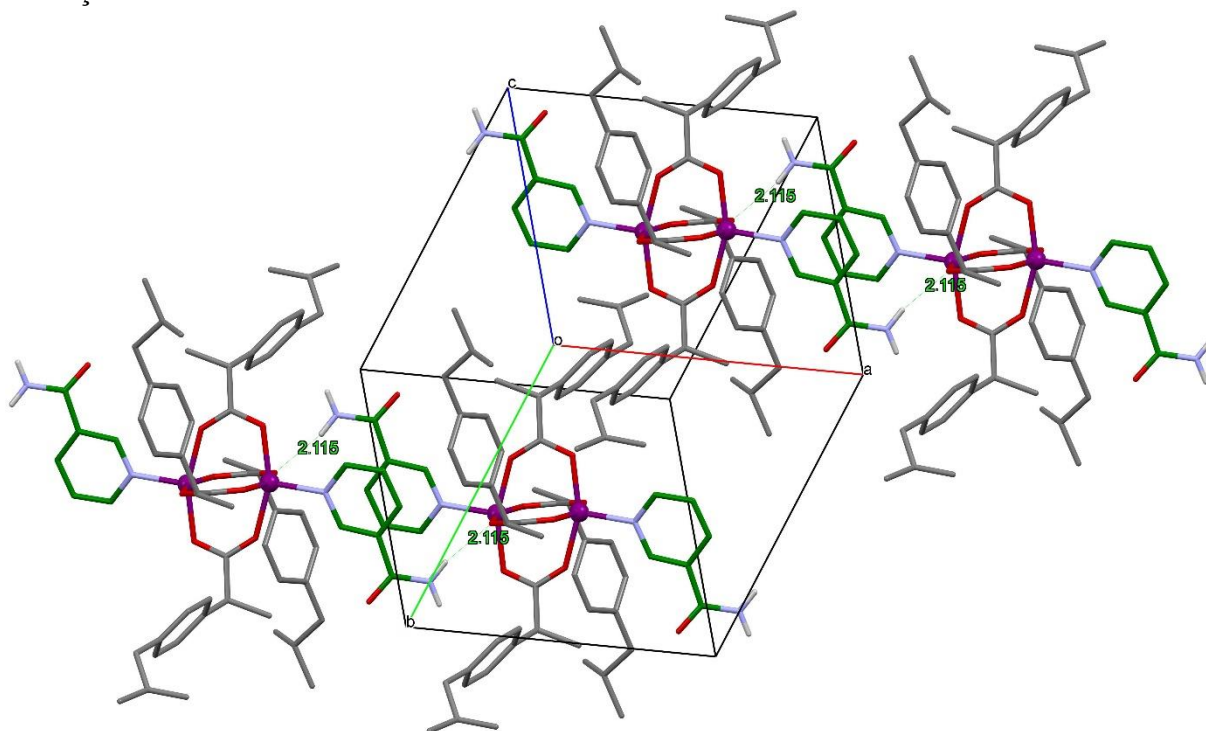
Tabela 23. Principais distâncias entre átomos e medidas de ângulos dos principais sistemas para o complexo **3**.

Ligação	Distância (Å)	Sistema	Ângulo (°)
Zn-O(3)	2,0154(16)	O(3)-Zn-O(4)#1	158,95(7)
Zn-O(4)#1	2,0313(17)	O(3)-Zn-N(1)	103,71(7)
Zn-N(1)	2,0395(18)	O(4)#1-Zn-N(1)	97,32(7)
Zn-O(1)	2,0484(17)	O(3)-Zn-O(1)	88,05(8)
Zn-O(2)#1	2,0700(17)	O(4)#1-Zn-O(1)	88,01(8)
Zn-Zn#1	2,9520(5)	N(1)-Zn-O(1)	98,49(7)
O(3)-C(21)	1,2630(3)	O(3)-Zn-O(2)#1	87,98(7)
O(4)-C(21)	1,2430(3)	O(4)#1-Zn-O(2)#1	88,39(7)
O(4)-Zn#1	2,0313(17)	N(1)-Zn-O(2)#1	102,32(7)
O(1)-C(8)	1,2420(3)	O(1)-Zn-O(2)#1	159,17(7)
O(2)-C(8)	1,2590(3)	O(3)-Zn-Zn#1	86,41(5)
O(2)-Zn#1	2,0700(17)	O(4)#1-Zn-Zn#1	72,55(5)
		N(1)-Zn-Zn#1	169,44(6)
		O(1)-Zn-Zn#1	78,56(5)
		O(2)#1-Zn-Zn#1	80,78(5)

O empacotamento molecular apresenta célula unitária triclinica (Figura 57) com as cadeias laterais dos grupos ibuprofeno voltados para o centro e com os eixos de simetria molecular posicionados em paralelo às duas faces opostas da célula [*o* (origem), arestas *a,c*].

A macroestrutura é composta por um empilhamento de lamelas com interfaces apolares unidas por interações de Van Der Waals entre as cadeias isopropil dos grupos ibuprofeno. As estruturas agrupam-se sob a forma de cadeias moleculares ao longo do eixo que contém os ligantes Nic através de ligações de hidrogênio recíprocas (2,115 Å) entre um átomo de hidrogênio da função amida e um átomo de oxigênio do grupo carbonila de um ligante ibuprofeno posicionado perpendicularmente ao plano espacial do ligante Nic. Uma segunda ligação ocorre de forma simétrica no lado oposto da estrutura permitindo a formação da cadeia. Os dois grupos ibuprofeno posicionados no mesmo plano dos ligantes Nic não produzem ligações de hidrogênio, porém posicionam-se às laterais do eixo da cadeia e interagem com a cadeia vizinha por interação de Van Der Waals.

Figura 57. Célula unitária triclinica para o complexo **3** e a representação das principais interações intermoleculares.



1.16.5 Análises espectrofotométricas dos perfis de absorção por UV-Vis e determinação das absorvidades molares para os complexos 1, 2 e 3 e seus precursores

Análises por espectrofotometria de UV-Vis são usuais para a síntese e identificação de compostos de coordenação, dos quais é possível extrair informações que confirmam a efetividade de uma reação pelo perfil de absorção da radiação UV-Vis e medir propriedades extensivas como o coeficiente de extinção molar. Os espectros a seguir (Figura 58, Figura 59) apresentam os perfis de absorção de soluções para os precursores e os complexos ternários, respectivamente.

Figura 58. Espectros de UV-Vis para os complexos precursores obtidos em THF

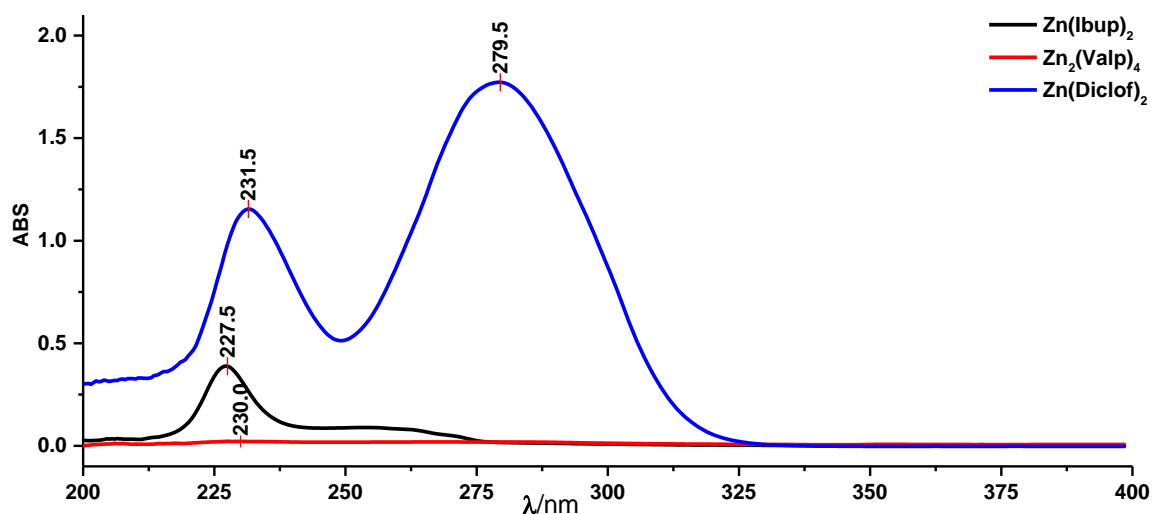
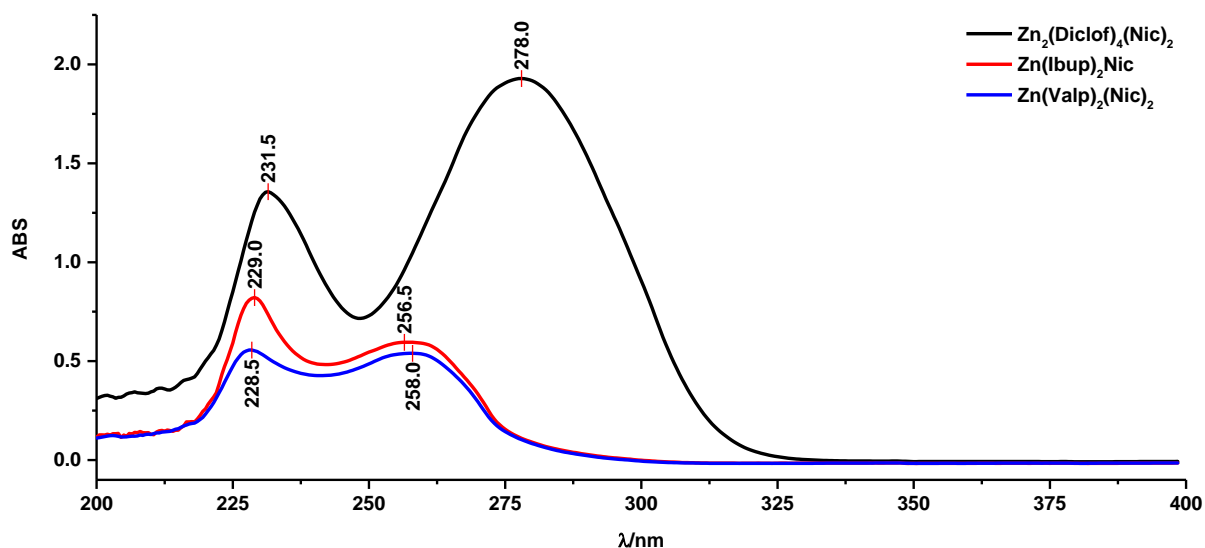


Figura 59. Espectros de UV-Vis para os complexos ternários em THF



A análise dos espectros do complexo $\text{Zn}(\text{Val})_2(\text{Nic})_2$ mostram bandas de absorção em λ 228 e 258 nm. A banda principal em λ 258 nm decorre dos ligantes nicotinamida e está na mesma posição observada para o ligante puro (ASFARAM; GHAEDI; DASHTIAN, 2017). As porções do ligante valproato apresentam baixa atividade UV, com uma banda suave em λ 230 nm. O complexo $\text{Zn}_2(\text{Diclof})_4(\text{Nic})_2$ apresentam alta atividade UV com λ máximo em 278 nm e uma segunda banda 231 nm. Esta atividade se explica pela presença dos dois anéis aromáticos presentes na estrutura do diclofenaco, onde as bandas se sobrepõem às bandas do ligante

nicotinamida. A presença da nicotinamida pode ser atribuída ao deslocamento sutil da banda principal para uma frequência mais energética (blue shift) de 1,5 nm em relação ao precursor $\text{Zn}(\text{Diclof})_2$. O complexo $\text{Zn}(\text{Ibup})_2\text{Nic}$ apresenta uma banda principal em 256,5 nm atribuída à aromaticidade do ligante nicotinamida, tal qual observado no espectro do complexo $\text{Zn}(\text{Val})_2(\text{Nic})_2$. O precursor $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$ apresenta baixa atividade, com λ máximo em 227,5 nm.

1.16.5.1 Análises dos coeficientes de absorvidade molar para os complexos ternários e seus precursores

O coeficiente de absorvidade molar ϵ foi determinado através da análise por UV-Vis de diluições seriadas das soluções dos complexos no comprimento de onda de absorção máxima (λ max) em THF (GILL; HIPPEL, 1989). O coeficiente ϵ é uma propriedade física intrínseca do composto e é matematicamente representado como a inclinação da curva de regressão linear ($y = ax + b$) da porção linear do gráfico de dispersão $y = f(x)$ (Figura 60) onde a correlação entre concentração (mol L^{-1}) versus absorção segue a lei de Lambert-Bier ($\epsilon = \frac{A}{c.l}$). Os dados calculados para todos os complexos e seus precursores estão na Tabela 24.

Figura 60. Método de determinação da absorvidade molar do composto $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$ em THF.

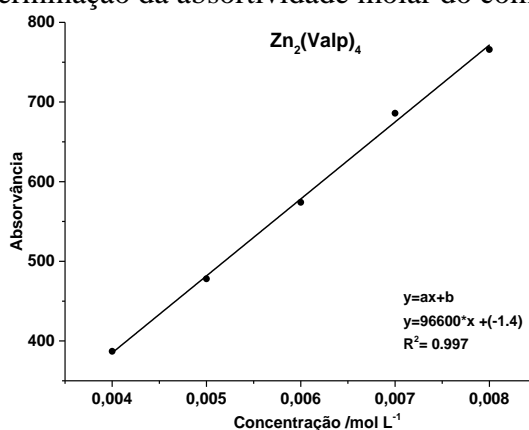


Tabela 24. Coeficientes de absorvidade ou extinção molar para os complexos ternários e os precursores.

	Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
Complexo binário	$\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$	230,0	96600
	$\text{Zn}(\text{Diclof})_2$	279,5	17040000

	Zn(Ibup) ₂	227,5	317,3
Complexo ternário	Zn(Valp) ₂ (Nic) ₂	258,0	4259627
	Zn ₂ (Diclof) ₄ (Nic) ₂	278,0	18720000
	Zn ₂ (Ibup) ₄ (Nic) ₂	256,5	6050

Todos os complexos ternários apresentaram valores de ϵ superiores aos respectivos precursores. Os resultados mostram que a intensidade de absorção da radiação UV tende à aumentar na medida em que o grau de coordenação do metal aumenta e os efeitos de transferência de carga em complexos octaédricos ficam mais evidentes (SHRIVER, 2008).

1.16.6 Determinação das condutividades molares dos complexos e as estabilidades químicas em solução ao decorrer do tempo

A condutividade molar Λ_m é um parâmetro indicativo do grau de ionização do complexo metálico em solução segundo DEAN, 1999. Valores de Λ_m acima de 100 S cm² mol⁻¹ indicam que o complexo possui cargas pontuais comuns aos sais em solução, enquanto valores mais próximos de zero que o complexo está coordenado com todos os ligantes de valência e apresenta-se como molécula neutra em solução (AL-MOGREN; ALAGHAZ; EBRAHEM, 2013). A Tabela 25 apresenta os valores das condutividades das soluções à 0,01 mol L⁻¹ em DMF obtidas após 30 min do preparo das soluções.

Tabela 25. Condutividades molares dos complexos e seus sais precursores.

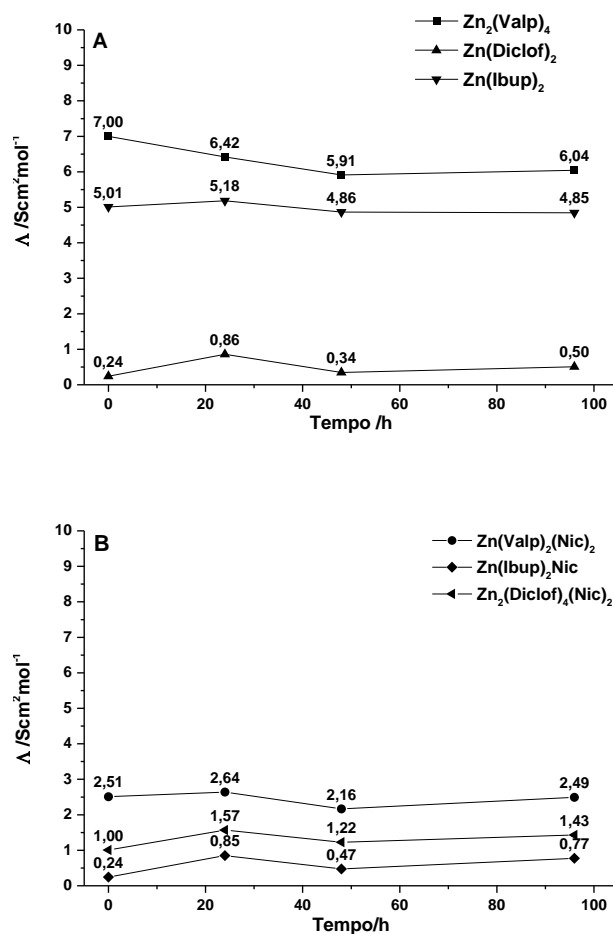
	Composto	Condutividade molar Λ_m (S cm ² mol ⁻¹)
Complexo binário	Zn ₂ (Valp) ₄	7,00
	Zn(Diclof) ₂	0,24
	Zn(Ibup) ₂	5,01
Complexo ternário	Zn(Valp) ₂ (Nic) ₂	2,51
	Zn ₂ (Diclof) ₄ (Nic) ₂	1,00
	Zn(Ibup)Nic	0,24

As leituras de Λ_m reforçam a tese de que os precursores são complexos moleculares e mantêm-se coordenados ao íon metálico por ligações do tipo quelato (bidentada), anteriormente evidenciadas com as medidas de $\Delta\nu_{\text{a-s}}$ dos grupos carboxilato efetuadas nas análises de FTIR para estes compostos binários. EL-MEGHARBEL; HAMZA; REFAT, (2015) obtiveram complexos binários de diclofenaco com Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} , os quais todos os exemplares apresentaram valores de Λ_m entre 43 e 54 $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$ e foram categorizados como não-eletrólitos com ligação de valência do tipo monodentada. As leituras de Λ_m também mostram que os complexos ternários são menos condutores que seus respectivos precursores e reforça a tese de complexo neutro molecular, conforme discutido na seção (57) pela análise de dados espectroscópicos de FTIR.

1.16.6.1 Determinação das estabilidades químicas dos complexos em solução

As estabilidades químicas em solução dos complexos ternários e seus precursores foram determinadas pela metodologia descrita por PICH et al., 2019. Este experimento visou determinar o grau de labilidade das ligações metal-ligante durante longos períodos de tempo de exposição do complexo ao solvente polar DMF. Os dados estão apresentados na Figura 61.

Figura 61. Estudo de estabilidade química dos complexos **1**, **2** e **3** (B) e seus precursores (A) em solução por condutividade elétrica.



As leituras indicam um decaimento gradual de 13,7% de Λ_m para o precursor $Zn_2(Valp)_4$ durante as primeiras 48 h, com as leituras estabilizando-se até 96 h. Este comportamento de decréscimo de condutividade foi observado por PICH et al., (2019) em um experimento análogo utilizando o complexo binário $Cu_2(Valp)_4$ em etanol e DMSO, no qual atribuiu-se à polimerização de parte do complexo em solução, uma vez que a produção de oligômeros reduzirá a concentração de moléculas no meio os valores aparentes de Λ_m cairão por ser uma função da concentração. O complexo binário $Zn(Ibup)_2$ apresentou um decréscimo de Λ_m 3,19% e foi considerado estável, enquanto o complexo $Zn(Diclof)_2$ apresentou uma variação positiva de 108,3% de Λ_m ao final de 96 h, porém a condutividade deste complexo está próxima da variação basal do método e não pode ser considerada como significativa.

O complexo $Zn(Valp)_2(Nic)_2$ variou negativamente 0,80% com A_m final de $2,49 S cm^2 mol^{-1}$, $Zn_2(Diclof)_4(Nic)_2$ variou positivamente 43% com A_m final de $1,43 S cm^2 mol^{-1}$, $Zn_2(Ibup)_4(Nic)_2$ variou positivamente 220,8% com A_m final de $S cm^2 mol^{-1}$, porém as leituras ocorrem próximas da variação basal do método e não podem ser consideradas significativas. O experimento mostra que os complexos não são lábeis em solvente polar em um experimento de 96 h.

1.16.7 Determinação dos pontos de fusão dos complexos

Os pontos de fusão dos complexos foram medidos em fusiômetro capilar analógico. As leituras foram obtidas visualmente, tendo o ponto de fusão assumido como a temperatura instantânea no aparecimento da primeira gota de líquido na parede do capilar. Os valores estão dispostos na Tabela 26.

Tabela 26. Pontos de fusão para os complexos ternários e os precursores.

Composto		Ponto de fusão (°C)	Referência (°C)
Complexo binário	$Zn_2(Valp)_4$	207	250 ^a
	$Zn(Diclof)_2$	244	252 ^b
	$Zn(Ibup)_2$	78	87-94 ^c
Complexo ternário	$Zn(Valp)_2(Nic)_2$ (1)	155	-
	$Zn_2(Diclof)_4(Nic)_2$ (2)	180	-
	$Zn_2(Ibup)_4(Nic)_2$ (3)	148	-

^aABU, *et al.*, (2013); ^bABU ALI; JABALI, (2016), ABU ALI *et al.*, (2016)

Os pontos de fusão para os complexos binários $Zn_2(Valp)_4$ e $Zn(Diclof)_2$ são valores considerados elevados para compostos moleculares, sugerindo que tais compostos apresentem interações intermoleculares fortes. Observam-se valores inferiores aos dados da literatura para estes dois complexos, porém salienta-se que os pontos de fusão destes complexos são sensíveis ao tempo com tendências de aumento do grau de cristalinidade e produzindo polimorfos com faixas de fusão diferentes do composto recém preparado ou recristalizado em solvente orgânico. As leituras para os compostos em discussão foram obtidas no dia seguinte à síntese a partir dos

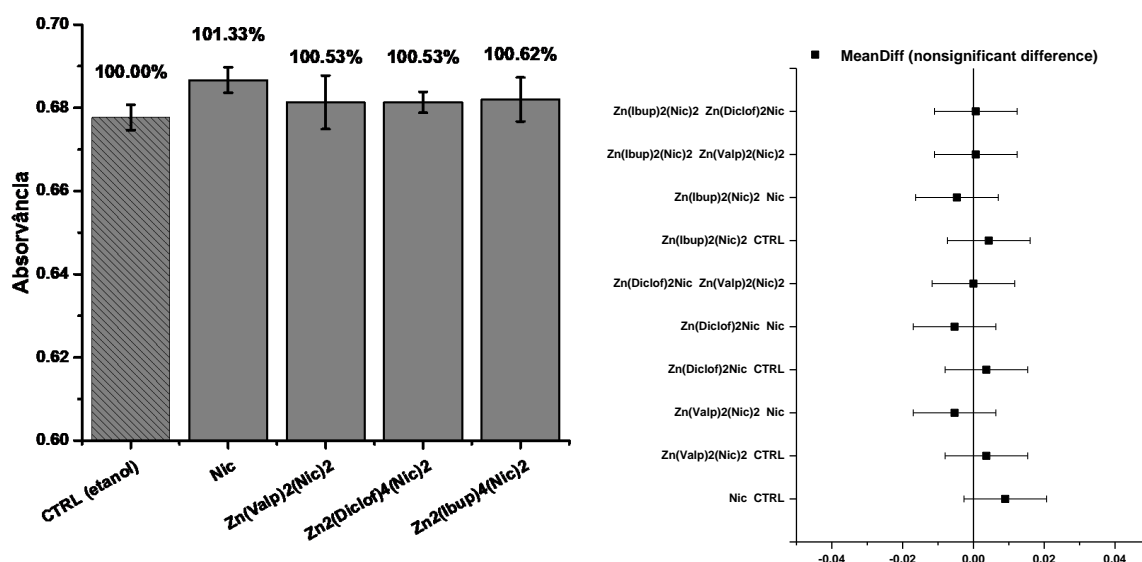
sólidos amorfos obtidos do meio aquoso da síntese sem processos de recristalização. O complexo binário $\text{Zn}(\text{Ibup})_2$ fundiu à 78 °C e indica haver interações intermoleculares fracas e alto grau de amorfismo.

As leituras para os complexos ternários foram obtidas a partir de fases cristalinas obtidas em solvente orgânico, de acordo com o método de síntese individual (41). Os complexos **1**, **2** e **3** fundiram à 155 e 180 e 148 °C respectivamente, uma faixa de temperatura de fusão comum para sólidos moleculares com interações intermoleculares fortes, como ligações de hidrogênio.

1.16.8 Determinação das atividades antioxidantes via radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$

A atividade antioxidante foi determinada pela reação do complexo com o radical livre $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pela metodologia descrita por RUFINO et al., 2007. Neste experimento monitorou-se a capacidade redutiva dos complexos de zinco (sequestro do radical livre do meio) pelo desaparecimento da espécie radicalar $\text{ABTS}^{\bullet+}$ monitorada em λ 734 nm.

Figura 62. Determinação da atividade redox dos complexos frente ao radical livre $\text{ABTS}^{\bullet+}$ com dados estatísticos.

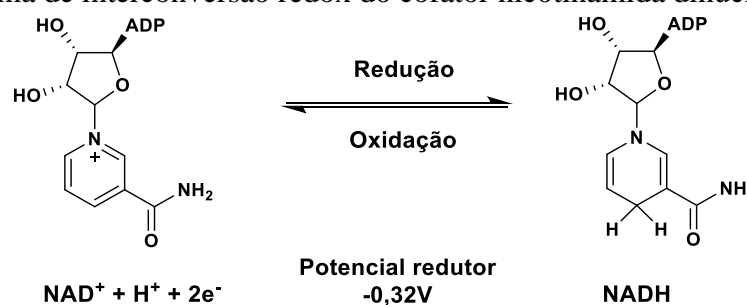


Os resultados das triplicatas e os desvios padrão (Figura 62) não mostram atividade redox de todos os complexos frente ao radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, bem como o ligante Nic livre. A análise estatística comparativa das médias por ANOVA com o teste de Tukey (Figura 62) mostraram que as

atividades redox de todos dos complexos e do ligante livre Nic não diferem significativamente do controle (etanol) para o intervalo de confiança de 0,05. O mesmo pode ser constatado quando o teste estatístico é cruzado, ou seja, as médias das atividades de cada complexo é confrontada com todos os outros exemplares no mesmo teste estatístico.

A aparente inatividade na captura de radical livre é indicativo de estabilidade química dos complexos. O anel da nicotinamida é um sistema receptor de elétrons quando o nitrogênio sp^2 está ligado à um sistema removedor de densidade eletrônica como ocorre no par redox do sistema NAD-NADH, como pode ser observado na Figura 63. Diferente da ribose, o Zn^{+2} apresenta um fluxo eletrônico em sentido contrário com capacidade de inibir a atividade redox da nicotinamida, corroborando com os resultados de blindagem de spin observados nos espectros de 1H e $^{13}CRMN$. Cabe salientar que no par redox $NAD \rightleftharpoons NADH$ a nicotinamida apresenta um potencial redutor de -0,32 V, ou seja, tende a capturar um átomo de hidrogênio com mais facilidade de que estabilizar uma espécie radicalar.

Figura 63. Esquema de interconversão redox do cofator nicotinamida dinucleotídeo (NAD)



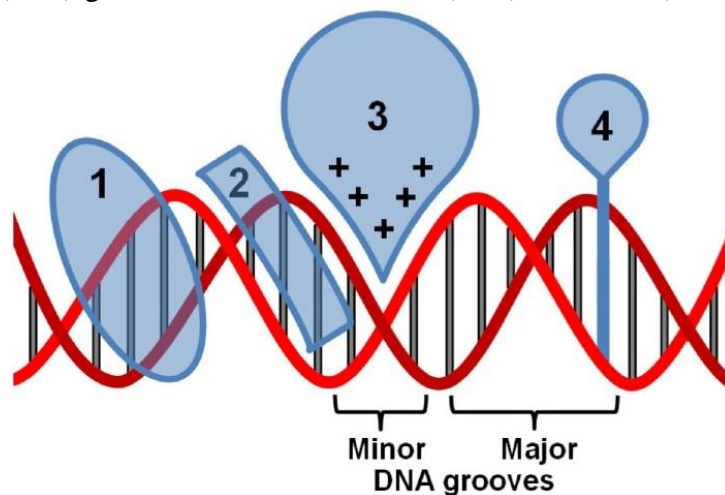
Fonte: (BELENKY; BOGAN; BRENNER, 2007)

Outro aspecto importante na inércia redutora dos complexo é a presença do átomo de Zn^{2+} com um potencial redutor positivo de + 0,76 V para o par redox $Zn^{2+} \rightleftharpoons Zn^0$ em relação ao potencial 0,00 V do hidrogênio. (HAYNES; LIDE; BRUNO, 2016) Esta propriedade termodinâmica garante que reações de redução do átomo de Zn^{2+} por captura de elétrons de qualquer natureza não ocorrerá em meio aquoso, como fluidos biológicos.

1.16.9 Análise das interações complexo metálico-DNA por dicroísmo circular

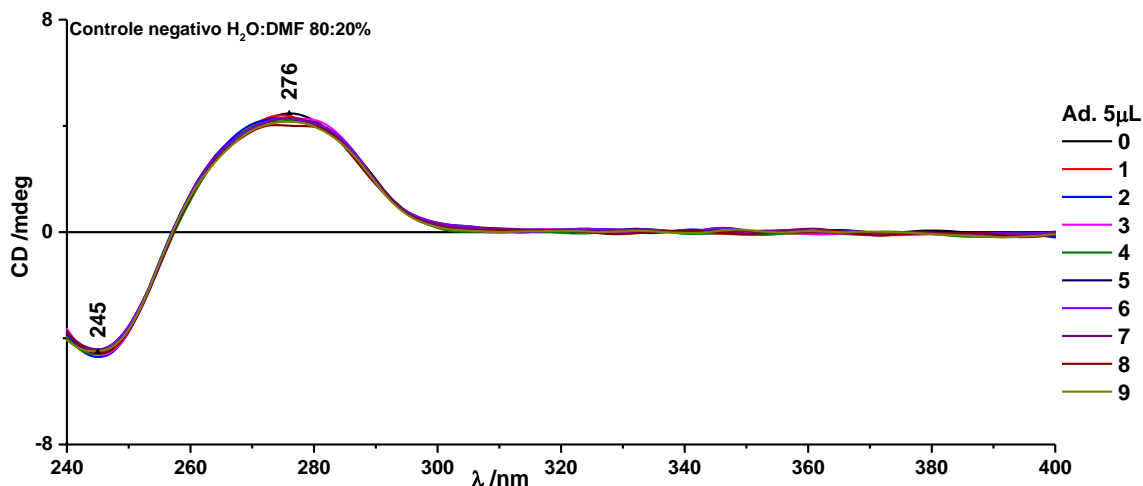
As interações químicas entre as moléculas do complexo metálico e cadeias de CT-DNA em solução foram tipificadas por espectrometria de dicroísmo circular. Os resultados foram plotados em gráficos de dispersão xy com sobreposição das linhas dos perfis de absorção. Cada linha representa a média de três leituras sequenciais da mesma amostra para redução do ruído de fundo. Uma ferramenta de suavização da linha (smooth) foi aplicada melhoramento das representações gráficas (método Savisky-Golay, polinômio de ordem 2, janela de 20 pontos) utilizando o software OriginPro 2016[®], OriginLab Corporation, versão b9.3.226 (teste) para sistema operacional Windows 10[®]. Os resultados das análises de dicroísmo circular foram avaliados de acordo com a evidência de interação DNA-Ligante como descrito na Figura 64.

Figura 64. Modos de interação DNA-pequenas moléculas: 1 (ligante de sulco grande), 2 (ligante de sulco pequeno), 3 (ligante eletrostático/alostérico), 4 (intercalador)



Fonte: ALMAQWASHI, *et al.*, (2016)

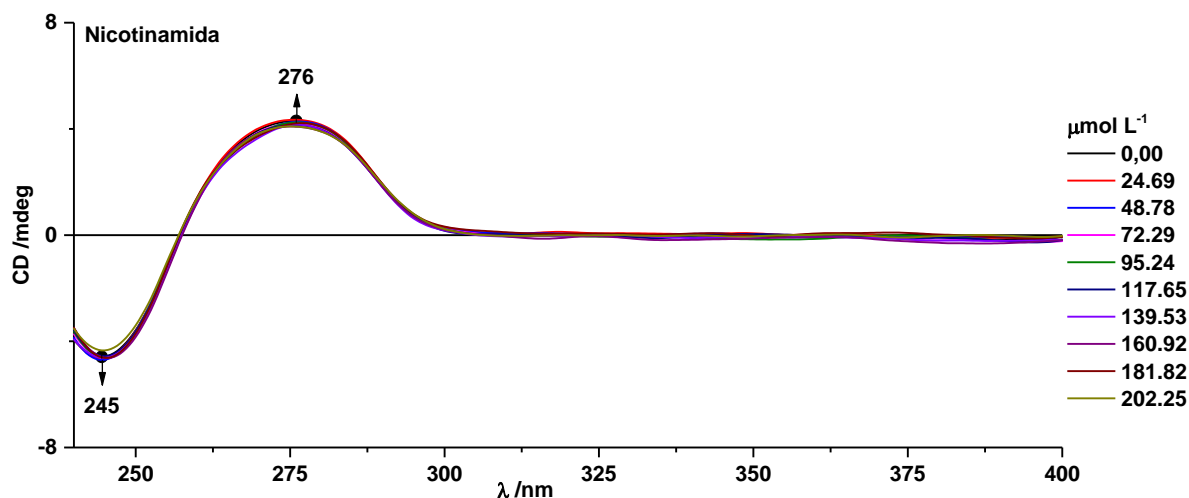
Figura 65. Sobreposição de espectros de dicroísmo circular de CT-DNA com adições crescentes de H₂O:DMF 80:20%



Os espectros obtidos para o experimento controle (Figura 65) não mostraram alterações da hélice do CT-DNA pela adição da mistura de solvente H₂O:DMF 80:20. Esta constatação é importante por indicar que as intensidades das bandas de CT-DNA não sofrem redução com a diluição após nove adições seriadas de solvente, tampouco efeitos de batocromismo são observados.

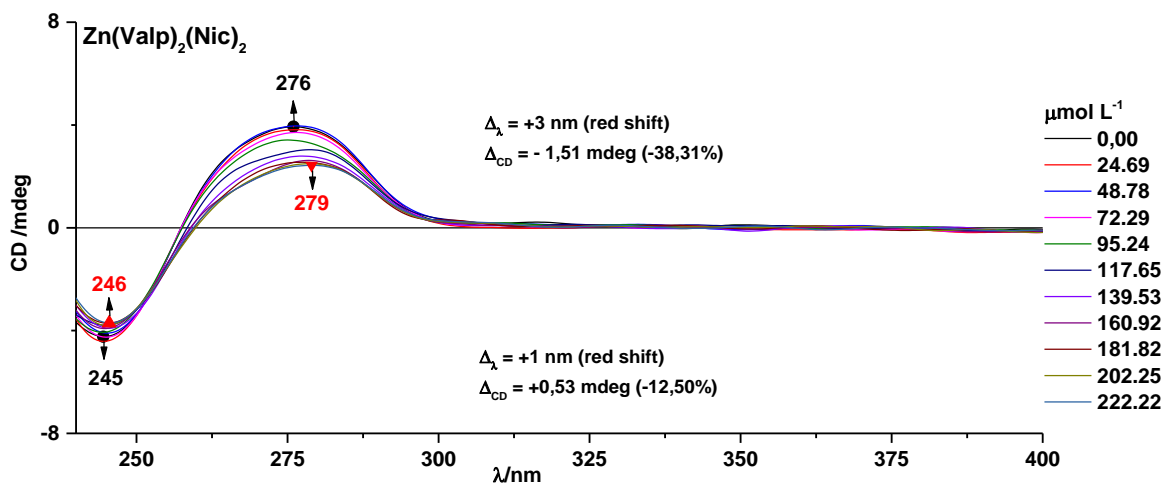
Os espectros obtidos para a nicotinamida (Figura 66) não apresentaram variações substanciais para nenhuma concentração do composto. Esta constatação é importante por indicar que as intensidades das bandas de CT-DNA não sofrem redução com a diluição após nove adições seriadas de solução de composto.

Figura 66. Sobreposição de espectros de dicroísmo circular de CT-DNA com adições crescentes de nicotinamida.



A inatividade aparente da nicotinamida com a dupla-hélice pode ser uma obviedade por tratar-se de uma molécula endógena com função intracelular comprovada (KNIP et al., 2000), contudo as altas concentrações utilizadas no estudo mostram que as cargas elétricas residuais e conformação estrutural podem explicar a inatividade do ligante. Existe repulsão eletrostática recíproca entre a cadeia de DNA e nicotinamida em pH neutro, pelo fato do DNA ser um sal sódico e manter os grupos fosfato em contato direto com o meio externo. A nicotinamida apresenta-se como base livre em pH neutro, condição que conserva os orbitais ligantes dos grupos químicos amida e piridina e produz densidade eletrônica de mesmo sinal que o DNA. Outra hipótese está no fato da estrutura da nicotinamida não ser planar, apesar de ser constituída por um anel piridínico. Análises espectroscópicas de $^1\text{HRMN}$ mostram desproporcionalidades dos hidrogênios do grupo amida e acoplamentos de spins nucleares do tipo J_2 (dois carbonos de distância) no anel decorrentes das torções estruturais produzidas pela presença do átomo de nitrogênio sp^2 e pela rotação da ligação C-C que liga o anel à carbonila (SILVERSTEIN, 1998). Estruturas aromáticas ricas em elétrons e com planicidade são agentes genotóxicos por intercalação de sulco à dupla-hélice e induzem à rupturas na cadeia estruturas aromáticas são determinantes para a genotoxicidade de moléculas como benzeno, benzo-a-pireno e *o*-fenantrolina (KELLETT et al., 2012).

Figura 67. Sobreposição de espectros de dicroísmo circular de CT-DNA com adições crescentes de complexo 1.



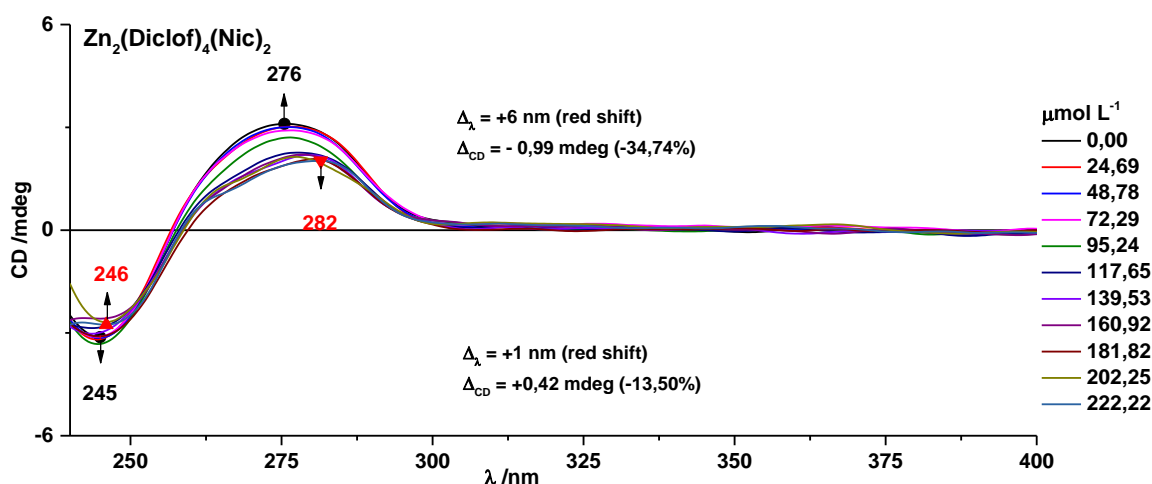
Os espectros de CD obtidos para as interações de CT-DNA com o complexo 1 (Figura 67) apresentam reduções na banda positiva em λ 276 nm e na banda negativa em λ 245 nm. A redução da banda positiva cessou na adição de número 9 ($391,30 \mu\text{mol}^{-1}$ de complexo) com decréscimo de 38,31% da intensidade em relação à análise em branco e com batocromismo de 3 nm para o vermelho (red shift). A banda positiva é resultado do grau de empilhamento dos pares de bases nitrogenadas da dupla-hélice, com a redução da intensidade sendo atribuída à formação de ligações de sulco complexo-DNA. A banda negativa é decorrente do grau de helicidade do polinucleotídeo e teve redução de 12,50% com red shift de 1 nm. O efeito de interação de sulco por complexos ternários contendo valproato são descritas por PICH et al., (2019), onde atribui-se este comportamento cromático à interação derivada da atração eletrostática entre potenciais parcialmente positivo das cadeias de laterais do valproato e o potencial parcialmente negativo do DNA.

Os resultados mostram a existência de interações eletrostáticas (cargas opostas) entre o complexo e o CT-DNA produzindo compressão longitudinal da estrutura e uma leve perda de helicidade, contudo não compromete a integridade da estrutura em si. Observa-se também um fenômeno de saturação dos sítios de interação DNA-complexo pela parada dos decréscimos das

bandas de CD a partir da nona adição de solução de complexo, além da estabilidade aparente nas outras regiões do espectro indicar apenas um tipo de interação.

As interações eletrostáticas evidenciadas no experimento são derivadas de caráter parcialmente positivo do complexo **1**. O íon de Zn^{2+} é um ácido de Lewis forte e transfere esta característica para a periferia da estrutura por meio da ligação de sp-d de valência e coordenação. O efeito de transferência de densidade eletrônica é observado ao comparar-se os espectros de 1H e $^{13}CRMN$ do complexo ternário e do precursor $Zn_2(Valp)_4$, os quais mostram que o átomo metálico produz um efeito de blindagem dos núcleos de próton e carbono dos ligantes, produzindo deslocamentos químicos δ mais próximos ao zero se comparados aos espectros dos ligantes isolados. DOS SANTOS, *et al.*, (2015) observaram o efeito de blindagem de spins ao comparar espectros de 1H e $^{13}CRMN$ de complexos ternários de Zn^{2+} com valproato e ligantes nitrogenados 2,2'-bipiridina e 1,10-fenantrolina.

Figura 68. Sobreposição de espectros de dicroísmo circular de CT-DNA com adições crescentes de complexo **2**.

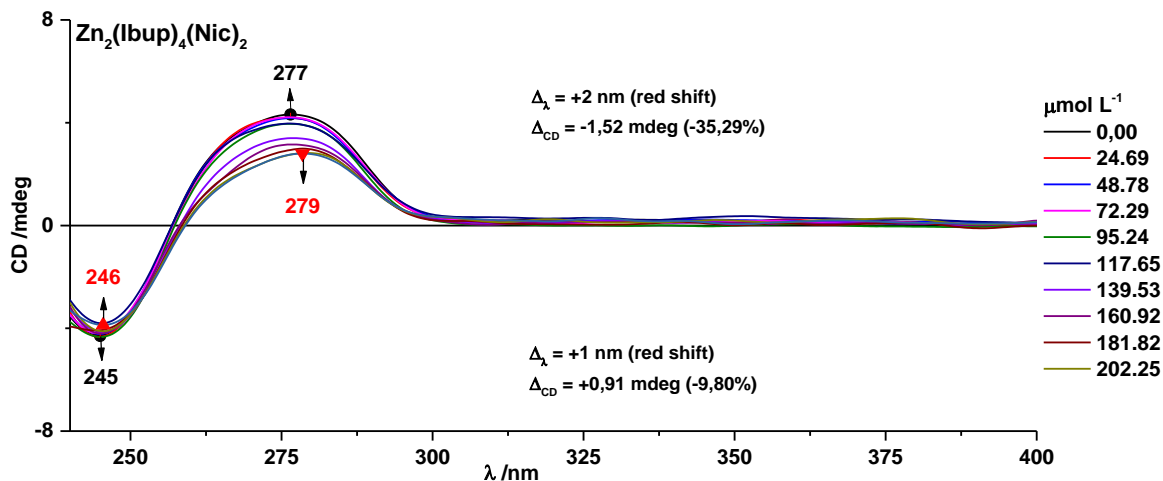


Os espectros de CD obtidos para as interações de CT-DNA com o complexo **2** (Figura 68) apresentam reduções na banda positiva em λ 276 nm e na banda negativa em λ 245 nm similares ao experimento com o complexo **1**. A redução da banda positiva cessou na adição de número 9 ($391,30 \mu\text{mol}^{-1}$ de complexo) com decréscimo de 34,74% da intensidade em relação

à análise em branco e com batocromismo de 6 nm para o vermelho (red shift). A banda negativa decorrente do grau de helicidade do polinucleotídeo teve redução de 13,50% com red shift de 1 nm.

Os graus de helicidade e empilhamento de pares de bases apresentaram efeito similar ao complexo **1**, mas com efeito de batocromismo red shift mais pronunciado (6 nm). O red shift mais intenso pode ser associado ao fato do complexo em questão apresentar pico máximo de absorção no espectro UV em λ 278 nm e ter um coeficiente de absortividade molar de $1,872 \times 10^7$ L mol⁻¹ cm⁻¹ (Tabela 24, Figura 59), o mais alto entre todos os complexos em estudo. Os resultados mostram que o complexo **2** interage com os sulcos do CT-DNA por atração eletrostática, com a probabilidade maior de interação com os sulcos maiores em decorrência do volume molar do complexo.

Figura 69. Sobreposição de espectros de dicroísmo circular de CT-DNA com adições crescentes de complexo **3**.



Os espectros de CD obtidos para as interações de CT-DNA com o complexo **3** (Figura 69) apresentam reduções na banda positiva em λ 277 nm e na banda negativa em λ 245 nm similares ao experimento com o complexo aos experimentos anteriores. A redução da banda positiva cessou na adição de número 9 ($391,30 \mu\text{mol}^{-1}$ de complexo) com decréscimo de 35,29% da intensidade em relação à análise em branco e com batocromismo de 2 nm para o vermelho (red shift). A banda negativa decorrente do grau de helicidade do polinucleotídeo teve

redução de 9,80% com red shift de 1 nm. Os graus de helicidade e empilhamento de pares de bases apresentaram efeito similar ao complexo **1** em todos os aspectos.

De modo geral, todos os três complexos ternários de Zn^{2+} não apresentaram interações físico-químicas detectáveis pelo método de dicroísmo circular que comprometam a integridade da dupla-hélice de CT-DNA exposto. As interações de sulco detectadas para todos os complexos aparentam ser atividade das cadeias laterais dos ligantes de valência (carboxilato) visto que nenhuma interação foi detectada no experimento com o ligante Nic isolado. Para tanto, pode-se concluir que o método em questão não detectou atividades genotóxica para todos os complexos com a manutenção da integridade da hélice das cadeias de CT-DNA.

1.16.10 Análise da habilidade de quebra de DNA plasmidial de E. coli in vitro

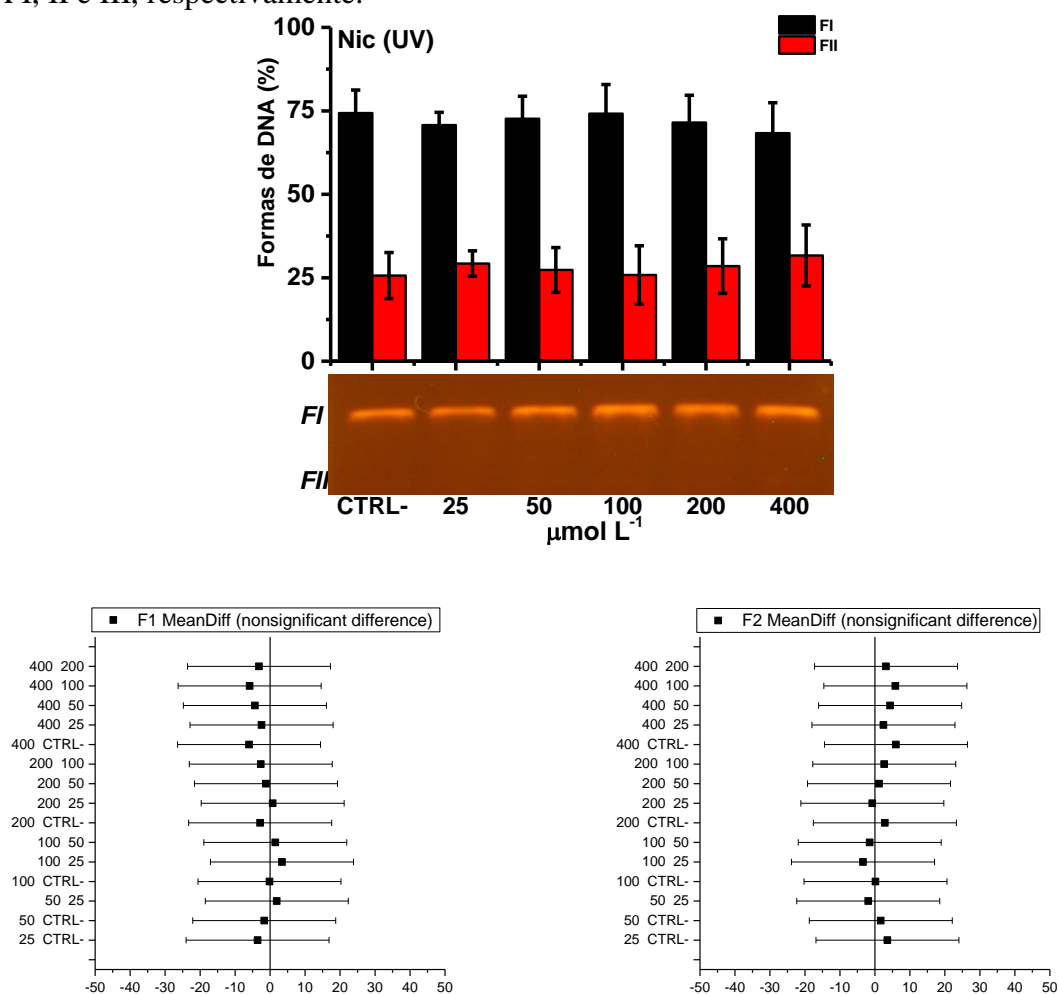
A habilidade dos complexos de produzirem quebras simples e duplas em cadeias de DNA plasmidial de *E. coli* por foto indução de luz UV e com ausência de luz foi avaliada pelas metodologias de eletroforese em gel, segundo descrição de SILVA et al., 2011. As imagens obtidas das separações eletroforéticas foram analisadas pelo software GelAnalyzer 2010, versão 2010^a, onde as bandas referentes às formas de DNA FI, FII e FIII foram quantificadas pela técnica de análise de densidade de pixels. As replicatas dos experimentos foram plotadas em gráficos de barras com desvio padrão para cada conjunto experimental. Aplicou-se análise de variância ANOVA intra e inter-experimental para avaliar as similaridades entre os resultados. Gráficos e análises estatísticas foram realizadas com uso do software OriginPro 2016[®], OriginLab Corporation, versão b9.3.226 (teste) para sistema operacional Windows 10[®].

1.16.10.1 Análise estatística dos testes de quebra de DNA induzida por radiação UV

Os resultados a seguir correspondem ao tratamento estatístico dos obtidos nos ensaios de indução de quebra de DNA *in vitro* induzida por radiação UV de λ 300-310 nm em um intervalo de tempo de 30 s. Este teste pode detectar a fragmentação do DNA decorrente do

ataque de espécies radicalares ou de sistemas de spins eletrônicos energizados no complexo pela foto indução. As fragmentações ocorrem pela transferência de radical livre à cadeia do DNA ou pelas intercalações/interações de sulco dos confôrmeros planares formados pela excitação eletrônica. Avaliaram-se as proporções de DNA intacto (FI, superenovelado), quebras simples (FII, DNA circular) e quebras duplas (FIII, DNA linear).

Figura 70. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pela nicotinamida induzida por radiação UV. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.

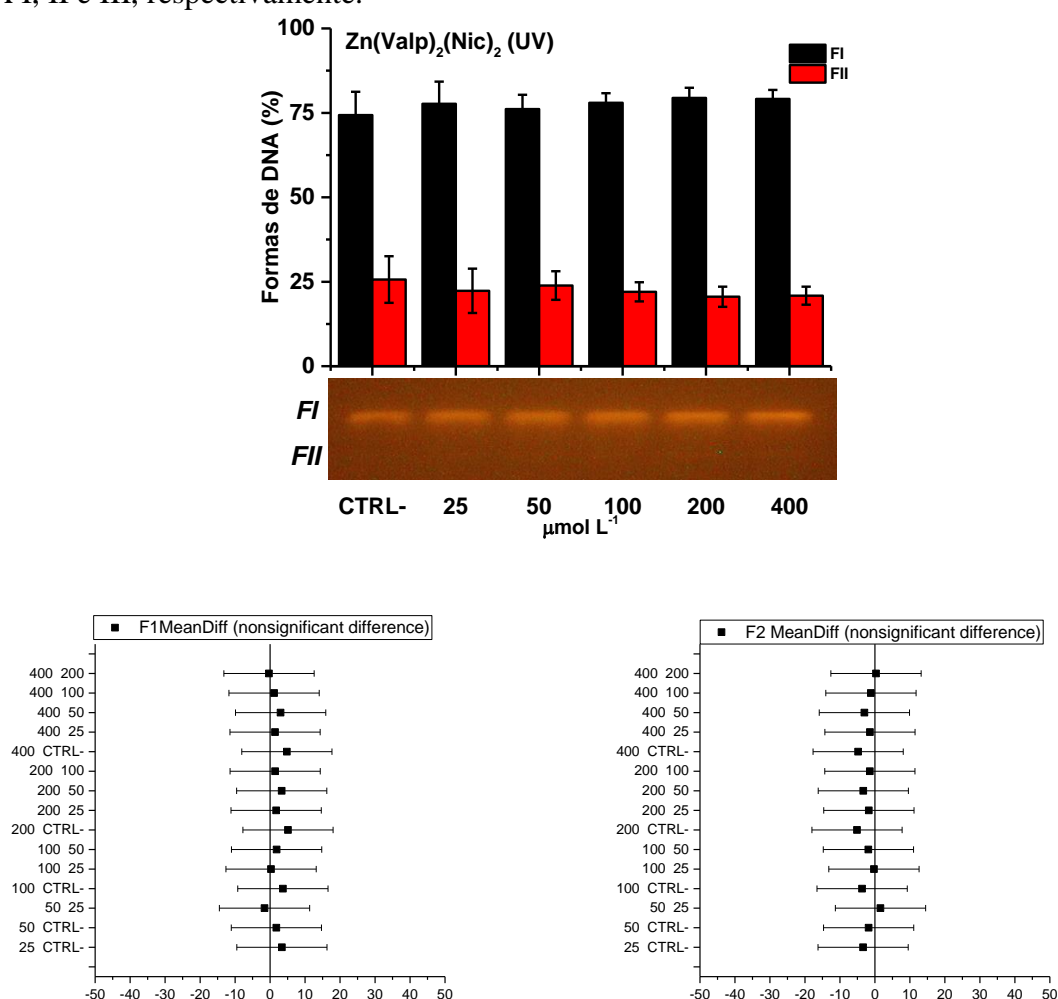


A Figura 70 apresenta as proporções médias entre as formas de DNA produzidos pela exposição à nicotinamida com foto indução. Verifica-se que na condição de foto indução não ocorre a formação de quebras duplas em nenhuma das concentrações testadas, apenas com produção de quebras simples em proporções no intervalo entre 20 e 30% para todas as

concentrações testadas. O tratamento estatístico intra experimental indica não haver diferença significativa entre a atividade do controle negativo ($\text{H}_2\text{O}:\text{DMF}$ 80:20) e as concentrações seriadas de nicotinamida em um intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

O experimento mostra que a nicotinamida livre não é capaz de produzir lesões ao DNA com 30 s de foto ativação em concentrações de até $400 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 71. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo complexo 1 induzida por radiação UV. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.

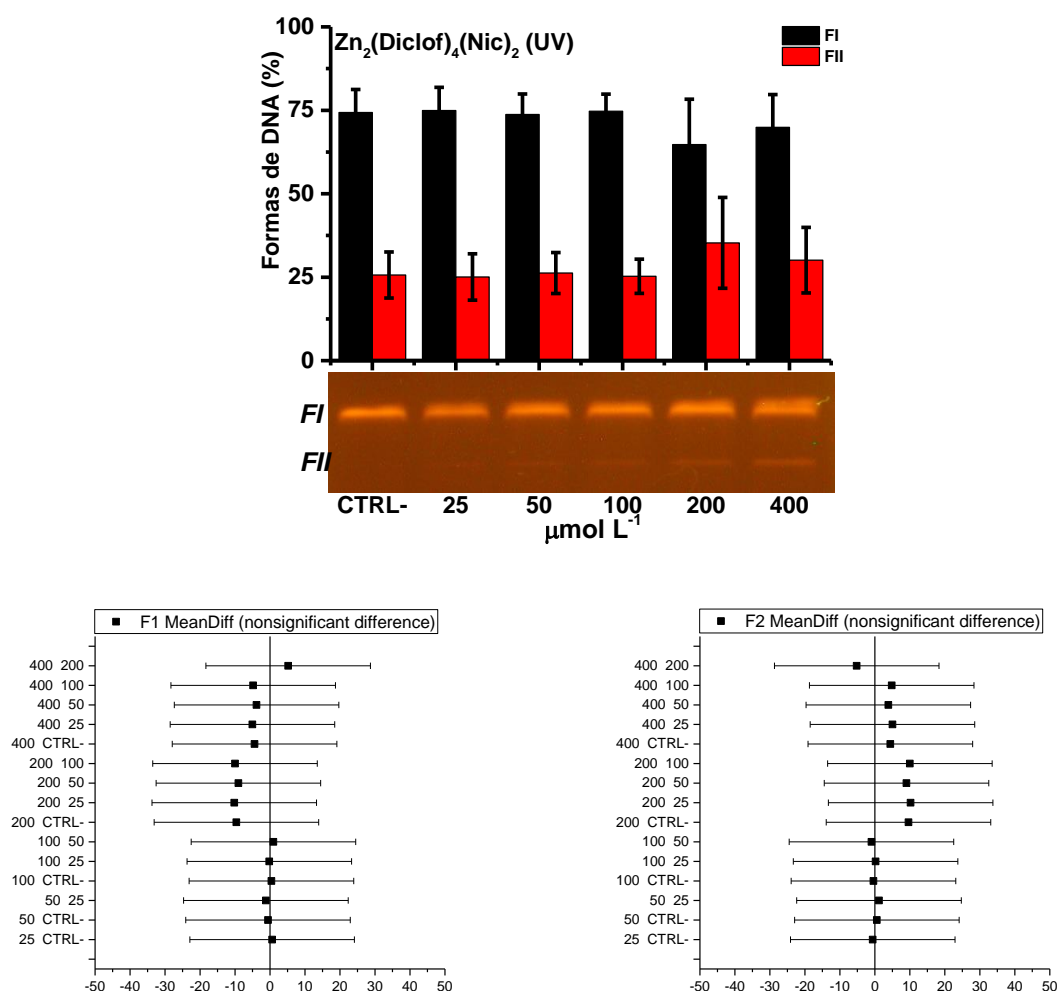


A Figura 71 apresenta as proporções médias entre as formas de DNA produzidos pela exposição complexo $\text{Zn}(\text{Valp})_2(\text{Nic})_2$ com foto indução. Verifica-se que na condição de foto indução não ocorre a formação de quebras duplas em nenhuma das concentrações testadas, apenas com produção de quebras simples em proporções no intervalo entre 20 e 30% para todas

as concentrações do complexo. O tratamento estatístico intra experimental indica não haver diferença significativa entre a atividade do controle negativo (H₂O:DMF 80:20) e as concentrações seriadas de Zn(Valp)₂(Nic)₂ em um intervalo de confiança de 95%.

O perfil gráfico e os resultados do tratamento estatístico por ANOVA indicam que o complexo Zn(Valp)₂(Nic)₂ não é foto ativável tal qual a nicotinamida livre além de apresentar menor variação estatística intra experimental.

Figura 72. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo complexo Zn₂(Diclof)₄(Nic)₂ induzida por radiação UV. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.



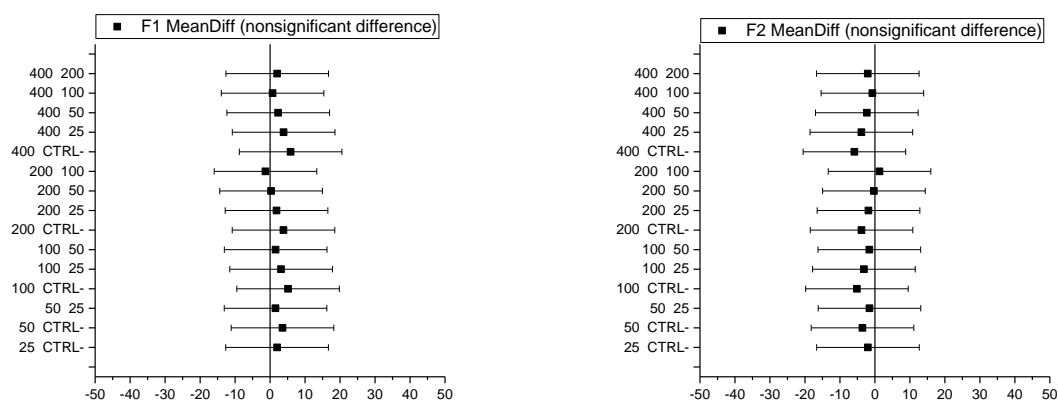
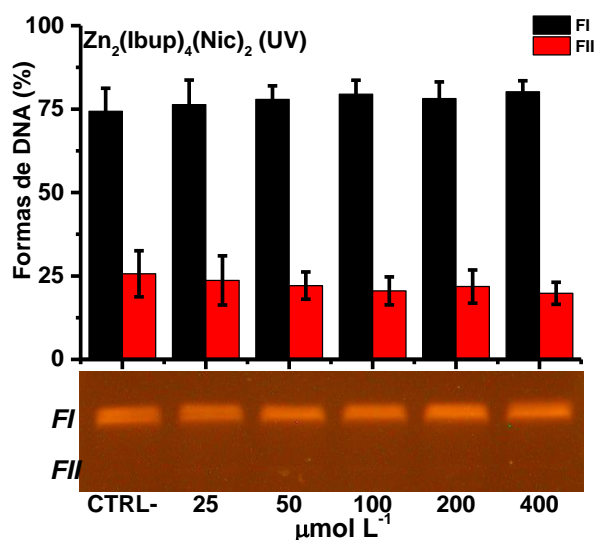
A Figura 72 apresenta as proporções médias entre as formas de DNA produzidos pela exposição complexo Zn₂(Diclof)₄(Nic)₂ com foto indução. Verifica-se que na condição de foto indução não ocorre a formação de quebras duplas em nenhuma das concentrações testadas,

apenas com produção de quebras simples em proporções no intervalo entre 20 e 40% para todas as concentrações testadas. O tratamento estatístico intra experimental indica não haver diferença significativa entre a atividade do controle negativo (H₂O:DMF 80:20) e todas as concentrações seriadas de Zn₂(Diclof)₄(Nic)₂ em um intervalo de confiança de 95% para as formas de DNA I e II.

O perfil gráfico e os resultados do tratamento estatístico por ANOVA indicam que o complexo Zn₂(Diclof)₄(Nic)₂ não é foto ativável tal qual a nicotinamida, porém ocorre um aumento na variação das médias nas concentrações de 200 e 400 µg mL⁻¹ com aparente tendência de crescimento de FII e redução de FI, porém sem significância estatística para um intervalo de confiança de 95 %.

A Figura 73 apresenta as proporções médias entre as formas de DNA produzidos pela exposição complexo Zn₂(Ibup)₄(Nic)₂ com foto indução. Verifica-se que na condição de foto indução não ocorre a formação de quebras duplas em nenhuma das concentrações testadas, apenas com produção de quebras simples em proporções de 20 a 40% para todas as concentrações testadas. O tratamento estatístico intra experimental indica não haver diferença significativa entre a atividade do controle negativo (H₂O:DMF 80:20) e todas as concentrações seriadas de Zn₂(Ibup)₄(Nic)₂ em um intervalo de confiança de 95% para as formas de DNA I e II.

Figura 73. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo complexo 3 induzida por radiação UV. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.



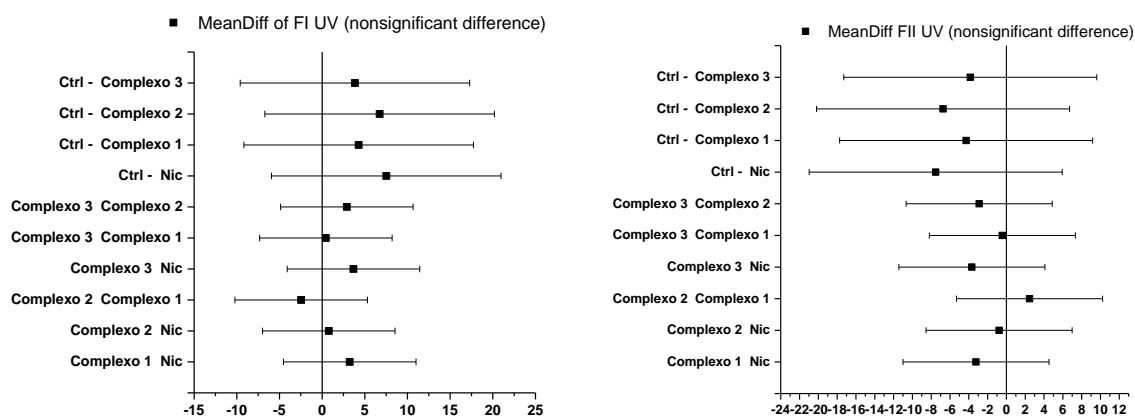
O perfil gráfico e os resultados do tratamento estatístico por ANOVA indicam que o complexo 3 também não é foto ativável e apresenta um perfil muito similar aos tratamentos realizados com a nicotinamida e o complexo 1.

1.16.10.1.1 *Análise estatística cruzada inter experimental para os experimentos com foto ativação*

Este estudo estatístico objetivou comparar as atividades dos complexos entre si para identificar possíveis diferenças de atividade. As médias experimentais obtidas para todas as concentrações e para os respectivos controles foram agrupadas por categorias (% de DNA FI,

FII) e submetidas à tratamento estatístico individual. Aplicou-se a ferramenta estatística ANOVA parametrizado, com comparações das médias por Teste de Tukey em nível de confiança de 95%, com verificação das igualdades de variância pelo teste de Levene em módulo no nível de confiança de 95%. Os resultados dos tratamentos estatísticos foram expostos graficamente na Figura 74. O parâmetro FIII não foi apresentado por ter relevância estatística nula pelo fato de todos os experimentos não apresentarem vestígios forma de DNA FIII e todas as médias serem iguais à zero.

Figura 74. Gráficos de ANOVA com aplicação do teste de Tukey para as médias inter-experimentais para cada tipo de forma de DNA produzido nos ensaios de foto ativação. Os gráficos são relativos às médias das formas de DNA I e II, respectivamente.

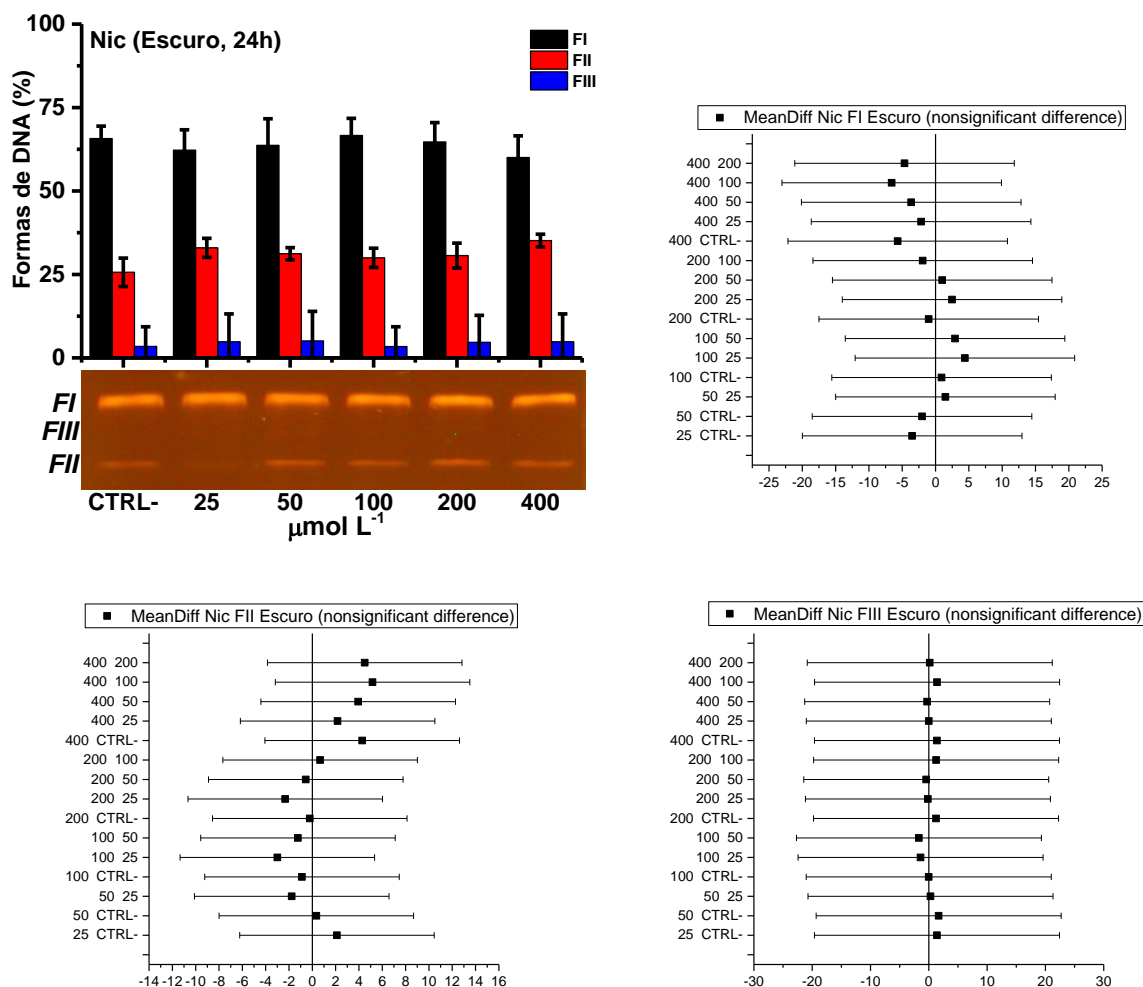


A análise estatística cruzada modulada nos parâmetros de FI, FII e FIII com teste de Tukey para um intervalo de confiança de 95% mostra que os todos complexos não diferem significativamente entre si em termos de atividade de indução de quebra de DNA plasmidial induzida por luz UV tampouco com o ligante Nic e com os controles negativos H₂O:DMF 80:20 para o intervalo de concentração do complexo de 0 à 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos indicam que a formação de DNA FII foi espontânea e que os complexos em estudo não são foto ativáveis, apesar da presença de sistemas com elétrons π conjugados nos anéis de piridina do ligante Nic e anéis benzênicos em Diclof e Ibup.

1.16.10.2 *Análise estatística para os experimentos de quebra de DNA plasmidial em ausência de luz*

Os resultados a seguir correspondem ao tratamento estatístico dos obtidos nos ensaios de indução de quebra de DNA *in vitro* em ausência de luz a 35 °C por 24 h. Este teste visa detectar fragmentação do DNA produzidas pelos complexos em condições de temperatura metabólica de mamíferos por exposição prolongada. As fragmentações tendem a ocorrerem por interação diretas como intercalações entre os pares de bases e induzindo as quebras. Avaliaram-se as proporções de DNA intacto (FI, superenovelado), quebras simples (FII, DNA circular) e quebras duplas (FIII, DNA linear).

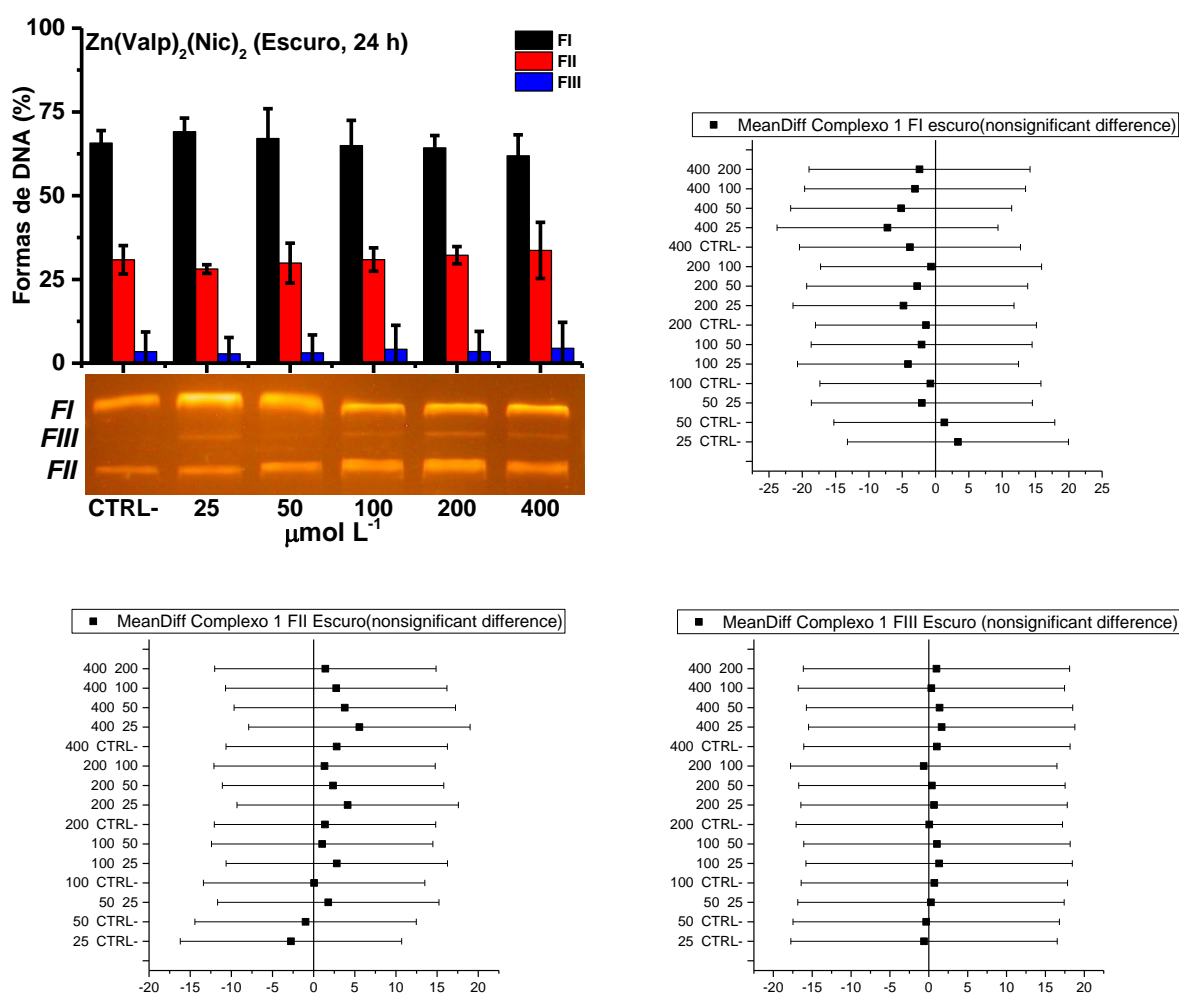
Figura 75. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo ligante Nic em ausência de luz. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.



A Figura 75 apresenta as proporções médias entre as formas de DNA produzidos pela exposição ao ligante Nic com exposição de 24 h à 35 °C. Verifica-se que este experimento induz à formação de quebras simples (FII) e quebras duplas (FIII) em todas as concentrações, incluindo o controle negativo. As quebras simples correspondem às proporções médias de 25 à 30% do total de DNA medido, enquanto as médias das quebras duplas variaram em um intervalo de 10 à 15%. O tratamento estatístico intra experimental indica não haver diferença significativa entre as proporções de quebras espontâneas do DNA (controle negativo H₂O:DMF 80:20) e as proporções de quebras nas concentrações seriadas de nicotinamida em um intervalo

de confiança de 95%. As análises indicam que a nicotinamida livre não é capaz de produzir lesões ao DNA com em temperatura metabólica de para um intervalo de 24 h.

Figura 76. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo o complexo $Zn(Valp)_2(Nic)_2$ em ausência de luz. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.

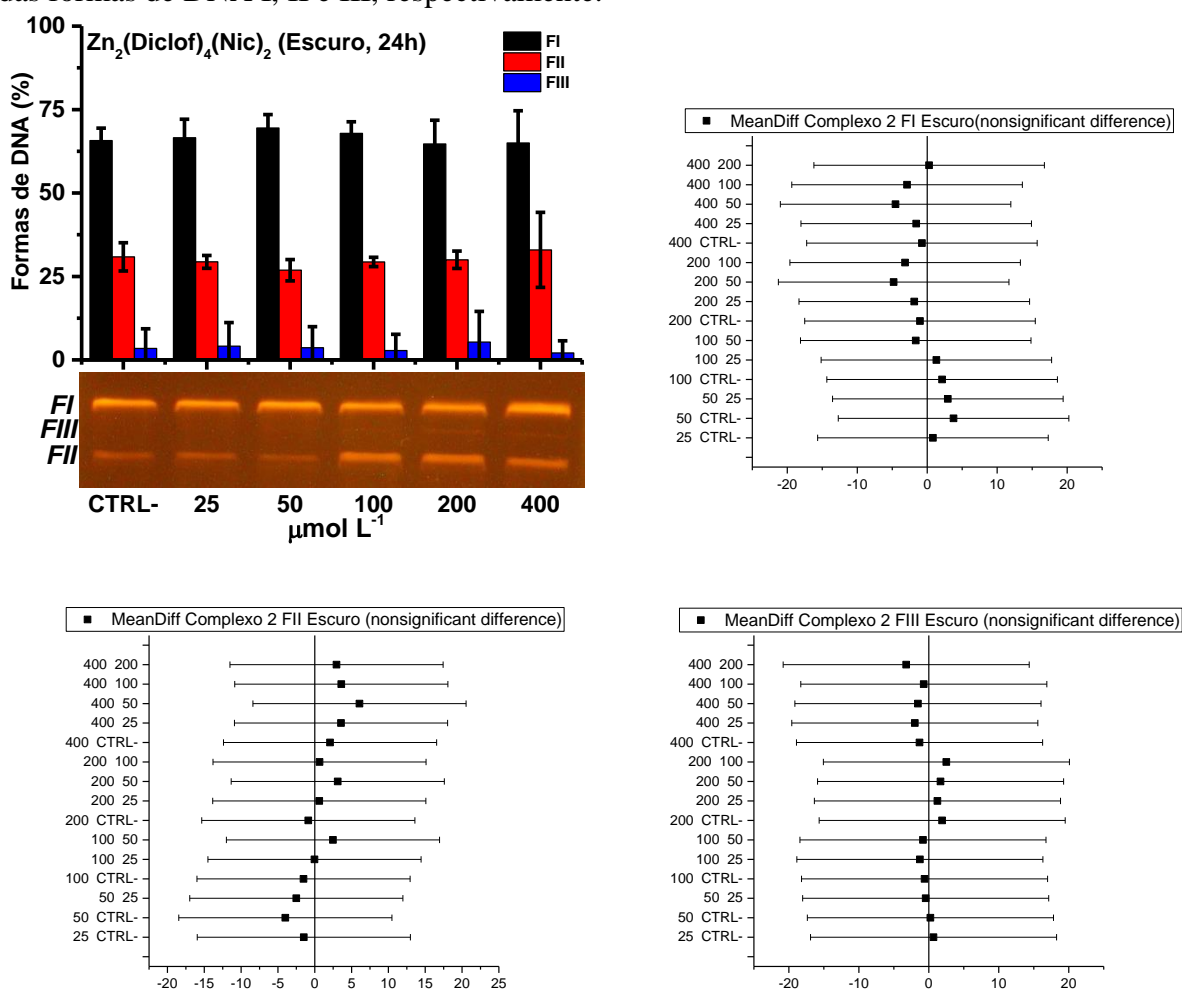


A Figura 76 apresenta as proporções médias entre as formas de DNA produzidos pela exposição complexo $Zn(Valp)_2(Nic)_2$ com aquecimento a 35 °C por 24 h. Verifica-se que esta condição induz a formação de quebras simples e quebras duplas em todas as concentrações testadas, com tendência de aumento da proporção de DNA FII a partir da concentração de 100 µg mL⁻¹, porém sem variação significativa intra experimental. As proporções de DNA FIII não

diferem significativamente na comparação cruzada entre as concentrações e o controle negativo.

Os resultados mostram uma correlação entre a redução da proporção de DNA FI e o acréscimo da concentração do complexo $Zn(Valp)_2(Nic)_2$ a partir de $100 \mu g mL^{-1}$. A redução da proporção de FI é traduzida em acréscimo de FII e indica uma habilidade do complexo em produzir quebras simples em concentrações mais elevadas do teste. Contudo, a literatura descreve a quebra simples como um dano que pode ser mitigado pelos mecanismos celulares de reparo de DNA (HREBACKOVA; HRABETA; ECKSCHLAGER, 2010).

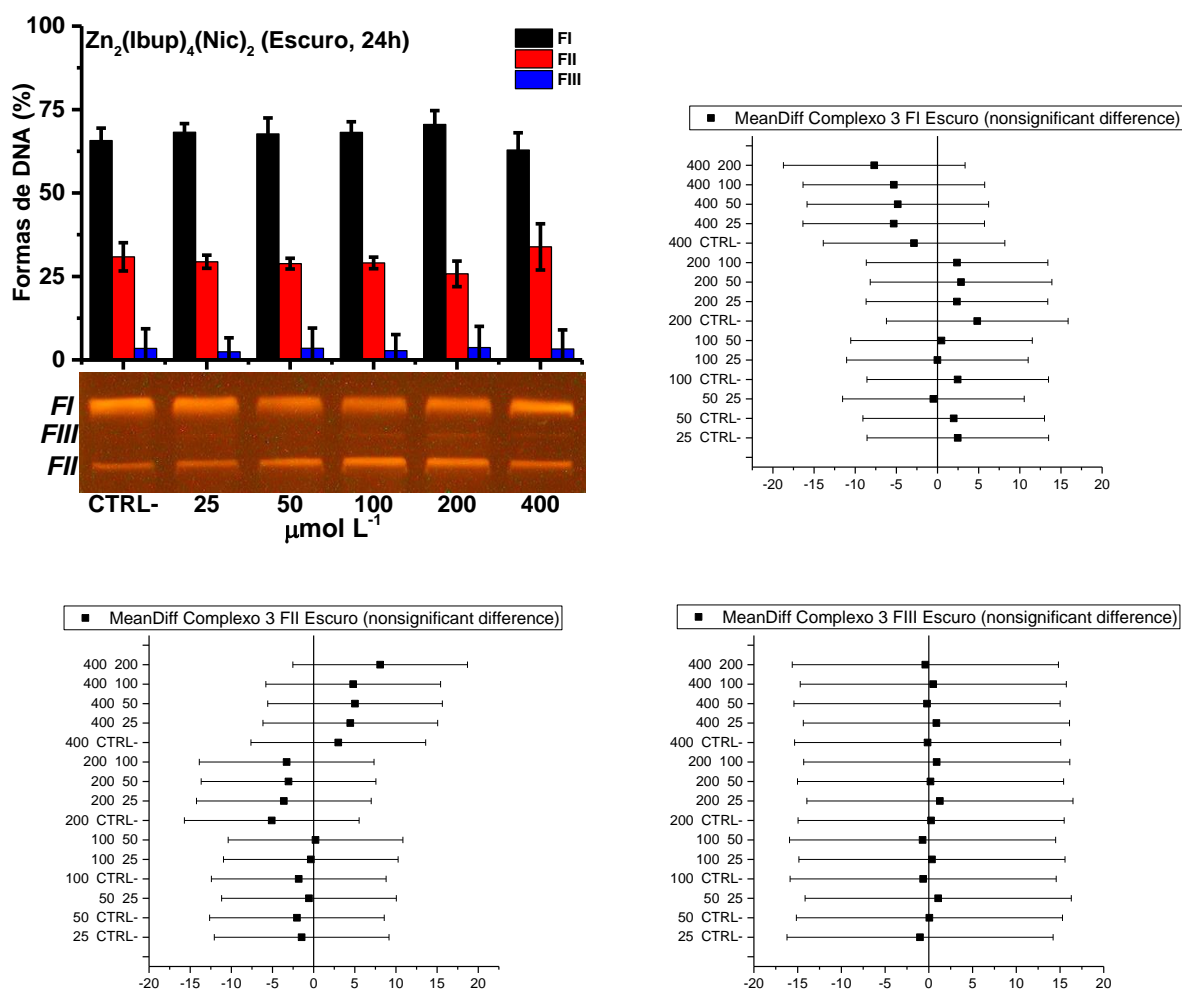
Figura 77. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo o complexo $Zn_2(Diclof)_4(Nic)_2$ em ausência de luz. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.



A Figura 77 apresenta as proporções médias entre as formas de DNA produzidos pela exposição ao complexo $Zn_2(Diclof)_4(Nic)_2$ à temperatura de 35 °C em ausência de luz. Verifica-se que nesta condição ocorrem a formação de DNA FII em todas as concentrações e no controle negativo em um intervalo médio de 25 a 30% do total. A análise estatística de ANOVA não mostra diferença significativa no teste cruzado para nenhuma das leituras médias, incluindo os controles para um intervalo de confiança de 95%. A proporção de DNA intacto (FI) mantém-se estável até a concentração de 100 $\mu g mL^{-1}$, com tendência de redução nas concentrações mais elevadas com similaridade ao perfil observado no experimento para o complexo $Zn(Valp)_2(Nic)_2$. As proporções médias de DNA FIII mantêm-se estáveis em um intervalo de 10 a 15% para todas as concentrações e o controle negativo sem diferença estatística cruzada para um intervalo de confiança de 95%.

A tendência de decréscimo de FI a partir da concentração de 100 $\mu g mL^{-1}$ traduz-se em tendência de aumento de FII sem alterar a proporção de FIII em relação ao controle negativo. Pode-se afirmar que o complexo $Zn_2(Diclof)_4(Nic)_2$ catalisa apenas as reações de quebras simples (FIII) em concentrações mais elevadas do teste após 24 h de exposição à 35 °C.

Figura 78. Gráficos de quebra de DNA plasmidial pelo o complexo $Zn_2(Ibup)_4(Nic)_2$ em ausência de luz. Abaixo estão os relatórios de ANOVA obtidos individualmente para as médias das formas de DNA I, II e III, respectivamente.

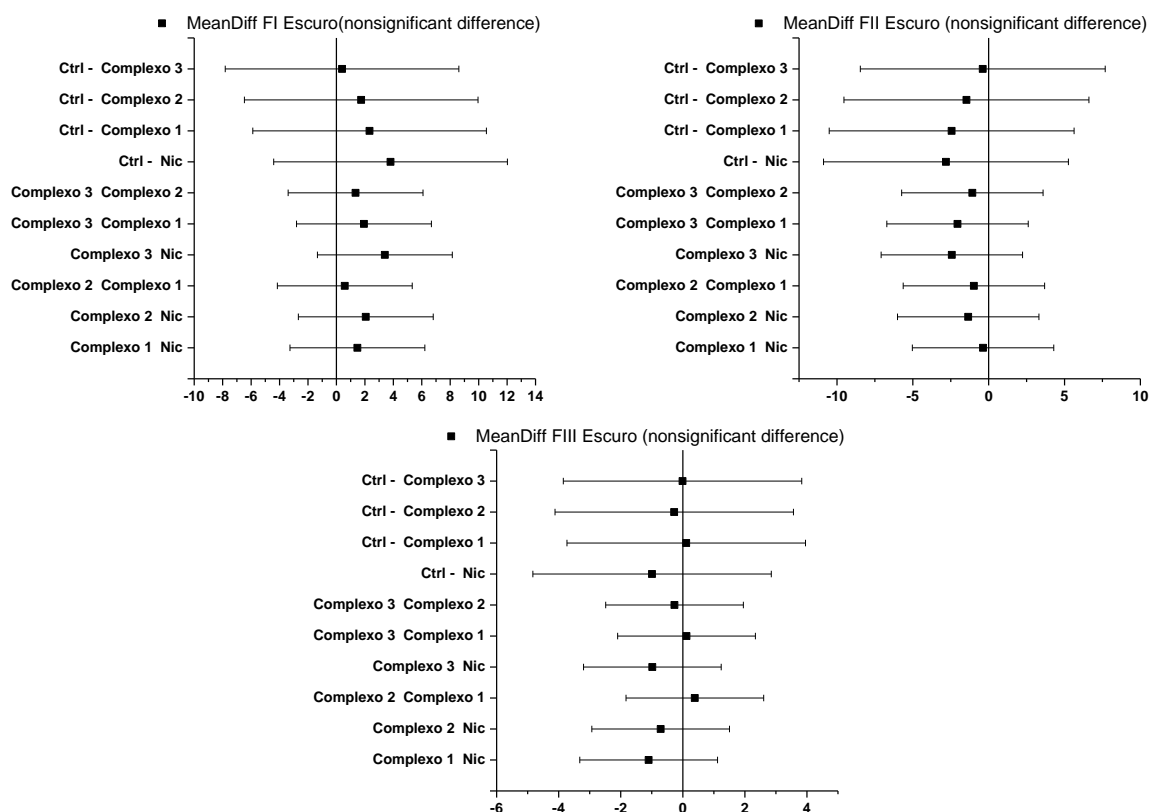


A Figura 78 apresenta as proporções médias entre as formas de DNA produzidos pela exposição ao complexo $Zn_2(Ibup)_4(Nic)_2$ à temperatura de 35 °C em ausência de luz. Os resultados apontam para uma inércia química do complexo frente ao DNA tal qual foi observado no experimento com indução luminosa. As análises estatísticas cruzadas não mostram diferença significativa para as proporções de DNA FI, FII e FIII para um intervalo de confiança de 95%. O experimento mostra que as fragmentações detectadas decorrem apenas da quebra espontânea do DNA exposto ao solvente e à temperatura.

1.16.10.2.1 Análise estatística cruzada inter experimental para os experimentos com ativação por radiação UV

Este estudo estatístico objetivou comparar as atividades dos complexos entre si para identificar possíveis diferenças. As médias experimentais obtidas para todas as concentrações e para o controle negativo foram agrupadas por categorias (% de DNA FI, FII e FIII) e submetidas à tratamento estatístico individual. Aplicou-se a ferramenta estatística ANOVA parametrizado, com comparações das médias por Teste de Tukey em nível de confiança de 95%, com verificação das igualdades de variância pelo teste de Levene em módulo no nível de confiança de 95%. Os resultados dos tratamentos estatísticos foram expostos graficamente na Figura 79.

Figura 79. Gráficos de ANOVA com aplicação do teste de Tukey para as médias inter-experimentais para cada tipo de forma de DNA produzido nos ensaios realizados em escuro. Os gráficos são relativos às médias das formas de DNA 1, 2 e 3, respectivamente.

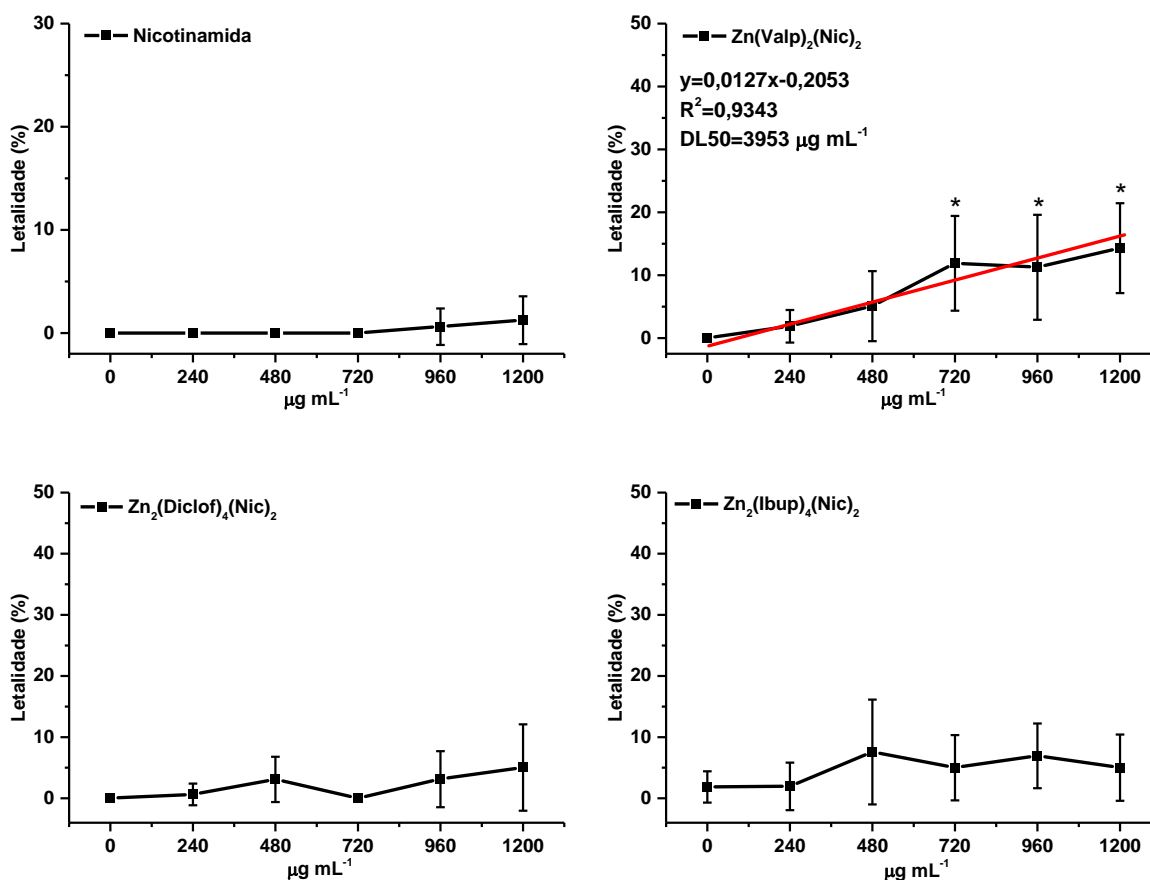


A análise estatística cruzada modulada nos parâmetros de FI, FII e FIII com teste de Tukey para um intervalo de confiança de 95% mostra que os todos complexos não diferem significativamente entre si em termos de atividade de indução de quebra de DNA plasmidial à temperatura metabólica (35 °C) por 24h, tampouco diferem significativamente do ligante Nic e com os controles negativos H₂O:DMF 80:20 para o intervalo de concentração do complexo de 0 à 400 µmol L⁻¹. Os resultados obtidos indicam que a formação de DNA FII e FIII foram espontâneas e que os complexos em estudo não mostram atividades perceptíveis por um período de exposição de 24 h.

1.16.11 Análise das atividades toxicológicas in vitro frente à A. salina

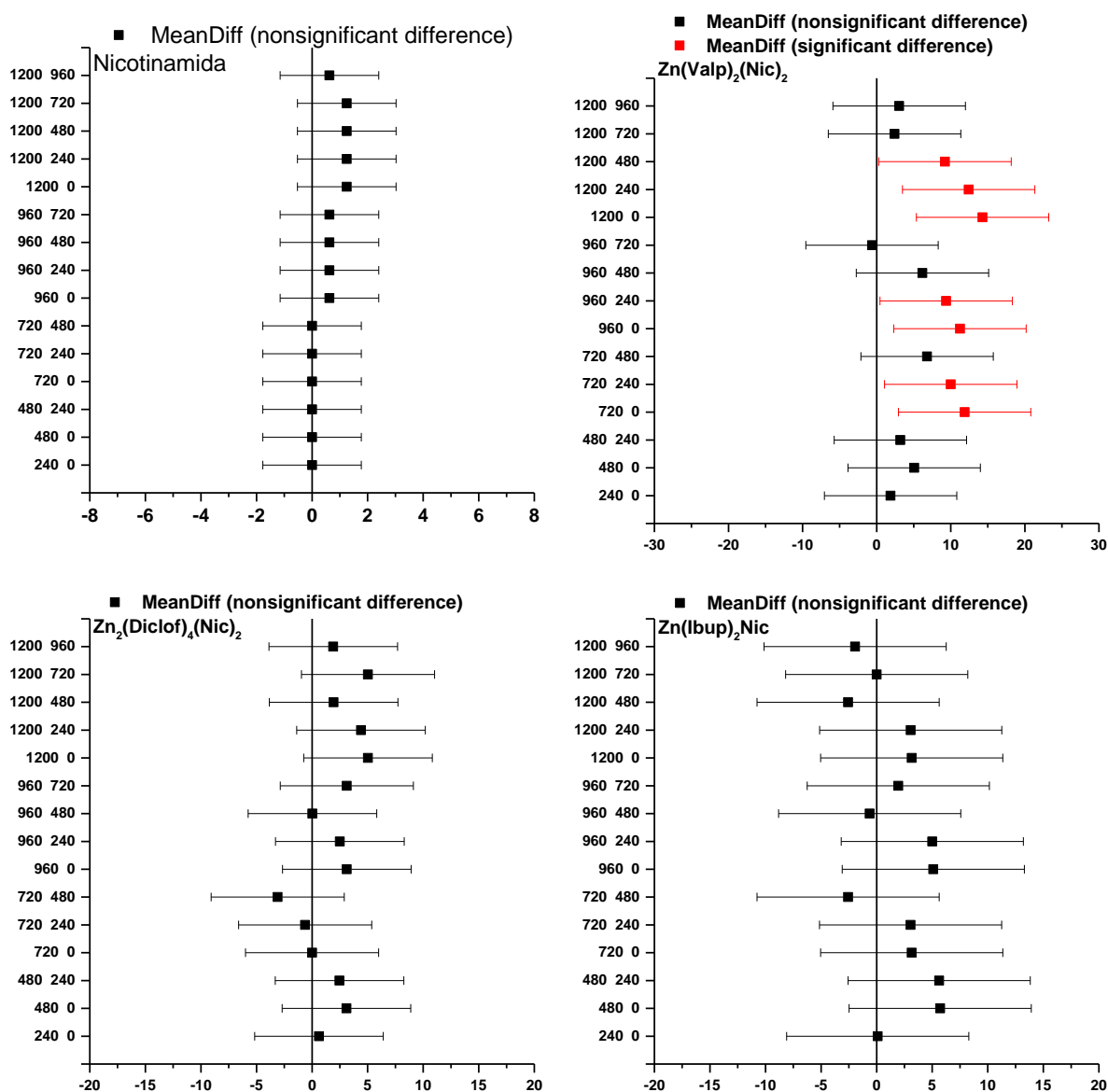
O experimento de toxicidade *in vitro* frente à *A. salina* foram executados de acordo a metodologia descrita por DOS SANTOS et al., 2015, no qual foram testados os complexos 1, 2 e 3 e o ligante Nic como controle. Testaram-se seis pontos de concentração, sendo cinco diluições seriadas e um controle negativo (0, 240, 480, 720, 960 e 1200 µg mL⁻¹) para volumes finais de 1,0 mL para uma população de 20 náuplios adultos. Cada concentração foi testada em quatro réplicas intra experimentais para dois ensaios separados. Os dados de letalidade média para 24 h de exposição (toxicidade aguda) foram plotados em gráficos de dispersão com a avaliação dos desvios padrão relativos e as curvas de tendência de mortalidade avaliadas por análise de regressão linear, de acordo com a descrição (Figura 80) de MEYER et al., 1982.

Figura 80. Gráficos de dispersão para determinação das doses letais para 50 % da população (DL50) para todos os complexos 1, 2 e 3 e o ligante Nic frente à *A. salina*. (*) Variação significativa em relação ao ponto 0 para $p \leq 0,05$.



Todos os experimentos foram tratados estatisticamente por análise de variância intra e inter-experimental para determinar a significância entre as médias. Aplicou-se a ferramenta estatística ANOVA com comparações das médias por Teste de Tukey em nível de confiança de 95%, com verificação das igualdade de variância pelo teste de Levene em módulo no nível de confiança de 95%. Os resultados dos tratamentos estatísticos foram expostos graficamente na Figura 81.

Figura 81. Relatórios das análises de variância ANOVA das médias intra-experimentais para as atividades citotóxicas dos complexos frente à *A. salina*. Utilizou-se o teste de Tukey com significância de 95%.

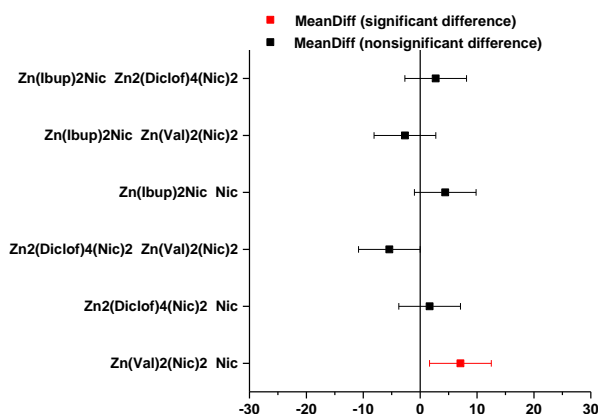


Os resultados para o complexo $\text{Zn}(\text{Valp})_2(\text{Nic})_2$ apresentaram diferenças significativas do controle negativo acima a partir da concentração $480 \mu\text{g mL}^{-1}$, além das concentrações variarem significativamente entre si com tendência linear de crescimento. A aplicação da análise de regressão linear mostra uma DL_{50} $3953 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a exposição aguda, sendo considerado pouco tóxico segundo a descrição de DOS SANTOS et al., 2015. Os resultados das análises estatísticas por ANOVA (Figura 81) indicam que as médias de letalidade confrontadas com as concentrações intra-experimentais para os complexos $\text{Zn}_2(\text{Diclof})_4(\text{Nic})_2$, $\text{Zn}(\text{Ibup})_2\text{Nic}$ e o

ligante Nic não apresentam variações significativas em relação ao controle negativo, portanto análises de regressão não são aplicáveis para estes casos.

A análise de variância ANOVA parametrizado inter-experimental das médias utilizando o teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% mostraram que existe diferença significativa de toxicidade apenas entre o complexo $\text{Zn}(\text{Valp})_2(\text{Nic})_2$ e a Nicotinamida, com q value de 5,16.

Figura 82. Análises de ANOVA inter experimentais para identificar as diferenças de toxicidade entre os complexos na concentração de $1200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cor vermelha significa variação significativa $P \leq 0,05$



O experimento de toxicidade aguda frente à *A. salina* indica que o complexo tem toxicidade similar à Nic, um composto considerado seguro por ser uma vitamina endógena essencial. Outros fatores que podem justificar a baixa toxicidade aguda dos complexos em estudo podem ser a massa molar superior à 500 g mol^{-1} . Existe a possibilidade de os complexos formarem dímeros e oligômeros em meio aquoso, que podem dificultar a absorção do complexo pelo animal pelo fato da absorção depender da transposição de membranas.

6. CONCLUSÕES

- Os fármacos Valproato, Diclofenaco e Ibuprofeno produziram complexos ternários de caráter molecular com Zn (II) de acordo com as descrições da literatura.
- A vitamina B3 coordena-se ao átomo de Zn (II) pela função piridina e proporciona polaridade, solubilidade e estabilidade química aos complexos com carboxilato.
- As metodologias de síntese provaram-se adequadas ao propósito, produzindo três complexos inéditos com pureza e rendimentos altos sem demandar processos de separação.
- As técnicas analíticas de FTIR, ^1H e ^{13}C RMN, ESI-TOF-MS-MS (+) e difração de raios X foram capazes de confirmar as estruturas químicas dos complexos de forma inequívoca.
- O teste de estabilidade em solução à 10 mmol L^{-1} por um período de 96 h mostrou que todo o complexo mantém a integridade estrutural em solução de solvente polar.
- O experimento avaliação das atividades redutoras frente ao radical ABTS^{•+} mostram que os complexos são inertes à espécies radicalares positivas.
- Os experimentos de interação com CT-DNA por espectroscopia CD mostraram que os três complexos reduzem os graus de helicidade e de empilhamentos dos pares de bases por interação de sulco, porém não comprometem a integridade química da hélice. Comprovou-se que a vitamina B3 livre não apresenta interações detectáveis com o DNA.
- Os experimentos de simulação de quebras simples e duplas de DNA plasmidial de *E. coli* com e sem foto-indução não produziram danos com significância estatística ao plasmídio, o que indica baixo potencial genotóxico para todos os casos.

- O teste de toxicidade aguda frente à *A. salina* mostrou que os três complexos em estudo não são tóxicos à organismos filtradores nas concentrações limites do teste, superiores à 0,1% m/v.
- Cabe concluir que a adição do Zn (II) e a vitamina B3 aos fármacos Valproato, Diclofenaco e Ibuprofeno é uma estratégia segura para elaboração de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

- ABU ALI, H. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of zinc(II) ibuprofen complexes with nitrogen-based ligands. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 69, n. 6, p. 1110–1122, 2016.
- ABU ALI, H.; JABALI, B. Synthesis, characterization and biological activity of novel complexes of zinc(II) diclofenac with nitrogen based ligands. **Polyhedron**, v. 107, p. 97–106, 2016.
- ABU, H.; DARAWSHEH, M. D.; RAPPOCCIOLO, E. Synthesis , crystal structure , spectroscopic and biological properties of mixed ligand complexes of zinc (II) valproate with 1 , 10-phenanthroline and 2-aminomethylpyridine. **Polyhedron**, v. 61, p. 235–241, 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria n.º 344, de 12 de maio de 1998. (*) -MODIFICADA PELA RESOLUÇÃO 33/2000. . 2000, p. 25.
- AL-MOGREN, M. M.; ALAGHAZ, A.-N. M. A.; EBRAHEM, E. A. Synthesis, spectroscopic, molecular orbital calculation, cytotoxic, molecular docking of DNA binding and DNA cleavage studies of transition metal complexes with N-benzylidene-N'-salicylidene-1,1-diaminopropane. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 114, p. 695–707, 2013.
- ALMAQWASHI, A. A. et al. Mechanisms of small molecule-DNA interactions probed by single-molecule force spectroscopy. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 9, p. 3971–3988, 2016.
- AMARANTE, C. B. DO et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431–434, 2011.
- ANVISA. **RDC n° 9, 20/02/2015D.O.U.**, 2015.
- ASFARAM, A.; GHAEDI, M.; DASHTIAN, K. Ultrasound assisted combined molecularly imprinted polymer for selective extraction of nicotinamide in human urine and milk samples:

Spectrophotometric determination and optimization study. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 640–650, 2017.

ATKINS, P. **Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5. ed. [s.l.] Bookman, 2012.

AYALA, J. D. **Química de coordenação: sais duplos e compostos de coordenação**, 2014. Disponível em: <<http://qui.ufmg.br/~ayala/matdidatico/coord.pdf>>

BARBOSA, A. C. **Quelato Complexos de Oxovanádio (IV): Potenciais Mimetizadores da Insulina**. [s.l.] UFSCAR, 2004.

BELENKY, P.; BOGAN, K. L.; BRENNER, C. NAD⁺metabolism in health and disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 12–19, 2007.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. **Circular Dichroism: Principles and Applications**New YorkWiley Press, , 2000.

BLENCOWE, D. K.; MORBY, A. P. Zn (II) metabolism in prokaryotes. **FEMS MICROBIOLOGY Reviews**, v. 27, p. 291–311, 2003.

BORTOLOTTI, T. et al. Photoinduced DNA cleavage promoted by two copper(II) complexes of tetracyclines and 1,10-phenanthroline. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 10519–10521, 2011.

BOULIKAS, T. Clinical overview on Lipoplatin TM: a successful liposomal formulation of cisplatin. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, n. 8, p. 1197–1218, 2009.

BROADHURST, C. L. et al. Characterization and Structure by NMR and FTIR Spectroscopy , and Molecular Modeling of Chromium (III) Picolinate and Nicotinate Complexes Utilized for Nutritional Supplementation. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 119–130, 1997.

BROWNE, R. A. Acute response versus reproductive performance in five strains of brine shrimp exposed to copper sulphate. **Marine Environmental Research**, v. 3, n. 1 980, p. 185–

193, 1979.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12th. ed. [s.l.] McGraw-Hill, 2011.

CHEN, C. S. et al. Metabolic stereoisomeric inversion of ibuprofen in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, v. 1078, n. 3, p. 411–417, 1991.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

DARAWSHEH, M. et al. New mixed ligand zinc(II) complexes based on the antiepileptic drug sodium valproate and bioactive nitrogen-donor ligands. Synthesis, structure and biological properties. **European journal of medicinal chemistry**, v. 82, p. 152–163, 23 jul. 2014.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. A intrigante bioquímica da niacina - Uma revisão crítica. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1739–1752, 2011.

DEAN, J. A. **Lange's Handbook of Chemistry**. 15. ed. [s.l.] McGraw-Hill, 1999.

DOS SANTOS, P. R. et al. Synthesis , structural characterization and previous cytotoxicity assay of Zn (II) complex containing 1 , 10-phenanthroline and 2 , 2 0 -bipyridine with valproic acid. **Polyhedron**, v. 90, p. 239–244, 2015.

DUBIEL, S. M. et al. Evaluation of the Debye temperature for iron cores in human liver ferritin and its pharmaceutical analogue, Ferrum Lek, using Mössbauer spectroscopy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 140, p. 89–93, nov. 2014.

EISI, H. et al. **Nomenclatura básica de química inorgânica: Adaptação simplificada, atualizada e comentada das regras da IUPAC para a língua portuguesa (Brasil)**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2014.

EL-MEGHARBEL, S. M.; HAMZA, R. Z.; REFAT, M. S. Synthesis, spectroscopic and thermal studies of Mg(II), Ca(II), Sr(II) and Ba(II) diclofenac sodium complexes as anti-inflammatory drug and their protective effects on renal functions impairment and oxidative

stress. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 135, p. 915–928, 2015.

F.M. AUSUBEL, R. BRENT, R.E. KINGSTON, D. D. M. **Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology**. 2. ed. [s.l: s.n.].

FARKAS, D.; HANSSON, Ö. Thioredoxin-mediated reduction of the photosystem I subunit PsaF and activation through oxidation by the interaction partner plastocyanin. **FEBS Letters**, v. 585, n. 12, p. 1753–1758, 2011.

FARRUGIA, L. J. *WinGX* suite for small-molecule single-crystal crystallography. **Journal of Applied Crystallography**, v. 32, n. 4, p. 837–838, 1999.

FROUDARAKIS, M. E. et al. Intrapleural administration of lipoplatin in an animal model. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 72, n. 1, p. 78–83, abr. 2011.

GARRET, A.; FITZGERALD, M. D.; CARLO PATRONO, M. D. The Coxibs, selective Inhibitors os Cyclooxygenase-2. **Drug Therapy**, v. 345, n. 6, p. 433–442, 2001.

GARRIDO, R. **Comissão de Nomenclatura e Tradução em RMN**, 2011.

GILL, C.; HIPPEL, P. H. VON. Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. **Analytical Biochemistry**, v. 182, p. 319–326, 1989.

HALLING-SORENSEN, B. et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals substance in the environment - A review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357–393, 1998.

HAMAMCI ALISIR, S. et al. Synthesis, characterization, photoluminescent properties and antimicrobial activities of two novel polymeric silver(I) complexes with diclofenac. **Journal of Molecular Structure**, v. 1130, p. 156–164, 2017.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

HAYNES, W. M.; LIDE, D. R.; BRUNO, T. J. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**.

97. ed. [s.l.] CRC PRESS, 2016.

HEGYI, J.; SCHWARTZ, R. A.; HEGYI, V. Pellagra : Dermatitis , dementia , and diarrhea.

International Journal of Dermatology, v. 43, p. 1–5, 2004.

HIJAZI, A. A.; DARAWSHEH, M. D.; RAPPOCCIOLO, E. Synthesis, crystal structure, spectroscopic and biological properties of mixed ligand complexes of zinc(II) valproate with 1,10-phenanthroline and 2-aminomethylpyridine. **Polyhedron**, v. 61, p. 235–241, set. 2013.

HREBACKOVA, J.; HRABETA, J.; ECKSCHLAGER, T. Valproic acid in the complex therapy of malignant tumors. **Curr Drug Targets**, v. 11, n. 3, p. 361–379, 2010.

IDA-ETO, M. et al. Prenatal exposure to organomercury, thimerosal, persistently impairs the serotonergic and dopaminergic systems in the rat brain: implications for association with developmental disorders. **Brain & development**, v. 35, n. 3, p. 261–4, mar. 2013.

İDE, S.; ATAÇ, A.; YURDAKUL, Ş. Spectroscopic and structural studies on dichlorobis(nicotinamide)zinc(II). **Journal of Molecular Structure**, v. 605, n. 1, p. 103–107, 2002.

JAUREGUI, J. I. et al. An aspartyl-carboxipeptidase is involved in the processing of pre-C sequence and C gene products and HBeAg secretion in human cells. **Journal of Hepatology**, v. 7, n. 1, p. 43, 1988.

JAYASEKARA, S.; DROWN, D. B.; SHARMA, R. P. Tolerance to cadmium and cadmium-binding ligands in Great Salt Lake brine shrimp (*Artemia salina*). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 11, n. 1, p. 23–30, fev. 1986.

JOHN DAVID LEE. **Química Inorgânica Não Tão Consisa**. 5^a ed. [s.l.] EDGARD BLÜCHER, 1999.

KALUĐEROVIĆ, G. N. et al. Metals in medicine. **Bioinorganic chemistry and applications**, v. 2012, p. 705907, jan. 2012.

KELLETT, A. et al. Radical-induced DNA damage by cytotoxic square-planar copper(II)

complexes incorporating o-phthalate and 1,10-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl. **Free radical biology & medicine**, v. 53, n. 3, p. 564–76, 1 ago. 2012.

KNIP, M. et al. Safety of high-dose nicotinamide: A review. **Diabetologia**, v. 43, n. 11, p. 1337–1345, 2000.

KOVALA-DEMERTZI, D. Metal ion–drug interactions. Preparation and properties of manganese (II), cobalt (II) and nickel (II) complexes of diclofenac.pdf. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 69, n. 4, p. 223–229, 1998.

KOVALA-DEMERTZI, D. Transition metal complexes of diclofenac with potentially interesting anti-inflammatory activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 79, n. 1–4, p. 153–157, 2000.

LOGARTO PARRA, A. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 8, n. 5, p. 395–400, set. 2001.

LONAPPAR, L. et al. Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. **Environment International**, v. 96, p. 127–138, 2016.

LORUSSO, D. et al. A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer. **Gynecologic oncology**, v. 133, n. 1, p. 117–23, abr. 2014.

MATSUMOTO, Y.; JASANOFF, A. Metalloprotein-based MRI probes. **FEBS letters**, v. 587, n. 8, p. 1021–9, 17 abr. 2013.

MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31–34, 1982.

MONNERET, C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. **Annales pharmaceutiques françaises**, v. 69, n. 6, p. 286–295, nov. 2011.

MORRIS, J. E. HYDRATION , ITS REVERSIBILITY , AND THE BEGINNING OF DEVELOPMENT IN THE BRINE SHRIMP , ARTEMIA SALINA. **Comp. Biochem. Physiology**, v. 39, p. 843–857, 1971.

MUJTABA, B. et al. Anaphylactic reaction to Tc-99m sestamibi (Cardiolite) during pharmacologic myocardial perfusion imaging. **Journal of nuclear cardiology: official publication of the American Society of Nuclear Cardiology**, v. 14, n. 2, p. 256–8, abr. 2007.

MÜLLER, U. **INORGANIC STRUCTURAL CHEMISTRY**. 2: [s.n.].

NÚÑEZ, C. et al. Synthesis, spectroscopic studies and in vitro antibacterial activity of Ibuprofen and its derived metal complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 45, p. 61–65, 2014.

PICH, C. T. et al. Mixed Ternary Mononuclear Copper(II) Complexes Based on Valproic Acid with 1,10-Phenanthroline and 2,2'-Bipyridine Ligands: DNA Interaction and Cytotoxicity in V79 Cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 3, p. 597–613, 2019.

RAINSFORD, K. D. **Ibuprofen: A critical Bibliographic review**. 1^a ed. Shelffield: Taylor & Francis Limited, 1999.

RE, R. et al. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231–1237, 1999.

ROLFE, H. M. A review of nicotinamide: Treatment of skin diseases and potential side effects. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 13, n. 4, p. 324–328, 2014.

RUFINO, M. DO S. M. et al. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Comunicado Técnico 128** Fortaleza Embrapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, , 2007. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.02.006>%5Cn<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643895800085>%5Cnhttp://www.cnpat.embrapa.br/download_publicacao.php?id=

209%0Ahttp://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9781107415324A009>

SANTOS, A. et al. Rubredoxin mutant A51C unfolding dynamics: a Förster Resonance Energy Transfer study. **Biophysical chemistry**, v. 148, n. 1–3, p. 131–7, maio 2010.

SHELDRICK, G. M. A short history of SHELX. **Acta Crystallographica Section A**, v. 64, n. 1, p. 112–122, 2007.

SHRIVER, D. **Química Inorgânica**. 4. ed. [s.l.] Bookman, 2008.

SILVA, P. P. et al. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: Cytotoxicity and DNA cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. II, p. 6414–6424, 2011.

SILVERSTEIN, R. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 6. ed. New York: [s.n.].

SINKO, P. **Martin; Físico-farmácia e Ciências Farmacêuticas**. 5. ed. [s.l.] Artmed, 2008.

SOKOLOVSKA, J. et al. P5 Enhanced expression of xanthine oxidase and NO synthases causing the overproduction of NO in kidneys of diabetic animals can be reduced by 1,4-dihydropyridines. In: **Nitric Oxide**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 31p. S15.

STILLEBROER, A. B. et al. Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: implications for prognosis, diagnosis, and therapy. **European urology**, v. 58, n. 1, p. 75–83, jul. 2010.

SWEETMAN, C. S.; BLAKE, P. S. **Martindale: The Complete Drug Reference**. 36th. ed. London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2009.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 100, n. 12, p. 1925–35, dez. 2006.

TRACY, S. T.; HALL, D. S. Metabolic Inversion of (R)-Ibuprofen: Epimerization and Hydrolysis of Ibuprofenyl-Coenzyme A. **Drug metabolism and Disposition**, v. 20, n. 2, p. 322–327, 1992.

USP 32. **US Pharmacopeia NF 32**. [s.l: s.n.].

USSERY, D. W. DNA Structure: A-, B- and Z-DNA Helix Families. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–7, 2002.

VASSILIEV, V.; HARRIS, Z. L.; ZATTA, P. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. **Brain research. Brain research reviews**, v. 49, n. 3, p. 633–40, nov. 2005.

VIETH, J. T.; LANE, D. R. Anemia. **Emergency medicine clinics of North America**, v. 32, n. 3, p. 613–628, ago. 2014.

WEED, R. I.; REED, C. F.; BERG, G. IS HEMOGLOBIN AN ESSENTIAL STRUCTURAL COMPONENT OF HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANES ?* This investigation of human red cell membranes was undertaken in order to determine whether the presence of hemoglobin in the membrane is essential for maintenance of the. **Journal of Clinical Investigation**, v. 42, n. 4, p. 581–588, 1963.

WICKRAMASINGHE, S. N. Morphology, biology and biochemistry of cobalamin- and folate-deficient bone marrow cells. **Baillière's clinical haematology**, v. 8, n. 3, p. 441–459, set. 1995.

WOODWARD, R. B. THE TOTAL SYNTHESIS OF CHLOROPHYLL *. **Tetrahedron**, v. 46, n. 22, p. 383–404, 1960.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Model List of Essential Medicines 19th List**, 2015.

Disponível

em:

<http://www.who.int/medicines/organization/par/edl/expcom13/eml13_en.pdf>

ZELEŇÁK, V.; VARGOVÁ, Z.; GYÖRYOVÁ, K. Correlation of infrared spectra of zinc(II) carboxylates with their structures. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, n. 2, p. 262–272, 2007a.

ZELEŇÁK, V.; VARGOVÁ, Z.; GYÖRYOVÁ, K. Correlation of infrared spectra of zinc(II) carboxylates with their structures. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, n. 2, p. 262–272, 2007b.

ZHANG, B.; LASH, T. D. Total synthesis of the porphyrin mineral abelsonite and related

petroporphyrins with five-membered exocyclic rings. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 39, p. 7253–7256, set. 2003.

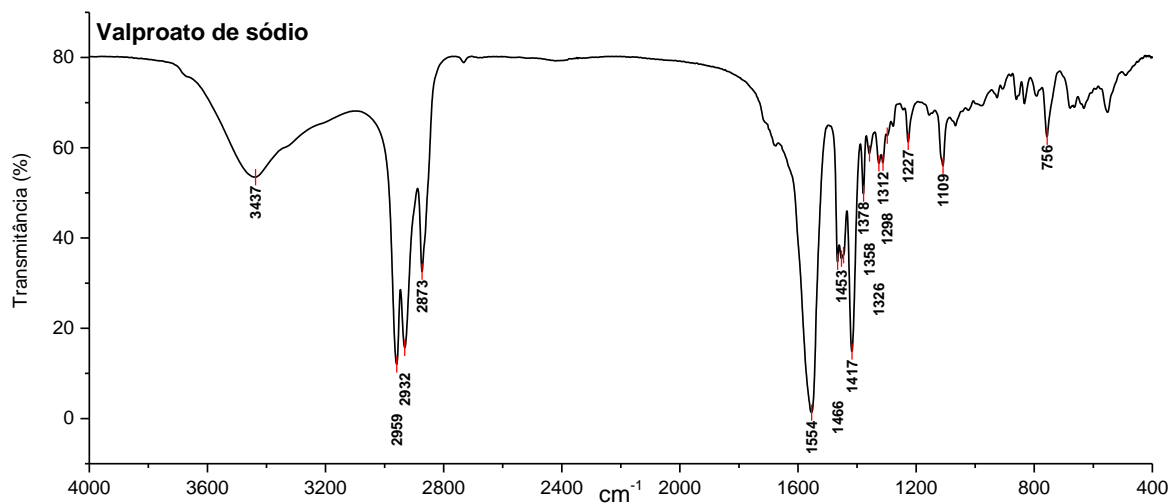
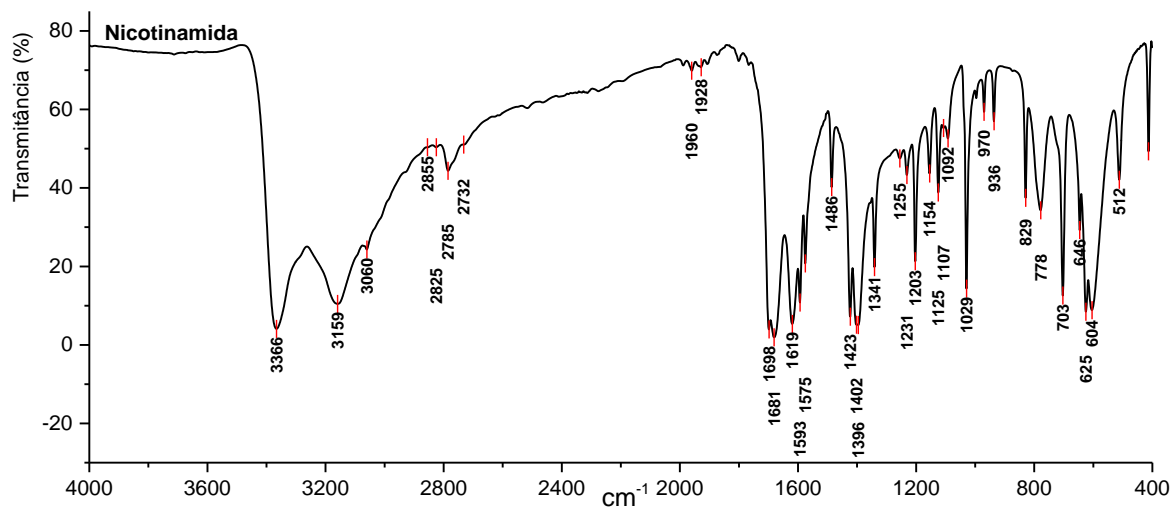
ZHANG, Y.; GEISSEN, S. U.; GAL, C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. **Chemosphere**, v. 73, n. 8, p. 1151–1161, 2008.

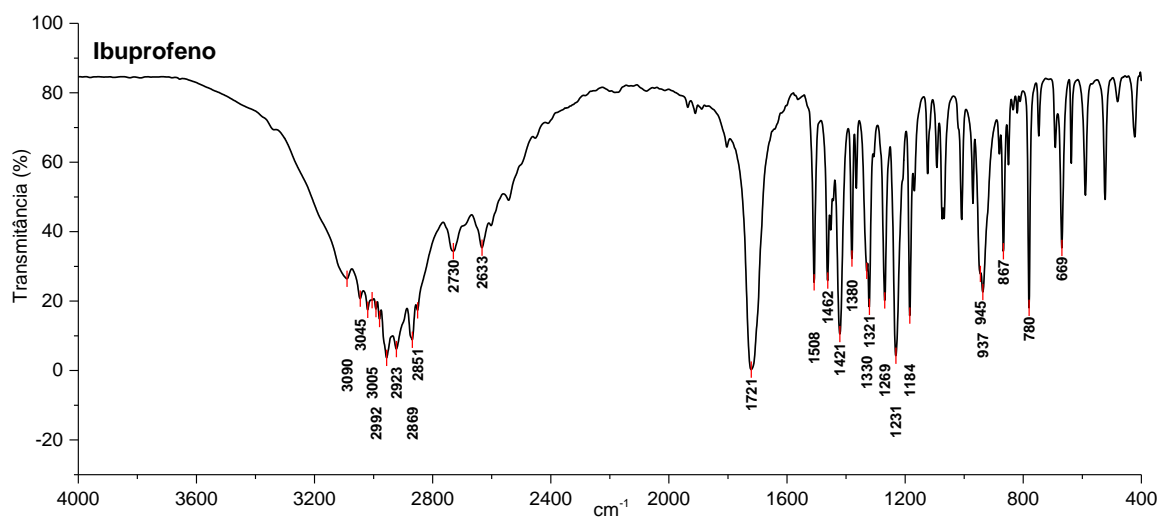
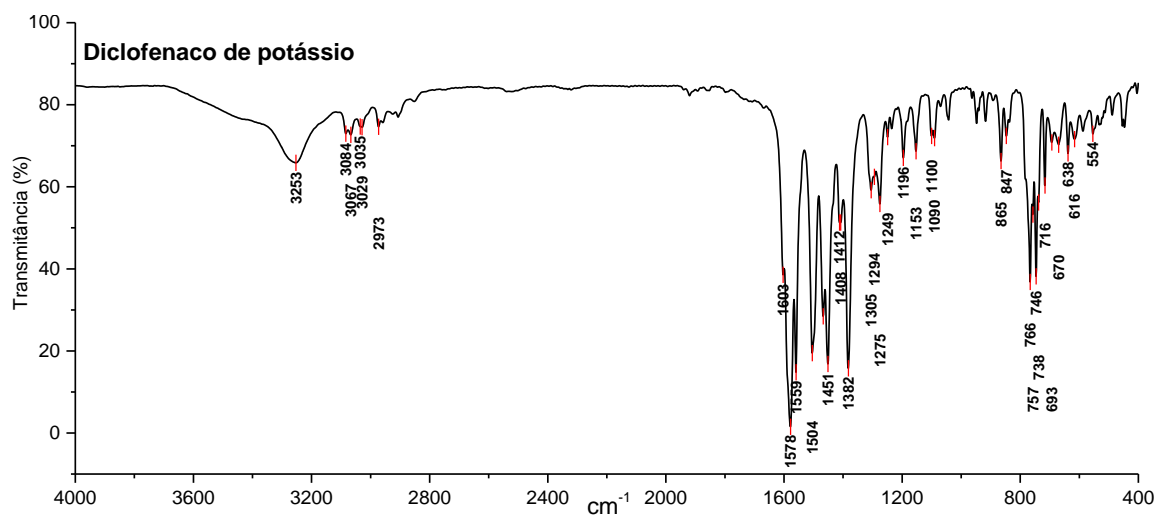
ZHOU, X. et al. Dopamine-containing gadolinium complex as magnetic resonance imaging contrast agent. **Journal of Rare Earths**, v. 30, n. 9, p. 884–889, set. 2012.

ZOLAL, A. et al. The effect of a gadolinium-based contrast agent on diffusion tensor imaging. **European journal of radiology**, v. 81, n. 8, p. 1877–82, ago. 2012.

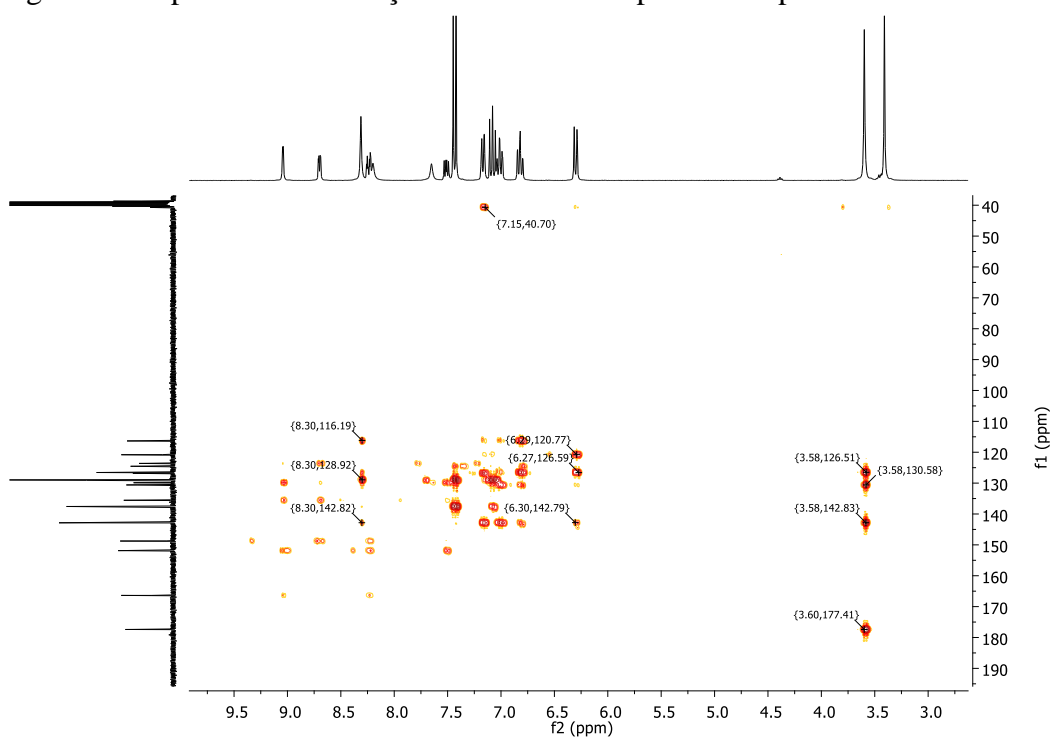
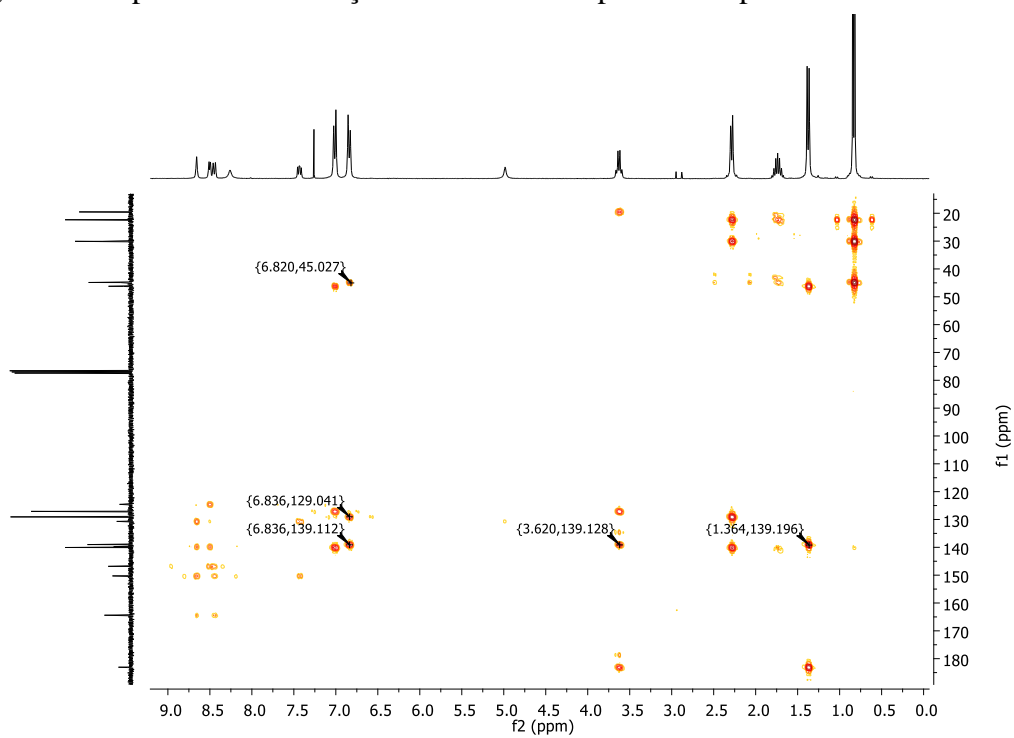
ANEXOS

Anexo A: Espectros de FTIR para os reagentes precursores





Anexo B: Espectros bidimensionais para os complexos 2 e 3

Figura 83. Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC para o complexo 2Figura 84. Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC para o complexo 3

Anexo C: Concessão de patente BR 102018009359-2 (íntegra)



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102018072486-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102018072486-0

(22) Data do Depósito: 31/10/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 19/03/2019

(51) Classificação Internacional: A61K 31/315; A61P 29/00.

(66) Prioridade Interna: BR102018009359-2 de 09/05/2018.

(54) Título: COMPOSTO COMPLEXO DE ZINCO COM DICLOFENACO E NICOTINAMIDA, PROCESSO DE PRODUÇÃO E USO DO MESMO

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 88648761000103. Endereço: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, Caxias do Sul, RS, BRASIL (BR), 95070-560, Brasileira

(72) Inventor: JOZI GODOY FIGUEIREDO; PAULO ROBERTO DOS SANTOS; LEANDRO TASSO; SIDNEI MOURA E SILVA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 31/10/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 26/05/2020

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



Relatório descritivo de patente de invenção

COMPOSTO COMPLEXO DE ZINCO COM DICLOFENACO E NICOTINAMIDA,
PROCESSO DE PRODUÇÃO E USO DO MESMO

Campo da invenção

[0001] A presente invenção descreve uma composição farmacêutica de um composto complexo organometálico para a preparação de medicamentos para o alívio da dor. A presente invenção atua nos campos de Química e Farmácia.

Antecedentes da invenção

[0002] A dor é reconhecida como um sintoma de alto custo em termos de sobrecarga humana e financeira. O manejo dos sintomas é o foco primário do cuidado. Atualmente sabe-se que a dor é reconhecida como uma das principais consequências relacionadas com as mais diversas patologias e suas repercussões são consideradas potencialmente prejudiciais para o organismo.

[0003] Apesar de ter sido considerada desde a antiguidade uma das grandes preocupações do ser humano, a dor é uma característica cardinal dos mecanismos protetores fisiológicos normais. Uma das funções é preservar o organismo, evitando o dano tecidual. O sistema nervoso informa sobre a ocorrência ou perigo de injúria, e a sensação de dor contribui para esta função, estando, portanto, relacionado às reações de fuga e esquiva. A dor pode ser classificada do ponto de vista temporal em dois grandes grupos: dor aguda (curta duração, com patologia identificável) e dor crônica (longa duração, com associação a uma patologia que pode não ser evidente).

[0004] Em se tratando da origem da estimulação do processo doloroso, podemos classificar a dor como nociceptiva (desencadeada pela estimulação dos nociceptores localizados em várias partes do organismo), neurogênica (dano tecidual neuronal nos sistemas nervoso periférico ou central), neuropática (disfunção de nervos) e psicogênica, que é a mais difícil de trabalhar, já que não se origina de uma fonte somática detectável, sendo

possivelmente desencadeada por fatores psicológicos.

[0005] Dor é uma sensação que compreende três mecanismos básicos: (i) transdução, que é a ativação dos nociceptores por transformação de um agente nóxico – mecânico, térmico e químico - em potencial de ação; (ii) transmissão, que é o conjunto de vias que permitem que o impulso nervoso, gerado ao nível de nociceptor, seja conduzido ao SNC; e (iii) modulação, vias responsáveis pela supressão da dor ativadas pelas próprias vias nociceptivas.

[0006] A transmissão da dor está associada à atividade elétrica nas fibras nervosas aferentes primárias, que possuem terminações livres no tecido periférico (pele, músculos, articulações, vísceras, conjuntivo dentre outros). As fibras nociceptivas aferentes são neurônios tipicamente pseudounipolares, com terminações periféricas e centrais. Neurotransmissores que são produzidos dentro do corpo celular (por exemplo, no gânglio da raiz dorsal) são liberados por terminações das fibras nervosas tanto periféricas quanto centrais. Dessa forma, estes neurotransmissores participam na produção do sinal doloroso periféricamente, bem como na promoção de eventos que levam as percepções centrais.

[0007] A opinião predominante atual é que as terminações nervosas livres das fibras A δ - β e fibras C constituem a região sensorial dos nociceptores. As fibras A δ são pouco mielinizadas e podem ser divididas em duas classes principais, que se diferenciam pela temperatura de ativação. As fibras A δ do tipo I são ativadas por temperaturas inferiores à 53 °C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas inferiores à 43 °C. A condução da informação nociceptiva que ocorre via fibras A δ é transmitida numa velocidade entre 12 e 30 m/s. As fibras C, também conhecidas como fibras polimodais, por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos, conduzem a uma velocidade muito mais lenta em relação às outras fibras nociceptivas, em torno de 0,5 a 2 m/s em virtude de não possuírem bainha de mielina. Elas correspondem a 80 % das fibras condutoras da informação nociceptiva. Também existem diferenças quanto ao tipo de estímulo nociceptivo capaz de

ativar essas fibras. Estas fibras aferentes fazem sinapse em um neurônio de segunda ordem na camada superficial da medula espinhal. O neurônio de segunda ordem cruza a medula espinhal até o lado contralateral e ascende pelo trato espinotalâmico até alcançar o tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem são ativados, levando a informação do estímulo doloroso até o córtex somatossensorial, onde ocorre a percepção da dor.

[0008] Quando se trata de fármacos para o tratamento da dor, abre-se uma lacuna no que diz respeito ao regime medicamentoso que pode ser estabelecido, tendo em vista que ainda não dispomos de um fármaco analgésico ideal, ou seja, que não promovam efeitos colaterais potenciais. Embora sejam altamente eficazes, os analgésicos de ação central geralmente não estão dissociados de efeitos adversos importantes, como náuseas, vômitos, depressão respiratória e sedação, entre outros menos comuns. Em contrapartida, os analgésicos de ação periférica também apresentam efeitos indesejáveis, tais como lesões do trato gastrointestinal e renal. Assim, torna-se evidente a necessidade de buscar medidas alternativas para o desenvolvimento de medicamentos para o combate da dor.

[0009] O desenvolvimento de um medicamento novo demanda aproximadamente 15 anos e envolve investimentos na ordem de um bilhão de dólares. A principal razão que contribui para o alto custo está no fato de que a maioria das moléculas candidatas a fármacos são descartadas durante as fases de testes I e II em razão da toxicidade. Estatísticas mostram que apenas 0,1% das moléculas sintetizadas ou obtidas de fontes naturais testadas possuem potencial para se tornar um fármaco comercial. Para tanto, a estratégia mais sensata e econômica para se obter novos fármacos consiste em modificar quimicamente moléculas de fármacos conhecidos e testá-las para os mesmos moldes da molécula de partida. Em muitos casos se obtém melhoramentos significativos na eficácia terapêutica.

[0010] Na literatura, diversas formas de executar tais modificações são descritas, mas dentre elas, destaca-se o bioisosterismo, que pressupõe que a

atividade farmacológica se dá por similaridade dos grupos farmacofóricos e/ou da estrutura molecular para um alvo terapêutico específico. A viabilidade de tal estratégia se justifica pelo aumento da chance de sucesso de descobrir um novo fármaco a partir de uma amostragem menor de compostos sintetizados em moldes similares à rota de obtenção do fármaco modelo.

[0011] Uma outra abordagem no desenvolvimento de novos fármacos é conhecida como hibridação molecular (HM). Baseia-se na conjugação de estruturas de compostos bioativos distintos em uma única molécula por meio de ligação química, sendo uma alternativa eficaz de no planejamento de fármacos, tal qual o bioisosterismo. Segundo a literatura, a HM pode basear-se na ligação direta de moléculas distintas (HM droga-droga) ou por grupos farmacofóricos distintos, uma classe denominada HM farmacofórica. Em ambos os casos uma a nova molécula produzida por HM passa a se chamar de híbrido, o qual pode apresentar maior afinidade e eficácia que os compostos que lhe deram origem, produzindo efeito farmacológico concomitante.

[0012] Devido a esses fatos, se faz interessante o desenvolvimento de um novo composto que apresente atividade antinociceptiva e possa ser empregado como um analgésico em humanos.

[0013] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0014] Apesar dos avanços na farmacocinética e na farmacodinâmica dos agentes antiálgicos, sua toxicidade reconhecidamente elevada é determinante de resultados clínicos conflitantes em função da necessidade de associações e interações medicamentosas, no entanto no mercado ainda não são tão abrangentes os fármacos para analgesia.

[0015] Com o conhecimento das propriedades farmacológicas dos analgésicos administrados por diferentes vias, tornou-se possível melhorar o tratamento da dor, reduzindo as complicações decorrentes de diversas síndromes dolorosas.

A morfina é um opioide hidrofílico que promove analgesia intensa e de longa duração, sem provocar bloqueios simpáticos. Entretanto, apresenta dispersão cranial, podendo provocar efeitos colaterais como prurido, náusea, vômito, insuficiência respiratória, diminuição da motilidade intestinal e mobilidade entre outros efeitos colaterais.

Sumário da invenção

[0016] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir do desenvolvimento de complexos ternários de zinco com diclofenaco e nicotinamida, o seu processo de obtenção, a sua aplicação na forma isolada ou em uma mistura medicamentosa para o uso humano e/ou veterinário na preparação de medicamentos para o alívio da dor. O composto da presente invenção propicia uma alternativa ao uso de analgésicos.

[0017] Embora exista no mercado composições farmacêuticas para o tratamento de processos inflamatórios e a sensação de dor, bem como seus processos de obtenção, nenhuma destas propõe moléculas organometálicas ternárias com zinco, diclofenaco e ligantes nitrogenados (ex. vitamina B₃) – Nicotinamida - como um potencial fármaco com atividade antinociceptiva.

[0018] É um objeto da presente invenção o composto complexo bis[bis[2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato] [nicotinamida] zinco(II)] e o composto intermediário bis[2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato] zinco (II).

[0019] O mecanismo de ação do complexo tende a funcionar pelo mesmo mecanismo do fármaco diclofenaco pela inibição inespecífica das enzimas ciclooxigenases (COXs), produtoras de moléculas mediadoras de processos inflamatórios (prostaglandinas) responsáveis pela sensação de dor. Além disso, o ligante nitrogenado nicotinamida é reportado como um agente endógeno com atividade anti-inflamatória e antioxidante, porém por outros mecanismos.

[0020] É um outro objeto da presente invenção o processo de produção do composto complexo e do seu sal intermediário.

[0021] A presente invenção também apresenta o processo de síntese,

obtenção e análise de complexos de zinco com diclofenaco e nicotinamida compreendida em duas etapas de síntese:

a) Obtenção de um sal intermediário de zinco e diclofenaco (complexo binário) a partir de uma reação química de dupla troca entre dois sais em solução: Sal inorgânico de zinco (II) + sal alcalino de diclofenaco. O produto intermediário de baixa solubilidade em solução é removido por filtração e secagem.

b) Obtenção do complexo ternário a partir de uma reação química de complexação (adição) do ligante nitrogenado nicotinamida ao complexo binário em solução seguido por um processo de cristalização e obtenção do produto por filtração e secagem.

[0022] É um objeto da presente invenção o uso do complexo para preparar um medicamento para tratar processos inflamatórios ou alívio da dor ou uma combinação destes em formulações farmacêuticas e/ou veterinárias.

[0023] Os complexos de zinco, diclofenaco e nicotinamida podem ser usados como componentes ativos de formas farmacêuticas destinadas ao tratamento de quadros clínicos de dor.

[0024] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados se refere aos complexos ternários de zinco com diclofenaco e nicotinamida, o seu processo de obtenção, aplicação na forma isolada ou em mistura medicamentosa para o seu uso em humanos e/ou veterinário na preparação de medicamentos para o alívio da dor.

Em experimentos realizados pelos inventores, o composto da presente invenção apresentou analgesia semelhante à morfina, porém no tangente da motilidade intestinal e mobilidade, apresentou-se de forma satisfatória não causando efeitos colaterais que fármacos derivados de opioides apresentam.

[0025] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0026] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras.

[0027] A figura 1 mostra o esquema de síntese do complexo ternário de zinco em bis[bis[2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato] [nicotinamida] zinco(II) em duas etapas. No passo 1, ocorre a produção de um sal binário intermediário e, no passo 2, a produção de um complexo ternário com nicotinamida ou ácido nicotínico.

[0028] A figura 2 mostra o resultado in vivo da aplicação do complexo ternário de zinco em um modelo antinociceptivo frente ao controle positivo (cloridrato de morfina). Composto bis[bis[2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato] [nicotinamida] zinco(II) apresenta atividade antinociceptiva em modelo de contorções induzidas por ácido acético em camundongos.

Descrição Detalhada da Invenção

[0029] A presente invenção descreve o complexo ternário de zinco com diclofenaco e nicotinamida, o seu processo de obtenção, aplicação na forma isolada ou em uma mistura medicamentosa para o uso humano e/ou veterinário na preparação de medicamentos para o alívio da dor.

[0030] É um objeto da presente invenção o composto complexo bis[bis[2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato] [nicotinamida] zinco(II)] e o composto intermediário bis[2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato] zinco (II).

[0031] É um outro objeto da presente invenção, um processo de produção do composto intermediário a partir do preparo de uma solução contendo um sal orgânico do fármaco diclofenaco em uma faixa de temperatura de 0 à 200° C, combinada com uma solução de sal contendo zinco (II).

[0032] Em uma concretização, a presente invenção descreve o processo de produção do composto intermediário, sendo esse composto preparado a partir de 0,668 g de diclofenaco de potássio (2 mmol) que é solubilizado em 30 mL de água purificada (grau Milli-Q) à 20 °C, acondicionada em frasco erlenmeyer de 250 mL de capacidade; seguida da preparação de uma segunda solução de

sulfato de zinco heptahidratado (0,287 g, 1 mmol) preparada em 10 mL de água grau milli-Q à 20 °C que foi vertida lentamente sobre a solução de diclofenaco de potássio e mantida sob agitação constante por 12 horas. Por fim, o produto sólido obtido em suspensão é separado por filtração em papel filtro, lavado com excesso de água Milli-Q e seco em liofilizador por 12 horas.

[0033] É um outro objeto da presente invenção, um processo de produção do complexo, em que o complexo é preparado a partir de mistura sólida ou líquida do composto intermediário 1 com nicotinamida.

[0034] Em uma concretização, a presente invenção descreve o processo de produção do complexo ternário de zinco com diclofenaco e nicotinamida, sendo esse preparado a partir de 0,655 g (1 mmol) do composto intermediário, sal binário $Zn(diclof)_2$, que é solubilizado em 20 mL de etanol absoluto à temperatura ambiente (20° C) em frasco erlenmeyer de 125 mL de capacidade; seguida do preparo de uma segunda solução com 0,244 g (2 mmol) de nicotinamida em 10 mL de etanol absoluto preparada à 20 °C que é vertida lentamente sobre a solução do composto intermediário sob agitação constante. Por fim, a mistura é agitada por 30 minutos e armazenada por 12 horas, sendo o produto sólido cristalizado separado por centrifugação, seguida por filtração em papel filtro e secagem em liofilizador por 12 horas.

[0035] É um outro objeto da presente invenção o uso do complexo ternário de zinco com diclofenaco e nicotinamida para preparar um medicamento em que a composição consiste do complexo como composto ativo e um excipiente farmacologicamente aceitável.

[0036] É um outro objeto da invenção a administração do complexo pelas vias tópica, oral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, transdérmica ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados.

[0037] É um objeto da presente invenção o uso do complexo para preparar um medicamento para tratar processos inflamatórios ou alívio da dor ou uma combinação destes em formulações farmacêuticas e/ou veterinárias.

[0038] A síntese do complexo ternário foi realizada em escala de bancada (5

mmol) utilizando materiais de partida com pureza certificada. Os sais inorgânicos de zinco (II) têm grau de pureza P.A. ACS ISO, sais alcalinos do diclofenaco têm grau de pureza padrão US Pharmacopeia, água grau Milli-Q e solventes orgânicos grau HPLC.

[0039] A obtenção do produto final envolve ao menos uma etapa de cristalização, filtração e secagem.

[0040] A composição farmacêutica pode apresentar-se nas formas farmacêuticas e dosagens galênicas líquidas, semi-sólidas e sólidas tais como soluções, suspensões, xaropes, injetáveis, pomadas, cremes, emulsões, aerossol, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos e/ou drágeas, todas as quais contendo preparações originárias do complexo de zinco, diclofenaco e nicotinamida.

[0041] O excipiente farmacêuticamente aceitável da composição farmacêutica pode ser água, solução salina, soluções tamponadas, solução de Ringer, solução de dextrose, solução de Hank, soluções salinas biocompatíveis contendo ou não polietilenoglicol, óleo de sésamo, oleato de etila, ou triglicerídeo, podendo ser preparadas composições com um excipiente ou uma mistura destes quando a composição apresentar-se na forma líquida.

[0042] O excipiente farmacêuticamente aceitável da composição farmacêutica pode ser dextrose, conservantes, aglutinantes, desintegrantes, diluentes, lubrificantes, tensoativos ou combinações dos mesmos quando a composição apresentar-se na forma sólida.

[0043] A composição farmacêutica ou veterinária apresenta atividade antinociceptiva.

[0044] Os compostos alvo desta invenção são compostos de coordenação, moléculas com função química mista, as quais consistem de moléculas orgânicas ligadas com um íon metálico em um arranjo geométrico conhecido como esfera de coordenação. Os sistemas biológicos utilizam complexos organometálicos como cofatores enzimáticos, em sítios ativos de enzimas e nas metaloproteínas. Moléculas com função biológica específica como as

hemoglobinas e as clorofilas possuem átomos metálicos (Fe II e Mg II, respectivamente) coordenados em anéis de porfirina responsáveis pela coordenação de O₂ e CO₂ nos processos da respiração e da fotossíntese.

[0045] A síntese de compostos de coordenação derivados de fármacos e metais de transição é uma abordagem química para a obtenção de novas moléculas candidatas a fármacos. No contexto histórico, a cisplatina (Cloreto de cis-diaminoplatina II) foi a primeira molécula puramente inorgânica a ser utilizada como fármaco no tratamento do câncer. Hoje, é um medicamento oncológico de primeira linha para o tratamento de câncer de ovário e esôfago. Seu mecanismo de ação ocorre por intercalação à α -hélice do DNA por complexação, geralmente às bases de guanina, induzindo às quebras duplas de cadeia e consequente apoptose das células. Após o advento da cisplatina, em 1978, muitas pesquisas foram desenvolvidas com o intuito de obter novos complexos análogos à cisplatina para o tratamento de outros tipos de câncer.

[0046] O zinco é um elemento dietético essencial para os animais. A concentração média de zinco em humanos adultos é de 32,86 mg Kg⁻¹, colocando-o como o segundo metal de transição mais abundante, inferior apenas ao ferro, que representa 60 mg Kg⁻¹. Após o cobre, o Zn²⁺ é o ácido de Lewis intracelular mais forte, coordenando-se principalmente a grupos tióis de cisteína e resíduos nitrogenados de imidazol em proteínas. O Zn²⁺ é um dos íons mais importantes para os sistemas biológicos, sendo essencial para a atividade de mais de 300 enzimas presentes em mais de 50 reações celulares. As anidrases carbônicas são metaloenzimas de zinco presentes nos músculos, sangue, fígado, rins e secreções dos mamíferos. A função básica deste grupo de enzimas é regular a concentração de prótons (acidez) do citosol, mitocôndrias, membranas celulares e fluidos pela captura de prótons via reação de equilíbrio ácido-base. Neste contexto, o Zn²⁺ é apresentado como um íon metálico com características ótimas para a síntese de compostos de coordenação derivados de fármacos.

[0047] Os fármacos anti-inflamatórios não-esteroides compreendem a classe

terapêutica mais produzida e consumida da história. Destacam-se os fármacos inibidores inespecíficos das ciclooxigenases (COXs) ácido acetilsalicílico (AAS), paracetamol, diclofenaco e ibuprofeno. Diclofenaco e ibuprofeno são administrados como analgésicos para remediação de processos inflamatórios causados por lesões, artrites, reumatismos, entre outros. Estes fármacos atuam através da inibição competitiva das enzimas ciclooxigenases, as quais convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas e outros mediadores químicos responsáveis pelos processos inflamatórios diversos e são causadores de quadros clínicos como dor e edema. Diclofenaco e ibuprofeno apresentam o grupo carboxilato como função química e grupo farmacofórico principal. Este grupo químico atua como uma base de Lewis forte frente a íons metálicos divalentes, como o Zn^{2+} e o Ca^{2+} por ligações de valência e de coordenação para formar sais complexos pouco dissociáveis em solução.

[0048] A configuração eletrônica do Zn^{2+} ligado a dois grupos carboxilato do fármaco possibilita ainda a coordenação de duas bases de Lewis neutras para formar uma esfera de coordenação de geometria octaédrica estável. Moléculas com átomos eletronegativos em hibridização sp_2 , como o N de piridinas e derivados coordenam de forma estável ao centro metálico e compõem complexos moleculares com características físico-químicas diferenciadas dos compostos de partida. Os derivados da piridina nicotinamina – Nic – e o ácido nicotínico – Nia – (complexo vitamínico B_3) são importantes ligantes nitrogenados biológicos presentes no metabolismo dos mamíferos em geral. Compreendem o principal intermediário da biossíntese do sistema redox NAD^+ - $NADH$ além de apresentar um número expressivo de funções intra e extracelulares como sequestro de radicais livres, inibição de processos inflamatórios, modulação enzimática (óxido nítrico sintase), entre outras. Estes derivados piridínicos apresentam características ideais para a produção de complexos ternários de Zn^{2+} com o diclofenaco com a vantagem de serem moléculas endógenas e com função comprovada.

[0049] A utilização de modelos animais adequados que reproduzam os

mecanismos que ocorrem durante o processo nociceptivo e as alterações observadas durante patologias como dores inflamatórias induzidas por agentes externos, por agentes térmicos e a associação da análise comportamental com a modulação farmacológica pode vir a contribuir substancialmente para o esclarecimento dos mediadores envolvidos nestes processos, dando uma ênfase especial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas através do estudo de moléculas de coordenação conjugadas com fármacos e/ou compostos químicos de eficácia já comprovada na literatura.

Exemplos - Concretizações

[0050] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo 1: Síntese do complexo ternário de zinco, diclofenaco e nicotinamida, realizada em dois passos reacionais.

[0051] Passo1: Obtenção do sal binário diclofenaco de zinco (II) – $Zn(diclof)_2$. Um total de 0,668 g de diclofenaco de potássio (2 mmol) foi solubilizado em 30 mL de água purificada (grau Milli-Q) à temperatura ambiente de 20 °C, acondicionada em frasco erlenmeyer de 250 mL de capacidade. Uma segunda solução de sulfato de zinco heptahidratado (0,287 g, 1 mmol), preparada em 10 mL de água grau milli-Q também à 20 °C, foi vertida lentamente sobre a solução de diclofenaco de potássio e mantida sob agitação constante por 12 horas. O produto sólido em suspensão foi separado por filtração em papel filtro, lavado com excesso de água Milli-Q e secado em liofilizador por 12 horas. O rendimento molar foi de 87%.

[0052] Passo 2: Obtenção do complexo ternário *bis[diclofenaco de (nicotinamida) zinco (II)]*. Um total de 0,655 g (1 mmol) do sal binário $Zn(diclof)_2$ foi solubilizado em 20 mL de etanol absoluto à temperatura ambiente (20° C) em frasco erlenmeyer de 125 mL de capacidade. Uma

segunda solução com 0,244 g (2 mmol) de nicotinamida em 10 mL de etanol absoluto preparada em temperatura ambiente (20 °C) foi vertida lentamente sobre a solução do sal binário sob agitação constante. A mistura foi agitada por 30 minutos e armazenada por 12 horas. O produto sólido cristalizado foi separado por centrifugação, seguida por filtração em papel filtro e secagem em liofilizador por 12 horas. O rendimento molar foi de 88%.

Exemplo 2 - Ensaio físico-químico e identificação estrutural por métodos espectroscópicos

[0053] A qualidade do produto pode ser verificada por procedimentos analíticos qualitativos e quantitativos, como:

- Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (qualitativo e quantitativo) para determinar a presença dos ligantes no núcleo metálico pelos respectivos isótopos de ^1H e ^{13}C , bem como quantificar os ligantes pelo cálculo das áreas integradas dos sinais correspondentes dos hidrogênios respectivos.
- Espectrofotometria de absorção atômica (quantitativo) para determinar o teor de zinco da composição.
- Análise elementar CNH (quantitativo) para determinar os teores de nitrogênio, carbono e hidrogênio da composição.
- Espectrometria de infravermelho (qualitativo) para determinar a presença de grupos químicos específicos dos ligantes.
- Espectrofotometria de ultravioleta e visível (qualitativo e quantitativo) para verificar bandas de absorção de radiação específicas do complexo e quantificar pela intensidade de absorção frente a um padrão de referência.
- Difração de raios-x (qualitativo) para verificar a composição estrutural em fase cristalina e polimorfismo.

[0054] Os produtos de síntese dos passos 1 e 2 foram analisados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton e carbono (^1H e ^{13}C RMN), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

(FTIR) e Espectrofotometria de Ultravioleta e Visível (UV-Vis). Propriedades físico-químicas de ponto de fusão e condutividade molar também foram obtidas.

➤ Dados espectroscópicos e físico químicos do sal precursor binário *bis[2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato] zinco (II)*

[0055] Rendimento: 87%; Ponto de fusão: 244 °C; Bandas de FTIR (cm^{-1} , pastilha de KBr): 3321, 3300, 3069, 3036, 2968, 2927, 1913, 1855, 1708, 1655, 1606, 1589, 1578, 1563, 1507, 1470, 1453, 1418, 1305, 1290, 1197, 1094, 868, 839, 769, 749, 717, 663, 534; $^1\text{HRMN}$ (δ -ppm, clorofórmio deuterado, 300,18 MHz): 3.75 (s-2H, CH_2), 6.44 (d-1H, CH, $J_{\text{H-H}} = 9\text{Hz}$), 6.78 (s-1H, NH), 6.85 (t-1H, CH, $J_{\text{H-H}} = 9\text{Hz}$), 6.93 (t-1H, CH, $J_{\text{H-H}} = 9\text{Hz}$), 7.06 (dt-1H, CH, $J_{\text{H-H}} = 9\text{Hz}$), 7.15 (d-1H, CH, $J_{\text{H-H}} = 9\text{Hz}$), 7.24 (d-2H, 2CH, $J_{\text{H-H}} = 6\text{Hz}$); $^{13}\text{CRMN}$ (δ -ppm, clorofórmio deuterado, 75,48 MHz): 40.62 (CH_2), 117.61 (CH), 121.75 (CH), 124.17 (C), 127.90 (CH), 128.81 (C), 129.98 (CH), 131.26 (2CH), 137.70 (C), 142.68 (2CCI); Banda máxima em UV-Vis (λ -nm, tetrahydrofurano): 280.5; Coeficiente de extinção molar (ϵ -L.mol $^{-1}$.cm $^{-1}$, tetrahydrofurano): 17,040,000.0; Condutividade molar (Λ -S.cm 2 .mol $^{-1}$, dimetilformamida): 0.24.

➤ Dados espectroscópicos e físico químicos do sal precursor binário *bis[bis[2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato] [nicotinamida] zinco(II)] (2)*

[0056] Rendimento: 88%; Ponto de fusão: 180 °C; Bandas de FTIR (cm^{-1} , pastilha de KBr): 3310, 3183, 3095, 3072, 3039, 2969, 2925, 1679, 1622, 1607, 1592, 1576, 1564, 1506, 1415, 1351, 1303, 1283, 1249, 1199, 1164, 1094, 1058, 869, 837, 774, 747, 720, 698, 656; $^1\text{HRMN}$ (δ -ppm, DMSO deuterado, 300,18 MHz): 3.59 (s-4H, 2 CH_2), 6.28 (d-2H, 2CH, $J_{\text{H-H}} = 9\text{Hz}$), 6.82 (dt-2H, 2CH, $J_{\text{H-H}} = 7\text{Hz}$), 7.01 (dt-2H, 2CH, $J_{\text{H-H}} = 7\text{Hz}$), 7.08 (dd-2H, 2CH, $J_{\text{H-H}} = 8\text{Hz}$), 7.15 (dd-2H, 2CH, $J_{\text{H-H}} = 7\text{Hz}$), 7.42 (d-4H, 4CH, $J_{\text{H-H}} = 8\text{Hz}$), 7.48 (m-

1H, CH_(Nic), $J_{H-H} = 5\text{Hz}$), 7.63 (s-1H, NH_(Nic)), 8.19 (s-1H, NH_(Nic)), 8.21 (m-1H, CH, $J_{H-H} = 8\text{Hz}$), 8.30 (s-2H, 2NH_(Diclof)), 8.69 (dd-1H, CH_(Nic), $J_{H-H} = 5\text{Hz}$), 9.03 (ds-1H_(Nic), CH); ¹³CNMR (δ -ppm, DMSO deuterado, 75,48 MHz): 40.73 (2CH₂), 116.34 (2CH), 120.82 (2CH), 123.60 (CH_(Nic)), 124.59 (2CH), 126.56 (2CH), 126.85 (2C), 128.97 (2CH), 129.12 (4CH), 129.82 (CH_(Nic)), 130.61 (2C), 135.46 (CH_(Nic)), 137.57 (2C), 142.86 (4CCl), 148.75 (CH_(Nic)), 151.92 (CH_(Nic)), 166.45 (CON_(Nic)), 177.40 (2COO⁻_(Diclof)); Absorção máxima no UV-Vis (λ -nm, tetrahydrofurano): 278; Coeficiente de extinção molar (ϵ -L.mol⁻¹.cm⁻¹, tetrahydrofurano): 18,720,000.0 ; Condutividade molar (Λ -S.cm².mol⁻¹, dimetilformamida): 1.00.

Exemplo 3 - Avaliação da atividade antinociceptiva do complexo bis[bis[2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato] [nicotinamida] zinco(II)] *in vivo* frente ao indutor algésico ácido acético

[0057] O ensaio *in vivo* foi realizado de acordo com o modelo experimental de dor induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,1 mol.L⁻¹ para avaliação da atividade antinociceptiva do complexo. Após a injeção i.p. do agente nociceptivo em camundongos, observa-se respostas que consistem em uma sequência de contrações e extensões do abdômen, as quais podem ser acompanhadas por torções do tronco e extensão dos membros posteriores do animal, as quais são parâmetros quantificáveis. Utilizaram-se camundongos CF1 machos com peso entre 30 e 35 gramas mantidos em jejum por 4 horas. As soluções do complexo foram administradas pela via oral (gavagem), com a injeção i.p. do agente nociceptivo (0,1 mL/10 g de massa corpórea) após 30 minutos. As contagens das contrações iniciaram 10 minutos após as injeções, com monitoramento por 20 minutos.

Exemplo 4 - Avaliação da atividade antinociceptiva do complexo bis[bis[2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato] [nicotinamida] zinco(II)] *in vivo* frente ao indutor algésico formalina.

[0058] Camundongos CF1 machos deixados em jejum por um período de 4 horas, com peso de aproximadamente 30 a 35 g, recebem administração subplantar de 20 µl de uma solução de formalina 1,2 % na pata direita traseira. Trinta minutos antes da administração da formalina o complexo de zinco foi administrado por via oral na dose de 1mg/kg numa suspensão com DMSO (10 %) e solução salina. O tempo que o animal lambe, sacode (comportamento conhecido como “*flinch*”) ou morde a pata traseira é então cronometrado. São observadas duas fases distintas. A primeira fase (0-5 minutos pós-injeção) é chamada de fase *neurogênica*, na qual ocorre a ativação direta dos nociceptores locais pela formalina, e a segunda (15-30 minutos após a injeção) é chamada de *fase inflamatória*, na qual o comportamento observado é resultante da ação de mediadores inflamatórios liberados pelo estímulo.

[0059] A Tabela 1 apresenta o resultado do teste antinociceptivo *in vivo* frente ao agente inflamatório formalina nas fases neurogênica e inflamatória.

Tabela 1. Resultados para o experimento de atividade antinociceptiva do complexo de zinco frente ao tratamento subplantar de formalina.

Tratamento	Tempo de lambida			
	Fase Neurogênica		Fase Inflamatória	
	Primeira fase	% de inibição	Segunda fase	% de inibição
Veículo	82.4 ± 5.8	-	69.1 ± 8.9	-
Cloridrato de Morfina	17 ± 2.4*	79	2.8 ± 4.8*	96
Complexo 1mg/kg	44.3 ± 7.9*	46	40.1 ± 6.5*	62

* **Efeito do complexo no teste da formalina em camundongos.** Os animais foram tratados 15 min antes da injeção de formalina (1,2 %) com salina (controle; e.v.) ou morfina (5 mg/Kg; s.c.) ou composto (1 mg/Kg, v.o.), respectivamente. Imediatamente após a administração da formalina o tempo de lambadura foi registrado por cerca de 5 min (1ª fase) e de 20 à 25 min (2ª fase). Os valores representam a média ± E.P.M do tempo de lambadura em segundos de cada fase (n=10). Foram utilizados 6-8 animais por grupo. * p<0,05 indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle (Salina). (Test Student – Neuman – Keuls).

[0060] No experimento da tabela 1 foi utilizado um agente químico (solução de formalina) administrada na área subplantar da pata dos animais. O teste de

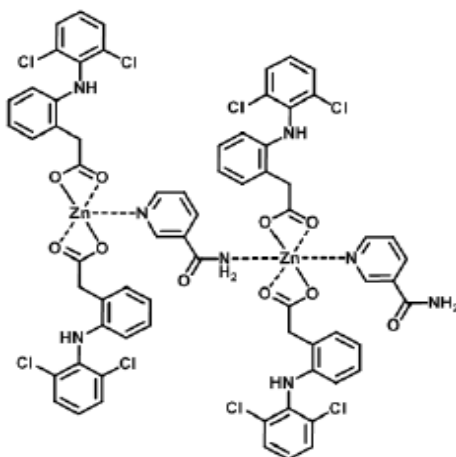
formalina se diferencia dos demais testes de dor, pois é possível verificar a resposta do animal a uma dor contínua e moderada gerada por tecido lesionado. Devido a esta relação com tecido lesionado, acredita-se que este teste produza um modelo mais válido de dor clínica do que os testes de mecanismo fásico ou de estímulo térmico. O cloridrato de morfina, derivado de opióide, foi escolhido por ser um analgésico potente, usado por diferentes vias, principalmente para o tratamento da dor aguda e também para síndromes dolorosas crônicas. Por ser hidrofílico, sua duração de ação é prolongada, porém essa característica também é responsável por permanência do fármaco no líquido durante tempo maior do que um opioide lipofílico. Com isso, ocorre maior difusão cranial e ligação do opioide aos receptores encefálicos, provocando efeitos colaterais como prurido, náusea, vômito e depressão respiratória, diminuição da motilidade e mobilidade.

[0061] Ambas as fases do processo doloroso induzido pela formalina (fase I e fase II) foram respectivamente inibidas pelo complexo apresentando, assim, efeito quando comparado ao controle cloridrato de morfina utilizado e, em resultados posteriores a este, não demonstra efeitos colaterais de motilidade intestinal e mobilidade sendo desta forma mais indicado ao tratamento de analgesia por não apresentar, até o momento, reações adversas.

[0062] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Composto complexo de zinco com diclofenaco e nicotinamida **caracterizado** por ser o bis[bis[2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato] [nicotinamida] zinco(II)] conforme a estrutura molecular:



2. Composto intermediário do composto complexo conforme definido na reivindicação 1 **caracterizado** por ser o bis[2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetato] zinco (II).

3. Processo de produção do composto intermediário conforme definido na reivindicação 2, **caracterizado** por ser a partir do preparo de uma solução contendo um sal orgânico do fármaco diclofenaco em uma temperatura de 20 °C, combinada com uma solução de sal contendo zinco (II).

4. Processo de produção do complexo conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** por ser preparado a partir de uma mistura líquida do composto intermediário 1 com nicotinamida.

5. Uso do complexo conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** por ser para preparar um medicamento em que a composição consiste do complexo como composto ativo e um excipiente farmacologicamente aceitável.

6. Uso do complexo de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** por ser para preparar um medicamento administrado pelas vias tópica, oral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, transdérmica ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados.

7. Uso do complexo de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** por ser para preparar um medicamento para tratar processos inflamatórios ou alívio da dor ou uma combinação destes em formulações farmacêuticas e veterinárias.

FIGURAS

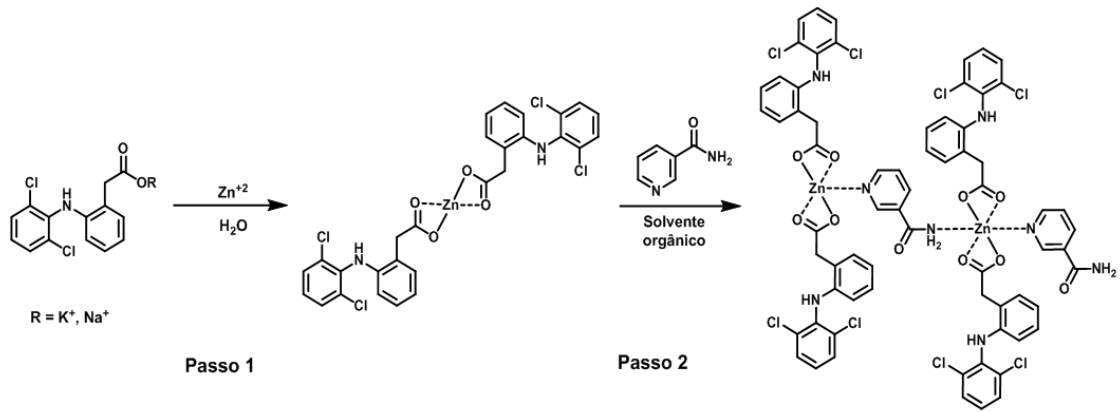


Figura 1

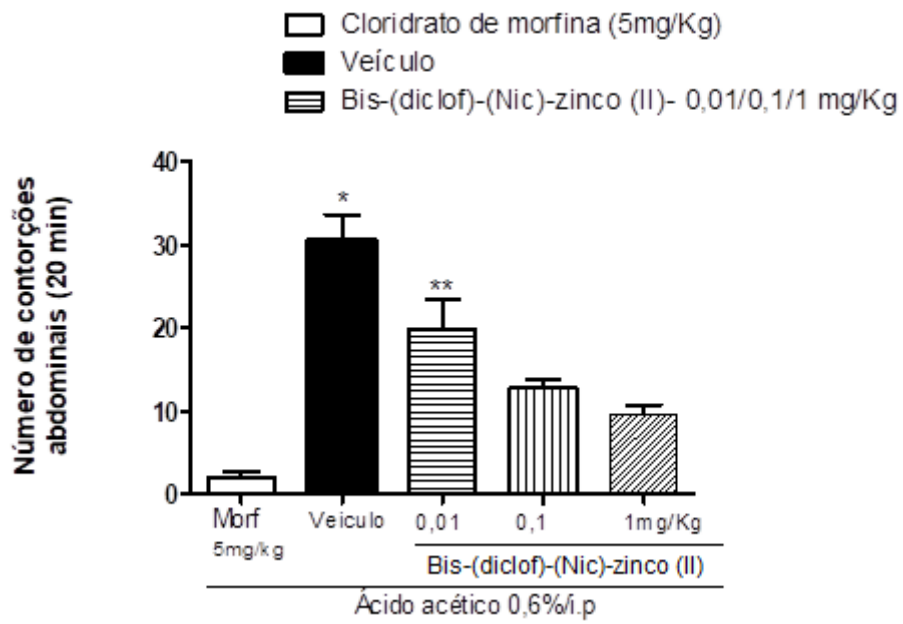


Figura 2

Anexo D: Artigo Journal of Inorganic Biochemistry



Synthesis, chemical characterization and DNA interaction study of new diclofenac and ibuprofen zinc (II)-nicotinamide ternary complexes as cyclooxygenase inhibitor prototypes



Paulo Roberto dos Santos^a, Claus Tröger Pich^b, Davi Back^c, Franco Smiderle^a, Françoise Dumas^d, Sidnei Moura^{a,*}

^a Laboratory of Natural and Synthetic Products, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS CEP: 95070-560, Brazil

^b Department of Energy and Sustainability, Araranguá Center, Federal University of Santa Catarina, Rod. Gov. Jorge Lacerda, 3201 Jardim das Avenidas, Araranguá, SC CEP: 88.906-072, Brazil

^c Natural and Exact Sciences Center, Chemistry Department, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS CEP: 97105-900, Brazil

^d Faculté de Pharmacy, Université Paris-Saclay, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Zinc complexes
NSAIDs
DNA interaction
Cytotoxicity

ABSTRACT

In the search for new drugs, strategies such as bioisosterism have been evidenced, in which the modification of molecules is already known to be active. Thus, metal complexes of known drugs have been highlighted, with examples of significant improvements in therapeutic efficacy. In this way, this work aimed at the synthesis of new zinc complexes with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), as well as the chemical characterization and the previous toxicity with *Artemia salina*, and evaluating the ability of these compounds to interact with DNA. As result, two new zinc II ternary complexes containing the NSAIDs diclofenac (Diclof) and ibuprofen (Ibup) and nicotinamide neutral linker (Nic) were obtained by the two-step solvent metal-ligand complexation method. Molecular structures were determined by NMR, FTIR, HR-MS, UV-Vis and X-ray diffraction, which demonstrated that both complexes are binuclear systems of general formula $[Zn_2(R-COO^-)_4(Nic)_2]$. Plasmidial DNA breakdown capacities were evaluated by producing single and double breaks (DNA FII and FIII) from plasmid incubation with complex solutions in the concentration range 0 to $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in experiments with the presence and absence of light. Both experiments did not show significant differences ($P \leq 0.05$) in induced DNA cleavage activity between the maximum study concentrations ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and the negative controls for both complexes. The types of complex 1 and 2 interactions with the secondary DNA structure were determined by titrating a CT-DNA solution with complex solutions and monitored by circular dichroism spectrometry. The results showed that both complexes interact with the grooves of the secondary structure of CT-DNA by electrostatic attraction, but without evidence of alteration in the primary structure. Acute toxicity tests against *Artemia salina* showed that both complexes did not produce lethality > 10% of the population up to a maximum concentration of $1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ within an exposure interval of 24 h. Thus, two new compounds were synthesized, characterized and had their previous toxicities determined. These compounds are promising new drugs, with the next step being evaluations of their activity.

1. Introduction

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs or NSAIDs are the largest therapeutic class used worldwide [1]. Diclofenac (Diclof) and ibuprofen (Ibup) are nonspecific cyclooxygenase (COX) inhibitors used for treatment of pain and inflammatory processes mediated by prostaglandins [2,3]. Despite their beneficial results, these molecules may have long-

term side effects due to the high doses required for a therapeutic response. Therefore, in order to improve the efficiency of these molecules, strategies such as the synthesis of metal complexes are a promising alternative for increasing the potency and bioavailability as well as decreasing the toxicity of the compounds [4].

Diclof and Ibup which has carboxylic acid as the main functional group, have a chemical affinity for metal ions, such as zinc II and

* Corresponding author at: Technology Department, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, 1130 Francisco Getúlio Vargas st., CEP 95070-560 Caxias do Sul, Brazil.

E-mail address: sidnei.moura@ucs.br (S. Moura).

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111046>

Received 21 October 2019; Received in revised form 17 February 2020; Accepted 19 February 2020

Available online 20 February 2020

0162-0134/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

copper II, to form coordination complexes with varied biological activity, with some papers being published in recent years. In this line, Hijazi Abu Ali has prepared ternary complexes from the binary salts Zn-Diclof and Zn-Ibup with some pyridine derivatives, such as 1,10-phenanthroline (Phen) and aninopyridine (ampy), which were tested to evaluate their cytotoxic activity against bacterial strains [5,6]. Pyridine-derived aromatic compounds are neutral binders with high affinity for Zn II and are mostly applied to complete the coordination sphere of complexes containing carboxylic acids. However, these aromatic compounds are mostly genotoxic and cytotoxic compounds and lead to a complicating factor for the application of these complexes as prototypes of NSAIDs [7,8].

Nicotinamide (Nic) is an ideal molecule for this purpose. Nic is the major component of vitamin B3 complex, being an essential biological compound tolerated by animals in high doses [9,10]. In addition, Nic has a number of biologic properties, including inducible NO synthase (iNOS) inhibition, free radical scavenging, MHC class II expression suppression, and ICAM-1 expression of intracellular adhesion molecule in endothelial cells, possibly due to Nic's ability to inhibit poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) [11–13]. Moreover, Nic has been shown to have N-donor properties for obtaining metal complexes with bivalent and trivalent cations [14,15]. As an example, Nic and its nicotinic acid analogue (Nia) are used as binders to stabilize chromium III ions in the preparation of chromium III-based dietary supplements that modulate glucose metabolism, fat reduction and muscle mass increase in sportsmen [9].

In this context, the aim of this work is to obtain ternary complexes of Zn-Diclof and Zn-Ibup with Nic as a nitrogen ligand with the intention of producing NSAID compounds capable of exploiting the anti-inflammatory activities of both ligands for the same pharmacological target. The complexes and their precursors were chemically characterized by ^1H and ^{13}C NMR, FTIR, HRMS and crystallographic analysis. The DNA interaction activities of the new complexes were evaluated by circular dichroism spectroscopy against CT-DNA, and the potential for DNA cleavage was determined by induction of plasmid DNA breakage with and without UV light induction by gel electrophoresis analysis. Biological activity was evaluated by the acute lethal toxicity test against *A. salina*.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Zinc nitrate, zinc (II) sulphate, nicotinamide, sodium carbonate and ethanol 99% were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Potassium diclofenac 99% and ibuprofen 99% (pharmaceutical grade) were obtained from Sigma-Aldrich. Ultrapure water was obtained from the Milli-Q (Millipore) apparatus. Ethanol and dimethylformamide (DMF) were purchased from Sigma-Aldrich (grade reagent) and used without further purification. Calf thymus DNA sodium salt (CT DNA) was used as obtained from Sigma Co. The plasmid pBSK II (2961 bp) used for DNA cleavage assays was purchased from Stratagene (California), transformed into DH5 alpha *Escherichia coli* competent cells, and amplified as previously described [16]. Plasmid DNA was extracted from *E. coli* and purified using the Qiagen® Plasmid Maxi Kit protocol [17]. The synthetic marine salt Blue Treasure® (iodate, nitrate and phosphate free) and brine shrimp cysts were purchased at a local aquarium store.

2.2. Physical measurements

^1H and ^{13}C NMR analysis was performed on a Fourier 300 spectrometer (Bruker) (300.18 MHz from ^1H and 75.49 MHz from ^{13}C with 5 mm probe) with 32 scans for ^1H and 5000 scans for ^{13}C , using CDCl_3 and $\text{DMSO}-d_6$ as solvents. Infrared analysis was performed on a Perkin Elmer Spectrum 400 FTIR spectrometer using solid samples by the KBr

pellet technique. Spectral data were obtained in the spectral interval from 400 to 4000 cm^{-1} (wavenumber) with a resolution of 1.0 cm^{-1} for 32 scans. UV-Vis analysis was performed on a Beckman DU®530 spectrophotometer (single beam) with 10 mm quartz cuvette and a spectral window of λ 200 to 350 nm using $1 \times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in THF. High resolution mass spectroscopy was performed according to the following conditions: complex solutions ($1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:1 v/v) were individually infused directly into the ESI source by means of a syringe pump (Harvard Apparatus) at a flow rate of $150\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. ESI (+)-MS and tandem ESI (+)-MS/MS were acquired using a hybrid high-resolution and high accuracy ($5\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) MicroTof (Q-TOF) mass spectrometer (Bruker Scientific) under the following conditions: capillary and cone voltages were set to +3500 V and +40 V, respectively, with a desolvation temperature of $100\text{ }^\circ\text{C}$. For ESI (+)-MS/MS, the energy for the collision-induced dissociations (CIDs) was optimized for each component. For data acquisition and processing in Q-TOF, control data analysis software (Bruker Scientific) was used. The data were collected in the m/z range of 100–2000 at the speed of two scans/s, providing the resolution of 10,000 (FWHM) at m/z 200. Melting points were measured by Quimis® optical apparatus using the glass capillary method (triplicate). Molar conductivity and chemical stability was measured by the Hydraulix® MCA-150 conductivity meter. Crystallographic analysis was performed on a Bruker D8 Venture Photon 100 diffractometer. Circular dichroism was obtained by JASCO J-815 CD Spectrometer.

2.3. Synthesis of zinc (II) complexes

2.3.1. Preparation of bis[2-(2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl)acetate] zinc(II)

The binary salt $[\text{Zn}(\text{Diclof})_2]$ was prepared as according to Abu Ali and Jabali [5] with modifications. Briefly, diclofenac potassium (0.668 g, 2.0 mmol) in 30 mL of water was added dropwise to a ZnSO_4 solution (2.87 g, 1.0 mmol, 10 mL of water) at room temperature. A white colloidal suspension was formed immediately, which was stirred for 12 h. The solid was then filtered, washed with ultrapure water, lyophilized for 12 h and stored in a dark flask. Yield: 0.655 g (87%); MP: $244\text{ }^\circ\text{C}$; IR (cm^{-1} , KBr pellet): 3321, 3300, 3069, 3036, 2968, 2927, 1913, 1855, 1708, 1655, 1606, 1589, 1578 ($\nu_a\text{ COO}^-$), 1563, 1507, 1470, 1453, 1418 ($\nu_s\text{ COO}^-$), 1305, 1290, 1197, 1094, 868, 839, 769, 749, 717, 663, 534, ($\Delta\nu\text{ COO}^-$) 160; $^1\text{HNMR}$ (δ -ppm, DCCl_3): 3.75 (s-2H, CH_2), 6.44 (d-1H, CH, $J_{\text{H-H}} = 9\text{ Hz}$), 6.78 (s-1H, NH), 6.85 (t-1H, CH, $J_{\text{H-H}} = 9\text{ Hz}$), 6.93 (t-1H, CH, $J_{\text{H-H}} = 9\text{ Hz}$), 7.06 (dt-1H, CH, $J_{\text{H-H}} = 9\text{ Hz}$), 7.15 (d-1H, CH, $J_{\text{H-H}} = 9\text{ Hz}$), 7.24 (d-2H, 2CH, $J_{\text{H-H}} = 6\text{ Hz}$); $^{13}\text{CNMR}$ (δ -ppm, CDCl_3): 40.62 (CH_2), 117.61 (CH), 121.75 (CH), 124.17 (C), 127.90 (CH), 128.81 (C), 129.98 (CH), 131.26 (2CH), 137.70 (C), 142.68 (2C); HRMS ESI (+): m/z 1326.8945 ($\text{C}_{56}\text{H}_{40}\text{Cl}_8\text{N}_4\text{NaO}_8\text{Zn}_2$) $[\text{Zn}_2(\text{diclof})_4 + \text{Na}]^+$, 1304.8890 ($\text{C}_{56}\text{H}_{41}\text{Cl}_8\text{N}_4\text{O}_8\text{Zn}_2$) $[\text{Zn}_2(\text{diclof})_4 + \text{H}]^+$, 1009.8808 ($\text{C}_{42}\text{H}_{30}\text{Cl}_6\text{N}_3\text{O}_6\text{Zn}_2$) $[\text{Zn}_2(\text{diclof})_3]^+$, 683.9134 ($\text{C}_{56}\text{H}_{40}\text{Cl}_8\text{N}_4\text{O}_8\text{Zn}_3$) $[\text{Zn}_2(\text{diclof})_4 + \text{Zn}]^{2+}$, 671.9417 ($\text{C}_{56}\text{H}_{41}\text{Cl}_8\text{N}_4\text{NaO}_9\text{Zn}_2$) $[\text{Zn}_2(\text{diclof})_4 + \text{Na} + \text{OH}]^{2+}$, 652.9533 ($\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_4\text{Zn}$) $[\text{Zn}(\text{diclof})_2 + \text{H}]^+$, 545.4074 ($\text{C}_{42}\text{H}_{31}\text{Cl}_6\text{N}_3\text{O}_7\text{Zn}_3$) $[\text{Zn}_2(\text{diclof})_3 + \text{ZnOH}]^{2+}$, 505.4474 ($\text{C}_{42}\text{H}_{31}\text{Cl}_6\text{N}_3\text{O}_6\text{Zn}_2$) $[\text{Zn}_2(\text{diclof})_3 + \text{H}]^{2+}$, 375.9477 ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{NO}_3\text{Zn}$) $[\text{Zn}(\text{diclof}) + \text{H}_2\text{O}]^+$, 357.9375 ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{Zn}$) $[\text{Zn}(\text{diclof})]^+$, 318.0055 ($\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NNaO}_2$) $[\text{diclof} + \text{Na} + \text{H}]^+$, 296.0233 ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{NO}_2$) $[\text{diclof} + 2\text{H}]^+$; UV-Vis (λ -nm, THF): 280.5; Molar Extinction Coefficient (ϵ - $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, THF): 17,040,000.0; Molar conductivity (Λ - $\text{S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$, DMF): 0.24.

2.3.2. Preparation of di- μ -(nicotinamide)-tetra-2-[2-(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetate di-zinc(II) (1)

Nic (0.244 g, 2.0 mmol (1.0 mmol excess)) was dissolved in 10 mL of ethanol 99% and slowly added to 20 mL of stirred ethanolic solution of $[\text{Zn}(\text{Diclof})_2]$ [3] (0.655 g, 1.0 mmol). A colloidal suspension was formed after 10 min, which was stirred for 2 h at room temperature. The white solid was obtained after 4 days by filtration, lyophilized for 12 h and

stored in a dark flask. Yield: 0.683 g, (88%); MP: 180 °C; IR (cm⁻¹, KBr pellet): 3310, 3183, 3095, 3072, 3039, 2969, 2925, 1679, 1622, 1607, 1592, 1576, 1564 (ν_a COO⁻), 1506, 1415 (ν_s COO⁻), 1351, 1303, 1283, 1249, 1199, 1164, 1094, 1058, 869, 837, 774, 747, 720, 698, 656; (Δν COO⁻) 149; ¹HNMR (δ-ppm, DMSO-D₆): 3.59 (s-4H, 2CH₂), 6.28 (d-2H, 2CH, J_{H-H} = 9 Hz), 6.82 (dt-2H, 2CH, J_{H-H} = 7 Hz), 7.01 (dt-2H, 2CH, J_{H-H} = 7 Hz), 7.08 (dd-2H, 2CH, J_{H-H} = 8 Hz), 7.15 (dd-2H, 2CH, J_{H-H} = 7 Hz), 7.42 (d-4H, 4CH, J_{H-H} = 8 Hz), 7.48 (m-1H, CH_(Nic), J_{H-H} = 5 Hz), 7.63 (s-1H, NH_(Nic)), 8.19 (s-1H, NH_(Nic)), 8.21 (m-1H, CH, J_{H-H} = 8 Hz), 8.30 (s-2H, 2NH_(Diclof)), 8.69 (dd-1H, CH_(Nic), J_{H-H} = 5 Hz), 9.03 (ds-1H_(Nic), CH); ¹³CNMR (δ-ppm, DMSO-D₆): 40.73 (2CH₂), 116.34 (2CH), 120.82 (2CH), 123.60 (CH_(Nic)), 124.59 (2CH), 126.56 (2CH), 126.85 (2C), 128.97 (2CH), 129.12 (4CH), 129.82 (CH_(Nic)), 130.61 (2C), 135.46 (CH_(Nic)), 137.57 (2C), 142.86 (4CCl), 148.75 (CH_(Nic)), 151.92 (CH_(Nic)), 166.45 (CON_(Nic)), 177.40 (2COO⁻_(Diclof)); HRMS ESI (+) m/z 1253.9655 (C₅₄H₄₂Cl₆N₇O₆Zn₂) [M-diclof]⁺, 1131.9225 (C₄₈H₃₆Cl₆N₅O₇Zn₂) [M-diclof-nic]⁺, 1009.8843 (C₄₂H₃₀Cl₆N₃O₆Zn₂) [Zn₂(diclof)₃]⁺, 796.9771 (C₃₄H₂₆Cl₄N₄NaO₅Zn) [Zn(diclof)₂Nic + Na]⁺, 774.9993 (C₃₄H₂₇Cl₄N₄O₅Zn) [Zn(diclof)₂Nic + H]⁺, 674.9318 (C₂₈H₂₀Cl₄N₂NaO₄Zn) [Zn(diclof)₂ + Na]⁺, 652.9525 (C₂₈H₂₁Cl₄N₂O₄Zn) [Zn(diclof)₂ + H]⁺, 602.0314 (C₂₆H₂₂Cl₂N₅O₄Zn) [Zn(diclof)(nic)₂]⁺, 478.9849 (C₂₀H₁₆Cl₂N₃O₃Zn) [Zn(diclof)(nic)]⁺, 398.9627 (C₁₄H₁₄Cl₂N₂NaO₂Zn) [Zn(diclof) + NH₄ + Na]⁺, 374.9478 (C₁₄H₁₂Cl₂NO₃Zn) [Zn(diclof) + H₂O]⁺, 357.9379 (C₁₄H₁₀Cl₂NO₃Zn) [Zn(diclof)]⁺, 318.0053 (C₁₄H₁₁Cl₂NNaO₂) [diclof + H + Na]⁺, 296.0233 (C₁₄H₁₂Cl₂NO₂) [diclof + 2H]⁺; UV-Vis (λ-nm, THF): 278; Molar Extinction Coefficient (ε-L·mol⁻¹·cm⁻¹, THF): 18,720,000.0; Molar conductivity (Λ-S·cm²·mol⁻¹, DMF): 1.00.

2.3.3. Preparation of bis[(R,S)-2-{4-(methypropyl)phenyl}propanoate] zinc (II)

The binary salt was prepared as according to Abu Ali et al. with modifications [6]. Briefly, 50 mL of (R,S)-2-{4-(methypropyl)phenyl}propanoic acid (0.825 g, 4.0 mmol) solution was neutralized with Na₂CO₃ (0.5 mol·L⁻¹) to pH 8.9 while stirred at room temperature. The Zn(NO₃)₂·6H₂O solution (0.594 g, 2 mmol, 20 mL) was dripped over the first under stirring. An amorphous white solid was immediately formed, which was filtered after 24 h and freeze dried for 24 h. Yield: 0.630 g, (66%); MP: 78 °C; IR (cm⁻¹, KBr pellet): 3424, 3091, 3023, 3007, 2954, 2925, 2868, 2847, 1902, 1712, 1639, 1559, 1545 (ν_a COO⁻), 1513, 1463, 1427, 1417 (ν_s COO⁻), 1384, 1367, 1292, 1219, 1191, 1167, 1123, 1073, 1022, 1005, 921, 849, 785, 742, 697, 637, 611, 549, 436, 128 (Δν COO⁻); ¹HNMR (δ-ppm, CDCl₃): 0.88 (d-6H, 2CH₃, J_{H-H} = 6 Hz), 1.35 (d-3H, CH₃, J_{H-H} = 7 Hz), 1.83 (sep-1H, CH, J_{H-H} = 6 Hz), 2.41 (d-2H, CH₂, J_{H-H} = 7 Hz), 3.62 (q-1H, CH, J_{H-H} = 6), 7.02 (d-2H, 2CH, J_{H-H} = 8 Hz), 7.14 (d-2H, 2CH, J_{H-H} = 8 Hz); ¹³CNMR (δ-ppm, CDCl₃): 19.19 (CH₃), 22.43 (2CH₃), 30.17 (CH), 45.06 (CH), 47.064 (CH₂), 127.18 (2CH), 129.14 (2CH), 138.39 (C), 140.19 (C), 184.06 (COO⁻); HRMS ESI (+) m/z 1155.4811 (C₆₅H₈₇O₁₀Zn₂) [Zn₂(ibup)₅ + 2H]⁺, 949.3534 (C₅₂H₆₉O₈Zn₂) [Zn₂(ibup)₄ + H]⁺, 761.2359 (C₃₉H₅₃O₇Zn₂) [Zn₂(ibup)₃ + H₂O]⁺, 743.2323 (C₇₈H₁₀₂O₁₂Zn₄) [Zn₄(ibup)₆]²⁺, 506.1439 (C₅₂H₆₈O₈Zn₃) [Zn₂(ibup)₄ + Zn]²⁺, 475.1825 (C₂₆H₃₅O₄Zn) [Zn(ibup)₂ + H]⁺, 328.0891 (C₁₃H₂₃NNaO₃Zn) [Zn(ibup) + H₂O + Na + NH₄]⁺, 287.0620 (C₁₃H₁₉O₃Zn) [Zn(ibup) + H₂O]⁺, 229.1201 (C₁₃H₁₈NaO₂) [ibup + Na + H]⁺; UV-Vis (λ-nm, THF): 256_(weak); Molar Extinction Coefficient (ε-L·mol⁻¹·cm⁻¹, THF): 317.3; Molar conductivity (Λ-S·cm²·mol⁻¹, DMF): 5.01.

2.3.4. Preparation of tetrakis-μ₂-[2-(4-(methypropyl)phenyl)propanoate] (bis-nicotinamide)di-zinc (II) (2)

Nic (0.244 g, 2.0 mmol) in DMF 99% (10 mL) was added dropwise over compound 5 solution (0.475 g, 1.0 mmol) in DMF 99% (15 mL). The mix was stirred for 2 h, which was posteriorly evaporated to 20% of initial volume by a rotatory evaporator. The pale yellow solution was kept in an open crystallization flask with the absence of light for 30 days.

The clear white crystals were filtered, washed with DMF and freeze dried for 24 h. Yield: 0.4126 g (69%); MP: 148 °C; IR (cm⁻¹, KBr pellet): 3440, 3318, 3283, 3201, 3182, 2959, 2930, 2867, 1689, 1636 (ν_a COO⁻), 1604, 1575, 1512, 1458 (ν_s COO⁻), 1412, 1372, 1287, 1199, 1056, 793, 699, 601, (Δν COO⁻) 178; ¹HNMR (δ-ppm, CDCl₃): 0.82 (d-12H, 4CH₃, J_{H-H} = 6 Hz), 1.35 (d-6H, 2CH₃, J_{H-H} = 7 Hz), 1.74 (sep-2H, 2CH, J_{H-H} = 7 Hz), 2.27 (d-4H, 2CH₂, J_{H-H} = 7 Hz), 3.62 (q-2H, 2CH, J_{H-H} = 7), 4.98 (s-1H, 1NH_(Nic)), 6.83 (d-4H, 4CH, J_{H-H} = 8 Hz), 7.00 (d-4H, 4CH, J_{H-H} = 8 Hz), 7.43 (dd-1H, 1CH_(Nic), J_{H-H} = 8 Hz), 8.26 (s-1H, 1NH_(Nic)), 8.43 (dt-2H, 2CH_(Nic), J_{H-H} = 8 Hz), 8.59 (dd-2H, 2CH_(Nic), J_{H-H} = 5 Hz), 8.85 (ds-2H, 2CH_(Nic), J_{H-H} = 2 Hz); ¹³CNMR (δ-ppm, CDCl₃): 19.54 (2CH₃), 22.33 (4CH₃), 30.09 (2CH), 44.86 (2CH), 46.24 (2CH₂), 124.57 (CH_(Nic)), 127.09 (4CH), 129.07 (4CH), 130.70 (CH_(Nic)), 137.01 (2C), 139.76 (CH_(Nic)), 140.06 (2C), 146.83 (CH_(Nic)), 150.26 (C_(Nic)), 164.39 (CON_(Nic)), 183.07 (2CO₂⁻); HRMS ESI (+): m/z 1093.3807 (C₅₈H₇₄N₂NaO₉Zn₂) [M-Nic + Na]⁺, 1071.3983 (C₅₈H₇₅N₂O₉Zn₂) [M-Nic + H]⁺, 987.3175 (C₅₁H₆₃N₄O₈Zn₂) [M-ibup]⁺, 865.2731 (C₄₅H₅₇N₂O₇Zn₂) [Zn₂(ibup)₃(Nic)]⁺, 883.2853 (C₄₅H₅₉N₂O₈Zn₂) [Zn₂(ibup)₃(Nic) + H₂O]⁺, 619.2110 (C₃₂H₄₀N₂NaO₅Zn) [Zn(ibup)₂(Nic) + Na]⁺, 597.2296 (C₃₂H₄₁N₂O₅Zn) [Zn(ibup)₂(Nic) + H]⁺, 513.1469 (C₂₅H₂₉N₄O₄Zn) [Zn(ibup)(Nic)₂]⁺, 475.1813 (C₂₆H₃₅O₄Zn) [Zn(ibup)₂ + H]⁺, 328.0889 (C₁₃H₂₃NNaO₃Zn) [Zn(ibup) + H₂O + NH₄ + Na]⁺, 287.0620 (C₁₃H₁₉O₃Zn) [Zn(ibup) + H₂O]⁺, 229.1201 (C₁₃H₁₈NaO₂) [ibup + Na + H]⁺; UV-Vis (λ-nm, THF): 256.5; Molar Extinction Coefficient (ε-L·mol⁻¹·cm⁻¹, THF): 6050.0; Molar conductivity (Λ-S·cm²·mol⁻¹, DMF): 0.24 (see Scheme 1).

2.4. Crystallography

Data were collected on a Bruker D8 Venture Photon 100 diffractometer equipped with an Incoatec IμS high brilliance Mo-Kα X-ray tube with two-dimensional Montel micro-focusing optics (120(2) K using an Oxford Cryosystems Cryostream 800 low temperature unit for complex 2). The structure was solved by direct methods using SHELXS [18]. Subsequent difference Fourier map analyses yielded the positions of the non-hydrogen atoms. All refinements were made by full-matrix least-squares on F² with anisotropic displacement parameters for all non-hydrogen atoms, which was carried out with the SHELXL package [18]. Hydrogen atoms were included in the refinement in calculated positions, but the atoms (of hydrogens) that are performing special bonds were located in the Fourier map. Drawings were done using ORTEP-3.1 for Windows and Mercury 4.1.0 [19].

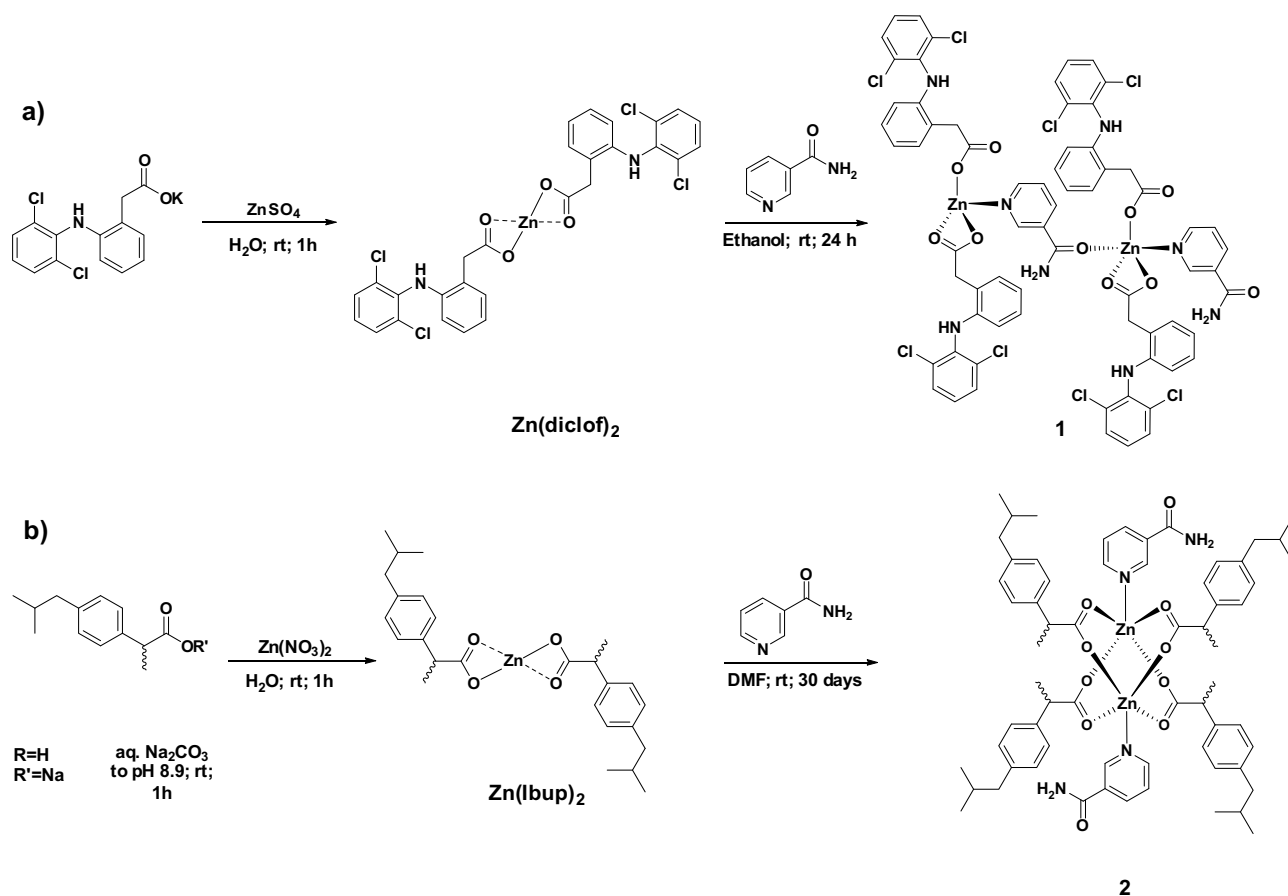
2.5. Chemical stability assay

Chemical stability experiments were performed according to Pich et al. with modifications [7]. In order to verify the chemical stability, the molar conductivities of the zinc complexes were measured in solution over a period of 96 h. Solutions of compounds 1, 2, 3 and 4 were prepared in DMF at a concentration of 1.0 mmol·L⁻¹ stocked in closed glass vials (Schott Duran® 25 mL) without headspace and maintained at room temperature for the entire experiment. Specific conductivities (κ) were measured at 0.5, 24, 48 and 96 h on a Hydraultis® MCA-150 conductivity meter. The molar conductivities (Λ) were calculated according to Eq. (1) [20].

$$\Lambda_{(S\text{cm}^2\text{mol}^{-1})} = \frac{\kappa_{(S\text{cm}^{-1})}}{c_{(mol\text{cm}^{-3})}} \quad (1)$$

2.6. DNA interaction activity: plasmid cleavage activity assay

Plasmid DNA pBSK II (Stratagene) was obtained and purified according to standard techniques [21]. The DNA cleavage ability of the ternary complexes 1 and 2, diluted in water:DMF 20%, were examined in order to establish the influence of compound concentration on the



Scheme 1. Two synthetic pathways with two steps: a) binary salt Zn(Diclof)₂ and (1) ternary complex Zn₂(Diclof)₄(Nic)₂; b) binary salt Zn(Ibup)₂ and ternary complex Zn₂(Ibup)₄(Nic)₂ (2).

conversion of pBSK II supercoiled DNA (F I) to the open circular (F II) and linear DNA (F III) using agarose gel electrophoresis to separate the cleavage products [22]. An experiment was performed with pure Nic in order to evaluate the activity of the N-donor ligand itself. Exploring experiments were designed in accordance to the proceedings calculated using the OriginPro® 2016 (b9.3.226, evaluation version). In general, 300 ng of pBSK II DNA (30 μmol L⁻¹ bp) in 10 mmol L⁻¹ HEPES buffer pH 7.0 was treated with Zn(II) complexes and Nic at concentrations of 25, 50, 100, 200 and 400 μmol L⁻¹ in a final concentration of 20% DMF at 37 °C in the absence of light (AL) for 24 h and UVB light (UV) for 30 s using a BIORAD® transilluminator UV 302 T26M apparatus with a UVB peak ranging from λ 300 to 312 nm at 100% light power. All the assays were conducted using freshly prepared solutions and included one negative control reaction with Milli-Q® water:DMF 80:20 (reference of spontaneous plasmid DNA fragmentation). Thereafter, each reaction was quenched by adding 4 μL of a loading buffer solution (50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7.5, 0.01% bromophenol blue, 50% glycerol, and 250 mmol L⁻¹ EDTA) and then subjected to electrophoresis on a 1.0% agarose gel containing 0.3 μg mL⁻¹ of ethidium bromide in 0.5 × TBE buffer (44.5 mmol L⁻¹ Tris pH 8.0, 44.5 mmol L⁻¹ boric acid, and 1 mmol L⁻¹ EDTA) at 90 V for 1.5 h. The resulting gels were visualized and digitized using a DigiDoc-It gel documentation system (UVP) (KODAK). The proportion of plasmid DNA in each band was quantified using GelAnalyzer version 2010a program (freeware). The quantification of supercoiled DNA (F I) was corrected by a factor of 1.47, since the ability of ethidium bromide to intercalate into this DNA topoisomeric form is decreased relative to open circular and linear DNA [23]. The results are expressed as graphic representations of the best correlation of the concentration in order to maximize Form III (linear) plasmid DNA.

2.7. Circular dichroism assay

The experiments were performed as described in the literature [24]. Samples of 200 μmol L⁻¹ CT-DNA in 10 mmol L⁻¹ of HEPES buffer were titrated with the Zn(II) ternary complexes (1 and 2) and N-donor ligand Nic in concentrations ranging from 52.63 to 416.66 μmol L⁻¹ (molar ratios of 0.1 to 1.0) and 0 (negative control) in a 5 mm quartz cuvette. The screenings were realized ranging from λ 240 to 400 nm at 37 °C immediately after the addition of the compounds. Results were plotted on xy graphics Spectra containing only the complexes and DNA (H₂O:DMF 80:20).

2.8. Brine shrimp (*A. salina*) cytotoxicity assay

Acute toxicity assays against the brine shrimp assay were performed as described by dos Santos et al. [25]. Briefly, *A. salina* eggs (50 mg) were hatched in a cubic glass aquarium with 2 L of artificial brine (18 g L⁻¹ of synthetic marine salt, phosphate and nitrate free, in sterile water) for 24 h over an air bubbling system and artificial light (clear halogen bulb, 60 W) at 27–30 °C. Twenty nauplii were transferred to each position of 24 well plates with 800 μL of brine. The complexes 1, 2 and Nic were grounded with NaCl and suspended in Milli-Q water and transferred (200 μL) to the plate wells (four replicates) at five concentrations (1200, 960, 720, 480, and 240 μg mL⁻¹) with Milli-Q water as a negative control. The plates were kept for 24 h under the environmental conditions of the hatching system in the absence of light. After light stimulation, motionless nauplii were considered dead under stereoscopic microscope visualization. Each experiment was performed two times on different days.

Results were expressed as the mean ± standard deviation obtained

from independent experiments. Statistical significance was evaluated by *t*-test and one way analysis of variance (ANOVA) with completely randomized design (CRD) and Tukey's test to assess statistical differences in case of normal distribution. Significance was accepted at *p* value ≤ 0.05 using OriginPro 2016 software (test version) for Windows.

3. Results and discussion

3.1. Chemical characterization of complexes 1 and 2

All analytical tools used in the analysis of complexes 1 and 2 made additional contributions to the final elucidation of the structures. FTIR, ^1H and ^{13}C NMR, UV-Vis and HRMS ESI (+) full scan spectra are given in supplemental material. The ^1H NMR data suggest that both complexes have a minimal formula $[\text{Zn}(\text{R-COO}^-)_2\text{Nic}]$, with the FTIR spectra showing the presence of main stretches for the R-COO $^-$ and R-CONH $_2$ functional groups present in the ligands [26]. The HRMS-MS mass spectra showed the same pattern of molecular ion formation stabilized by the loss of a valence binder (Diclof or Ibup), followed by the loss of a Nic binder (Figs. 1 and 2). The monoisotopic mass pattern confirms that the ions have a unit positive charge, two Zn atoms and the presence of three R-COO $^-$ ligands and two Nic ligands. The analysis suggests that the complexes are a binuclear structure of composition $\text{Zn}_2(\text{R-COO}^-)_4(\text{Nic})_2$ and corroborate the 2:1 proportionality of (R-COO $^-$):(Nic) obtained by the integrated peak area of ^1H RMN.

Crystal data and more details of the data collection and refinements of complexes 1 and 2 are presented in (see Table 1).

3.2. Structural determination of complex 1

Complex 1 is binuclear with Zn II atoms coordinated individually by two Diclof units. A Diclof molecule is monodentate (valence bond Zn-O distance of 1.992 Å) with the second being bidentate (O-Zn-O chelate bonds, 2.084 and 2.291 Å) (Fig. 3). A Nic molecule coordinates to first Zn atom by pyridine ring (Zn-N 2.042 Å), with the oxygen of the amide group binding to the second one (Zn-O 2.031 Å) to form a molecular bridge. The main bonds and angles are shown in Table 2.

The Fig. 4 shows that the intermolecular environment, which is maintained by hydrogen bonds. The Diclof chelating molecule has an intramolecular hydrogen bond between the secondary amine and a carbonyl oxygen, whereas the second oxygen (valence atom) binds to the hydrogen NH $_2$ of Nic (1.944 and 1.918 Å). The second hydrogen NH $_2$ group of Nic binds to the valence oxygen (2.048 and 2.131 Å) of the monodentate Diclof ligand of the neighbouring molecule, which provide four intermolecular hydrogen bonds per binuclear unit. The arrangement presents the lamellar packing of successive molecular layers with a thickness of about 15 Å. The lamellar core is composed of the Zn II coordinating sphere and the Nic ligands attached to the side molecules by hydrogen bonds, while the two outer lamella interfaces are composed of the side chains of the Diclof groups positioned in a

plane orthogonal to the plane of the lamella. The lamellar interfaces are linked by the Van Der Waals (VDW) interaction between the 2,5-dichlorophenyl groups positioned at the ends of the chains of the Diclof groups.

The binuclear structure observed in the X-ray analysis for complex 1 corroborates with the other results obtained in the HRMS, NMR and FTIR spectroscopies. HRMS analysis has shown the ion m/z 1253.9655 $[\text{M-Diclof}]^+$ arising from the breakdown of the monodentate valence bond (Zn-O, 1.992 Å) (Table 2) and elimination of a Diclof molecule. MS2 fragmentation of the $[\text{M-Diclof}]^+$ ion yields two fragments at m/z 1131.9225 $[\text{M-Diclof-Nic}]^+$ and m/z 1009.8929 $[\text{Zn}_2(\text{Diclof})_3]^+$ corresponding to subsequent losses of the N-donor molecules, which maintain their bonds to the Zn atoms by longer and weak monodentate coordination bonds (Zn-O (Nic) 2.030 Å; Zn-N (Nic) 2.042 Å).

The ^1H NMR results for complex 1 in DMSO- D_6 show the proportionality of 2:1 between Diclof:Nic-like crystallographic results. The two polar hydrogens of the amide function are shifted at δ 7.64 and 8.19 ppm as the result of the epimerization of the C-N bond in a free-rotation environment observed in Fig. 4 in solution [26]. The FTIR data corresponding to the asymmetric ν_a and symmetric ν_s vibrations of the COO groups in complex 2 show a variation $\Delta\nu_{(\text{COO})} = 178 \text{ cm}^{-1}$, whereas the precursor Zn(Ibup) $_2$ has $\Delta\nu_{(\text{COO})} = 128 \text{ cm}^{-1}$. The results of $\Delta\nu_{(\text{COO})}$ confirm that the structure of complex 2 is a bridging *syn-syn* chelate, whereas its precursor is a chelating bidentate molecule ($\Delta\nu_{(\text{COO})}$ bridging $> \Delta\nu_{(\text{COO})}$ chelating) [6,27].

3.3. Structural determination of complex 2

The structure consists of centre-symmetric binuclear Zn units, which is typical of $[\text{M}_2(\text{carboxylate})_4(\text{L})_2]$ complexes, with the ligands providing four O-Zn bond bidentate carboxylate residues. The Ibup binders exhibit a blade wheel arrangement on the Zn-Zn axis, an arrangement which has already been described by Darawsheh et al. for valproate complexes and monodentate N-donor binders [28]. In this line, each Zn II atom has a pentavalent square pyramidal coordinate geometry with the apex of the pyramid being formed by the axial coordination of the Nic N-donor. Nic rings placed perpendicularly to the amide groups have shown one hydrogen bond with the carboxylate group (see Fig. 5).

The structures are grouped as molecular chains along the axis containing the Nic ligands through reciprocal hydrogen bonds (2.115 Å) between a NH $_2$ group and an oxygen atom of the carbonyl group of an Ibup linker positioned perpendicular to the spatial plane of Nic. A second bond occurs symmetrically on the opposite side of the structure, allowing the formation of the molecular strand. The macrostructure is composed of a stack of lamellae with apolar interfaces joined by reciprocal VDW interactions between the lateral chains of the Ibup groups placed around molecular axes. These weak intermolecular interactions can be linked to the low melting point (148 °C) and high solubility of 2 in organic solvents.

The crystallographic data of complex 2 was confirmed by HRMS, ^1H

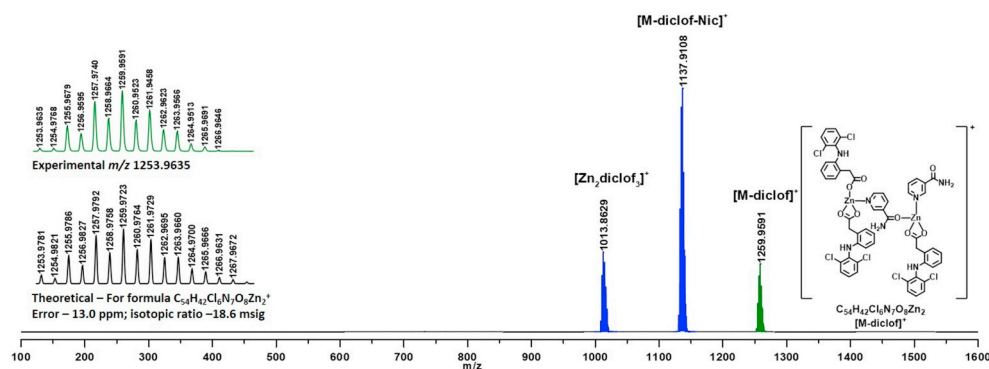


Fig. 1. MS-MS spectrum of m/z 1259.9635 $[\text{M-Diclof}]^+$ at 15 eV with monoisotopic peak at m/z 1253.9635. Isotopic pattern of parent ion is presented over simulated isotopic pattern. Two peaks at m/z 1137.9108 and 1013.8629 corresponds of two subsequent loss of Nic. (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

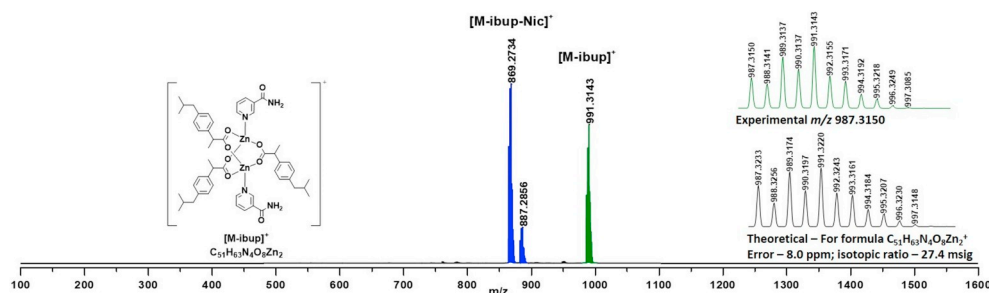


Fig. 2. MS-MS spectrum of m/z 991.3168 $[M-Ibup]^+$ at 15 eV with monoisotopic peak at m/z 987.3150. Isotopic pattern of parent ion is presented over simulated isotopic pattern. A loss of Nic is observed at m/z 869.2734 and a change Nic to H_2O can be seen at m/z 887.2856. (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

NMR and FTIR spectroscopies. Analysis of complex 2 solution (methanol: H_2O) by low energy ESI-MS-MS (5 eV CID) produces the major ion m/z 987.3175, which is the exact mass of the complex with the loss of a valence binder $[M-Ibup]^+$. The MS-MS fragmentation of this ion at 15 eV produces the derivative ion with m/z 865.2731 that results from the loss of a Nic equivalent $[M-Ibup-Nic]^+$, and its derivative at m/z 883.2853 with the capture of a H_2O molecule $[M-Ibup-Nic + H_2O]^+$ (Fig. 2). The 1H NMR results for complex 2 in $CDCl_3$ shows the proportionality of 2:1 between Ibup:Nic-like crystallographic results. The two polar hydrogens of the amide function are shifted at δ 5.04 and 8.24 ppm as the result of the epimerization of the C–N bond in a free-rotation environment observed in Fig. 6 [26]. The FTIR data corresponding to the asymmetric ν_a and symmetric ν_s vibrations of the COO groups in complex 2 show a variation $\Delta\nu_{(COO)} = 178\text{ cm}^{-1}$, whereas the precursor $Zn(Ibup)_2$ has $\Delta\nu_{(COO)} = 128\text{ cm}^{-1}$. The results of $\Delta\nu_{(COO)}$ confirm that the structure of complex 2 is a bridging *syn-syn* chelate, whereas its precursor is a chelating bidentate molecule ($\Delta\nu_{(COO)}$ bridging $>$ $\Delta\nu_{(COO)}$ chelating) [6,27] (see Table 3).

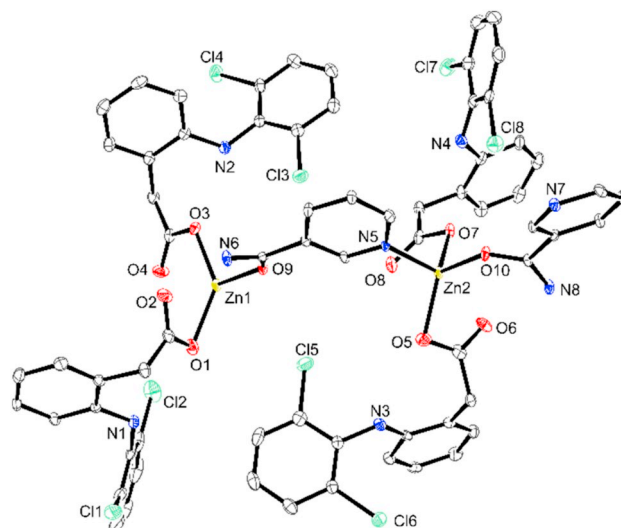


Fig. 3. ORTEP view of molecular structure of 1.

Table 1
Crystal data and structure refinement for 1 and 2.

Parameters	1	2
Empirical formula	$C_{68}H_{52}Cl_8N_8O_{10}Zn_2$	$C_{64}H_{80}N_4O_{10}Zn_2$
Formula weight	1555.52	1196.06
T/K	120(2)	294(2)
Radiation, $\lambda/\text{\AA}$	Mo $K\alpha$; 0.71073	Mo $K\alpha$; 0.71073
Crystal system, space group	Monoclinic, $C2/c$	Triclinic, $P-1$
Unit cell (\AA) dimensions		
A	12.4146(6)	10.8397(5)
B	17.4369(8)	11.1735(5)
C	31.1732(12)	15.6644(7)
$\alpha(^{\circ})$	90	109.941(2)
$\beta(^{\circ})$	97.722	95.604(2)
$\gamma(^{\circ})$	90	111.251(2)
$V(\text{\AA}^3)$	6686.9(5)	1608.32(13)
Z	4	1
Calculated density (g cm^{-3})	1.545	1.235
Absorption coefficient (mm^{-1})	1.103	0.803
$F(000)$	3168	632
Crystal size (mm)	$0.304 \times 0.170 \times 0.075$	$0.30 \times 0.17 \times 0.08$
Theta range for data collection	2.30 to 30.51	2.27 to 29.60
Index ranges	$-17 \leq h \leq 9$ $-21 \leq k \leq 19$ $-35 \leq l \leq 43$	$-15 \leq h \leq 11$ $-14 \leq k \leq 15$ $-19 \leq l \leq 21$
Reflections collected/unique	22,333/20,343	24,445/9001
Completeness to the theta max	99.6%	99.5%
Absorption correction	Multi-scan	Multi-scan
Max. and min. transmission	0.740 and 0.862	0.9486 and 0.7847
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2	Full-matrix least-squares on F^2
Data/restraints/parameters	20,343/0/865	9001/0/369
Goodness-of-fit on F^2	1.087	0.996
Final R index [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0647$, $wR_2 = 0.1525$	$R_1 = 0.0508$, $wR_2 = 0.1195$
R indices	$R_1 = 0.0947$, $wR_2 = 0.1670$	$R_1 = 0.0891$, $wR_2 = 0.1341$
Largest diff. peak and hole ($e\text{\AA}^{-3}$)	1.135 and -0.787	2.666 d -0.578

Table 2
Selected bond distances (Å) and bond angles (°) for 1.

Bond	Distance (Å)	System	Angle (°)
Zn(2)-O(7)	1.992(3)	O(7)-Zn(2)-O(10)	102.33(13)
Zn(2)-O(10)	2.030(3)	O(7)-Zn(2)-N(5)	103.93(15)
Zn(2)-N(5)	2.042(4)	O(10)-Zn(2)-N(5)	94.82(13)
Zn(2)-O(5)	2.084(3)	O(7)-Zn(2)-O(5)	138.29(14)
Zn(2)-O(6)	2.291(4)	O(10)-Zn(2)-O(5)	109.78(14)
Zn(2)-C(42)	2.511(5)	N(5)-Zn(2)-O(5)	99.25(14)
Zn(1)-O(3)	1.989(3)	O(7)-Zn(2)-O(6)	93.75(13)
Zn(1)-O(9)	2.030(3)	O(10)-Zn(2)-O(6)	92.25(12)
Zn(1)-N(7)#1	2.045(4)	N(5)-Zn(2)-O(6)	159.05(13)
Zn(1)-O(1)	2.097(3)	O(5)-Zn(2)-O(6)	59.80(13)
Zn(1)-O(2)	2.270(4)	O(3)-Zn(1)-O(9)	101.36(12)
Zn(1)-C(14)	2.515(5)	O(3)-Zn(1)-N(7)#1	100.75(15)
		O(9)-Zn(1)-N(7)#1	94.74(13)
		O(3)-Zn(1)-O(1)	138.18(13)
		O(9)-Zn(1)-O(1)	112.17(14)
		N(7)#1-Zn(1)-O(1)	100.63(14)
		O(3)-Zn(1)-O(2)	95.28(13)
		O(9)-Zn(1)-O(2)	93.01(12)
		N(7)#1-Zn(1)-O(2)	160.43(13)
		O(1)-Zn(1)-O(2)	59.81(13)

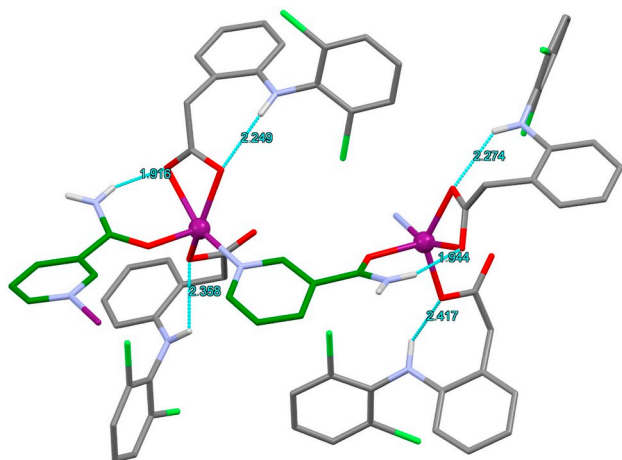


Fig. 4. Molecular arrangement of 1 showing grouped Diclof chains in the external plane and Nic unities (green moieties) placed in a perpendicular plane of the unitary cell. Only polar H-bonded are showed to clear view.

3.4. Stability assay

To ensure that the complexes are stable for long periods of incubation, mainly in the cytotoxicity and genotoxicity experiments, molecular conductivity Λ experiments were performed. The results obtained are shown in Fig. 7 and according to Dean [20], which indicate that precursors and ternary complexes are not electrolytes. The results have been corroborated by Pich et al. (2019) in a similar experiment using Cu^{2+} ternary complexes [7]. Therefore, maintaining the apparent molar conductivity as a function of time without increasing or decreasing trend indicates that they are stable to dissociation or solution ionization over a period of 96 h.

3.5. DNA interaction activity

Initially complexes 1, 2 and Nic were tested for their ability to cleave the supercoiled plasmid DNA (F 1), forming a linear (F 2) or linear (F 3). In the experiments realized in the absence of light conditions (Fig. 8), it can be observed that there was no significant variation in complexes 1 and 2 when compared to the negative control, but a small tendency toward increasing the DNA cleavage activity can be observed in the higher concentrations.

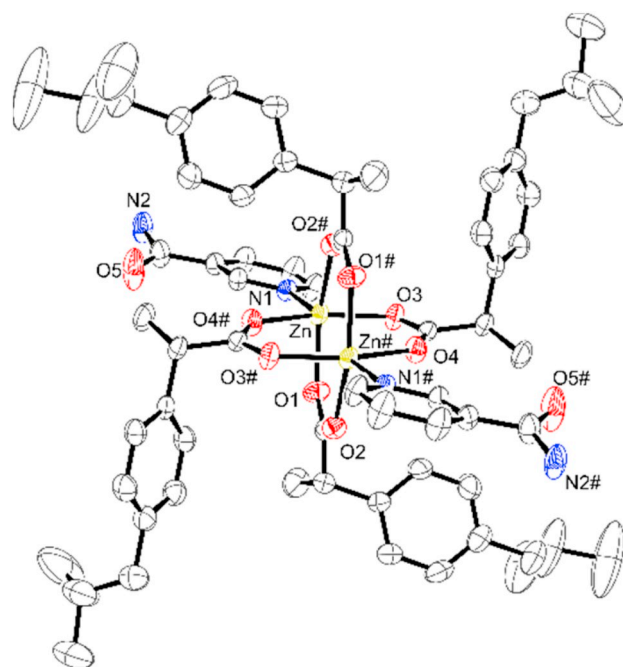


Fig. 5. View of the molecular structure of 2, showing the atom numbering scheme.

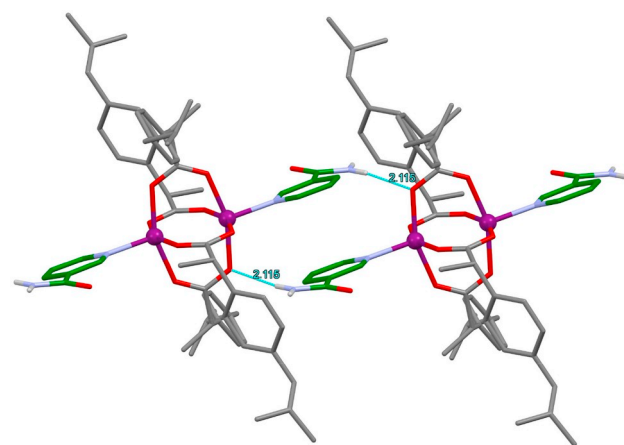


Fig. 6. Crystal arrangement of 2. The molecular chain are jointed by reciprocal intermolecular hydrogen bonds of Nic groups and Ibup carboxyl groups. Lateral chains are jointed by intermolecular VDW interactions.

Table 3
Selected bond distances (Å) and bond angles (°) for 2.

Bond	Distance (Å)	System	Angle (°)
Zn-O(3)	2.0154(16)	O(3)-Zn-O(4)#1	158.95(7)
Zn-O(4)#1	2.0313(17)	O(3)-Zn-N(1)	103.71(7)
Zn-N(1)	2.0395(18)	O(4)#1-Zn-N(1)	97.32(7)
Zn-O(1)	2.0484(17)	O(3)-Zn-O(1)	88.05(8)
Zn-O(2)#1	2.0700(17)	O(4)#1-Zn-O(1)	88.01(8)
Zn-Zn#1	2.9520(5)	N(1)-Zn-O(1)	98.49(7)
O(3)-C(21)	1.263(3)	O(3)-Zn-O(2)#1	87.98(7)
O(4)-C(21)	1.243(3)	O(4)#1-Zn-O(2)#1	88.39(7)
O(4)-Zn#1	2.0313(17)	N(1)-Zn-O(2)#1	102.32(7)
O(1)-C(8)	1.242(3)	O(1)-Zn-O(2)#1	159.17(7)
O(2)-C(8)	1.259(3)	O(3)-Zn-Zn#1	86.41(5)
O(2)-Zn#1	2.0700(17)	O(4)#1-Zn-Zn#1	72.55(5)
		N(1)-Zn-Zn#1	169.44(6)
		O(1)-Zn-Zn#1	78.56(5)
		O(2)#1-Zn-Zn#1	80.78(5)

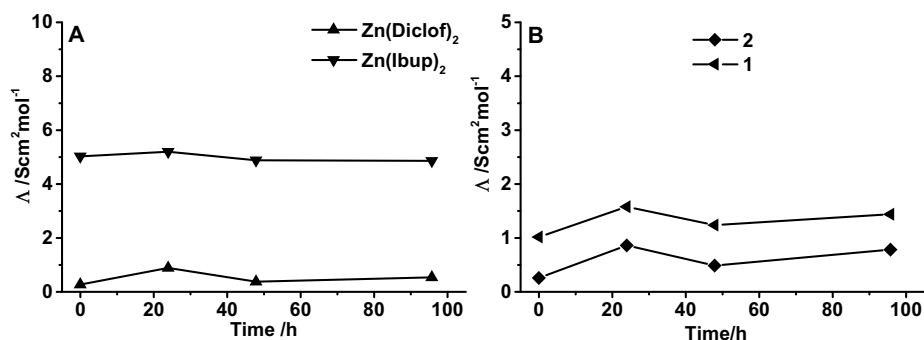


Fig. 7. Molar conductivity variance of the precursor (A) and 1 and 2 (B) at 0.01 mol L^{-1} in DMF of 96 h.

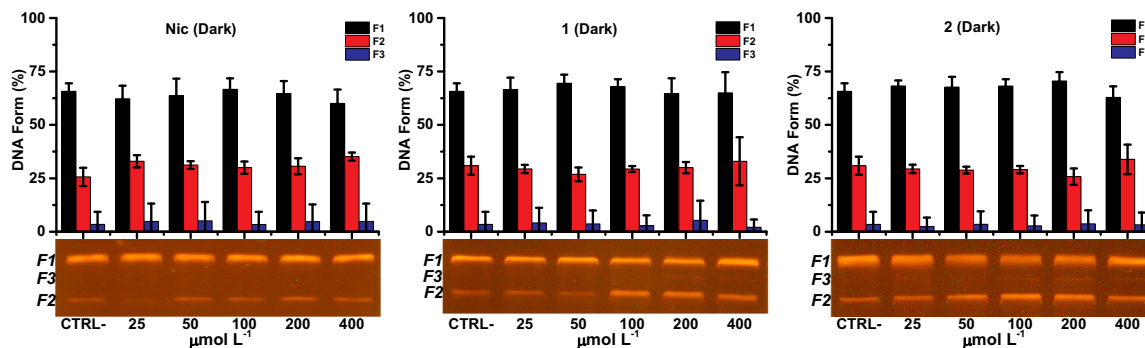


Fig. 8. Plasmid DNA breaks induced by complex exposition at five different concentrations and negative control (CTRL) in dark conditions at 37 °C and 24 h. No significant results can be observed. (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

In the experiments under UV radiation, results similar to the ones obtained in the absence of light were obtained, which means that no significant results were observed when compared to the negative control activity in all experiments in Fig. 9. It can be observed that complex 1 at UV light induction had a tendency to increase the DNA F2 ratio from 200 to 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$, but no significant variation in the negative control can be observed. In addition, no double break formations (DNA F2) were detected in this experiment, indicating that this complex does not undergo photoactivation at 300 nm. Complex 2 did not have DNA breaking ability at all concentrations tested, presenting no UV excitation.

The complexes were incubated with pBSK II plasmid DNA to measure the type of induced damage these complexes can cause to the molecular structure of the DNA under direct exposure and also by photoinduction with UV radiation. In the case of 24 h exposure at 37 °C in the absence of light, the major genetic damage double breaks (F3) and the minor damage single breaks (F2) did not present significant variations between all concentrations and the negative control. For the

photoinduction experiment, the results also showed that there was no statistical difference between the controls and all the complex concentrations, besides only producing single breaks. This experiment showed that both complexes had low cleavage activity in both experiments and also showed that these complexes were not able to produce radical species or other reactive species to DNA by UV light induction.

3.6. Circular dichroism experiment

The effect of the complexes on the secondary structure of DNA was verified by circular dichroism (CD) spectroscopy (Fig. 10). Free Nic did not show any kind of detectable DNA interaction at every concentration used in this experiment. The result was consistent, as Nic is an essential endogenous molecule with proven intracellular function [10]. However, the apparent inactivity of free Nic can be explained by two different factors: the reciprocal coulombic repulsion between the electronegative groups (amide and imine groups on the pyridine ring) and the external phosphate groups on the DNA double-helix and the low

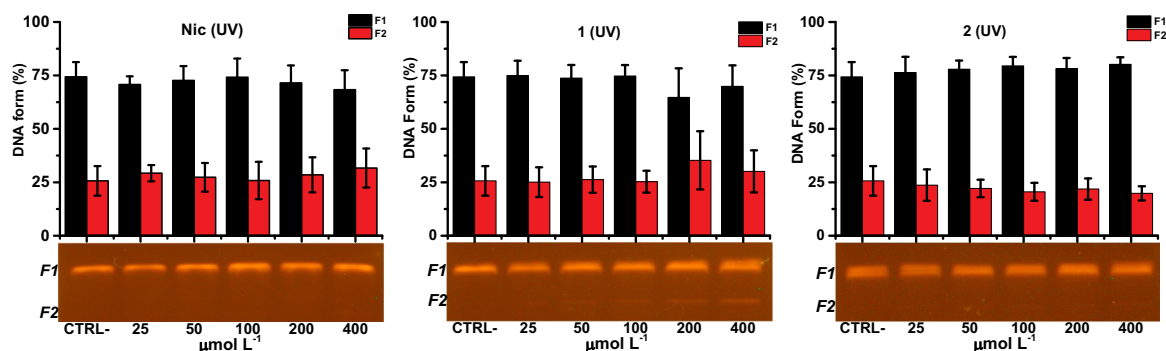


Fig. 9. Plasmid DNA breaks induced by complex exposition at five different concentrations under UV light (30 s) at room temperature over. No significant results can be observed. (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

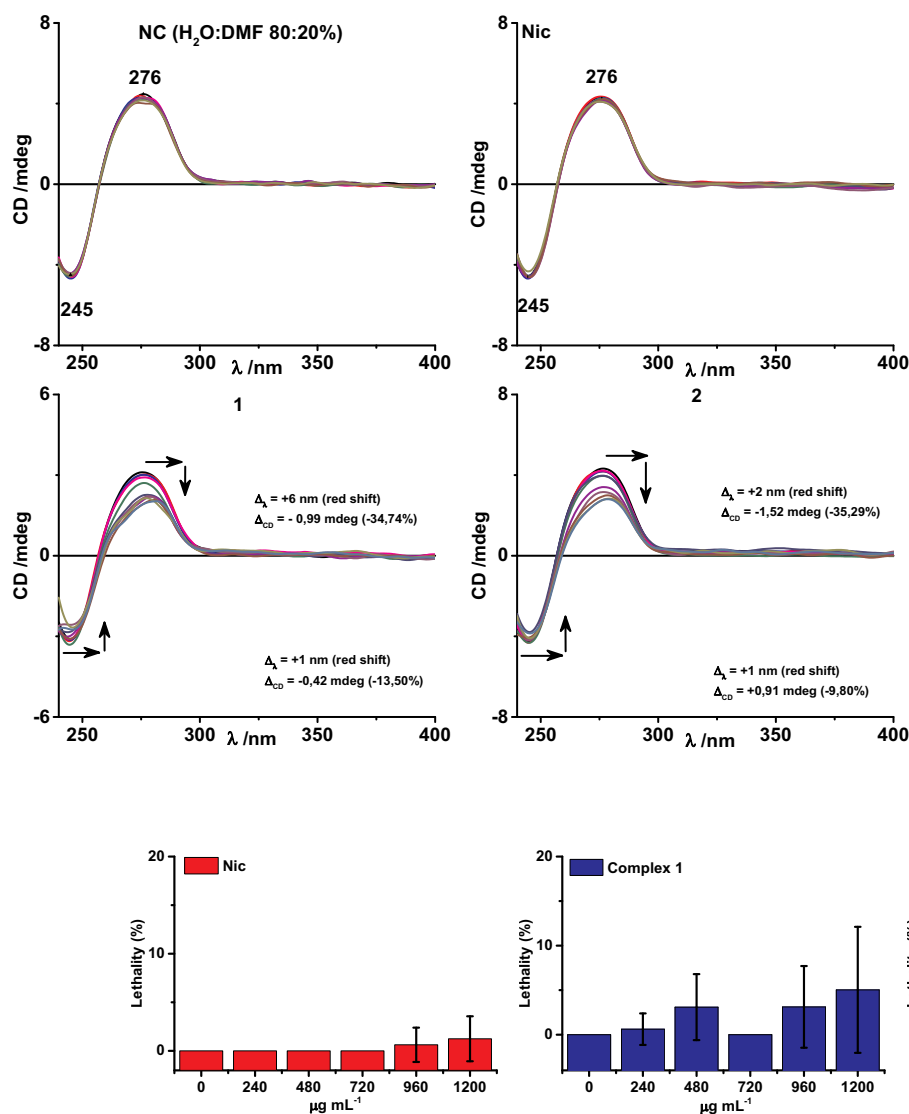


Fig. 10. Circular dichroism of CT-DNA titrated with negative control (solvent), nicotinamide alone, and complexes 1 and 2 in concentrations ranging from 0.00 to 222.22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (molar ratios of 0.10 to 1.00) and 0 (NC). (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig. 11. Acute toxicity of Nic, 1 and 2 against *A. salina* after 24 h of exposition. No significant toxicity can be observed in the concentrations tested. (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

flatness of the Nic molecule by the epimerization of the amide group reducing the likelihood of groove intercalations.

The two complexes showed alterations in the λ 245 and 275 nm bands that are associated with helicity and base-pair stacking, respectively [29]. Complex 1 promoted a shortening of the 275 nm band corresponding to 34%, relative to the control stopped at addition 9 (181.82 $\mu\text{mol L}^{-1}$, molar ratio 1:1), promoting a red shift of 6 nm. The negative band at 245 nm showed a shortening of 13% at addition 9, with a red shift of 1 nm. In this sense, complex 2 also promoted hypochromism of the 276 nm band corresponding to 35%, relative to the control stopped at addition 9 (391.30 $\mu\text{mol L}^{-1}$), promoting a red shift of 2 nm. The negative band at 245 nm showed a shortening of 9.8% at addition 9, with a red shift of 1 nm. These results demonstrate that the interactions between the complexes and DNA molecule are due to groove binding events [8,30]. The interactions evidenced tend to occur in the large DNA groove because both binuclear molecule complexes are larger than small molecules like their starting materials [31]. The attractive factor can be attributed to the fact that both complexes have large molecular peripheries with electrophilic structures formed by lateral chains of Diclof or Ibup.

3.7. Cytotoxicity activity against brine shrimp (*A. salina*)

The toxicity of the complexes can be understood as the result of exposure of the organism to the xenobiotic for a stipulated period of time. Filtering organisms, such as brine shrimp, accumulate high doses of the xenobiotic in small intervals of time, because they have high mobility in the medium, short life cycle and accelerated metabolism. Free-swimming and sowing of the medium in the search for food causes the xenobiotic to accumulate rapidly in the shrimp organism and express the toxicity in the first hour of exposure [32]. Both complexes 1 and 2 or Nic alone showed no apparent toxicity to *A. salina* in 24 h (Fig. 11). For comparison, the concentrations tested up to 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were not able to present lethality of 10% of individuals.

The choice of Nic as a control is justified by the fact that this molecule is the common point between the experiments, being an endogenous molecule and having a lower molar mass than the two complexes. The result shows that Nic is a good negative control, since it did not produce significant lethality at all concentrations tested when compared to the negative control (0). The tests performed with complexes 1 and 2 indicate that both complexes have no measurable toxicity at concentrations up to 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The two complexes don't differ statistically intra- or inter- experimentally, showing that both

complexes can't be considered toxic at maximum concentrations of work [33]. It is concluded that the complexed form of the Zn II NSAIDs and the Nic binder produces molecules of low toxicity, no DNA cleavage activity (instead of its ability to interact with the molecule) and low chemical lability in polar solvent. Both complexes proved to be a safe transport medium for two molecules with different anti-inflammatory actions in the same molecular system.

4. Conclusion

Complex **1** is composed of binuclear units linked in chains by Nic molecular bridges with Diclof groups coordinated asymmetrically to the Zn II core, which leads to the formation of five coordinated spheres in the form of distorted pyramids. Complex **2** is a binuclear molecule with four Ibupr groups chelated by *syn-syn* mode in a *tetrakis-μ* arrangement. The sphere has five coordination as a pyramidal square base form, with apices formed by monodentate Nic groups.

In both cases, the steric conformation of these bulky structures contributes to the low interaction of these molecules with the double helix of DNA observed in circular dichroism experiments, where only similar groove interactions can be highlighted for both complexes. A similar assessment can be made for cases of induction of plasmidial DNA breakage, where dark and UV light-induced activity did not show significant differences in relation to the negative controls.

In this sense, Zinc-NSAIDs and Nic complexes were synthesized in order to obtain mixed molecules with the potential to explore concomitant pharmacological activities of the two ligands for the same pharmacophore target, in this case COX enzymes. These new molecules have shown that the presence of Nic as a neutral binder improves the solubility of the complexes. The absence of DNA cleavage activity, together with the results obtained in the *A. salina* acute toxicity test, shows that both compounds are tolerable compounds with pharmacological potential to be applied as an anti-inflammatory agent with improved characteristics as compared to parent drugs. Therefore, these compounds should be explored *in vitro* or *in vivo* to identify activity, bioavailability, and toxicity of this drug prototype.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

Thanks to UCS, CEBIME-UFSC, UNESC and UFSM. Thanks to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Ministério da Educação - Brasil funding research.

Author contributions

Paulo Roberto dos Santos and Franco Smiderle carried out all synthesis, chemical isolation and spectroscopic analysis, besides having prepared chemical stability and toxicity experiments. Françoise Dumas guided in the chemical synthesis and literature review. Claus Tröger Pich carried out circular dichroism and Plasmidial DNA interactions assays and wrote the discussion of his experiments. Sidnei Moura guided all studies, wrote the abstract, introduction and conclusion, and besides revised the manuscript. Davi Back carried out crystallographic experiments, wrote the discussion of his experiments.

Appendix A. Supplementary material

CCDC-1912900, and 1912900 contain the supplementary crystallographic data for the complexes **1** and **2**, respectively. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Center, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+ 44) 1223-336-033; or

e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk. Supplementary data to this article can be found online at doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111046>.

References

- [1] B. Halling-Sorensen, S.N. Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lutzhoft, J. SE, Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals substance in the environment - a review, *Chemosphere* 36 (1998) 357–393, [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00354-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8).
- [2] S. Hamamci Alisir, B. Sariboga, S. Caglar, O. Buyukgungor, Synthesis, characterization, photoluminescent properties and antimicrobial activities of two novel polymeric silver(I) complexes with diclofenac, *J. Mol. Struct.* 1130 (2017) 156–164, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.10.026>.
- [3] G.C. Seuanes, M.B. Moreira, T. Petta, M.P.F. De Moraes Del Lama, L.A.B. De Moraes, A.R.M. De Oliveira, R.M.Z.G. Naal, S. Nikolaou, Novel binuclear μ -oxo diruthenium complexes combined with ibuprofen and ketoprofen: interaction with relevant target biomolecules and anti-allergic potential, *J. Inorg. Biochem.* 153 (2015) 178–185, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.08.004>.
- [4] D. Kovala-Demertzi, Transition metal complexes of diclofenac with potentially interesting anti-inflammatory activity, *J. Inorg. Biochem.* 79 (2000) 153–157, [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(99\)00175-0](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(99)00175-0).
- [5] H. Abu Ali, B. Jabali, Synthesis, characterization and biological activity of novel complexes of zinc(II) diclofenac with nitrogen based ligands, *Polyhedron*. 107 (2016) 97–106, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.01.010>.
- [6] H. Abu Ali, S.N. Omar, M.D. Darawsheh, H. Fares, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of zinc(II) ibuprofen complexes with nitrogen-based ligands, *J. Coord. Chem.* 69 (2016) 1110–1122, <https://doi.org/10.1080/00958972.2016.1149819>.
- [7] C.T. Pich, P.R. Dos Santos, T.V.O. Fortunato, M. Chiarello, I.M. De Oliveira, N.E. Ghermani, M. Machado, M. Roesch-ely, H. Terenzi, J.A.P. Henriques, F. Dumas, N. E. Germani, S. Moura, Mixed Ternary Mononuclear Copper(II) Complexes Based on Valproic Acid with 1,10-Phenanthroline and 2,2'-Bipyridine Ligands: DNA Interaction and Cytotoxicity in V79 Cells, *J. Braz. Chem. Soc.* 30 (2019) 597–613. doi:10.21577/0103-5053.20180229.
- [8] T. Bortolotto, P.P. Silva-Caldeira, C.T. Pich, E.C. Pereira-Maia, H. Terenzi, Tunable DNA cleavage activity promoted by copper(II) ternary complexes with N-donor heterocyclic ligands, *Chem. Commun.* 52 (2016) 7130–7133, <https://doi.org/10.1039/c6cc03142k>.
- [9] C.A.B. De Maria, R.F.A. Moreira, A intrigante bioquímica da niacina - Uma revisão crítica, *Quim Nova* 34 (2011) 1739–1752.
- [10] M. Knip, I.F. Douek, W.P.T. Moore, H.A. Gillmor, A.E.M. McLean, P.J. Bingley, E.A.M. Gale, Safety of high-dose nicotinamide: a review, *Diabetologia*. 43 (2000) 1337–1345, <https://doi.org/10.1007/s001250051536>.
- [11] R.W. Pero, B. Axelsson, D. Siemann, D. Chaplin, G. Dougherty, Newly discovered anti-inflammatory properties of the benzamides and nicotinamides, *Mol. Cell. Biochem.* 193 (1999) 119–125, <https://doi.org/10.1023/A:1006932714982>.
- [12] J.S. Ungerstedt, M. Blombäck, T. Söderström, Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines, *Clin. Exp. Immunol.* 131 (2003) 48–52, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02031.x>.
- [13] M. Lappas, M. Permezel, The anti-inflammatory and antioxidative effects of nicotinamide, a vitamin B 3 derivative, are elicited by FoxO3 in human gestational tissues: implications for preterm birth, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 1195–1201, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.10.009>.
- [14] S. Ide, A. Ataç, Ş. Yurdakul, Spectroscopic and structural studies on dichlorobis (nicotinamide)zinc(II), *J. Mol. Struct.* 605 (2002) 103–107, [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(01\)00747-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(01)00747-5).
- [15] V. Zelenák, M. Sabo, W. Massa, P. Llewellyn, Preparation, characterization and crystal structure of two zinc(II) benzoate complexes with pyridine-based ligands nicotinamide and methyl-3-pyridylcarbamate, *Inorganica Chim. Acta.* 357 (2004) 2049–2059, <https://doi.org/10.1016/j.jica.2004.01.016>.
- [16] M.W. Tan, L.G. Rahme, J. a Sternberg, R.G. Tompkins, F.M. Ausubel, *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 2408–2413. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2408>.
- [17] Q.S.& A. Technologies, QIAGEN® Plasmid Purification Handbook, 2012.
- [18] G.M. Sheldrick, A short history of SHELX, *Acta Crystallogr. Sect. A.* 64 (2007) 112–122, <https://doi.org/10.1107/S0108767307043930>.
- [19] L.J. Farrugia, WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837–838, <https://doi.org/10.1107/S0021889899006020>.
- [20] J.A. Dean, Lange's Handbook of Chemistry, 15th ed., McGraw-Hill, 1999. doi:<https://doi.org/10.1080/10426919008953291>.
- [21] D.D.M. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology., 2nd ed., 2002.
- [22] A. Neves, H. Terenzi, R. Horner, A. Horn, B. Szpoganicz, J. Sugai, Hydrolytic DNA cleavage promoted by a dinuclear iron(III) complex, *Inorg. Chem. Commun.* 4 (2001) 388–391, [https://doi.org/10.1016/S1387-7003\(01\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S1387-7003(01)00233-7).
- [23] P.P. Silva, W. Guerra, J.N. Silveira, A.M.D.C. Ferreira, T. Bortolotto, F.L. Fischer, H. Terenzi, A. Neves, E.C. Pereira-Maia, Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 6414–6424, <https://doi.org/10.1021/ic101791r>.

- [24] T. Bortolotto, P.P. Silva, A. Neves, E.C. Pereira-Maia, H. Terenzi, Photoinduced DNA cleavage promoted by two copper(II) complexes of tetracyclines and 1,10-phenanthroline, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 10519–10521, <https://doi.org/10.1021/ic201349s>.
- [25] P.R. Dos Santos, M. Roesch Ely, F. Dumas, S. Moura, Synthesis, structural characterization and previous cytotoxicity assay of Zn (II) complex containing 1, 10-phenanthroline and 2, 2'-bipyridine with valproic acid, *Polyhedron*. 90 (2015) 239–244. doi:<https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.02.012>.
- [26] R. Silverstein, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 6th ed., New York, 1998.
- [27] V. Zelenák, Z. Vargová, K. Györyová, Correlation of infrared spectra of zinc(II) carboxylates with their structures, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 66 (2007) 262–272, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.02.050>.
- [28] M. Darawsheh, H. Abu Ali, A.L. Abuhijleh, E. Rappocciolo, M. Akkawi, S. Jaber, S. Maloul, Y. Hussein, New mixed ligand zinc(II) complexes based on the antiepileptic drug sodium valproate and bioactive nitrogen-donor ligands. Synthesis, structure and biological properties., *Eur. J. Med. Chem.* 82 (2014) 152–163. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.067>.
- [29] N. Berova, K. Nakanishi, R.W. Woody, *Circular Dichroism: Principles and Applications* (2000) 912.
- [30] S. Dhar, M. Nethaji, A.R. Chakravarty, Effect of charge transfer bands on the photo-induced DNA cleavage activity of [1-(2-thiazolylazo)-2-naphtholato]copper(II) complexes, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 805–812, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.12.014>.
- [31] A.A. Almaqwashi, T. Paramanathan, I. Rouzina, M.C. Williams, Mechanisms of small molecule-DNA interactions probed by single-molecule force spectroscopy, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 3971–3988, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw237>.
- [32] B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta Med.* 45 (1982) 31–34.
- [33] P.R. dos Santos, M.R. Ely, F. Dumas, S. Moura, Synthesis, structural characterization and previous cytotoxicity assay of Zn(II) complex containing 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine with valproic acid, *Polyhedron*. 90 (2015) 239–244, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.02.012>.