

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“COMPLEXOS METÁLICOS LUMINESCENTES COM
ÁCIDOS FENÓLICOS COORDENADOS: ALVOS SELETIVOS
A MITOCÔNDRIAS E MAPEAMENTO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE IN VITRO E IN VIVO POR TÉCNICAS
FLUORESCENTES”**

Eldevan dos Santos Silva*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA.

Orientadora: Professora Dra. Rose Maria Carlos

*bolsista FAPESP

SÃO CARLOS - SP

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Eldevan dos Santos Silva, realizada em 16/11/2017:

Profa. Dra. Rose Maria Carlos
UFSCar

Prof. Dr. Antonio Carlos Massabni
UNESP

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva
UFSCar

Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago
Embrapa

Prof. Dr. João Batista Fernandes
UFSCar

Dedicatória

*Gostaria de dedicar este trabalho
aos meus pais (Esmeraldo e
Magnei), ao meu irmão Eneilson e
minha irmã Magnoélia, à minha
companheira Nay Nogueira e meu
Filho Miguel pelo amor, carinho,
paciência e apoio nos momentos
bons e difíceis. Amo muito vocês!*

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.

(Albert Einstein)

“Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão.”

(Chico Xavier)

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”.

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

Esse é um momento bem especial, aquele momento no qual agradecemos às pessoas boas, pesquisadores e amigos. Pessoas que contribuíram nesta missão. Gostaria de agradecer imensamente à **Prof. Dra. Rose Maria Carlos** pela orientação, paciência, discussões e confiança durante esses 5 anos de trabalho.

Aos Professores **Dr. João Batista, Dra. Maria de Fátima, Dr. Tiago Venâncio, pela receptividade em seus laboratórios e colaboração, Dr. Otaciro Rangel IF-USP-São Carlos** (pela contribuição e discussões dos EPR), **Dr. Benedito IQ-USP-São Carlos, (pela disponibilidade do laboratório e EPR), Dr. Kleber Thiago** pela disponibilidade do laboratório e contribuição nas sínteses.

Ao Professor **Dr. Odair Bueno**, UNESP-Rio Claro, pelos experimentos em formigas.

Às Professoras **Dra. Helena de Assis e Maria Vital** da Universidade Federal do Paraná (UFPR) pela contribuição nos estudos comportamentais e toxicológicos.

Ao Professor **Dr. Leif Horsfelt Skibsted** pela paciência e contribuição nos estudos de alimentos.

Aos colegas do **LAFIB**, obrigado pelos conhecimentos compartilhados, como também pela amizade.

Aos colegas do Grupo de Sistema Nervoso Central e Doenças Degenerativas da Farmacologia da UFPR pela ajuda nos experimentos com ratos.

Aos colegas do Grupo de Ecologia e toxicologia do Departamento de Farmacologia da UFPR pela ajuda nos experimentos com os peixes zebrafish.

A todos os professores e funcionários da UFSCar, UFPR e Universidade da Dinamarca (KU) que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho. Gostaria de agradecer imensamente à **Dorai Periotto** pelos experimentos com fungos e alguns experimentos no espectrômetro de massas.

Ao artista e mestre do vidro, **Ademir Sertori** por estar sempre disponível.

Aquele agradecimento muito especial à **Luciana Vizotto**, pela amizade, carinho e por todos experimentos de RMN.

À Inara de Aguiar pela contribuição nos cálculos teóricos.

À Izonete Guiloski (Cris) pelos experimentos bioquímicos.

A Leonardo DiCastro pela ajuda e ensinamentos com a experimentação animal.

À Tia Eurídice e todos os colegas e amigos do grupo Associação Espírita Obreiros do Bem de São Carlos.

Aos meus amigos Chico e Chauana, Nicholas (Sherek), Rafael (O Rafa de Serra Negra), Débora Eduarda, Mariana Romano, Mariana Cali, Caroline Riverin, Luciana Lazzarini, Ana Lazzarini, Fábio Otsuka e Leandro de Carvalho pela amizade, conselhos e descontração mesmo nos momentos difíceis dos últimos 5 anos.

Gostaria de agradecer imensamente à minha esposa **Nay** por todos os momentos que vivemos durante essa caminhada e ao nosso pequeno **Miguel** por alegrar cada momento, mesmo naqueles mais difíceis.

A Deus por todas as bênçãos em minha vida, e por me conduzir em todas as viagens, especialmente as de moto.

À FAPESP, pelas bolsas concedidas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS - 2,2' -azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

ACh - Acetilcolina

ATP - Trifosfato de adenosina

BHT - 3,5-Di-terc-4-butilhidroxitolueno

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

DPPH - 2-difenil-1-picrilhidrazil

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTNB - 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoato

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

GABA – ácido γ -aminobutírico

GPx – glutationa peroxidase

GTP – guanosina trifosfato

iso - ácido isovanílico

LPO - lipoperoxidação

NBT - Nitroazul de tetrazólio

NADPH - Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

POBN – α (4-piridil-1-óxido)-N-tert-butilnitrona

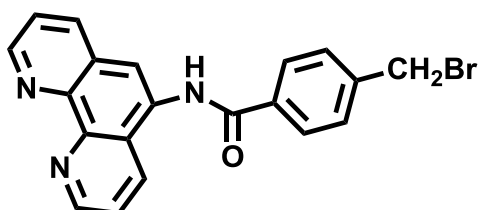
RPA - N-(5-amino-1,10-fenantrolina) benzamida-rodamina

SOD - superóxido dismutase

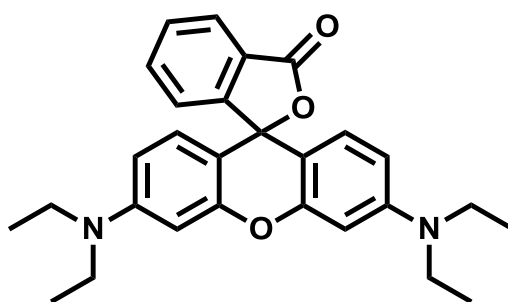
TEMP - 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol

TEMPO - 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil

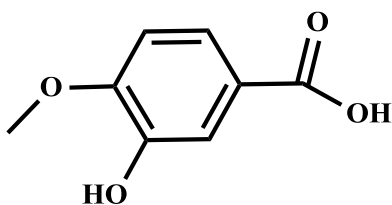
FÓRMULAS ESTRUTURAIS E NOMES DOS LIGANTES E COMPLEXOS



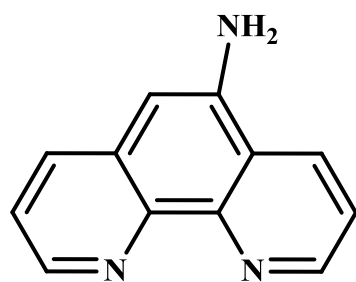
4-(bromometil)-N-(1,10-fenantrolin-5-il)benzamida



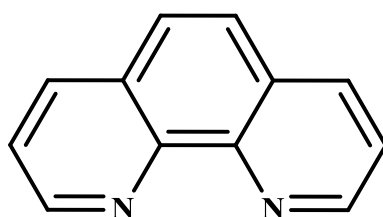
Rodamina B



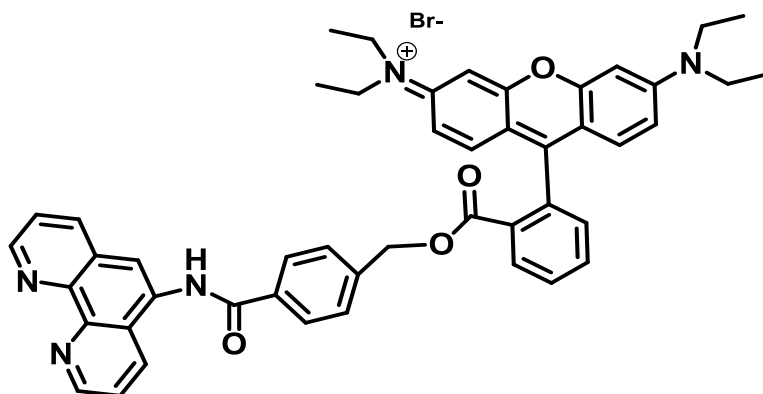
Ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzóico (ácido isovanílico - iso)



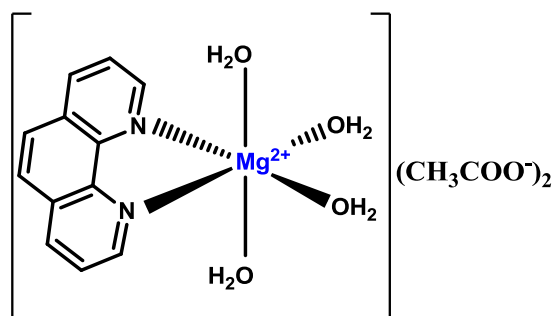
5-amino-1,10-fenantrolina



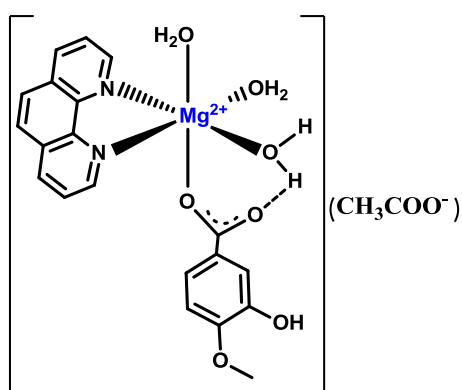
1,10-fenantrolina



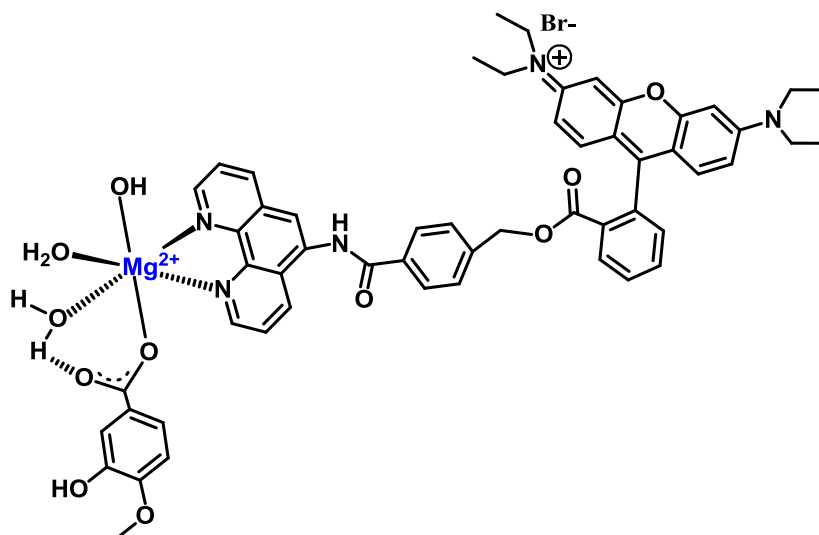
RPA-N-(9-(2-(((4-((1,10-fenantrolin-5-il) carbamoil) benzil) oxi) carbonil) fenil)-6-(dietilamino)-3H-xanten-3-ilideno)brometo de N-etiletanamínio



Aqua-complexo - $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})_2$



cis- $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$



Complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1: Processos de redução do oxigênio molecular por elétrons e formação das espécies reativas do oxigênio: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Adaptado de BUETTNER et al., 1983. 3
- Figura 1.2: Formigas cortadeiras 7
Fonte: unibras.com.br/tecnico-detalle/control-das-formigas-ortadeiras
- FIGURA 1.3: Mecanismo de formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e do ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Fonte: Adaptado de GRIPPA et. al 2014. 9
- FIGURA 2.1: Representação do Campo Aberto 32
- Figura 2.2: Representação do experimento de natação forçada 33
Fonte Adaptado: CRYAN et al., 2002
- Figura 2.3: Representação do labirinto em cruz elevada 33
Fonte Adaptado: Pellow, S., et al., 2002
- FIGURA 3.1: Espectros de RMN ^1H para a phen livre (A) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$ (B), em MeOD- d_4 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. 41
- FIGURA 3.2: Estrutura do complexo *cis*- $[\text{Mg}(\text{iso})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})_2$ (A) e (B) Estrutura otimizada em fase gasosa utilizando o DFT. 44
- FIGURA 3.3: Espectro de RMN de ^{13}C na região compreendida entre 150 e 180 ppm para o ânion (A) e para o complexo *cis*- $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})_2$ (B) em MeOD- d_6 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. 46
- FIGURA 3.4: Espectros de RMN de ^1H do *cis*- $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})_2$ (A), 1,10-fenantrolina livre (B) e ânion (C) em MeOD- d_4 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. 48
- FIGURA 3.5: Espectro de EPR em MeOD- d_4 do complexo *cis*- $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})_2$, e do padrão de Cr(III). 49

- FIGURA 3.6: Espectro de RMN ^1H do complexo *cis*- $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ nos tempos zero e após 120 h de exposição à luz (A) e protegido da luz (B) em solução tampão fosfato pH = 7,4 em (D_2O). 51
- FIGURA 3.7: Curva potenciométrica obtida para o ânion livre (A) e *cis*- $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ (B). 52
- FIGURA 3.8: Espectro de RMN ^1H em DMSO-d_6 a 25 ± 1 °C e Espectro de massas (B) do ligante 4-(bromometil)-N-(1,10-fenantrolin-5-il) benzamida em metanol ultra puro. 54
- FIGURA 3.9: Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 a 25 ± 1 °C (A) Espectro de massas em MeOH ultra puro (B), do ligante RPA. 57
- FIGURA 3.10: Espectro de infravermelho do ligante RPA em pastilha de CsI. 59
- FIGURA 3.11: Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ em MeOD-d_4 a 25 ± 1 °C. 65
- FIGURA 3.12: Espectro de RMN de ^{13}C para o ânion (A) e complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ (B) em MeOD-d_4 a 25 ± 1 °C. 64
- FIGURA 3.13: Estruturas da Rodamina B (A), ligante RPA (B), complexo (C). Espectros de absorção eletrônica na região UV-Vis (D) da rodamina B base livre (linha preta), ligante RPA (linha vermelha) e do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ (linha azul) (D) em metanol. 65
- FIGURA 3.14: Espectros de emissão (linha azul) e excitação (linha vermelha) do ligante RPA (A) e do complexo (B). ($\lambda_{\text{exc}} = 530$ nm) em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4). 67
- FIGURA 3.15: Espectros de emissão obtidos durante a fotólise com luz contínua em 550 nm do ligante RPA (A) e do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$, em solução tampão fosfato pH=7,4. 68

FIGURA 3.16: Espectros de RMN ^1H do complexo [Mg(RPA)(iso)(H₂O)(OH)] . Exposição à luz (A) e protegido da luz (B) por 96 horas em MeOD-d₄ a 25 ± 1 °C. 69

FIGURA 4.1: Crescimento micelial do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias de incubação com 500 µL de metanol como controle, 1,10-fenantrolina, ácido isovanílico livre e complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) utilizando uma concentração de 100 mgL⁻¹. 73

FIGURA 4.2 Atividades das enzimas acetilcolinesterase no cérebro (AChE) (A), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), (B, C), peroxidação lipídica (LPO) (D) e superóxido dismutase (SOD) (E) no trato digestivo do peixe zebra após 96 h de exposição a diferentes concentrações do complexo (0,20, 1,00 e 2,00 mgL⁻¹) e controle (CTR). Os dados são média \pm SE, n = 6-10. Não houve diferença significativa no valor médio em relação ao controle (p <0,05). A atividade é expressa em µmol/min/mg de proteína. * = diferença significativa. 76

FIGURA 4.3: Teste de locomoção e de ansiedade em ratos machos da família Wistar após 21 dias de exposição a 3,0 mgkg⁻¹/dia do complexo e controle (CTR). Os resultados do controle estão representados nas áreas pontilhadas dos gráficos. Os dados são média \pm SEM, n = 6-10. Não houve diferença significativa no valor médio em relação ao controle (p <0,05). *diferença significativa entre as amostras. 79

FIGURA 4.4: Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), 80
superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase
(GST) e glutathione redutase (GSH) nas regiões do cérebro
(hipocampo, estriado e córtex frontal) no fígado e nos rins dos ratos
após 21 dias de exposição a $3,0 \text{ mgkg}^{-1}$ por dia do complexo e controle
(CTR). A atividade é expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Os
resultados do controle são mostrados nas áreas pontilhadas dos
gráficos. Os dados são média \pm SE, $n= 6-10$. Não houve diferença
significativa no valor médio em relação ao controle ($p < 0,05$).
*diferença significativa entre as amostras.

FIGURA 5.1: FIGURA 5.2: Taxa de consumo de oxigênio em 83
amostras de carne suína lombo (a) e copa lombo (b) com $n = 4$ na
presença de $600 \mu\text{molL}^{-1}$ do *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO).

Figura 5.2: Espectros de ressonância paramagnética de spin e gráficos 85
de integral de pico do sinal de EPR versus concentração do complexo
obtidos em fase aquosa para as amostras de lombo e copa lombo em
solução tampão MES pH 5,7 armazenados no escuro durante 2 horas a
 75°C com o sequestrador de radicais POBN na presença de diferentes
concentrações do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO).

Figura 5.3: Gráfico da intensidade relativa do sinal de EPR do 86
sequestrador de radicais POBN versus tempo obtidos a 70°C durante
14 dias utilizando o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO)
como antioxidante e as amostras: Controle (lombo (linha preta) e copa
lombo (linha verde)), lombo com $1,2 \text{ mmolL}^{-1}$ do complexo (linha
azul) e copa lombo com $1,2 \text{ mmolL}^{-1}$ do complexo (linha vermelha).

- FIGURA 5:4 (A) Espectros de EPR do radical DPPH^{•+} livre (controle, linha preta) e na presença do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) (linhas coloridas). (B) Gráficos de área do sinal de EPR para o DPPH^{•+} livre e na presença do complexo
- FIGURA 5.5: Espectro de absorção eletrônica UV-vis do radical ABTS^{•+} na presença de diferentes concentrações do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO).
- FIGURA 5.6: Porcentagem de inibição do radical superóxido utilizando o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) (a) e o ácido isovanílico livre (b) pelo o ensaio com a VitB2/MET/NBT.
- FIGURA 5.7: Estrutura Otimizada (DFT) do ácido isovanílico livre (A) e complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) (B).

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: Resultados de análise elementar dos teores de C, H e N para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$ considerando a fórmula mínima $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{MgN}_2\text{O}_8$.	39
TABELA 3.2: Dados de RMN de ^1H para 1,10-fenantrolina (phen) livre e para o aquo-complexo $([\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2)$ em MeOD-d_4 a 25 ± 1 °C. Deslocamentos químicos em δ (ppm), multiplicidade de spin entre parênteses.	42
TABELA 3.3: Tempo de relaxação da 1,10-fenantrolina e do aquo-complexo $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$ em MeOD-d_4 a 25 ± 1 °C.	42
TABELA 3.4: Resultados de análise elementar dos teores de C, H e N para o complexo <i>cis</i> - $[\text{Mg}(\text{iso})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ considerando a fórmula mínima $\text{MgC}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9$.	43
TABELA 3.5: Parâmetros geométricos (comprimentos de ligação) para a geometria otimizada por DFT do complexo <i>cis</i> - $[\text{Mg}(\text{iso})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$.	45
TABELA 3.6: Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e COSY para o complexo <i>cis</i> - $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ em MeOD-d_6 a 25 ± 1 °C.	49
TABELA 3.7: Tempo de relaxação do ânion isovanilato, da 1,10-fenantrolina livre e complexo <i>cis</i> - $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$ obtidos nos espectros de RMN de ^1H em MeOD-d_4 a 25 ± 1 °C.	50
TABELA 3.8: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , δ (ppm) e constante de acoplamento J(Hz) do ligante 4-(bromometil)-N-(1,10-fenantrolin-5-il) benzamida.	55
TABELA 3.9: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , dept135 em δ (ppm) e a constante de acoplamento J (Hz) do ligante RPA.	58

TABELA 3.10: Análise elementar dos teores de C, H e N para o complexo [Mg(RPA)(Iso)(H ₂ O)(OH)], considerando a fórmula mínima MgC ₅₆ H ₅₈ BrN ₅ O ₁₁ .	60
TABELA 3.11: Deslocamentos químicos de RMN ¹ H, ¹³ C em δ (ppm) e constantes de acoplamento em J (Hz) e COSY para o complexo [Mg(RPA)(iso)(H ₂ O)(OH)] em MeOD-d ₄ a 25 ± 1 °C.	62
TABELA 3.12: Máximos de absorção (nm) e absortividade molar (Lmol ⁻¹ cm ⁻¹) obtidos dos espectros de absorção eletrônica UV-Vis dos ligantes rodamina B e RPA livres e do complexo [Mg(RPA)(iso)(H ₂ O)(OH)] em metanol.	66
TABELA 3.13: Valores de rendimento quântico de emissão do ligante RPA e do complexo [Mg(RPA)(iso)(H ₂ O)(OH)] em diferentes solventes.	67
TABELA 4.1: Mortalidade (%) e Média de sobrevivência 50% (S ₅₀) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> alimentados com dieta artificial, com ácido isovanílico livre, complexo <i>cis</i> -[Mg(phen)(iso)(H ₂ O) ₃](CH ₃ COO) e sulfluramida.	72
TABELA 4.2: Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> após 30 dias do experimento.	73
Tabela 5.1: Valores de IC ₅₀ para inibição do radical ABTS ^{•+} pelo complexo <i>cis</i> -[Mg(phen)(iso)(H ₂ O) ₃](CH ₃ COO).	92

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 3.1: Rota sintética para o aquo-complexo	39
Esquema 3.2: Rota sintética para o complexo <i>cis</i> - [Mg(iso)(phen)(H ₂ O) ₃](CH ₃ COO)	43
Esquema 3.3: Rota sintética para obtenção do ligante 4- (bromometil)-N-(1,10-fenantrolin-5-il) benzamida.	53
Esquema 3.4: Rota de síntese para o N-(9-(2-(((4-((1,10- fenantrolin-5-il) carbamoil) benzil) oxi) carbonil) fenil)-6- (dietilamino)-3H-xanten-3-ilideno)brometo de N- etiletanamínio- RPA	56
Esquema 3.5: Rota sintética para obtenção do complexo [Mg(RPA)(iso)(H ₂ O)(OH)].	60

POSPOSTAS DE MECANISMOS

Proposta de Mecanismo 5.1: Proposta de mecanismo para a inibição do oxigênio singlete e do radical TEMPO usando o complexo <i>cis</i> -[Mg(phen)(iso)(H ₂ O) ₃](CH ₃ COO)	88
Proposta de mecanismo 5.2: Proposta de mecanismo de inibição do radical estável DPPH [•] por transferência de próton.	90
Proposta de mecanismo 5.3: Mecanismo de inibição do radical ABTS ^{•+} via processo de transferência de próton.	91
Proposta de mecanismo 5.4: Proposta de mecanismo para inibição do radical peroxila pelo complexo <i>cis</i> -[Mg(phen)(iso)(H ₂ O) ₃](CH ₃ COO)	93

RESUMO

COMPLEXOS METÁLICOS LUMINESCENTES COM ÁCIDOS FENÓLICOS COORDENADOS ALVOS SELETIVOS A MITOCÔNDRIAS E MAPEAMENTO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* POR TÉCNICAS FLUORESCENTES. Nesta tese são descritas as sínteses e caracterizações dos complexos *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) e [Mg(RPA)(iso)(H₂O)(OH)], onde phen = 1,10-fenantrolina, iso = isovanilato e, e RPA = N-(9-(2-(((4-((1,10-fenantrolin-5-il) carbamoyl) benzil)oxi)carbonil)fenil)-6-(diethylamino)-3H-xanten-3-ilideno) brometo de N-etiletanamínio. Os complexos foram caracterizados por análise elementar (CHN), espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, Dept135, 2D COSY e DOSY. Comparado ao ácido isovanílico livre, os complexos obtidos são estáveis no estado sólido, em solução aquosa e sob estímulo luminoso. A viabilidade para aplicação do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) na área agrícola (inseticida e fungicida contra a formiga cortadeira do gênero *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiótico *leucoagaricus gongylophorus*) e na área pecuária (proteção da carne de porco) foram investigadas. A atividade inseticida do complexo investigada na forma de iscas (2,0mgg⁻¹) apresentou um modo de ação lento com 100% de mortalidade no sexto dia, S₅₀ = 2b e inibição completa do desenvolvimento do fungo simbiótico. Este complexo não apresentou toxicidade para o meio aquático quando exposto ao peixe paulistinha (Zebrafish) por 96 horas em uma concentração de 2,0 mgL⁻¹. Também não apresentou toxicidade no meio terrestre avaliado em um estudo crônico com ratos Wistar machos por, tratados por 21 dias com solução salina do complexo via intraperitoneal (3,0 mg/kg). Os estudos comportamentais (campo aberto, natação forçada e labirinto em cruz

elevado) sugeriram que este complexo possui características de fármacos do tipo ansiolítico. O complexo apresentou atividade antioxidante inibindo a formação das espécies reativas do oxigênio ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$), com IC_{50} abaixo de $100\mu\text{molL}^{-1}$. Os estudos realizados com amostras de carne suína (lombo e copa lombo) indicaram a inibição da peroxidação lipídica e aumento do tempo de prateleira (14 dias).

ABSTRACT

LUMINESCENT METALLIC COMPLEXES WITH COORDINATED PHENOLIC ACIDS: SELECTIVE TARGETS TO MITOCHONDRIA AND ANTIOXIDANT ACTIVITY MAPPING IN VITRO AND IN VIVO BY FLUORESCENT TECHNIQUES. In this work, the syntheses and characterizations of the complexes are presented, *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) and [Mg(RPA)(iso)(H₂O)(OH)], where phen =phenanthroline, iso= isovanillic , and N-(9-(2-(((4-((1,10-phenanthrolin-5-yl)carbamoyl)benzyl)oxy)carbonyl)phenyl)-6-ethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium bromide (RPA) by elemental analysis of C, H, N and thermogravimetric analysis and by NMR of ¹H and ¹³C, 2D COSY and DOSY. Compared to isovanillic acid, the complexes obtained are stable in the solid state, in aqueous solution and are not photodegradable. The insecticidal activity of *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) in the form of the baits (2.0mgg⁻¹) investigated against leaf-cutting ants of the genus *Atta sexdens rubropilosa* presented a mode of action slow with 100% mortality on the sixth day, S₅₀ = 2b, and complete inhibition of the development of the symbiotic fungus *leucoagaricus gongylophorus*. This complex did not show any toxicity to aquatic environment when exposed to paulistinha fish (Zebrafish) for 96 hours at a concentration of 2.0 mgL⁻¹. It also showed no toxicity in the terrestrial environment. In this chronic study during 21day, male Wistar rats were treated with *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) complex saline solution via intraperitoneal (3.0 mg/kg). Behavioral studies (open field, forced swimming and high cross labyrinth) have suggested that this complex possesses characteristics of anxiolytic drugs. Complex I has high inhibition capacity to oxygen reactive species (¹O₂, O₂•⁻), with IC₅₀ below 100μM. It has presented excellent inhibition of lipid peroxidation (ROO•,

LO•) investigated in pork samples with IC_{50} at the scale 500 mmolL^{-1} . complex, presented in this work, opens a new horizon of applications in agricultural, medic, and food areas.

Sumário

Introdução.....	1
1.1.1 Radicais Livres	2
1.1.2 Estresse Oxidativo	4
1.1.3 Sistemas de Defesa Antioxidante	4
1.1.4 Alternativas no Combate aos Efeitos do Estresse Oxidativo	5
1.3 Ratos da família Wistar e Peixe-zebra (danio rerio ou paulistinha)	8
1.4 Processos de Degradação de Alimentos.....	8
1.5 Química do Magnésio e suas funções biológicas	10
2.0 OBJETIVOS.....	12
Capítulo 2	13
2.0 MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1 Reagentes.....	14
2.2 Preparação dos complexos	14
2.2.1 Síntese do complexo precursor $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO}^-)_2$	14
2.2.2 Preparação do complexo <i>cis</i> - $[\text{Mg}(\text{iso})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO}^-)$	15
2.2.3 N-(9-(2-(((4-((1,10-fenantrolin-5-il) carbamoil) benzil)oxi) carbonil)fenil)-6-(dietilamino)-3H-xanten-3-ilideno)brometo de N-etiletanamínio- (RPA).....	16
2.2.4 Preparação do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$	17
2.3.1 Equipamentos	18

2.3.2	Análise Elementar	18
2.3.3	Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-Vis	18
2.3.4	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	19
2.3.5	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	19
2.3.6	Ressonância paramagnética de elétrons (EPR).....	20
2.3.7	Análise Termogravimétrica – TGA	20
2.3.8	Cálculos computacionais.....	21
2.3.9	Luminescência.....	21
2.4	Metodologia	21
2.4.1	Actinometria.....	21
2.4.2	Rendimento quântico de emissão.....	23
2.4.3	Condutividade molar	24
2.4.4	Determinação do pKa utilizando o método potenciométrico	24
2.4.5	Determinação da estabilidade química utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio RMN ¹ H	25
2.4.6	Determinação da atividade sequestradora do radical ânion superóxido (O ₂ ⁻) utilizando o nitro-azul tetrazólio (NBT)	25
2.4.7	Determinação da atividade antioxidante do complexo pelo decréscimo do sinal de EPR do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH•).....	26

2.4.8	Determinação da atividade antioxidante do complexo pelo decréscimo da absorção no visível do radical ABTS ⁺	26
2.5	Atividade inseticida do complexo: ensaios <i>in vivo</i> com as formigas cortadeiras do gênero <i>atta sexden rubropillosa</i>	27
2.5.1	Coleção de insetos	27
2.5.2	Bioensaios	28
2.5.3	Ensaio de ecotoxicidade (testes de toxicidade aguda) e estudo aquático com o peixe-zebra.....	28
2.5.4	Ensaio de biomarcadores bioquímicos no peixe zebra.....	29
2.5.5	Experimentos <i>in vivo</i> - Estudos em ratos de Wistar (machos)	31
2.5.6	Teste de natação forçada	32
2.5.7	Labirinto em cruz elevada.....	33
2.5.8	Biomarcadores bioquímicos - (ratos Wistar)	34
2.5.10	Oxidação lipídica monitorada por espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons	35
2.5.11	Estudo de tempo de armazenamento de carne suína.....	35
2.5.12	Taxa de consumo de oxigênio.....	36
2.5.13	Análise estatística	37
Capítulo 3	38

Síntese e Caracterização do Aquo-complexo $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO}^-)_2$ do ligante RPA e dos Complexos <i>cis</i> - $[\text{Mg}(\text{iso})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO}^-)$ e $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]$ onde iso = isovanilato	38
3.1 Caracterização por RMN do aquo-complexo $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO}^-)_2$	39
3.2 Caracterização do <i>cis</i> - $[\text{Mg}(\text{iso})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO}^-)$	43
3.2.1 Estudo de estabilidade por RMN de ^1H	50
3.2.1 Solubilidade e valor do pKa do complexo <i>cis</i> - $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO}^-)$	52
3.3.2 Caracterização do Complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{Iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$	59
3.4 Propriedades Espectroscópicas	64
3.4.2. Espectro de absorção eletrônica no UV-Vis.....	64
3.4.3 Espectro de emissão, excitação e rendimento quântico.....	66
3.4.4 Irradiação com luz contínua.....	68
3.5 - Estabilidade do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ por RMN ^1H	68
Capítulo 4	70
Estudo da Atividade Inseticida, Toxicológica e Avaliação da Capacidade Antioxidante do Complexo <i>cis</i> - $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$	70
4.1 Atividade inseticida contra <i>Atta sexdens rubropilosa</i> e seu fungo simbiótico	71

4.2 Impacto do complexo <i>cis</i> -[Mg(phen)(iso)(H ₂ O) ₃](CH ₃ COO) sobre a vida aquática.....	74
Capítulo 5	81
5.0 Estabilidade Oxidativa em Amostras de Carne suína.....	82
5.1 Desativação do oxigênio singlete produzido pela fotossensibilização da riboflavina	86
Capítulo 6	98
6.0 Conclusões e Perspectivas.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

Introdução

Capítulo 1

Introdução

Introdução

1.0 INTRODUÇÃO

A presente tese apresenta uma discussão a respeito da síntese e caracterização de complexos metálicos de Mg(II) com o grupo fenólico isovanilato coordenado e ensaios com formulações pesticidas usando a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* como modelo padrão. São apresentados também, estudos sobre a inibição das espécies reativas do oxigênio *in vitro* e *in vivo*, estudos toxicológicos em sistema aquático (peixe zebra ou paulistinha) e terrestre (ratos da família Wistar machos). Além de investigações da peroxidação lipídica em amostras de carne suína.

1.1.1 Radicais Livres

Energia é essencial para a manutenção da vida.^{1, 2} Por esse motivo, os organismos vivos durante seu processo evolutivo desenvolveram células específicas capazes de produzir energia química pelo consumo de oxigênio atmosférico.¹ A principal função do oxigênio nos organismos aeróbicos é a produção de energia pela síntese do ATP. Porém, esse processo leva a produção de radicais livres podendo resultar na indução de danos celulares e conseqüentemente no estresse oxidativo.³

Radical livre pode ser definido como qualquer espécie química no qual apresenta elétrons desemparelhados.^{3, 4} No meio biológico, os radicais livres podem ser formados a partir de moléculas de oxigênio levando a formação das espécies reativas do oxigênio (ROS – do inglês reactive oxygen species). Quando respiramos, o oxigênio do ar é inspirado por nossos pulmões até a corrente sanguínea, e assim transportado para todo o corpo. Ao alcançar as mitocôndrias, (organelas presentes no citoplasma das células eucarióticas) o oxigênio respirado é usado para transformar a glicose em energia na forma de ATP. Mais de 95% de todo o

Introdução

oxigênio utilizado neste processo é reduzido a água por meio da adição de 4 elétrons.⁵ Esse processo é realizado pela enzima citocromo *c* oxidase, e envolve a formação sequencial de ROS: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (HO^{\cdot}), Figura 1.1.^{1, 2, 6, 7, 8}

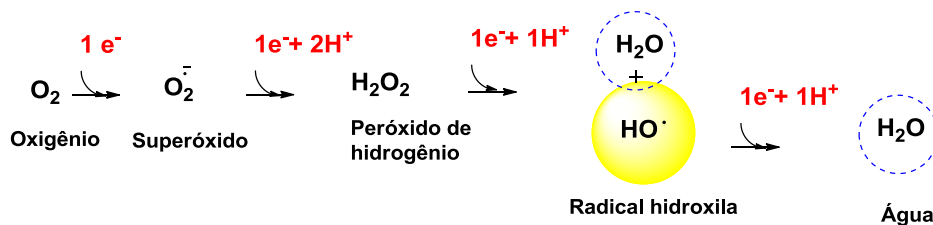
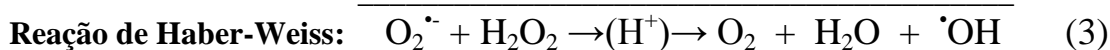
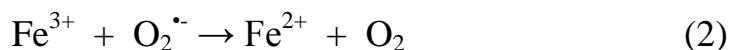
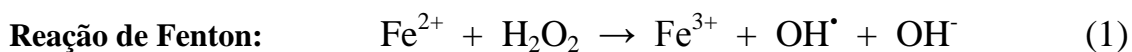


FIGURA 1.1: Processos de redução do oxigênio molecular por elétrons e formação das espécies reativas do oxigênio: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil. Adaptado de BUETTNER et al., 1983.

O peróxido de hidrogênio, embora não seja um radical livre, pode atuar como mensageiro secundário nas reações catalisadas por metais de transição, como ferro e cobre, formando o radical hidroxil (HO^{\cdot}), por meio da reação de Fenton e de Haber-Weiss, conforme as equações 1,2 e 3.^{6, 7, 8, 9, 10, 11}

O radical hidroxil possui alta reatividade e tempo de vida na ordem de milissegundos, sendo considerado o mais deletério dos radicais do oxigênio, podendo clivar a molécula do DNA e participar da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares.¹²



Introdução

1.1.2 Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção e a eliminação das espécies reativas de oxigênio, podendo ocorrer tanto pelo aumento na formação destas espécies, quanto pela queda na capacidade antioxidante celular.¹³ Este tem sido relacionado com agravamento de diversas doenças crônicas não transmissíveis, tais como câncer, diabetes mellitus tipo 2, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cognitivas e doença de Parkinson.^{14, 15, 16} Além de oxidar as lipoproteínas de baixa densidade o qual pode contribuir na formação de células espumosas e arteriosclerose.¹⁷

1.1.3 Sistemas de Defesa Antioxidante

Antioxidantes são substâncias que possuem a capacidade de neutralizar radicais livres.¹⁸ Estão em constante atividade nos organismos vivos e necessitam de quantidades suficientes para neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais livres que são constantemente produzidos.^{18, 19, 20, 21}

O sistema de defesa antioxidante envolve duas classes principais: os antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos. Os dois sistemas atuam no sentido de impedir os efeitos deletérios causados pelas espécies reativas do oxigênio nas células. Os antioxidantes enzimáticos podem ser classificados em defesas primárias e secundárias. As defesas primárias são compostas pelas enzimas glutathione peroxidase (GST), responsável pela redução das peroxidases, que são substratos em potencial para reação de Fenton. A catalase (CAT) é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e uma molécula de oxigênio.¹⁹ A enzima superóxido dismutase (SOD), converte o ânion radical superóxido

Introdução

=====

(O_2^-) em peróxido de hidrogênio, o qual por sua vez é um substrato para a enzima catalase.²⁰

As enzimas glutathione redutase (GSH) e glicose-6-fosfatodesidrogenase (G6PD) compõem o sistema de defesa antioxidante secundário.²² A GSH atua na remoção de H_2O_2 e outros peróxidos promovendo sua redução a água. A G6PD atua na regeneração do NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase), sendo responsável pela proteção celular e contra o estresse oxidativo, uma vez que regenera a forma reduzida da glutathione (GSH).^{17, 23}

O sistema de defesa antioxidante não enzimático tem origem tanto endógena quanto exógena. Por exemplo, o ácido ascórbico (vitamina C) após ser absorvido pelo trato gastrointestinal atua na inibição do ânion radical superóxido, do hidroperóxido, do peroxinitrito e do ácido hipocloroso bem como na regeneração do α -tocoferol (vitamina E) a partir do radical α -tocoferoxil.²⁴

1.1.4 Alternativas no Combate aos Efeitos do Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo pode ser minimizado pelas modificações nas condições ambientais ou pela administração de compostos capazes de bloquear ou minimizar o desencadeamento das reações oxidativas.²⁵ Neste contexto, várias estratégias vêm sendo usadas, entre elas, aumentar os níveis intracelulares de SOD ou administrá-las de maneira exógena.^{26, 27, 28} Entretanto, o uso de SOD como tratamento terapêutico é bastante restrito devido aos altos custos, autorização para uso e efeitos colaterais.²⁹

Vale ressaltar que o sistema de defesa antioxidante enzimático não inibe o radical hidroxil, e a única maneira de minimizar seu ataque a biomoléculas, é pela administração de antioxidantes exógenos. Nesse aspecto, as vitaminas (ácido ascórbico, α -tocoferol, retinol, carotenóides),

Introdução

=====
ácido úrico e glutathiona (GSH) atuam no sequestro desse radical com a formação de produtos menos reativos, impedindo as reações oxidativas em cadeia.³⁰

Apesar da importância dos polifenóis no estresse oxidativo ser reconhecida, a atividade *in vivo* desses compostos é difícil de ser demonstrada em decorrência da baixa bio-disponibilidade e acúmulo na região gastrointestinal.³¹ Isso por sua vez, é em grande parte, consequência da sua elevada susceptibilidade a modificações metabólicas.^{31, 32, 33, 34, 35}

As propriedades biológicas dos antioxidantes exógenos motivam as pesquisas para a elucidação da reatividade química destas moléculas no meio biológico e no desenvolvimento de novas estratégias para melhorar a biodisponibilidade.

1.2 Formigas Cortadeiras e Inseticidas

As formigas cortadeiras saúvas, quenquéns e *Atta sexdens rubropilosa*, Figura 1.2, constituem as principais pragas das áreas de reflorestamento brasileiro e representam 79.7% dos custos no controle de pragas florestais no país.^{36, 37, 38, 39} Pesquisas realizadas nos anos 90 indicaram a existência de cerca de 45 espécies de formigas cortadeiras no Brasil, sendo a do gênero *Atta sexdens rubropilosa* distribuídas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Goiás e Paraná.⁴⁰ Os danos causados por essas formigas em plantações, pastagens, culturas vegetais e de frutas, provocam prejuízos na ordem de 21 bilhões de reais anuais na produção agrícola brasileira.^{39, 41, 42}

Introdução

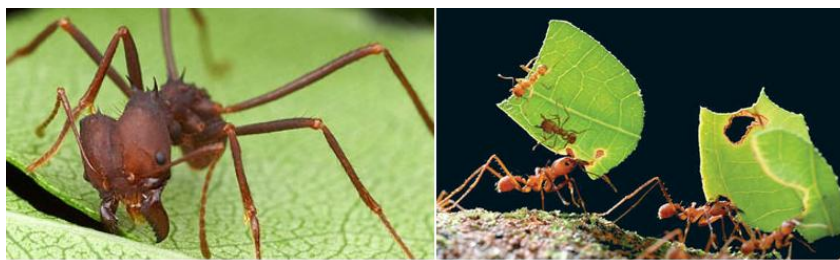


Figura 1.2: Fotos das formigas cortadeiras do gênero *atta sexdens rubropillosa*

Fonte: unibras.com.br/tecnico-detalle/controlde-das-formigas-cortadeiras

As formigas cortadeiras do gênero *atta sexdens rubropillosa* possuem uma associação mutualística com seu fungo simbiote (*Leucoagaricus gongylophorus*).⁴³ Tal associação gera uma total dependência entre ambos, sendo que as formigas usam vegetais frescos para o desenvolvimento do fungo usado na sua própria alimentação.⁴⁴ O fungo se desenvolve sobre o material vegetal, produzindo nutrientes para as formigas, especialmente para as larvas.^{45, 46}

Um dos inseticidas comerciais mais usados no combate e controle de formigas cortadeiras no Brasil é a sulfluramida (N-etil-perfluoroctano sulfonamida). Este inseticida atua diretamente no sistema nervoso dos insetos pela inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase bem como na cadeia respiratória de insetos. Apesar de eficiente este inseticida apresenta alta toxicidade tanto para o ambiente aquático quanto terrestre o que tornou seu uso restrito em diversos países,⁴⁷ e no Brasil está previsto sua suspensão em 2021.⁴⁸

Isso torna o desenvolvimento de novos inseticidas e fungicidas que visam o controle de formigas cortadeiras e seu fungo simbiote um grande desafio tecnológico para a ciência moderna, visto que a produção de alimentos está diretamente ligada ao controle de pragas nas lavouras. Além

Introdução

=====

disso, os novos inseticidas devem ser eficientes no controle e combate das formigas e apresentar baixo custo financeiro e operacional, além de baixa toxicidade para o meio aquático e terrestre.^{49, 50}

1.3 Ratos da família Wistar e Peixe-zebra (danio rerio ou paulistinha)

A linhagem de ratos não-endogâmica da família de Wistar (*Rattus norvegicus*) é um modelo bastante usado em pesquisas ao redor do mundo.⁵¹ Possui um ciclo de reprodução curto, baixo custo comparado a outros animais de maior porte e possui um DNA com 80% de compatibilidade com os seres humanos.⁵²

Esses animais são frequentemente usados no monitoramento ambiental em sistemas terrestres em experimentos de exposição a produtos nocivos por curtos ou longos períodos de tempo.⁵³ Nestes casos o comportamento é avaliado pelas alterações comportamentais e bioquímicas.⁵⁴

Conhecido como danio rerio ou paulistinha, o peixe zebra, também é usado como modelo animal para o monitoramento ambiental em sistemas aquáticos onde são investigadas as alterações nos parâmetros bioquímicos.^{55, 56, 57} Estes peixes apresentam um ciclo de reprodução curto, baixo custo quando comparados com outros modelos experimentais terrestres e contem homólogos próximos de muitas proteínas humanas.^{58, 59, 60, 61}

1.4 Processos de Degradação de Alimentos

O estudo de constituintes químicos em alimentos é crucial para sua manutenção e qualidade.⁶² Ele determina o valor nutricional do produto, sua atratividade sensorial e o desenvolvimento de mudanças desejáveis ou indesejáveis devido às interações com outros constituintes

Introdução

durante o período de armazenamento.⁶³ Em geral, a exposição de alimentos e bebidas à luz, pode levar a formação de produtos oxidados, que são impróprios para o consumo.⁶⁴ Algumas horas de exposição à luz em prateleiras ou em freezer, são suficientes para alteração do sabor e do odor dos alimentos perecíveis, levando-os a rejeição pelos consumidores e provocando grandes prejuízos à indústria alimentícia.⁶⁵

Os mecanismos de oxidação lipídica dependem de vários fatores, como a atividade enzimática, presença de metais e pressão parcial do oxigênio.⁶⁴ Por exemplo, a riboflavina ou vitamina B2 (RF), um nutriente essencial presente em altas quantidades em carnes (especialmente suína) e produtos lácteos sendo muito sensível a irradiação luminosa.

Quando exposta a luz de 400 a 500 nm a (RF) alcança o estado excitado tripleto ($^3\text{RF}^*$). Neste estado excitado a (RF) pode atuar como um fotossensibilizador ativando a formação do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) ou do ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), por um processo de transferência de energia ou de elétrons com o oxigênio no seu estado fundamental tripleto ($^3\text{O}_2$), Figura 1.3.

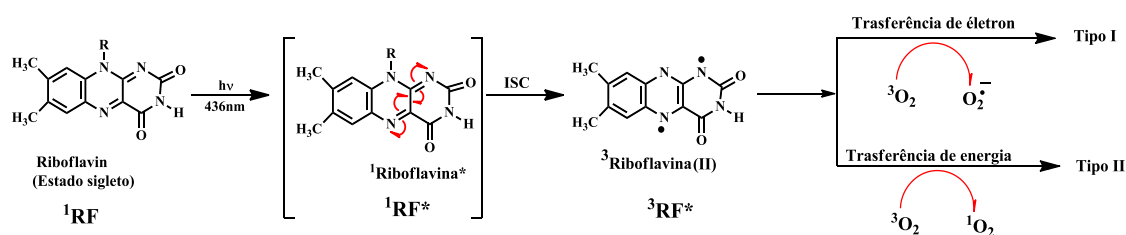


FIGURA 1.3: Mecanismo de formação do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e do ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a partir da riboflavina. Fonte: Adaptado de GRIPPA et. al 2014.

Tanto o $\text{O}_2^{\cdot-}$ quanto o $^1\text{O}_2$ na presença de ácidos graxos poli-insaturados promove a peroxidação lipídica de produtos perecíveis. Com a

Introdução

=====

presença de um substrato (aminoácidos), pode ocorrer a formação do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), via processo de transferência de elétron (processo tipo I).^{62, 63, 64, 65}

Para inibir estes processos e aumentar o tempo de prateleira de produtos perecíveis, a indústria alimentícia faz uso de antioxidantes sintéticos. Entretanto, o uso de antioxidantes sintéticos apresentam vários obstáculos como restrição de uso pelos órgãos governamentais e preferências pelos consumidores bem como um número crescente de trabalhos que descrevem a toxicidade destes compostos.

Uma estratégia é o uso de antioxidantes naturais como polifenóis, isoflavonas e carotenóides.⁶⁶ Um limitante para a aplicação destes compostos em escala industrial é a baixa solubilidade e instabilidade destes compostos em meio biológico.^{67, 68, 69, 70, 71, 72}

1.5 Química do Magnésio e suas funções biológicas

Na tabela periódica o elemento magnésio (Mg) pertence ao grupo dos metais alcalino-terrosos com configuração $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2$ alcançando o estado de oxidação 2+ quando oxidado. É um dos íons metálicos mais abundantes na crosta terrestre.^{73, 74} Possui raio iônico de 0,72 Å para o número de coordenação 6 e geometria octaédrica, $[Mg(H_2O)_6]^{2+}$.^{75, 76}

O íon magnésio(II) participa de várias funções celulares e enzimáticas, incluindo os canais iônicos e ciclos metabólicos.^{77, 78} São conhecidas mais de 300 enzimas nas quais o magnésio atua como cofator.^{79, 80} Vale ressaltar que a quantidade média necessária de magnésio para suprir as necessidades fisiológicas é de 300 a 400µg/dia dependendo do indivíduo.^{79, 80}

Introdução

1.6 Proposta de trabalho

As discussões apresentadas anteriormente mostram a importância do desenvolvimento de inseticidas/fungicidas eficientes, mas que apresentem baixa toxicidade ao ecossistema local. Mostram também o vasto campo de aplicações de substâncias antioxidantes bem como a importância de novas estratégias para aumentar a estabilidade de antioxidantes naturais.

Neste contexto, este trabalho pretende desenvolver um composto antioxidante que apresente baixo custo operacional e baixa toxicidade e que possa atuar tanto na área agrícola como pecuária.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um complexo de Mg(II) contendo o ânion isovanilato na esfera de coordenação e que possa atuar como inseticida/fungicida para o combate das formigas cortadeiras do gênero *atta sexden rubropilosa* e seu fungo simbiótico *leucoagaricus gongylophorus* e como antioxidante na preservação de carne suína.

2.2 Objetivos específicos:

- a) Sintetizar e isolar os seguintes complexos *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CF₃COO) e [Mg(RPA)(iso)(H₂O)(OH)] onde phen = 1,10-fenatrolina iso = ácido isovanílico RPA = N-(9-(2-(((4-((1,10-fenantrolin-5-il)carbamoil)benzil)oxi)carbonil)fenil)-6-(dietilamino)-3H-xanten-3-ilideno)brometo de N-etiletanamínio.
- b) Caracterizar os complexos obtidos pelas técnicas de IV com transformada de Fourier, UV-Vis, ESI-MS, análise elementar dos teores de H, C e N, RMN ¹H e ¹³C, DOSY, COSY ¹H¹H, TGA e ESR;
- c) Avaliar a estabilidade e solubilidade dos complexos em solução aquosa no escuro e na presença de luz por RMN ¹H
- e) Investigar a atividade inseticida e fungicida realizando ensaios *in vivo* com formigas cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiótico *leucoagaricus gongylophorus*;
- f) Investigar a toxicidade e o stress oxidativo frente ao peixe-zebra e ratos da família Wistar machos;
- g) Avaliar a inibição da peroxidação lipídica em amostras de carne suína (lombo e copa lombo);

Capítulo 2

Parte Experimental

Introdução

2.0 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os seguintes reagentes usados nesta tese foram todos de procedência da empresa Sigma Aldrich. 5-amino-1,10-fenantrolina, brometo de 4-bromometil benzoílo, rodamina B, acetato de magnésio tetra hidratado, ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzóico (ácido isovanílico), ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico, riboflavina, nitro-azul tetrazólio, α -(4-piridil-1-óxido)-N-terc-butilnitrona, 4-hidroxi-2,2,6,6-trimetilpiperidina-1-oxil, 2,2,6,6-tetrametil-4-iperidinol, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, Sal de diamônio do 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), Cloreto de acetilcolina, ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico $\geq 98\%$, ácido pirogálico, L-glutationa reduzido, Glutationa peroxidase bovino, albumina de soro bovino (pH 7,0 $\geq 98\%$), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, L-Metionina $\geq 98\%$, 3,5-di-terc-4-butilhidroxitolueno, superóxido dismutase. As amostras de carne suína lombo e copa lombo, foram obtidas da empresa dinamarquesa Slagteriskolen (Roskilde, Dinamarca).

Os solventes trietilamina (TEA) e peróxido de hidrogênio foram de grau HPLC, de procedência Sigma-Aldrich e as soluções aquosas foram preparadas com água Milli-Q.

2.2 Preparação dos complexos

2.2.1 Síntese do aqua-complexo $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$

Este complexo foi preparado por um método similar ao descrito na literatura mas com algumas modificações.⁸¹ Em 20,0 mL de metanol anidro adicionou-se 0,300g (1,40 mmol) de acetato de magnésio tetra hidratado. O sistema ficou sob agitação constante e atmosfera de N_2 por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,25 g (1,40 mmol) de 1,10-

Introdução

=====

fenantrolina. A mistura reacional ficou sob agitação e atmosfera de N₂ em refluxo por mais duas horas. Após resfriar, a mistura foi filtrada e rotaevaporada para redução do volume para cerca de 3,0 mL, a qual foram adicionados 40,0 mL de acetonitrila gelada. O precipitado branco formado foi filtrado e lavado com 50,0 mL de acetonitrila gelada. O composto foi seco a vácuo e armazenado em um dessecador. Rendimento: 80%.

2.2.2 Preparação do complexo *cis*-[Mg(iso)(phen)(H₂O)₃](CH₃COO)

Em um balão de fundo redondo de 3 bocas, adicionou-se 25,0 mL de metanol anidro e 0,352 (1,64 mmol) de acetato de magnésio. Em seguida, adicionou-se 0,300 g (1,64 mmol) de 1,10-fenantrolina e 0,278g (1,64 mmol) do ácido isovanílico. O sistema ficou sob agitação constante e atmosfera de N₂ por 10 minutos. A seguir, adicionou-se 0,170 µL (1,64 mmol) da base trietilamina. A mistura reacional foi mantida sob agitação constante e temperatura de 110 °C por 2h. Após resfriar, a mistura foi filtrada duas vezes para remover impurezas. A solução remanescente foi rotaevaporada para cerca de 3,0 mL e na sequência foram adicionados 30,0 mL de água gelada. O precipitado formado foi filtrado e lavado com 50,0 mL de água gelada. O composto foi seco a vácuo e armazenado em um dessecador. Rendimento: 52%.

Introdução

2.2.3 N-(9-(2-(((4-((1,10-fenantrolin-5-il) carbamoil) benzil)oxi) carbonil)fenil)-6-(dietilamino)-3H-xanten-3-ilideno)brometo de N-etiletanamínio- (RPA)

O ligante RPA foi sintetizado seguindo o procedimento descrito na literatura.⁸² Preparou-se uma solução de brometo de 4-bromometil-benzoil (0,238 g, 0,860 mmol) em 25,0 mL de acetonitrila anidra. A esta solução adicionou-se lentamente 50,0 mL de uma solução de 5-amino-1,10-fenantrolina 0,839 g, (0,860 mmol) em acetonitrila. A solução resultante foi mantida sob agitação constante por 18 h em atmosfera de N₂ e temperatura ambiente. O sólido obtido foi separado por filtração e lavado com acetonitrila anidra e solução de bicarbonato de sódio 5,0%. O sólido foi seco sob vácuo com rendimento de 79%.

O precursor RPA foi preparado pela adição de (0,50 g, 1,11 mmol) da rodamina B, 0,44 g, (1,13 mmol) do precursor intermediário 4-(bromometil)-N-(5-amino-1,10-fenantrolina) benzamida, em 8,0 mL de dimetilformamida anidro. A mistura reacional foi mantida por 64 h e aquecimento de 100 ± 1 °C com agitação constante e em atmosfera de N₂. Após este período a solução foi rotaevaporada. O sólido obtido foi solubilizado em 20,0 mL de diclorometano, filtrado e em seguida, rotaevaporado novamente.

Ao sólido obtido foi adicionado 2,0 mL de diclorometano. Na sequência, o produto remanescente foi purificado por coluna cromatográfica de óxido de alumínio neutro usando como eluente uma mistura ternária de diclorometano, n-hexano e etanol nas proporções: (10:4:1-10:2:1 v/v). As frações foram reveladas por cromatografia em camada delgada, usando uma mistura ternária de diclorometano, n-hexano e etanol na proporção (8:1:1;v/v). A solução remanescente foi concentrada

Introdução

=====

para um volume de 3,0 mL e precipitada com éter etílico anidro. O sólido foi seco sob vácuo e rendimento de 28%.

2.2.4 Preparação do complexo [Mg(RPA)(iso)(H₂O)(OH)]

Em um tubo selado adicionou-se 10,0 mL de metanol anidro, 0,250 g (0,33 mmol) de RPA, 0,070 g de acetato de magnésio (0,33 mmol), 0,55 g (0,33 mmol) de ácido isovanílico e 35 µL (0,33 mmol) de trietilamina sob atmosfera de N₂ por 10 minutos. Em seguida a mistura reacional foi mantida sob agitação constante e temperatura de 110 ± 1 °C por 2 h. Após retornar à temperatura ambiente, a mistura foi filtrada 3 vezes para completa remoção de reagentes livres e impurezas. A solução remanescente foi rota-evaporada para cerca de 2,0 mL, e na sequência foram adicionados 40,0 mL de água gelada. A mistura foi filtrada e lavada com 20,0 mL de acetona anidra. O sólido foi seco sob vácuo. Rendimento 50%.

Introdução

2.3 Equipamentos e Técnicas de caracterização

2.3.1 Equipamentos

Evaporador Rotativo da BUCHI modelo RII.

Centrífuga da FANEM modelo 206-R.

Banho termostatzado da TECNAL, modelo TE 2005.

Banho Metabólico Bubnoff da SOLAB, modelo SL 157.

Reatores fotoquímicos montados no laboratório LAFIB, que consistem de um sistema carrossel de 8 lâmpadas RAYONET nos comprimentos de onda de irradiação 420 nm e 350 nm.

Homogeneizador Ultra-Turrax T-25 - Janke and Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Germany.

2.3.2 Análise Elementar

Para a determinação da porcentagem (%) de carbono, nitrogênio e hidrogênio (C, H e N) foi utilizado um analisador de modelo EA 1108 da FISIONS, na central analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

2.3.3 Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-Vis

Os espectros de absorção eletrônica na região do UV-Vis foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Agilent 8453A.

Introdução

2.3.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no estado sólido utilizando-se um espectrofotômetro SHIMADZU com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21 na região compreendida entre 4000 e 200 cm^{-1} . As amostras no estado sólido foram diluídas em CsI, mantida em estufa a 120 °C, na proporção 1/100 (amostra/CsI).

2.3.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C , Cosy, dept), foram obtidos em um espectrômetro BRUKER 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio) equipado com trocador automático de amostra, sonda de 5 mm BFO (smart probe com ATMA[®]) e bobina de gradiente de campo em z, unidade geradora de gradiente de campo e unidade de temperatura variável. Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Espectrômetro BRUKER - 14,1 Tesla (600 MHz para frequência do hidrogênio): equipado com trocador automático de amostra, *cryo*-sonda TCI ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) de 5,0 mm com ATMA[®] (*Automatic Tunning MAtching*) e gradiente de campo em z, sonda BBI com ATMA[®], gradiente de campo em z, unidade de temperatura variável, unidade geradora de gradiente de campo, unidade *cryo-fit*[®] e unidade LC-SPE acoplado. Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos

Introdução

2.3.6 Ressonância paramagnética de elétrons (EPR)

Para as medidas de ressonância paramagnética de elétrons foram utilizados dois equipamentos: As medidas de EPR para o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO), foram realizadas com um espectrômetro Bruker EMX Plus (Rheinstetten, Germany) operando na banda-X, frequência de 9,76 GHz, potência de micro-ondas de 1 mW, e amplitude de modulação de 1 G, cavidade retangular TE 102, capilar de quartzo (d.i.= 0,75 mm) à temperatura de 303 K. Estes experimentos foram realizados no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

A atividade antioxidante do complexo livre e na presença de carne de porco foi investigada utilizando o espectrômetro Bruker ER-160FC e Magnettech Miniscope MS200 ESR (Berlim, Alemanha) nas seguintes condições: campo de modulação 100 kHz, amplitude de modulação 0,200 G (POBN) e 0,700 G (TEMPO), constante de tempo 327,68 ms, tempo de conversão 1310,72 ms, campo central 3365,98 G (POBN) ou 3364,15 (TEMPO), largura de varredura 49,82 G (POBN) ou 97,78G (TEMPO), frequência de micro-ondas 9,64 GHz, potência de micro-ondas 20,0 mW e temperatura 23 ± 1° C. A varredura do campo magnético foi calibrada usando padrão de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) ⁸³. Estes experimentos foram realizados no departamento de alimentos da Universidade de Copenhagen-Dinamarca.

2.3.7 Análise Termogravimétrica – TGA

As análises de TGA foram realizadas no equipamento TG 209 F3 Tarsus, sob fluxo contínuo de N₂, na faixa de temperatura de 40 a 600 ± 1°C, a uma taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹. Foram obtidos os perfis de

Introdução

=====

degradação térmica de cada uma das amostras. Utilizou-se 10,0 mg das amostras.

2.3.8 Cálculos computacionais

A geometria do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) foi otimizada pelo programa Gaussian 09,⁸⁴ no vácuo em nível da teoria do funcional de densidade com o funcional híbrido B3LYP⁸⁵ e conjunto de base LanL2DZ.⁸⁶ Após definição das bases, realizou-se os cálculos levando em consideração o efeito dos solventes metanol e água, utilizando o modelo de polarização contínua, cujo efeito de polarização é representado numericamente e computado por uma integração numérica. Assim, a estrutura otimizada foi utilizada nos estudos de estado excitado. As energias das transições eletrônicas foram obtidas pelo método TD-DFT (dependente do tempo).

2.3.9 Luminescência

Os espectros de emissão e de excitação foram obtidos no espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC .

2.4 Metodologia

2.4.1 Actinometria

A intensidade da luz incidente nos estudos fotoquímicos foi medida através da actinometria. Foi utilizado o actinômetro químico sal de Reinecke *trans*-K[Cr(NH₃)₂(NCS)₄].^{87,88} Para obtenção do sal K₃[Fe(C₂O₄)₃] 3H₂O utilizou-se uma mistura de uma solução de 1,50 molL⁻¹ de K₂C₂O₄ e com uma solução 1,50 molL⁻¹ de FeCl₃ sob agitação

Introdução

=====

constante e protegida da luz, foi utilizado 1,0 L de solução. O precipitado de $K_3[Fe(C_2O_4)_3] \cdot 3H_2O$ foi recristalizado em água morna, depois seco e armazenado em um dessecador na ausência de luz.

Irradiou-se 3,0 mL da solução do actinômetro em uma cela de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico por 3 min. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 2,0 mL da solução de actinômetro irradiada para um balão volumétrico de 10,0 mL contendo 2,5 mL de tampão acetato ($1,0 \text{ molL}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 $0,50 \text{ molL}^{-1}$), e 1,0 mL de uma solução 0,1% de 1,10-fenantrolina. O volume da solução foi ajustado para 10,0 mL com água destilada. Em seguida, preparou-se um branco utilizando o mesmo procedimento, exceto que a solução de actinômetro não foi irradiada. As duas soluções foram mantidas no escuro por uma hora e, após esse tempo, foram medidas as absorvâncias das duas soluções no comprimento de onda de 510 nm.

Para calcular a intensidade da luz incidente utilizou-se a equação 1:

$$I_i = \frac{6,02 \times 10^{23} \times V_1 \times V_3 \times \Delta A}{\phi_{Fe} \times t \times V_2 \times l \times \epsilon_{Fe} \times f} \quad (1)$$

Onde:

V_1 = volume da solução de actinômetro irradiada (mL);

V_2 = volume da alíquota de solução irradiada para análise (mL);

V_3 = volume final, ou seja, volume do balão volumétrico onde o V_2 foi diluído;

ΔA = diferença da absorvância a 510 nm da solução irradiada e da absorvância a 510 nm do branco;

$\Phi_{Fe^{2+}}$ = rendimento quântico de formação do íon Fe^{2+} no comprimento de onda da luz irradiada;

Introdução

f = fração da luz absorvida pela solução irradiada no comprimento de onda de irradiação;

t = tempo de irradiação em segundos;

l – caminho ótico da cela (cm);

ϵ_{Fe} = coeficiente de extinção molar do íon complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ a 510 nm ($\epsilon = 1,11 \times 10^4 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$);

I_i = intensidade da luz incidente (Einstein s^{-1});

O valor encontrado para a intensidade das lâmpadas usadas nos experimentos fotoquímicos em solução aquosa para o complexo II foi de $1,26 \cdot 10^{-7} \text{ Einstein s}^{-1}$.

2.4.2 Rendimento quântico de emissão

O cálculo de rendimento quântico de emissão é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos por um determinado composto. Este pode ser determinado por comparação com um padrão conhecido da literatura,⁸⁹ como $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, a partir da equação (2)⁹⁰:

$$\Phi_{\text{am}} = \Phi_{\text{std}} (I_{\text{am}}/A_{\text{am}}) (A_{\text{std}}/I_{\text{std}}) (\eta_{\text{am}}/\eta_{\text{std}})^2 \quad (2)$$

Onde,

A_{am} , A_{std} são as absorbâncias da amostra e do padrão em um mesmo comprimento de onda;

I_{am} , I_{std} são as intensidades integradas de emissão da amostra e do padrão;

η_{am} , η_{std} são os índices de refração dos solventes^{91,92} usados para preparar as soluções da amostra e do padrão.

Os valores de rendimento quântico encontrados para rodamina B, precursor RPA e complexo, foram 0,71, 0,65 e 0,62 respectivamente.

Introdução

2.4.3 Condutividade molar

As medidas de condutividade molar para o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) foram realizadas em um condutivímetro Thermo Electron Coporation Orion 013610, sendo o aparelho calibrado com solução padrão de cloreto de potássio (thermo) 1413 μS/cm e 25 °C. Após a calibração, o eletrodo foi lavado com água miliQ. Em seguida, foram efetuadas as medidas dos padrões cloreto de magnésio, sulfato de magnésio e acetato de magnésio em soluções de 2 e 10%.⁹³ Por conta da solubilidade, as medidas do complexo foram preparadas em soluções 0,5 e 1%. As medidas foram realizadas em triplicatas.

2.4.4 Determinação do pKa utilizando o método potenciométrico

O Pka do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) foi determinado pelo método potenciométrico. Para as medidas de ph foram preparadas soluções de ácido clorídrico 2,0x10⁻² molL⁻¹ e hidróxido de sódio 2,0x10⁻² molL⁻¹. Preparou-se um branco e em seguida solubilizou-se 6,0 mg do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) em 15,0 mL de água miliQ em um béquer de 50,0 mL, sob agitação constante. O pH da amostra foi ajustado para 12 com a solução padrão de NaOH. Durante as medidas o eletrodo permaneceu em repouso até estabilização da leitura. Foram adicionadas alíquotas de 25 a 2000 μL da solução padrão de HCl_(aq) à amostra, e após cada adição o pH foi registrado até atingir o pH 2. Com os dados obtidos obteve-se uma curva de titulação (pH x V) para determinação do pKa do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) . Os experimentos foram realizados em triplicatas. A mesma metodologia foi aplicada para o ácido isovanílico livre.⁹⁴

2.4.5 Determinação da estabilidade química utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio RMN ^1H

O estudo de estabilidade foi realizado em solução aquosa pH=7,4. O complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) foi exposto à luz solar e comparado com a amostra protegida da luz através dos espectros de RMN ^1H . Os experimentos foram realizados durante 5 dias para ambas as amostras. Os espectros foram processados no software MestReNova 9.0.

2.4.6 Determinação da atividade sequestradora do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) utilizando o nitro-azul tetrazólio (NBT)

Para avaliar a capacidade sequestradora do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) utilizou-se riboflavina como fotosensibilizador, nitro-azul tetrazólio como spin trap e o aminoácido metionina como substrato.⁹⁵ O meio de incubação consistiu de 10,0 μL de Riboflavina com uma concentração de 3,3 μmolL^{-1} , 100,0 μL de metionina em uma concentração de 10,0 mmolL^{-1} , 100,0 μL de NBT em uma concentração de 46,0 μmolL^{-1} e 2,80 mmolL^{-1} de tampão fosfato pH=7,4 em uma concentração de 0,10 molL^{-1} .^{95,96}

O sistema foi incubado por 5 minutos em um reator utilizando lâmpadas de 420 nm. Em seguida, determinou-se o valor da absorção em 560 nm das soluções em estudo contra um branco. Concentrações de 50; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0 e 300,0 μmolL^{-1} do ácido isovanílico livre e do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) foram investigadas e logo após calculou-se o IC₅₀.

Os resultados foram expressos em média \pm SD, considerado

Introdução

=====

100% da redução do NBT como controle. Os valores de IC₅₀ foram calculados a partir de regressão não linear no software Graphpad Prism 6.0.

2.4.7 Determinação da atividade antioxidante do complexo I pelo decréscimo do sinal de EPR do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH•)

Foram preparadas soluções do radical DPPH• e do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) nas concentrações de 1,0×10⁻⁴ molL⁻¹ e 1,0×10⁻³ molL⁻¹ respectivamente, em metanol. Em seguida, a amostra do complexo foi diluída nas concentrações de 25; 50; 75; 100; 150; 200 e 250 μM. As mesmas concentrações foram estudadas para o ácido isovanílico livre. Em um tubo de ensaio foram adicionados de 25,0 até 250,0 μL de solução do ácido isovanílico livre e do complexo à solução do radical DPPH• e deixados no escuro por 1h. Os valores de IC₅₀ foram calculados a partir de regressão não linear no software Graphpad Prism, versão 6.0 a partir do cálculo das integrais (área relativa) de todos os sinais do radical DPPH obtidos no EPR em função da concentração do complexo.⁹⁷

2.4.8 Determinação da atividade antioxidante do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) pelo decréscimo da absorção no visível do radical ABTS^{•+}

O radical ABTS^{•+} foi gerado a partir da reação entre o sal de ABTS e persulfato de potássio. Preparou-se uma solução 0,0070 molL⁻¹ do sal ABTS e 0,0025 molL⁻¹ de persulfato de potássio em água destilada, em seguida, essa solução foi mantida em repouso no escuro por 16 horas para formação do radical. Após o período de incubação, a solução do radical ABTS^{•+} foi diluída em tampão fosfato (pH 7,4). As soluções do complexo e

Introdução

=====

do ácido isovanílico livre foram preparadas em solução tampão fosfato pH 7,4 utilizando uma concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$.

Em uma cubeta foram adicionados 900,0 μL da solução de radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$ (máximo de absorção em 734 nm, $\epsilon_{734} = 15000 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$) e 100,0 μL da solução do complexo ou do ligante. A mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, e em seguida, foi realizada a leitura das absorções.

O valor de IC_{50} (concentração de composto necessária para reduzir a concentração inicial do radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$ em 50%) foi determinado variando a concentração do inibidor entre 0 e 200,0 μmolL^{-1} . Assumindo o controle como 100% da atividade do radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$, a porcentagem de inibição antioxidante do complexo foi calculada em comparação ao controle.⁹⁸ Foram utilizados como padrões o Trolox e a Vitamina C. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os dados tratados no software GraphPad Prism 6.0.

2.5 Atividade inseticida do complexo *cis*-

[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) : ensaios *in vivo* com as formigas cortadeiras do gênero *atta sexdens rubropilosa*

2.5.1 Coleção de insetos

As formigas cortadeiras *atta sexdens rubropilosa* foram coletadas aleatoriamente em formigueiros do Laboratório de Formigas Urbanas e Abelhas do Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro. Os formigueiros eram abastecidos diariamente com folhas de *Eucalyptus* sp., sementes de aveia e, ocasionalmente, com folhas de outras plantas, tais como *Hibiscus* sp., *Ligustrum* sp. ou pétalas de rosa.

Introdução

2.5.2 Bioensaios

O complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) e o ácido isovanílico livre foram incorporados à dieta artificial das formigas nas concentrações de 0,20 até 2,0 mg/g. Para manutenção das formigas isoladas do formigueiro, foi usada uma dieta sólida preparada com 1,25g de glicose, 0,25g de peptona bacteriológica, 0,025 g de extrato de levedura e 0,25 g de ágar bacteriológico, dissolvidos em 25,0 mL de água destilada.⁹⁹ Para realização dos bioensaios, foram utilizadas operárias médias de *atta sexdens rubropilosa* com massa corpórea variando de 15,0 a 20,0 mg. Foram distribuídas em lotes de 50 operárias para cada concentração testada, divididas em grupos de dez formigas e mantidas em 5 placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel filtro.

As placas foram colocadas em estufa à temperatura de 24 ± 1 °C, umidade relativa acima de 70% e examinadas diariamente para a retirada e anotação do número de formigas mortas durante um período de 25 dias. Os dados obtidos foram comparados através do teste não paramétrico “log-rank”, com nível de significância de 5%, utilizando-se o software GraphPad, aplicativo Prisma 6.0.¹⁰⁰

2.5.3 Ensaios de ecotoxicidade (testes de toxicidade aguda) e estudo aquático com o peixe-zebra

A ecotoxicidade do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO), foi investigada usando o peixe-zebra (*danio rerio*) com dimensões de $3,40 \pm 0,04$ cm e $0,35 \pm 0,01$ g.¹⁰¹ Foram obtidos da empresa Aquaritiba Aquários e Peixes Ornamentais Ltda em Curitiba-PR e transportados ao Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, sendo

Introdução

=====
mantidos em aquários estoques de 20,0 L para o processo de aclimatação, com foto-período de 12h claro: 12h escuro, aeração constante e temperatura da água de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Receberam alimentação diariamente com ração para peixes ornamentais da marca Alcon®. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná sob o nº 943.

Após aclimatação, os peixes foram divididos em cinco grupos experimentais (20 peixes cada grupo), sendo o grupo controle mantido durante todo o período experimental. Os demais grupos foram expostos às concentrações de 0,20; 1,00; 2,00 e 3,00 mg/L do complexo. O bioensaio foi estático com duração de 96 horas. Após o período de exposição, os animais foram anestesiados em água contendo benzocaína 1% e eutanasiados por secção medular. O cérebro e as vísceras (fígado + intestino) foram retirados e armazenados em freezer -80°C para análises bioquímicas.

2.5.4 Ensaio de biomarcadores bioquímicos no peixe zebra

Devido à pequena quantidade de tecido, as análises bioquímicas foram realizadas utilizando 2 peixes. As amostras (fígado + intestino) foram descongeladas, moídas, pesadas e homogeneizadas na proporção de 1:10 (m/V) em tampão fosfato $0,10 \text{ molL}^{-1}$ e pH 7,0. As amostras de cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato $0,10 \text{ molL}^{-1}$ e pH 7,5 com auxílio de um micro-homogeneizador. Já as amostras das vísceras (fígado + intestino) foram centrifugadas por 30 minutos a $15.000 \times g$ a 4°C e as de cérebro, por 20 minutos a $10.000 \times g$ a 4°C , obtendo-se assim duas fases. Para as amostras de cérebro determinou-se a atividade da enzima acetilcolinesterase e nas vísceras (fígado + intestino) analisou-se a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione S-

Introdução

=====

transferase , além da lipoperoxidação.^{102, 103, 104} Em uma microplaca adicionou-se às amostras, o 5,5–ditio-bis-2-nitrobenzoato) a $0,75 \text{ mmolL}^{-1}$ e o substrato acetiltiocolina a $10,0 \text{ mmolL}^{-1}$.^{102, 104, 105} As leituras foram realizadas em 405 nm.

As análises da enzima superóxido dismutase foi determinada utilizando-se a capacidade de auto-oxidação do pirogalol. Em um microtubo adicionou-se amostra, tampão (Tris-base $1,0 \text{ molL}^{-1}$ /EDTA $5,0 \text{ mmolL}^{-1}$ pH 8,0) e pirogalol ($15,0 \text{ mmolL}^{-1}$) mantendo-se a mistura incubada por 30 min. Na sequência adicionou-se $600 \mu\text{L}$ de HCl ($1,0 \text{ molL}^{-1}$).^{105, 106} A absorção da solução resultante foi medida a em 440 nm.

A atividade da enzima catalase foi avaliada utilizando-se uma microplaca, na qual foram adicionados as amostras e solução tampão (Tris–base $1,0 \text{ molL}^{-1}$ /EDTA $5,0 \text{ mmolL}^{-1}$ pH 8,0, peróxido de hidrogênio $20,0 \text{ mmolL}^{-1}$ em $400,0 \mu\text{L}$ de água MilliQ).^{105,107} A absorção da solução resultante foi medida em 240 nm.

A atividade da enzima glutationa S-transfersase foi determinada utilizando-se uma microplaca, na qual foram adicionados as amostras e soluções de glutationa reduzida a $3,0 \text{ mmolL}^{-1}$ e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno a $3,0 \text{ mmolL}^{-1}$ em $400,0 \mu\text{L}$ de água MilliQ.^{105, 108} A absorção foi medida a 340 nm.

As análises da lipoperoxidação foram realizadas pela avaliação da concentração de hidroperóxidos usando o ensaio FOX (Ferrous Oxidation/Xylenol Orange Method). O sobrenadante das amostras foi tratado com metanol na proporção 1:2 (v/v) sendo em seguida centrifugado por 10 minutos a 10.000 xg a 4°C . Em seguida, o sobrenadante foi transferido para microtubos e incubado com uma solução de laranja de xilenol $100,0 \mu \text{ molL}^{-1}$, H_2SO_4 $25,0 \text{ mmolL}^{-1}$, BHT $4,0 \mu \text{ molL}^{-1}$, sulfato ferroso amoniacal $250 \mu \text{ molL}^{-1}$ e metanol 90% por 30 min. A absorção do

Introdução

=====

sistema reacional foi medido a 570 nm.¹⁰⁹ A concentração de proteína foi determinada com albumina bovina como padrão.¹¹⁰

2.5.5 Experimentos *in vivo* - Estudos em ratos de Wistar (machos)

Foram usados ratos machos de aproximadamente 4 meses de idade, com peso entre 230 e 300g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para este estudo 5 animais foram mantidos em gaiola de policarbonato (41 x 34 x 16 cm) com cepilho. As gaiolas foram colocadas, em uma sala com umidade e temperatura controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclos claro e escuro de 12 horas (7-19h). A água e a comida foram fornecidas a vontade durante todo o estudo. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos distintos de acordo com a necessidade de cada experimento. Todos os experimentos e tratamento dos animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, protocolo número 924. O máximo de esforço foi empreendido para minimizar possíveis desconfortos causados aos animais.

Foi realizado um estudo crônico durante 21 dias, no qual foi utilizado uma solução de 3,0 mg/mL do complexo preparado em solução salina 5% (m/v) e aplicada intraperitoneal com uma dosagem de 3,0 mg/kg todos os dias, às 14:00 horas. No 21º dia foi realizado uma sessão treino, e no 22º a sessão teste.¹¹¹

Com o objetivo de avaliar a atividade motora dos ratos, foi executado o teste de campo aberto, no qual utilizou-se um aparato que consiste em uma arena redonda (100 cm de diâmetro e 45 cm de altura), com o solo dividido em 19 quadrantes, Figura 2.1. Os animais foram colocados no centro do campo aberto e deixados a explorá-lo livremente

Introdução

=====

durante 5 minutos. Foram registrados três parâmetros motores: Número de quadrantes (isto é, o número de travessias das quatro patas do animal de um quadrante para outro), frequência de levantar (o número de vezes que os animais permaneciam sobre as patas traseiras) e tempo de imobilidade (tempo em segundos que o animal permanece imóvel).¹¹²



Figura 2.1: Representação do Campo Aberto

Fonte Adaptado: CRYAN et al., 2002

2.5.6 Teste de natação forçada

O teste de natação forçada consistiu em duas etapas. A primeira foi uma sessão treino, na qual os animais foram colocados em um tanque cilíndrico de policloreto de polivinila com dimensões de 25 cm de diâmetro e 60 cm de altura, preenchido com água a uma temperatura de 24 ± 1 °C, com profundidade de 25 cm, que não permite que os ratos toquem o fundo do tanque por 15 min, Figura 2.2. Após 24 horas da primeira sessão, os animais foram submetidos ao teste de natação por 5 minutos e seu comportamento monitorado por uma câmera localizada acima do tanque.^{113,114}

Esse teste teve como objetivo avaliar 3 parâmetros comportamentais: tempo de natação (definido como movimentos horizontais, no qual o animal realiza movimentos circulares e cruzamentos

Introdução

=====

de um quadrante para o outro), tempo de imobilidade (verificada quando não existe nenhum movimento adicional além daqueles necessários para manter a cabeça do animal fora da água) e o tempo de escalada (consiste em movimentos verticais, no qual o animal tenta com as patas dianteiras escalar as paredes do cilindro). A água era substituída após cada teste a fim de evitar a influência de temperatura e substâncias deixadas pelo rato anterior. Os resultados foram expressos em segundos.^{115,116}

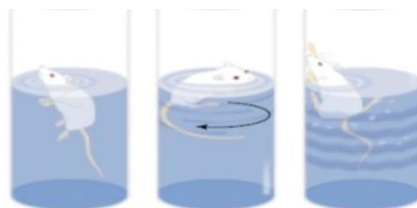


Figura 2.2: Representação do experimento de natação forçada
Fonte Adaptado: CRYAN et al., 2002

2.5.7 Labirinto em cruz elevada

Para avaliar o comportamento ansiolítico dos ratos, um dos testes mais utilizado é o labirinto em cruz elevada, o qual baseia-se em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos.¹¹⁷ O aparato para o teste consiste em dois braços abertos e dois braços fechados (por paredes laterais), opostos entre si, conforme a Figura 2.3. O rato é posto no centro do labirinto e deixado a explorá-lo e todo comportamento é filmado por 5 minutos.

Introdução



Figura 2.3: Representação do labirinto em cruz elevada

Fonte Adaptado: WALF et al., 2007

2.5.8 Biomarcadores bioquímicos - (ratos Wistar)

Para determinação da atividade das enzimas acetilcolinesterase, superóxido dismutase, catalase, glutathione S-transferase e da lipoperoxidação (utilizou-se a mesma metodologia de biomarcadores bioquímicos aplicada em 2.5.4)

2.5.9 Desativação do estado tripleto da riboflavina e inibição do oxigênio singleto pelo complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO)

Oxigênio singleto (¹O₂) foi gerado pela exposição da riboflavina a luz de 436 nm.¹¹⁸ A formação do oxigênio singleto foi monitorada com o 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol (TEMP) como spin trap pela formação do radical estável 4-hidroxi-TEMPO gerado pela reação do TEMP com oxigênio singleto.^{119,120} O oxigênio singleto foi gerado em 2,0 mL de água destilada contendo TEMP (100,0 mmolL⁻¹) e riboflavina (2,0 × 10⁻⁵ molL⁻¹). Foram preparadas amostras de ácido isovanílico e complexo

Introdução

=====

cis-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) em diferentes concentrações (20-600 μmolL⁻¹).

As amostras foram irradiadas à temperatura ambiente em uma cubeta de quartzo durante 20 min. Os valores de IC₅₀ foram calculados por regressão não-linear a partir da integração (área relativa) de todos os sinais de EPR do radical em função da concentração estudada.⁹⁷

2.5.10 Oxidação lipídica monitorada por espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons

As amostras de carne foram preparadas por homogeneização em solução tampão (MES 50,0 mmolL⁻¹ pH 5,7) utilizando um homogeneizador Ultra Turrax. Para este experimento, manteve-se uma relação de 4:10 m/v, (emulsão de carne/solução tampão), spin trap POBN (100 mmolL⁻¹) e diferentes concentrações do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) (100 a 700 μmolL⁻¹). O ácido isovanílico livre não foi estudado devido a sua baixa solubilidade em água. As amostras foram aquecidas durante 2 horas em banho-maria a 75 ± 1°C em pequenos sacos plásticos.¹²¹ Na sequência, foram filtradas e centrifugadas a temperatura ambiente para separação da fase aquosa e analisadas por EPR.

2.5.11 Estudo de tempo de armazenamento de carne suína

Com o intuito de investigar o efeito protetor do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) durante o tempo de armazenamento das amostras de carne, utilizou-se o spin trap POBN na concentração de 100,0 mmolL⁻¹ em solução tampão fosfato pH 7,0 e 5g de emulsão de carne para 10 mL de solução tampão (m/v), utilizando-se uma concentração de 1,50

Introdução

=====

mmolL⁻¹ do . As amostras foram mantidas em recipientes de vidros dentro de uma estufa a 70 ± 1 °C protegidos da luz.

O estudo da peroxidação lipídica das amostras foi acompanhado pela formação do radical/adulto/POBN^{*} durante 15 dias, por espectroscopia paramagnética de elétrons.¹²² Os valores de IC₅₀ foram calculados por regressão não linear a partir da integração (área relativa) de todos os sinais em função da concentração estudada.⁹⁷

2.5.12 Taxa de consumo de oxigênio

As amostras foram preparadas com 13,0 g de carne suína a qual foi homogeneizada com 107,0 mL de solução tampão MES 0,050 molL⁻¹ pH 5,7. A suspensão foi mantida a 37,0°C e imediatamente transferida para um recipiente de vidro totalmente vedado (150,0 mL). As amostras foram mantidas sob agitação constante e a concentração de oxigênio foi medida com um eletrodo de oxigênio de Clark por 180 minutos. A proporção de 100% de leitura de oxigênio foi calibrada com solução tampão MES com saturação de ar a 37 ± 1 °C durante 15 minutos.¹²³ Foi realizado um ajuste linear entre 96 e 66% para calcular a taxa de consumo de oxigênio expresso em % O₂/Min. Cada amostra consistiu em quatro réplicas independentes e os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD).

Introdução

2.5.13 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em duplicatas ou quintuplicata e foram expressas como média \pm DP. As análises foram executadas com o uso dos programas OriginPro2015 e GraphPad Prism 6.01. Todos os testes foram considerados como estatisticamente significantes, quando $p < 0,05$.

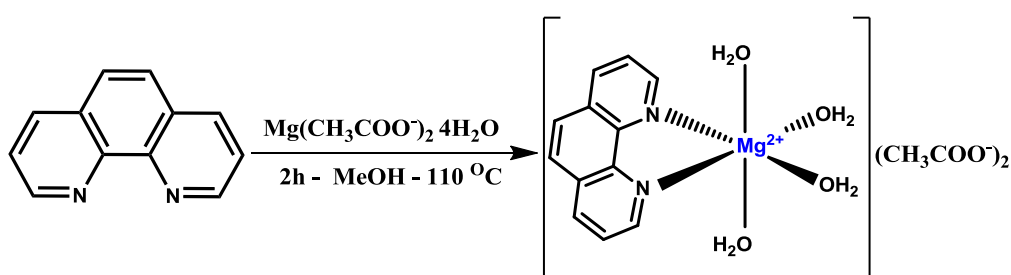
Capítulo 3

Síntese e Caracterização do Aquo-complexo
 $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$ do ligante RPA e dos
Complexos
cis- $[\text{Mg}(\text{iso})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ e
 $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]$ onde iso = isovanilato

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização por RMN do aquo-complexo $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$

Com o objetivo de avaliar o efeito da coordenação do ligante 1,10-fenantrolina ao íon $\text{Mg}(\text{II})$, o aquo-complexo $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO}^-)_2$ foi sintetizado, conforme o procedimento descrito na seção 2.2.1 e esquematizado na via sintética 3.1.



Esquema 3.1: Rota sintética para o aquo-complexo

Os dados de análise elementar de C, H e N indicam a presença de um composto com fórmula mínima de $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{MgN}_2\text{O}_8$, Tabela 3.1. A partir dos dados do espectro de massas, *Figura A, em anexo*, é possível verificar a presença dos fragmentos $m/z = 181,07$ correspondendo à phenH^+ e do fragmento $m/z = 203,05$ referente ao íon $[\text{Mg}(\text{phen})]^{2+}$.

TABELA 3.1: Resultados de análise elementar dos teores de C, H e N para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$ considerando a fórmula mínima $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{MgN}_2\text{O}_8$.

experimental (teórico) %			
	C	H	N
	44,12 (44,62)	5,92 (6,08)	6,44 (6,50)
% Erro	1,13	2,70	0,93

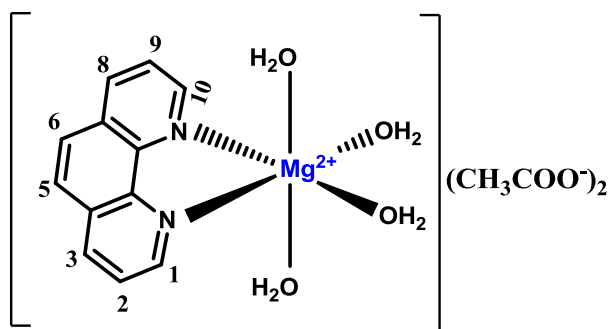
Resultados e Discussão

Os espectros de RMN de ^1H da 1,10-fenantrolina e do aquo-complexo são mostrados na Figura 3.1 (A e B), e as atribuições dos picos na Tabela 3.2. A coordenação da 1,10-fenantrolina ao íon $\text{Mg}(\text{II})$ levou ao deslocamento de todos os sinais da fenantrolina para maiores frequências, bem como na alteração da multiplicidade dos sinais, de dubletos e multipletos bem definidos, para singletos alargados, Figura 3.1 B. Essa alteração pode ser atribuída a alta densidade de carga do íon $\text{Mg}(\text{II})$ que altera o momento de quadrupolo elétrico da molécula, indicando que a troca do hidrogênio ocorre a uma velocidade alta.^{124, 125}

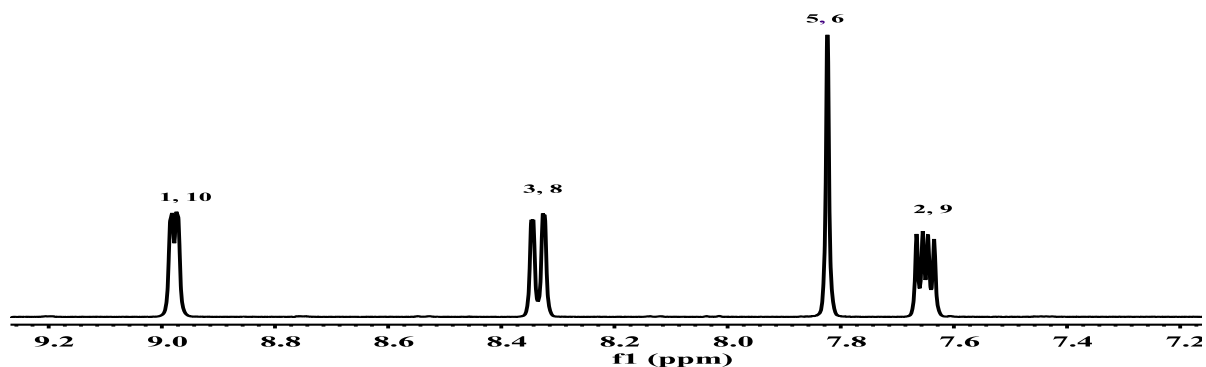
De maneira geral, os tempos de relaxação em espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) podem ser descritos como: relaxação spin-rede ou longitudinal, caracterizada por T_1 e relaxação spin-spin ou transversal, caracterizada por T_2 . Vale lembrar, no entanto, que ambos os processos são distintos e ocorrem simultaneamente, mas com tempos diferentes dependendo da amostra.^{124, 125}

Os dados da Tabela 3.3, mostram uma redução no tempo de relaxação T_1 após a coordenação do íon $\text{Mg}(\text{II})$ em todos os prótons. O tempo de relaxação do próton T_{1_1} da 1,10-fenantrolina, por exemplo, teve seu tempo reduzido em 84% após a coordenação. Isso indica que tal efeito pode está relacionado com alto poder polarizante do íon $\text{Mg}(\text{II})$.^{125, 126, 127}

Resultados e Discussão



A



B

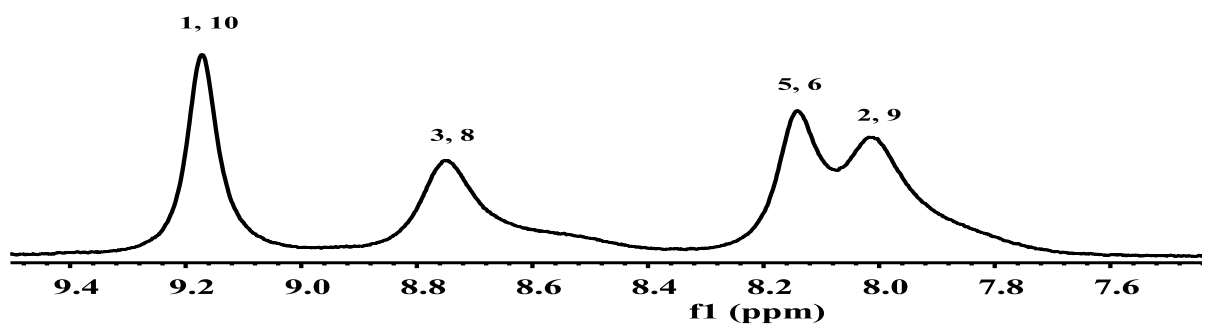


FIGURA 3.1: Espectros de RMN ^1H para a phen livre (A) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$ (B), em MeOD-d_4 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Resultados e Discussão

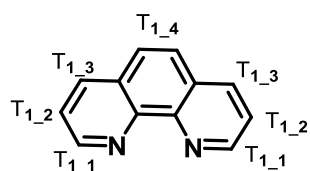
TABELA 3.2: Dados de RMN de ^1H para 1,10-fenantrolina (phen) livre e para o aquo-complexo ($[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$) em MeOD- d_4 a 25 ± 1 °C. Deslocamentos químicos em δ (ppm), multiplicidade de spin entre parênteses.

^1H	phen	aquo-complexo
	δ (ppm,m)	δ (ppm, m)
1,10	8,98 (dd) 2H	9,17 (sl)*
3, 8	8,34 (dd) 2H	8,75 (sl)
5, 6	7,82 (s) 2H	8,14 (sl)
2, 9	7,65 (q) 2H	8,01 (sl)

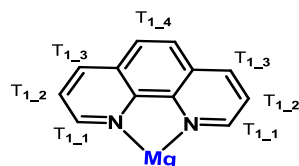
* (sl) Sinal alargado

TABELA 3.3: **Dados de** RMN de ^1H para o tempo de relaxação da 1,10-fenantrolina livre (phen) e do aquo-complexo $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$ em MeOD- d_4 a 25 ± 1 °C.

A) phen



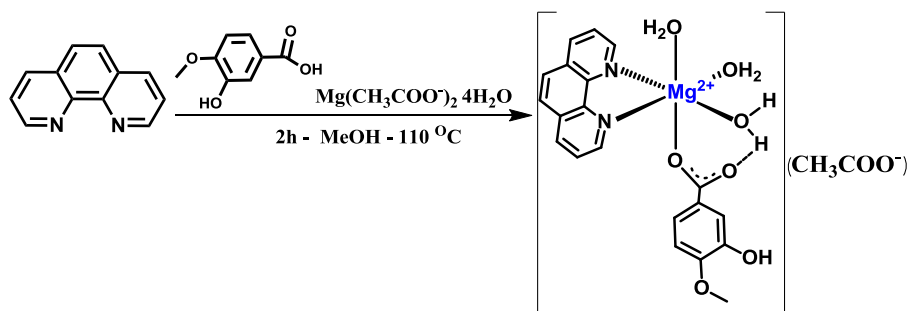
B) $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$



T. de relaxação (s)	phen	$[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$
T_{1-1}	5,60	0,89
T_{1-2}	4,70	2,67
T_{1-3}	4,60	3,25
T_{1-4}	4,50	3,21

3.2 Caracterização do *cis*-[Mg(iso)(phen)(H₂O)₃](CH₃COO)

O esquema 3.2 apresenta a rota sintética usada na obtenção do complexo *cis*-[Mg(iso)(phen)(H₂O)₃](CH₃COO). Os dados de análise elementar de C, H e N mostrados na Tabela 3.4 indicam a presença de um composto com fórmula mínima [MgC₂₂H₂₄N₂O₉] MM = 484,75 g/mol.



Esquema 3.2: Rota sintética para obtenção do complexo *cis*-[Mg(iso)(phen)(H₂O)₃](CH₃COO).

TABELA 3.4: Resultados de análise elementar dos teores de C, H e N para o complexo *cis*-[Mg(iso)(phen)(H₂O)₃](CH₃COO) considerando a fórmula mínima MgC₂₂H₂₄N₂O₉.

MM(g/mol)	experimental(teórico) %		
	C	H	N
484,75	55,01 (54,51)	5,12 (4,99)	5,91 (5,78)
% Erro	0,90	2,53	2,1

Todas as tentativas para obtenção de um mono cristal que permitisse a análise estrutural do complexo falharam. Por este motivo a geometria do complexo foi otimizada por cálculo computacional usando a teoria do funcional de densidade (DFT).

A estrutura molecular otimizada é mostrada na Figura 3.2 e os parâmetros geométricos (comprimentos de ligação e ângulos de ligação) na

Resultados e Discussão

Tabela 3.5. A estrutura proposta é coerente com outros complexos de Mg(II) contendo grupos carboxilato na esfera de coordenação.^{128, 129, 130, 131}

Na estrutura mostrada na Figura 3.2, um dos átomos de oxigênio do grupo carboxilato do ligante isovanilato está coordenado ao íon Mg(II) e o outro interage por uma ligação hidrogênio com uma molécula de água coordenada ao Mg(II), deixando a carga negativa do grupo carboxilato ressonando sobre o anel gerado com a coordenação.

Na geometria otimizada dois átomos de N do anel da fenantrolina ficam posicionados perpendiculares ao isovanilato e quase simetricamente localizados entre duas moléculas de água uma das quais interage com o isovanilato. Os comprimentos de ligação obtidos são coerentes com os observados para complexos de Mg(II) contendo na esfera de coordenação moléculas de água e grupo carboxilato.^{129, 131} Os dados da Tabela 3.5 mostram que a ligação hidrogênio com o átomo de oxigênio do grupo carboxilato fortalece a ligação Mg-O(carboxilato) em relação as ligações Mg-O(OH₂). Por outro lado, espera-se que a ligação hidrogênio deveria diminuir a basicidade do grupo carboxilato (isovanilato). Consistente com a geometria proposta o espectro de RMN de ¹³C do complexo mostrou um deslocamento químico do C13 do grupo carboxilato do isovanilato de 7 ppm, indicando um aumento da acidez do ânion isovanilato após coordenação ao íon Mg(II), Figura 3.3.

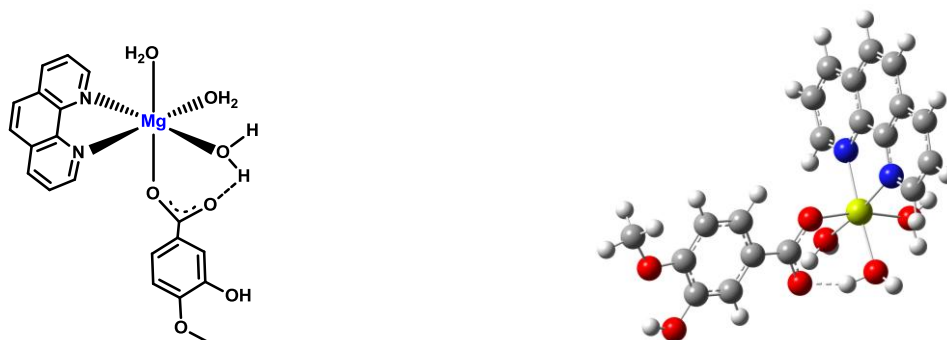
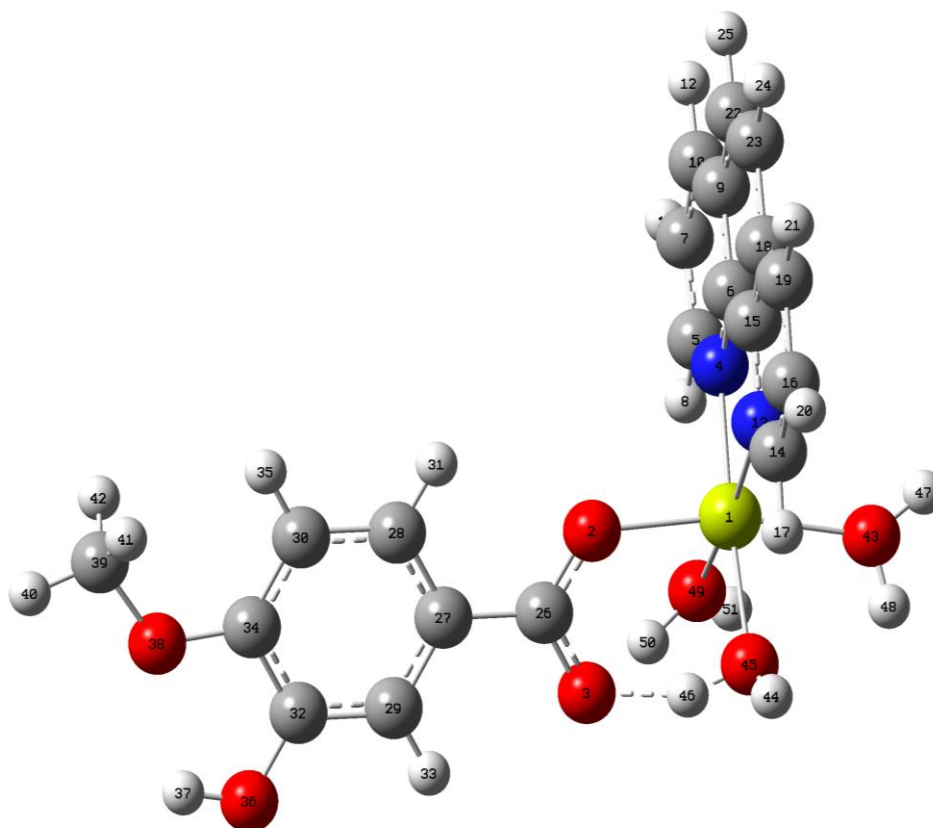


FIGURA 3.2: Estrutura do complexo *cis*-[Mg(phen)(H₂O)₃](CH₃COO) (A) e (B) Estrutura otimizada em fase gasosa utilizando o DFT.

Resultados e Discussão

TABELA 3.5: Parâmetros geométricos (comprimentos de ligação) para a geometria otimizada por DFT do complexo *cis*-[Mg(iso)(phen)(H₂O)₃](CH₃COO)



Dados teóricos^{129, 131}

Ligação	Comprimento de ligação(Å)
Mg-O43	2,08
Mg-O45	2,12
Mg-O49	2,08
Mg-O2	2,04
O3-O45	2,55
Mg-N4	2,17
Mg-N13	2,20

Resultados e Discussão

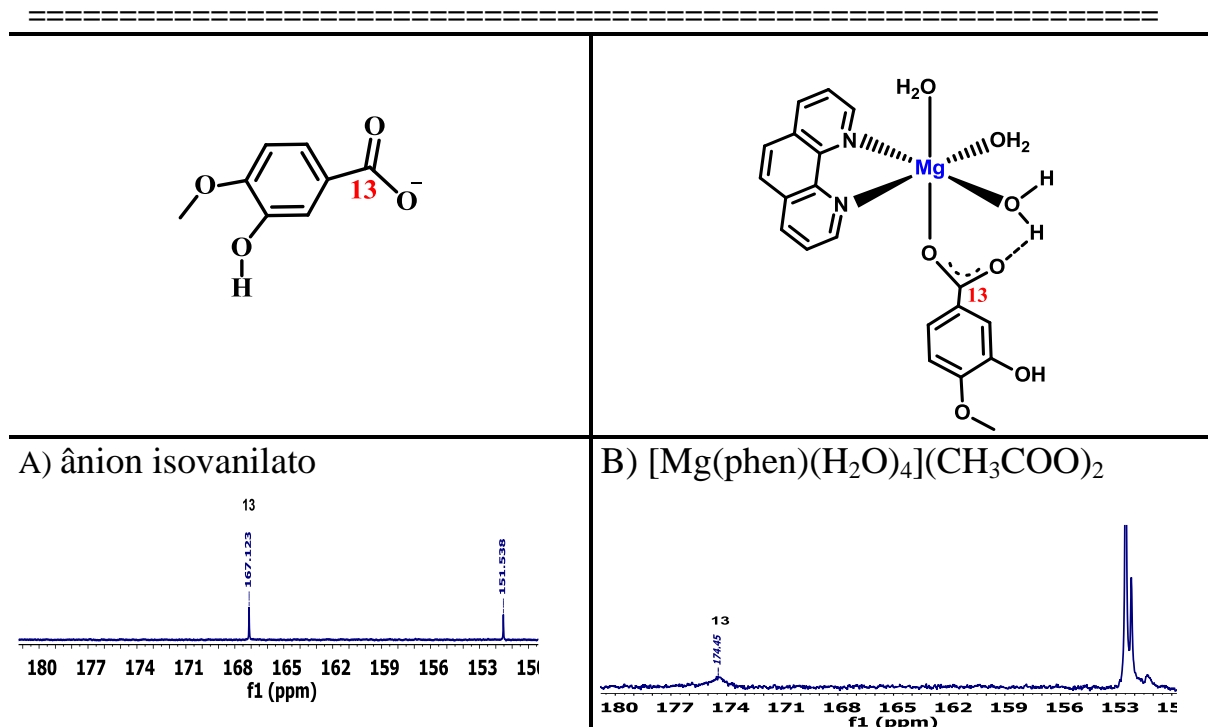


FIGURA 3.3: Espectro de RMN de ^{13}C na região compreendida entre 150 e 180 ppm para o ânion (A) e para o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) (B) em MeOD-d₆ a 25 ± 1 °C.

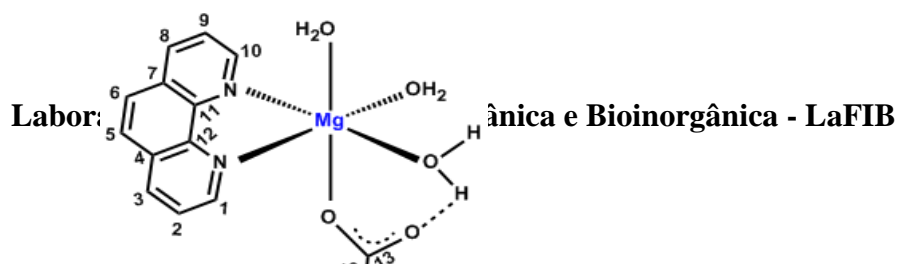
Para corroborar com a análise estrutural realizou-se experimentos de RMN de ^1H , e COSY. Os espectros de RMN de ^1H para o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO), da fenantrolina livre e do ácido isovanílico em MeOD-d₄ são mostrados na Figura 3.4 e Tabela 3.6. A fenantrolina contém quatro pares de hidrogênio equivalentes, os quais ressonam na região de 7.6 a 9.2 ppm. O efeito da coordenação ao íon Mg(II) resulta em alterações significativas tanto nos prótons da fenantrolina quanto no íon isovanilato. Todos os sinais são alargados e deslocam para menor frequência. As alteração mais significativa ocorreram nos prótons 5 e 6, 2 e 9 da fenantrolina e nos prótons 17 e 18 do íon isovanilato, os quais alargam ao ponto de se sobreporem, comportamento que pode ser explicados pela redução no tempo de relaxação na ordem de 70 e 90% respectivamente, Tabela 3.7, após a coordenação do íon isovanilato ao

Resultados e Discussão

Mg(II). Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C e COSY ($^1\text{H}^1\text{H}$) em MeOD- d_4 são apresentados em Anexo, nas Figuras D, E e F.

Com o objetivo de melhor analisar os sinais alargados, foi efetuado o experimento de EPR do complexo em MeOD- d_4 e do padrão de Cr(III) usado como referência, com um $g = 1,9797$, Figura 3.5. O complexo apresentou $g = 2,0043$, indicando um sinal proveniente de um radical orgânico, com intensidade muito baixa em relação ao padrão de Cr(III), mostrando que o sinal observado para o complexo não era significativo.^{132, 133} sendo considerado apenas impureza de baixa intensidade presente na amostra e não justifica o alargamento de sinal observado nos espectros de RMN.

Os resultados do tempo de relaxação (T_1) do complexo *cis*-[Mg(iso)(phen)(H₂O)₃](CH₃COO), Tabela 3.7, mostram uma redução nos tempos de relaxação dos prótons $T_{1,1}$ e $T_{1,2}$ de 94,60 e 97,12% respectivamente, em comparação à 1,10-fenantrolina livre. O efeito da coordenação no íon Mg(II) não alterou apenas os prótons próximos ao centro de coordenação, mas todos os prótons do complexo, a exemplo disso, é a redução de 46% no valor do tempo de relaxação dos prótons $T_{1,1}$ do grupo metoxi em relação ao ligante livre.



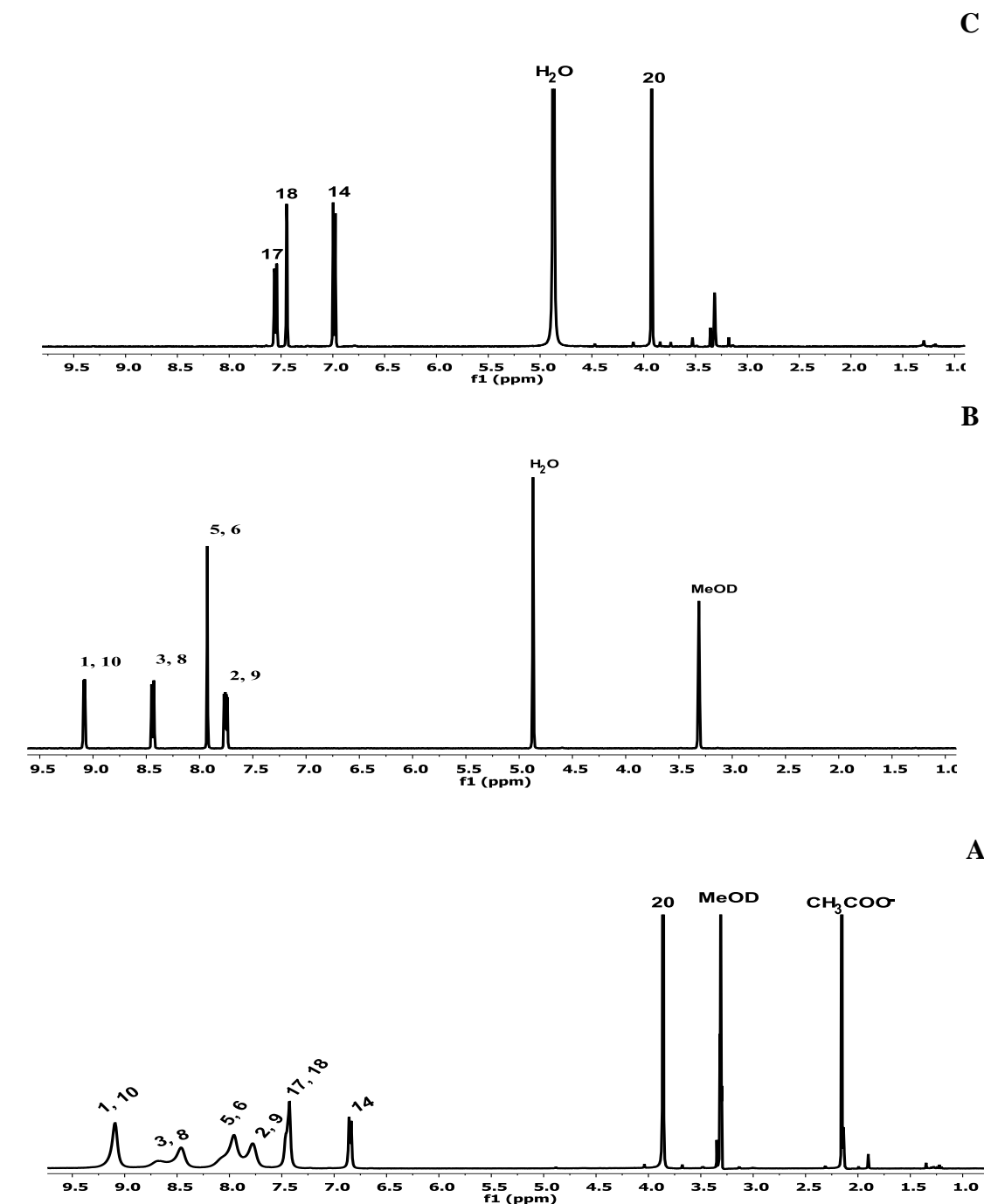


FIGURA 3.4: Espectros de RMN de ^1H do *cis*- $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ (A), 1,10-fenantrolina livre (B) e ânion (C) em MeOD-d_4 a 25 ± 1 °C.

Resultados e Discussão

TABELA 3.6: Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e COSY para o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) em MeOD-d₆ a 25 ± 1 °C.

C (δ)	C (δ)	H (δ)	COSY
1 (150,41)	10 (150,13)	1,10 (9,10)	7,78; 9,10
2 (127,17)	9 (127,17)	2, 9 (7,78)	7,78; 8,50; 9,10
3 (138,91)	4 (129,85)	3 (8,50)	8,50; 9,10
5 (128,92)	6 (128,92)	5,6 (8,00)	8,0
7 (129,85)	8 (138,91)	8 (8,50)	7,78; 8,50; 9,10
11 (145,99)	12 (145,87)	-	-
13 (172,30)	15 (142,79)	-	-
14	111,26	14 (6,81)	6,81
16 (149,27)	19 (123,01)	-	
17 (115,96)	- 18 (121,48)	7,37	7,37
20	55,95	3,75 (s)	3,75

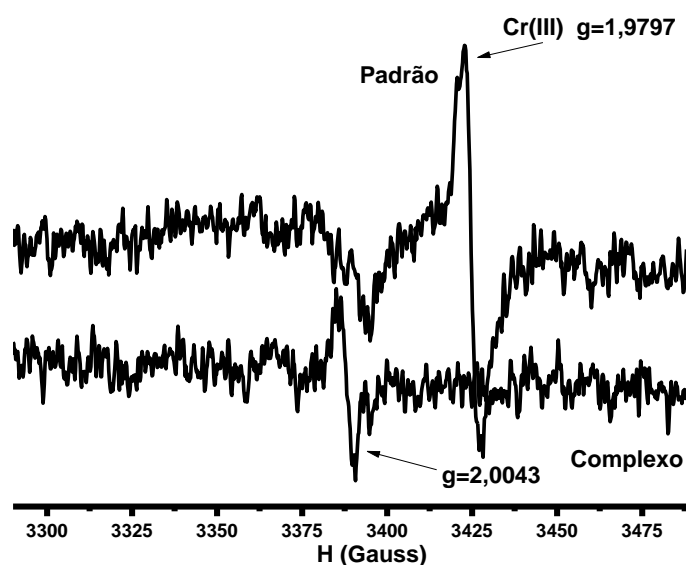
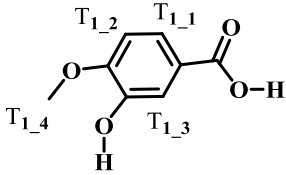
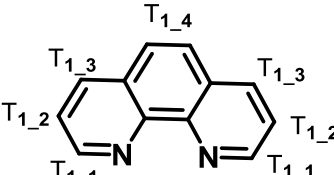
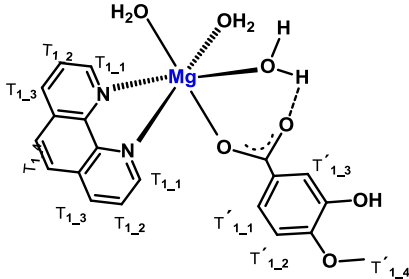


FIGURA 3.5: Espectro de EPR em MeOD-d₄ do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO), e do padrão de Cr(III).

Resultados e Discussão

TABELA 3.7: Tempo de relaxação do ânion isovanilato, da 1,10-fenantrolina livre e complexo *cis*-[Mg(phen)(H₂O)₄](CH₃COO)₂ obtidos nos espectros de RMN de ¹H em MeOD-d₄ a 25 ± 1 °C.

A) Ácido isovanílico	B) 1,10 – fenantrolina	C) <i>cis</i> -[Mg(phen)(H ₂ O) ₄](CH ₃ COO) ₂	
			
T. de relaxação (s)	Ácido isovanílico	1,10-fenantrolina	Complexo I
T ₁₋₁	2,0	5,6	0,3
T ₁₋₂	1,5	4,7	0,1
T ₁₋₃	1,6	4,6	0,7
T ₁₋₄	5,0	4,5	1,1
T' ₁₋₁ e T' ₁₋₂	-	-	0,6
T' ₁₋₃	-	-	2,2
T' ₁₋₄	-	-	2,7

3.2.1 Estudo de estabilidade por RMN de ¹H

O complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) mostrou-se estável em solução aquosa quando estocado no abrigo da luz ou exposto à luz solar natural pelo período de 120 horas, Figura 3.6 A e B. A estabilidade pode ser comprovada pela ausência de alterações nos espectros de RMN de ¹H em tampão fosfato D₂O (pH = 7,4).

Resultados e Discussão

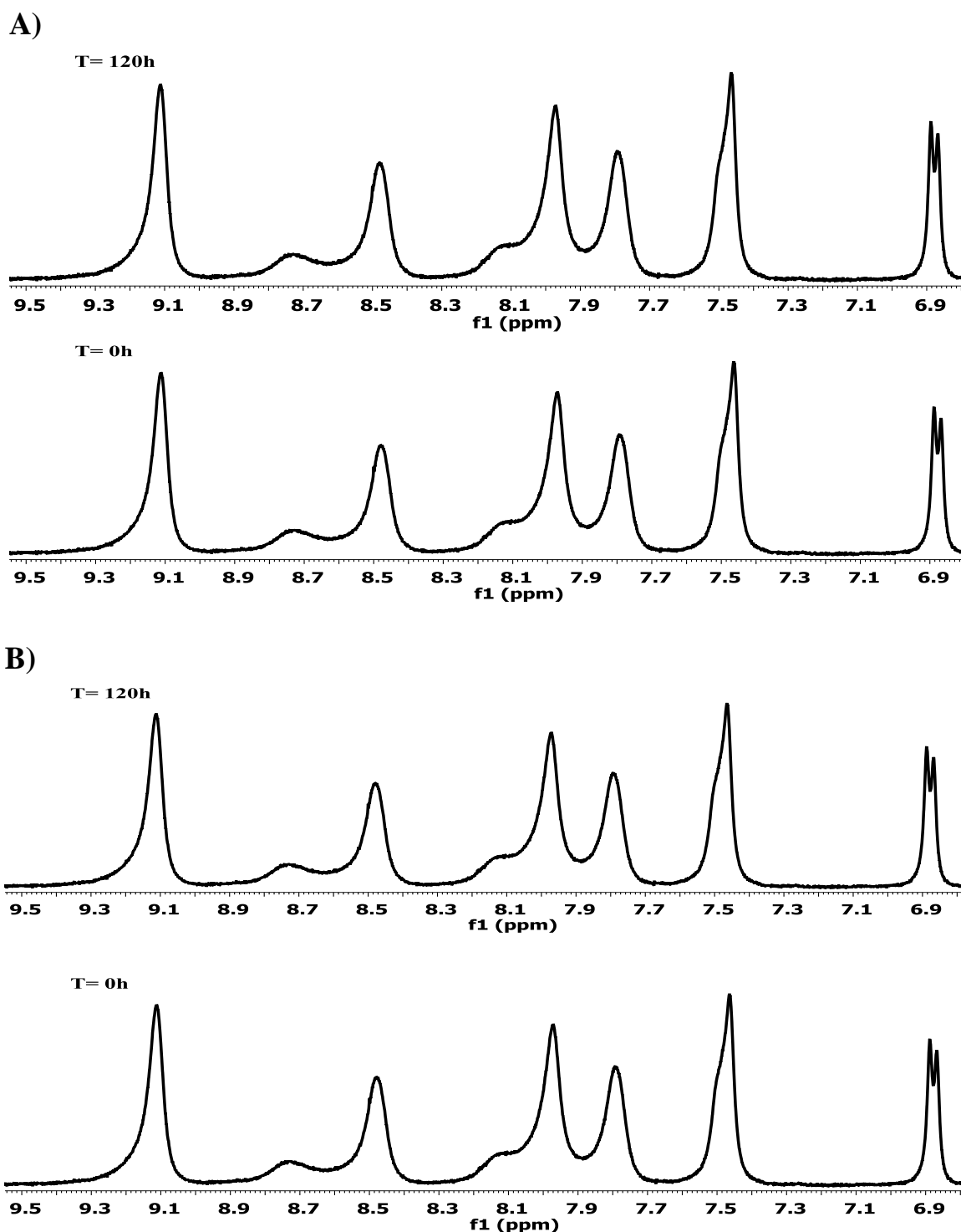


FIGURA 3.6: Espectro de RMN ^1H do complexo *cis*- $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ nos tempos zero e após 120 hs de exposição à luz (A) e protegido da luz (B) em solução tampão fosfato pH = 7,4 em (D_2O).

3.2.1 Solubilidade e valor do pKa do complexo

cis-Mg(phen)(iso)(H₂O)₃(CH₃COO)

O valor de pKa para o ácido isovanílico livre e do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃(CH₃COO)] foram determinados pelo método potenciométrico,⁹⁴ Figura 3.7 A e B. Os valores de 4,67 (ligante livre) e 6,02 (complexo) mostram que o complexo apresenta menor acidez comparada ao ácido isovanílico livre.

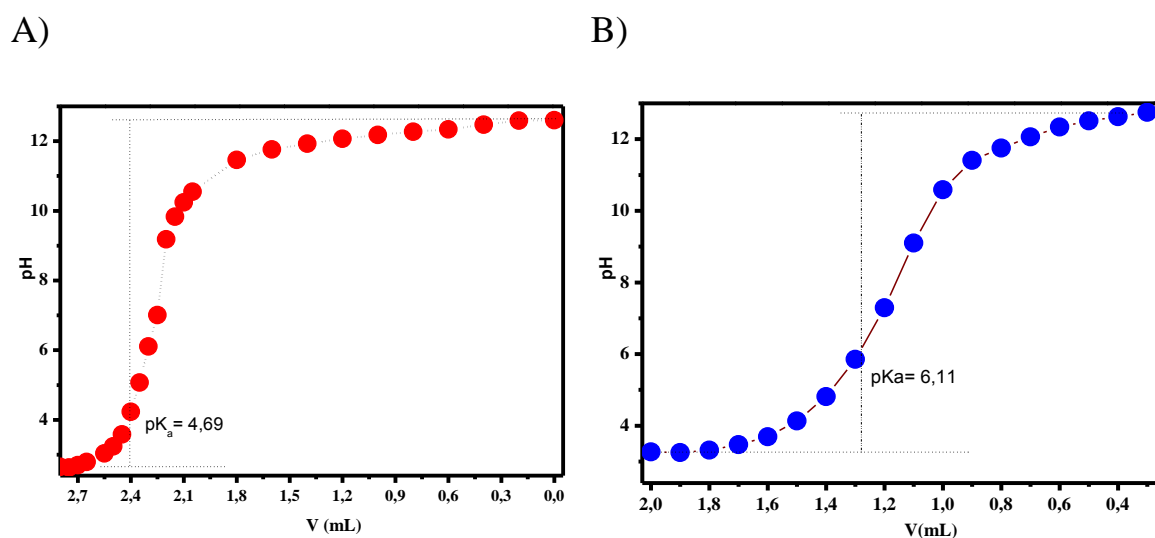
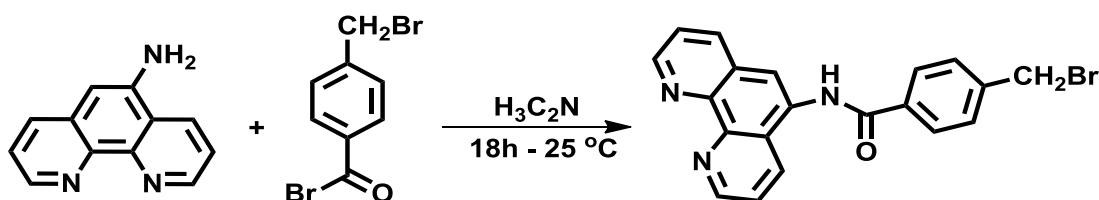


FIGURA 3.7: Curva potenciométrica obtida para o ânion livre (A) e *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃(CH₃COO)] (B).

3.3 Caracterização do ligante 4-(bromometil)-N-(1,10-fenantrolin-5-il) benzamida

O ligante 4-(bromometil)-N-(1,10-fenantrolin-5-il)benzamida foi sintetizado de acordo com a metodologia proposta na literatura,⁸² seguindo a rota sintética proposta no esquema 3.3. As medidas de espectrometria de massas com ionização por "electrospray", Figura 3.8, mostraram uma relação $m/z = 392$ $[C_{20}H_{14}N_3O]H-Br$, além da presença do brometo em $m/z = 471,7$. Este ligante foi caracterizado por RMN de 1H , Figura 3.8 A e ^{13}C , Figura G em anexo). Os deslocamentos químicos, constantes de acoplamentos, e suas respectivas atribuições são mostrados na Tabela 3.8. Os experimentos de RMN foram realizados em DMSO- d_6 deuterado a fim de atribuir o sinal referente ao grupo amino em 10,89 ppm, Figura 3.8 A. Os dados obtidos são concordantes com os valores apresentados na literatura,⁸² o que confirma a formação desta molécula.



Esquema 3.3: Rota sintética para obtenção do ligante 4-(bromometil)-N-(1,10-fenantrolin-5-il) benzamida.

Resultados e Discussão

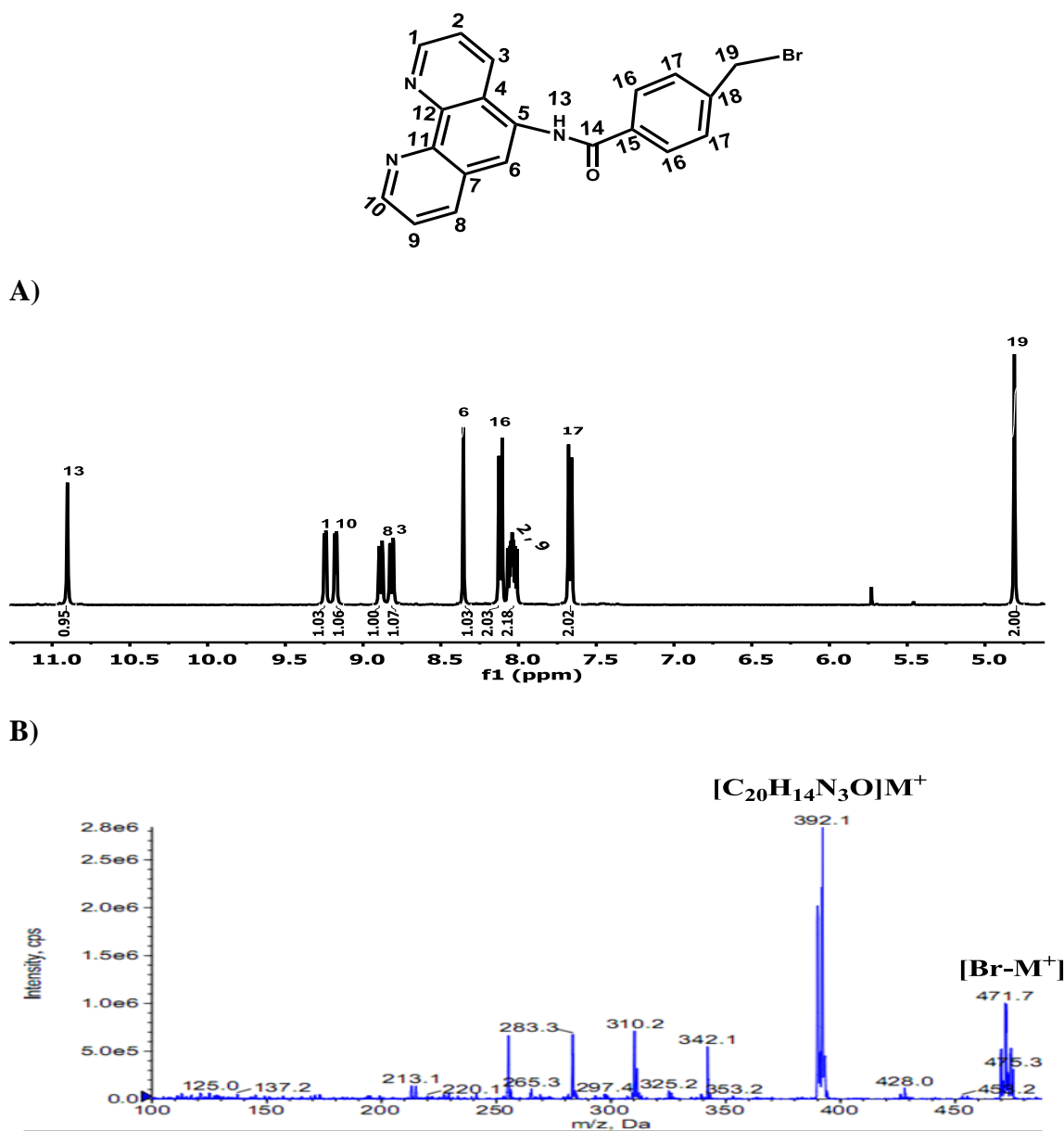


FIGURA 3.8: Espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 a 25 ± 1 °C e Espectro de massas (B) do ligante 4-(bromometil)-N-(1,10-fenantrolin-5-il) benzamida em metanol ultra puro.

Resultados e Discussão

=====

TABELA 3.8: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , em δ (ppm) e constante de acoplamento J(Hz) do ligante 4-(bromometil)-N-(1,10-fenantrolin-5-il) benzamida.

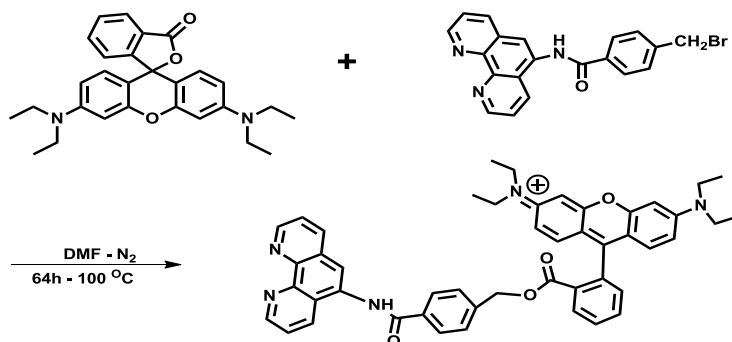
X (δC)	X(δC)	δxH (ppm), (mult) J(Hz)
1	150,10	9,24- 9,24; (m); 4,6-1,5
2 (123,30)	9 (123,85)	8,02 - 8,07; (m)
3	136,56	8,87 - 8,89; (d,d); 8,5-1,5
4 (132,21)	5 (145,68)	-
6	(123,91)	8,35; (s)
7	(144,11)	-
8	126,93	8,87 - 8,89; (d,d); 8,3-1,6
10	149,75	9,16 - 9,18; (d,d); 4,6-1,5
11 (132,34)	12 (128,21)	-
13	-	10,90 (s)
14 166,37	15 (134,09)	-
18	142,13	-
16	129,60	8,10 - 8,12; (d); 8,1
17	128,55	7,65 - 7,67; (d); 8,2
19	33,68	4,81;(s)

3.3.1 Caracterização do ligante RPA-N-(9-(2-(((4-((1,10-fenantrolin-5-il) carbamoil) benzil) oxi) carbonil) fenil)-6-(dietilamino)-3H-xanten-3-ilideno)brometo de N-etiletanamínio

O ligante RPA foi sintetizado segundo a metodologia proposta na literatura⁸² conforme a rota sintética proposta no Esquema 3.4. Os experimentos foram realizados por espectrometria de massas com

Resultados e Discussão

ionização por "electrospray", Figura 3.9 B. Na Figura 3.9B é possível identificar o pico do íon molecular em m/z 754,4 $[C_{48}H_{44}N_5O_4]M^+$.



Esquema 3.4: Rota de síntese para o N-(9-(2-(((4-((1,10-fenantrolin-5-il) carbamoil) benzil) oxi) carbonil) fenil)-6-(dietilamino)-3H-xanten-3-ilideno)brometo de N-etiletanamínio- RPA.

Os dados obtidos são concordantes com os valores apresentados na literatura¹, confirmando a obtenção deste composto. Os espectros de RMN de ¹³C mostraram que a substituição do brometo (baixa eletronegatividade) pelo oxigênio (alta eletronegatividade) no carboxilato da rodamina-B base, provocou um deslocamento químico (δ) de 33,55 ppm no carbono 19, passando de 33,68 ppm no ligante 4-(bromometil)-N-(5-amino-1,10-fenantrolina) benzamida, para 67,23 ppm no ligante RPA.¹²⁴ Outra informação que leva a confirmação do ligante RPA são os 18 sinais CH do RMN Dept135 no módulo positivo e dois sinais (19 e 40) no módulo negativo referente ao (CH₂), Tabela 3.9 e Figura H em anexo.

O espectro de absorção na região do infravermelho, Figura 3.10, obtido em pastilha de CsI para o ligante RPA, confirma a presença dos estiramentos ν_{CO} em 1720 e 1182 cm^{-1} correspondente ao grupo éster e os estiramentos ν_{CO} em 1650 e 1582 cm^{-1} atribuídos à função amida, além do estiramento ν_{COC} em 1279 cm^{-1} indicando a função éter.

Resultados e Discussão

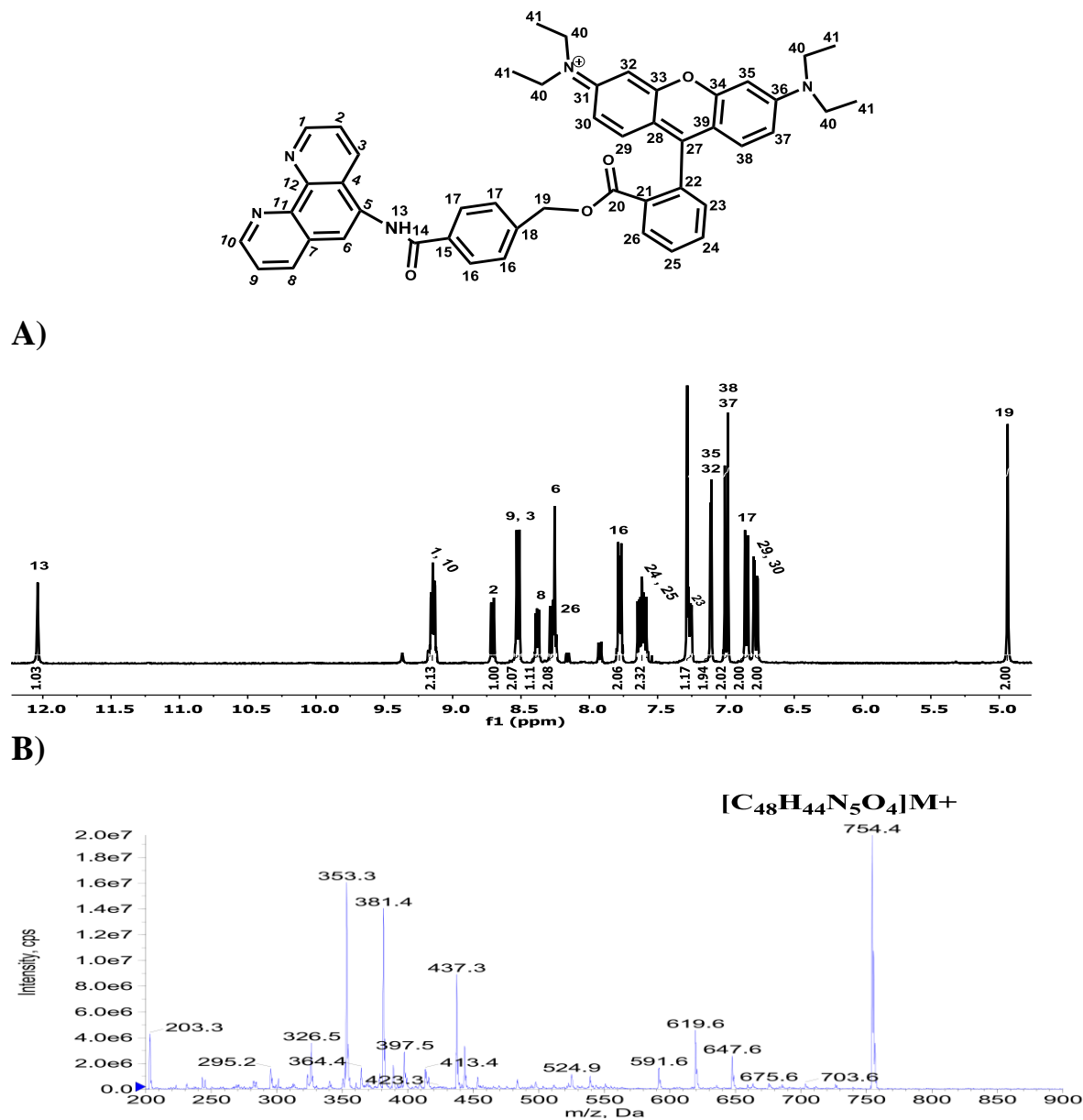


FIGURA 3.9: Espectro de RMN de ¹H em CDCl₃ a 25 ± 1°C (A), e Espectro de massas em MeOH ultra puro (B), do ligante RPA.

Resultados e Discussão

=====

TABELA 3.9: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , dept135 em δ (ppm) e a constante de acoplamento J (Hz) do ligante RPA.

X(δC)	X(δC)	Dept135 X(δC)	δH (ppm), (mult) J (Hz)
1* 150,31	10* (150,42)	1; 10 (150,31; 150,42)	9,14; (ddd); 6.5, 4.3, 1.7 Hz,
2	133,44	2 (133,44)	8,71 (dd); 8,3;1,7
3	132,51	3 (132,51)	8.55 – 8.50; (m)
4 (133,42)	5 (147,70)	-	-
6	126,55	6 (126,55)	8.41 – 8.35; (m)
7	145,84	-	-
8	123,76	8 (123,76)	8.30 – 8.24; (m)
9	124,36	9 (124,36)	7.82 – 7.74; (m)
11 - 12	130,80	-	-
14	165,80	-	-
15 (139,68)	18 (129,00)	-	-
16	128,70	16 (128,708)	7.65 – 7.58; (m)
17-29 - 30	128,39 -130,80	17 (128,39)	6.88 – 6.81; 6.78; (m); 2,5
19	67,00	19 (67,23)	4,97; (s)
20 (168,53)	21 (144,97)	-	-
22 (139,68)	27 (132,95)	-	-
23	-	-	7.27 – 7.25; (m)
24 - 25	130,68	25 (130,68)	7,58- 762; (m)
26	128,29	26 (128,29)	7.00; (d); 9,4
31-36 (156,31)	33 (158,32)	28 (127,151)	-
34	158,81	-	-
32 - 35	97.26	32-35 (96,26)	7,11; (d); 2,4
37 - 38	131,73	38 (131,731)	7,41 - 7,44; (d); 2,4
39 (132,76)	28 (127,15)	-	-
40	46,09	40 (46,09)	3,76; (s)
41	13,67	41 (16,67)	1,29; (t), 7,1

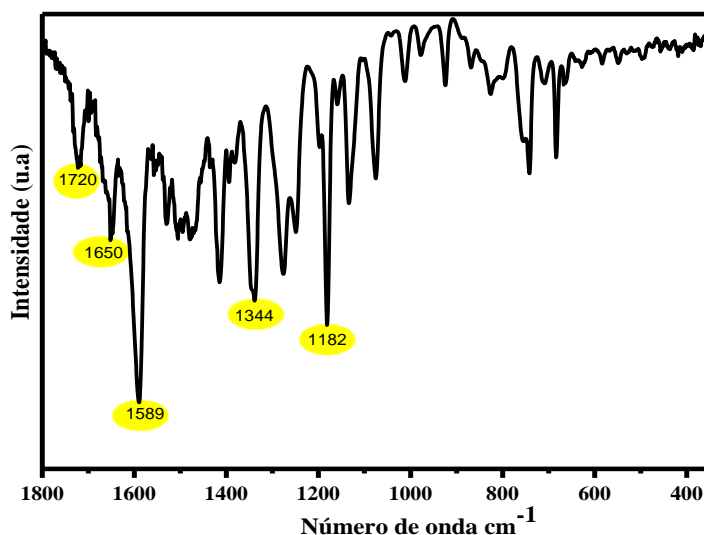
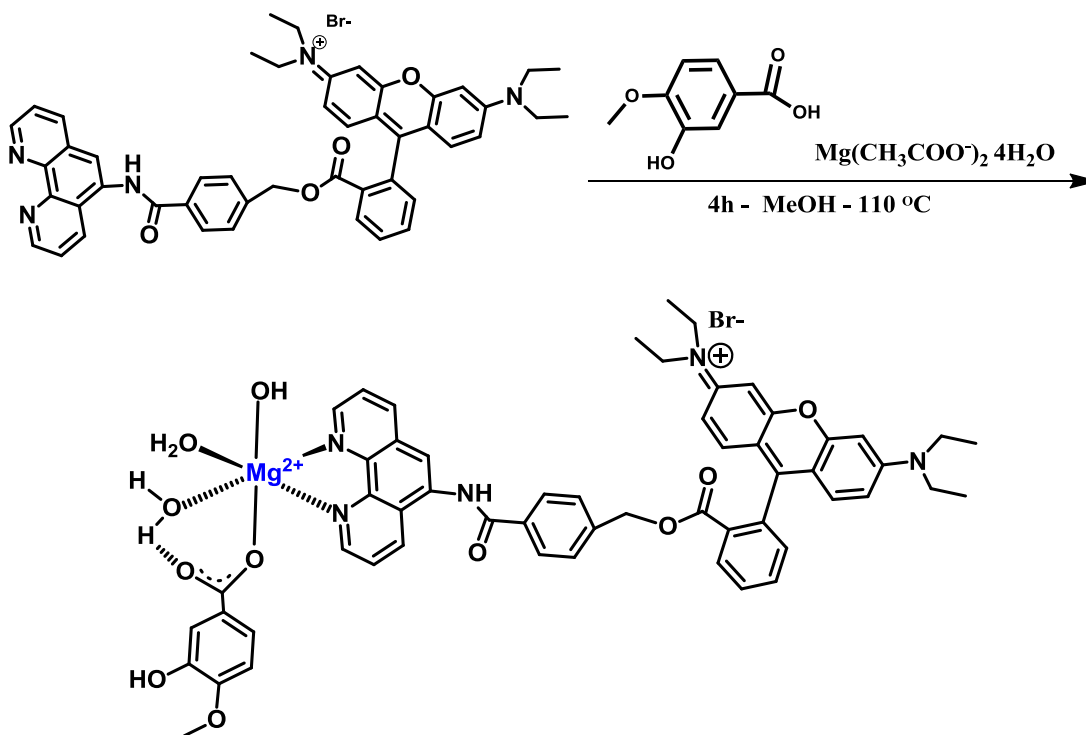


FIGURA 3.10: Espectro de infravermelho do ligante RPA em pastilha de CsI.

3.3.2 Caracterização do Complexo [Mg(RPA)(Iso)(H₂O)(OH)]

O complexo [Mg(RPA)(iso)(H₂O)(OH)] foi sintetizado conforme o esquema 3.5 e os dados de análise elementar de C, H e N indicam a presença de um composto com fórmula mínima (MgC₅₆H₅₈BrN₅O₁₁) MM = 1081,30 g/mol. Os dados experimentais estão coerentes com a proposta prevista para o complexo. A Tabela 3.10 apresenta os dados referentes à porcentagem em massa de C, N e H obtidos. É possível observar concordância entre os dados experimentais e calculados para carbono, porém, uma alteração para o átomo de hidrogênio e nitrogênio, o que pode estar relacionado a dificuldade de purificação de compostos com a presença de corantes.

Resultados e Discussão



Esquema 3.5: Rota sintética para obtenção do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$.

TABELA 3.10: Análise elementar dos teores de C, H e N para o complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{Iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$, considerando a fórmula mínima $\text{MgC}_{56}\text{H}_{58}\text{BrN}_5\text{O}_{11}$.

M.M (g/mol)	Experimental (teórica) %		
	C	H	N
1080,30	62,80 (62,20)	5,60 (5,41)	6,68 (6,48)
% Erro	0,95	3,3	2,99

3.3.3 Caracterização por RMN do complexo
[Mg(RPA)(iso)(H₂O)(OH)]

Os espectros de RMN de ¹H, e COSY (¹H¹H) do complexo [Mg(RPA)(iso)(H₂O)(OH)] são mostrados na Figura 3.11 e na Figura G (A) em anexo, com as atribuições dos respectivos hidrogênios e carbonos apresentadas na Tabela 3.11. Observa-se a ausência do sinal do H13 em 12,03 ppm, sugerindo que a coordenação ao íon metálico Mg(II) pode ter deixado o H13 mais ácido, favorecendo a troca pelo deutério do metanol.¹²⁴ Outro indicativo da coordenação do íon Mg(II), foi a redução nos valores das constantes de acoplamentos J, de 6,5 para 4,3 nos prótons 1,10 do ligante RPA para o complexo, indicando a presença de grupo retiradores de elétrons.^{124, 134, 135}

Analisando o espectro de RMN de ¹³C do ácido isovanílico livre e do complexo, Figura 3.12 (A e B), pode-se verificar um deslocamento químico (δ) de 7 ppm para o C42(carboxilato) de 167 para 172 em relação ao ácido isovanílico livre, indicando a coordenação do íon Mg(II). Esse comportamento é idêntico ao observado para o complexo [Mg(phen)(H₂O)₄](CH₃COO)₂, o qual foi discutido na secção 3.2.2 e em outros sistemas de Mg(II).³³

Resultados e Discussão

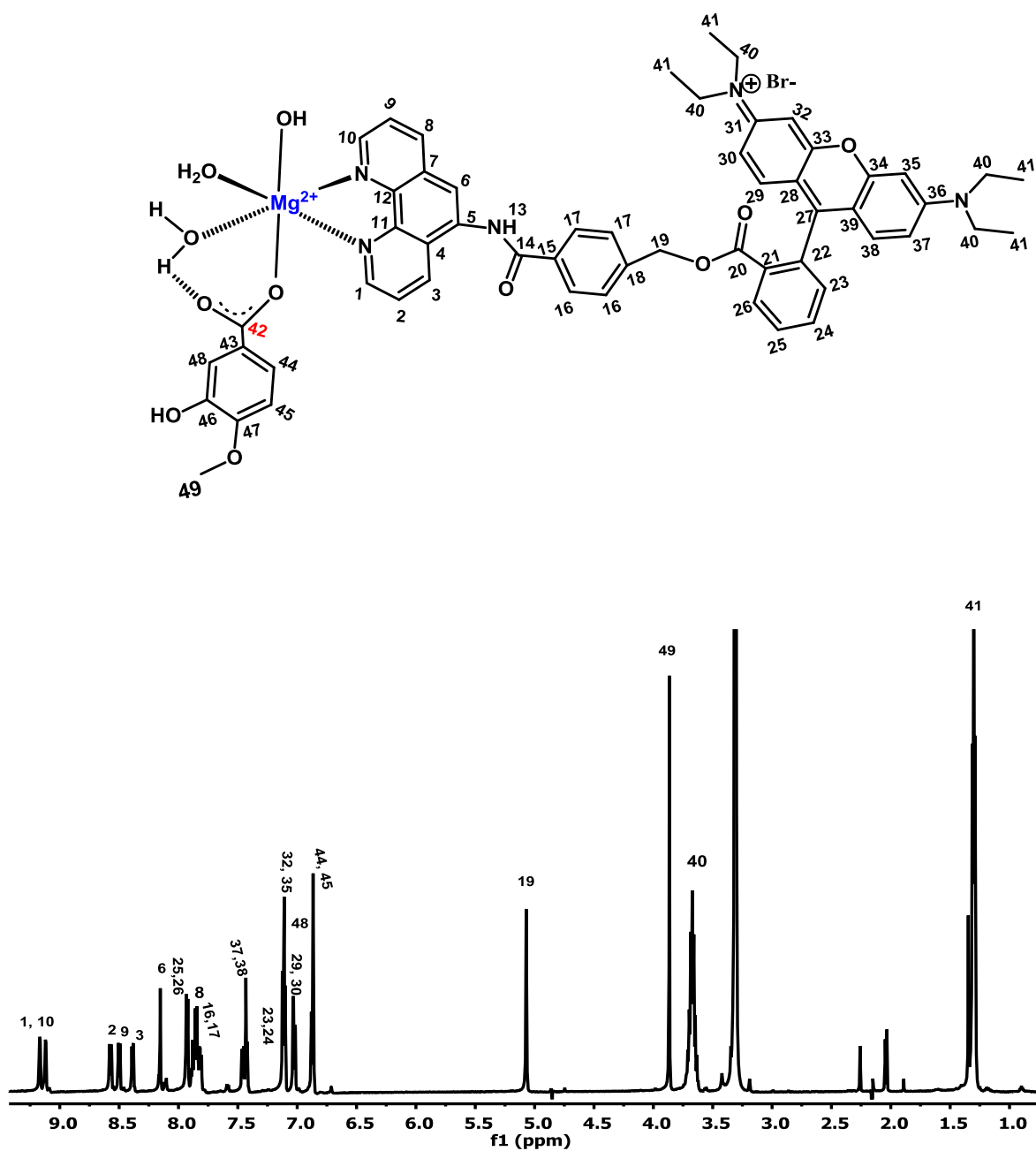


FIGURA 3.11: Espectro de RMN de 1H do complexo $[Mg(RPA)(iso)(H_2O)(OH)]$ em $MeOD-d_4$ a 25 ± 1 °C.

Resultados e Discussão

=====

TABELA 3.11: Deslocamentos químicos de RMN ¹H, ¹³C em δ (ppm) e constantes de acoplamento em J (Hz) e COSY para o complexo [Mg(RPA)(iso)(H₂O)(OH)] em MeOD-d₄ a 25 ± 1°C.

Posição	δC	δH (ppm), (mult) J (Hz)	COSY
1 (150,31)	10 (150,42)	9,11- 9,17; (d,d); 1,67-1,74	9,12-7,85
2	133,44	8,39 - 8,57; (d); 8,4-1,7	7,84-8,39-8,57-9,12;
3	132,518	8,46-8,38; (d,d); 8,1-1,70	8,46 -7,81
4 (133,423)	5 (145,84)	-	-
7	130,69	-	-
6	126,55	8,15, (s)	8,15
8	124,36	7,81-7,87; (m)	7,81-8,46- 9,11
9	123,76	8,46; (d); 8,1-1,7	8,46-7,81-7,84
11 - 12 (130,80)	14 (165,80)	-	-
15 139,68	18 (129,00)	-	-
16 - 17	128,70 -128,39	7,81-7,87; (m)	7,81-8,46
19	67,00	5,07; (s)	5,07
20 - 21	168,53-144,97	-	-
22 (139,68)	27 132,95	-	-
23 - 24	130,68	7,09-7,12;(m)	7,09-7,10-7,92-7,93
25 - 26	128,29	7,92-7,93; (m)	7,92-7,93-7,10
29 - 30	130,80	7,01; (m)	7,01
31-36- 33-	156,31	-	-
34 (158,322)	158,81	-	-
32 - 35	96	7,10; (m)	7,10-7,92
37 - 38	131,73	7,417; (m)	7,42-7,86
39 (132,760)	28 (127,15)	-	-
40	46,09	2,11 (m)	3,65
41	12,08	1,28-1,31; (m)	1,28
42 (174,36)	43 (150,72)	-	-
46 (146,841)	47 (158,81)	-	-
44 (110,61)	45 (121,98)	7,03; (m)	7,03
48	113,98	6,88; (m)	6,88-7,45
49	55,95	3,85	3,85

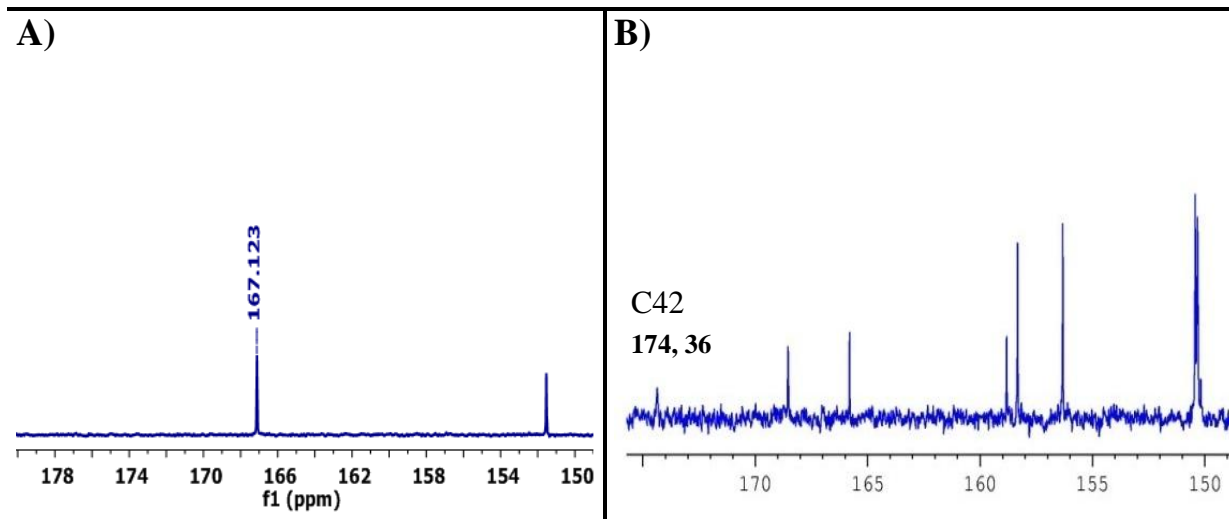


FIGURA 3.12: Espectro de RMN de de ^{13}C para o ânion isovanilato (A) e complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ (B) em MeOD-d_4 a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.4 Propriedades Espectroscópicas

3.4.2. Espectro de absorção eletrônica no UV-Vis

O espectro de UV-vis da rodamina B em metanol, Figura 3,15A, apresenta uma absorção intensa em 544 nm, com absorvidade molar (ϵ) de $70.000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, atribuída à transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$.^{136, 137, 138} Para o ligante RPA, Figura 3.13B, observa-se um deslocamento de 12 nm do máximo de absorção em relação à rodamina B, passando de 544 para 557 nm ($\epsilon = 90.000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ -Tabela 4.12). O complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ apresenta ϵ de $100.000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ com máximo de absorção em 557 nm, Tabela 3.12.¹³⁹ Para a absorção em 228 nm são observadas as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel aromático da 1,10-fenantrolina, com um valor de ϵ passando de 80.000 para $120.000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, após a coordenação do ligante RPA no íon $\text{Mg}(\text{II})$, devido à sobreposição das bandas da 1,10-fenantrolina com a rodamina. Para a absorção em 263 nm foi observada a mesma tendência após a coordenação. As bandas de intensidade fraca observadas na região de 300 a 400 nm, também são atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ da rodamina B.

Resultados e Discussão

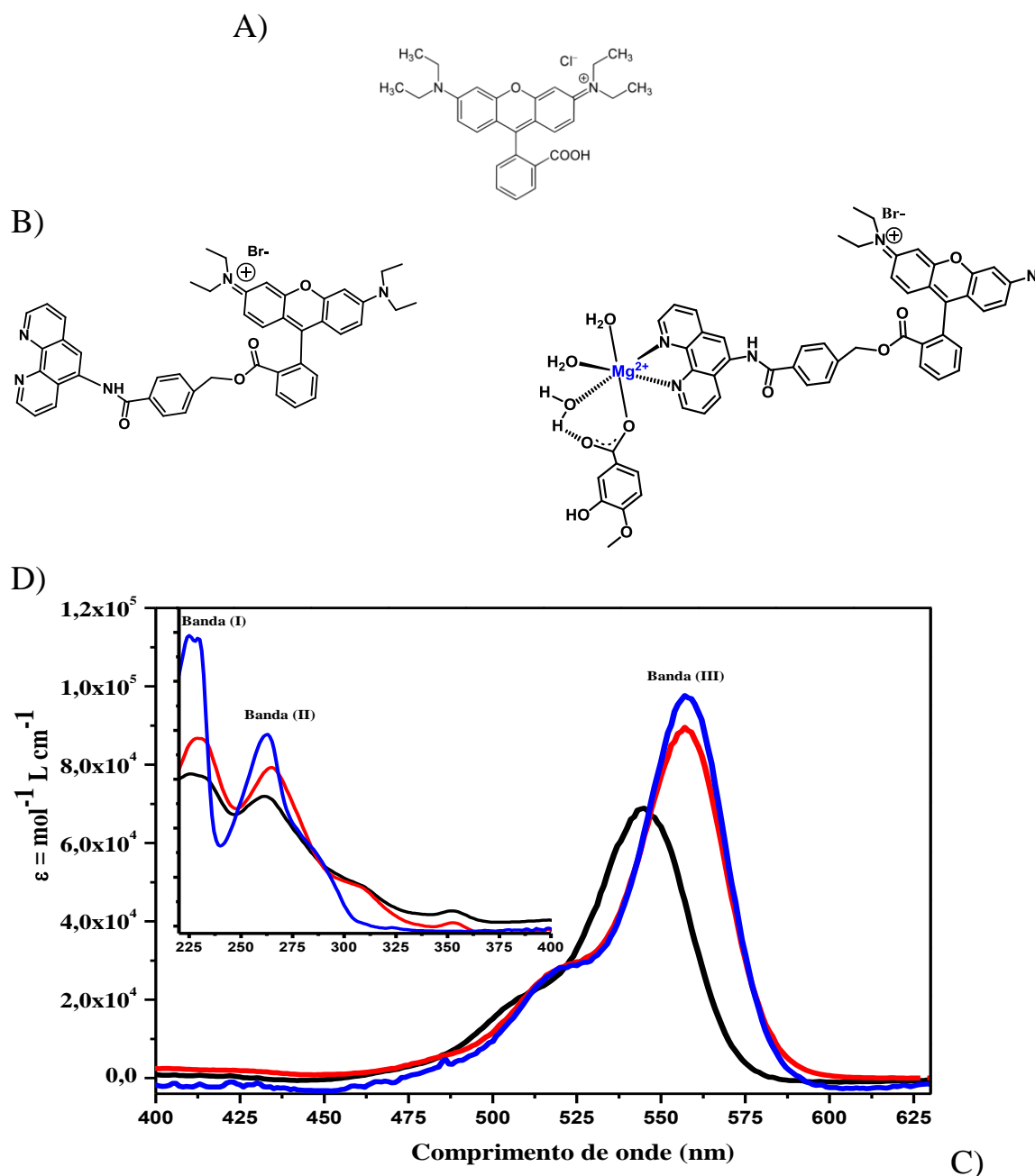


FIGURA 3.13: Estruturas da Rodamina B (A), ligante RPA (B), complexo (C). Espectros de absorção eletrônica na região UV-Vis (D) da rodamina B base livre (linha preta), ligante RPA (linha vermelha) e do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ (linha azul) (D) em metanol.

Resultados e Discussão

TABELA 3.12: Máximos de absorção (nm) e absorvidade molar ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) obtidos dos espectros de absorção eletrônica UV-Vis dos ligantes rodamina B e RPA livres e do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ em metanol.

Compostos	Banda I $\pi \rightarrow \pi^*$ (phen)	Banda II $\pi \rightarrow \pi^*$ (phen)	Banda III $\pi \rightarrow \pi^*$
-	λ (ϵ)	λ (ϵ)	λ (ϵ)
Rodamina B	-	263 (53000)	544 (70000)
RPA	228 (77000)	263 (64000)	557 (90000)
$[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$	228 (120000)	263 (80000)	557 (100000)

3.4.3 Espectro de emissão, excitação e rendimento quântico de emissão para o complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$

A Figura 3.14 mostra o espectro de emissão e de excitação do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$, do ligante RPA em solução aquosa (pH= 7,4). A emissão do complexo é caracterizada por uma banda intensa com máximo em 582 nm, característico de compostos orgânicos.^{140, 141, 142} O espectro de excitação ($\lambda_{\text{em}} = 530$ nm) do ligante RPA e do complexo são imagens especulares do espectro de absorção do ligante RPA, indicando que a emissão é proveniente da transição $\pi\text{-}\pi^*$ do ligante RPA. Os deslocamentos de Stokes obtidos são de 683 cm^{-1} para o ligante RPA e de 670 cm^{-1} para o complexo, mostrando que o efeito da coordenação não alterou as propriedades fotofísicas do complexo.¹⁴³

Resultados e Discussão

É importante notar que em tampão fosfato pH=7,4, a coordenação não levou à supressão da emissão da rodamina B, ao contrario, manteve suas propriedades fotofísicas como pode ser observado nos valores de rendimento quântico de emissão ($\Phi_e=0,62$, corante rodamina B, $\Phi_e=0,59$ para o ligante RPA e $\Phi_e=0,57$ para o complexo), Tabela 3.13. Além disso, não observou-se alteração nos valores de rendimento quântico de emissão para solventes próticos e apróticos, Tabela 3.13, indicando que a emissão é proveniente da transição $\pi-\pi^*$ do ligante RPA.

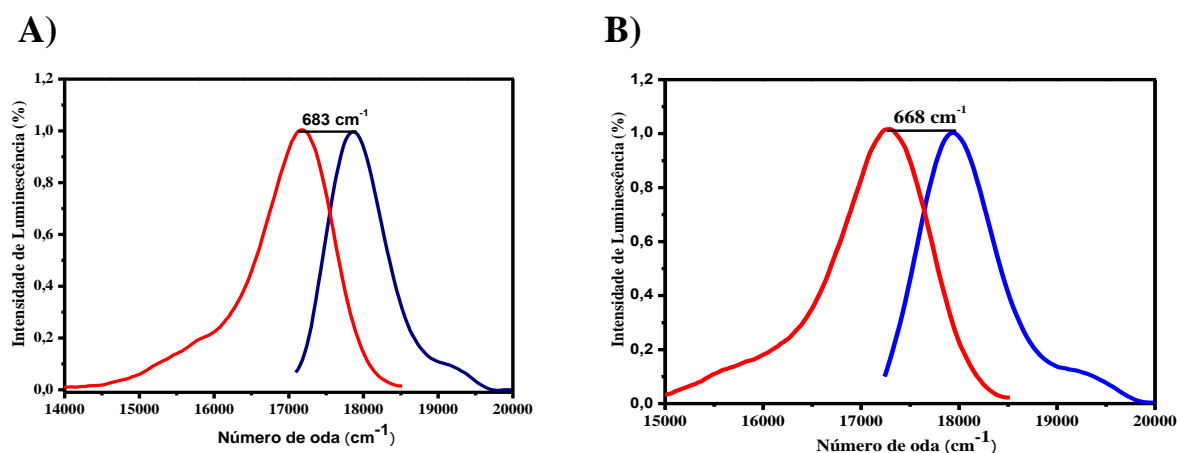


FIGURA 3.14: Espectros de emissão (linha azul) e excitação (linha vermelha) do ligante RPA (A) e do complexo (B). ($\lambda_{exc} = 530 \text{ nm}$) em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4).

TABELA 3.13: Valores de rendimento quântico de emissão do ligante RPA e do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ em diferentes solventes.

Solvente	Polaridade solvente/ caráter doador de H^+	Viscosidade (mNsm^{-2})	$\lambda_{\text{máx}}$ de emissão (nm)	RPA Φ_e	Complexo Φ_e
Tampão (pH=7,4)	0,32/ prótico	1,000	530	0,62	0,57
Etanol	0,29/ prótico	1,786	530	0,63	0,60
Acetonitrila	0,31/ aprótico	0,397	530	0,70	0,67

3.4.4 Irradiação com luz contínua

A estabilidade do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ frente a irradiação com luz de 550 nm, foi investigada em solução tampão fosfato, (pH 7,4). A Figura 3.15 mostra que a irradiação contínua ($I_0 = 1 \times 10^{-8}$ einstens s^{-1}) por 180 min não levou a alterações significativas nos espectros de emissão do ligante RPA livre e do nem do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$.

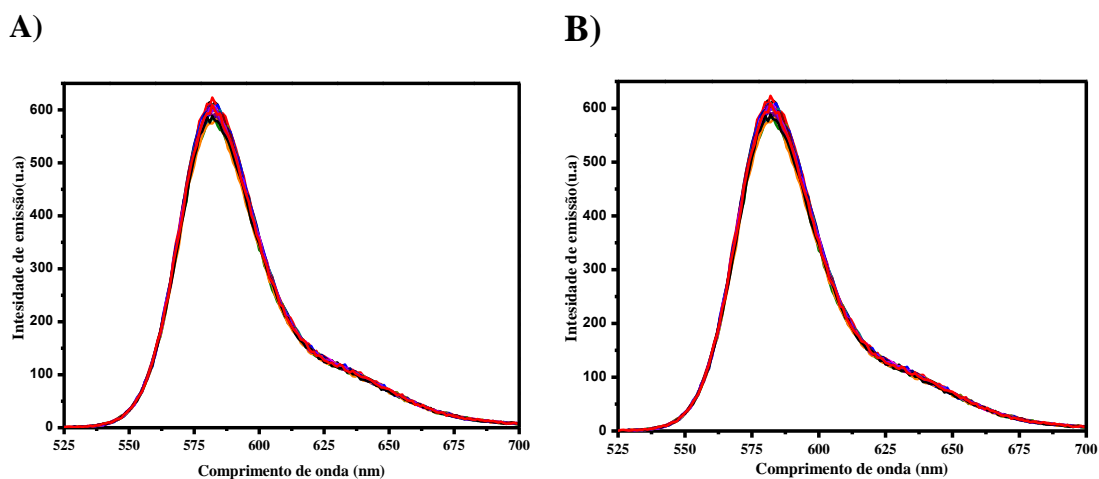


FIGURA 3.15: Espectros de emissão obtidos durante a fotólise com luz contínua em 550 nm do ligante RPA (A) e do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$, em solução tampão fosfato pH=7,4.

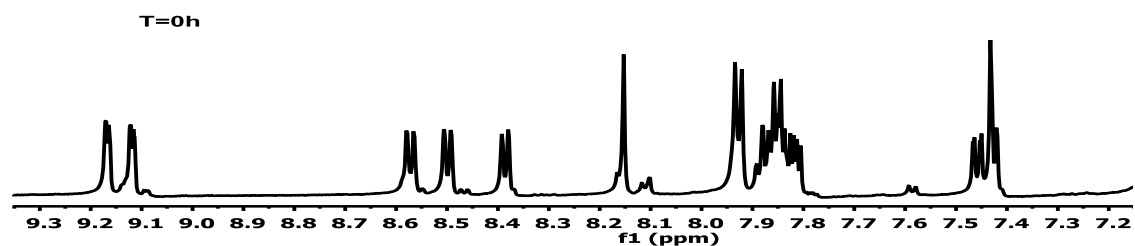
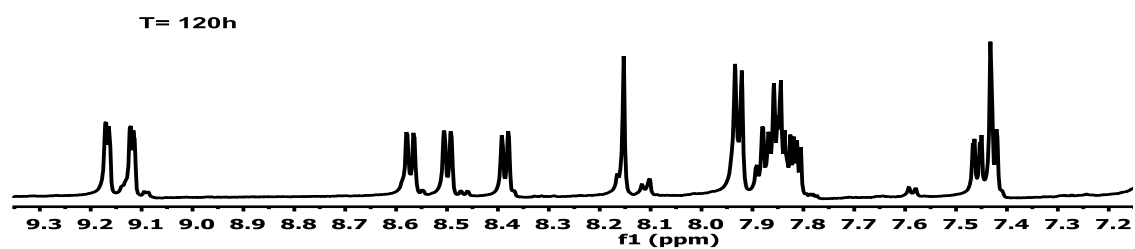
3.5 - Estabilidade do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ em metanol investigada por RMN ^1H

3.5.1- Ausência e presença de luz

A estabilidade do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$ em metanol deuterado (MeOD-d_4), foi avaliada por RMN ^1H quando exposto à luz solar natural durante 96 horas. Para efeitos de comparação uma amostra foi mantida protegida da luz pelo mesmo período de tempo. A Figura 3.16 A e B mostra que os espectros de RMN de ^1H não tiveram alterações significativas com o decorrer do tempo.

Resultados e Discussão

A)



B)

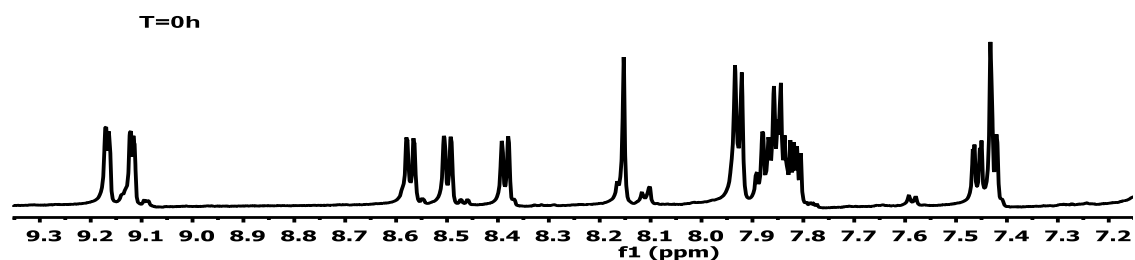
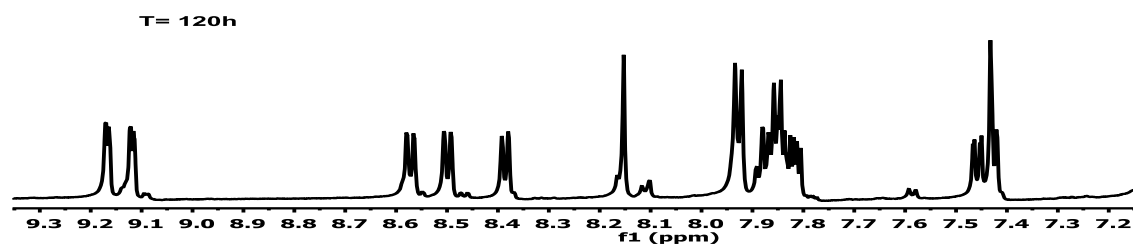


FIGURA 3.16: Espectros de RMN ^1H do complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$. Exposição à luz (A) e protegido da luz (B) por 96 horas em MeOD-d_4 a 25 ± 1 °C.

Capítulo 4

Estudo da Atividade Inseticida, Toxicológica e
Avaliação da Capacidade Antioxidante do
Complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃OO)

4.0 - Atividade Inseticida

4.1 Atividade inseticida contra *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiótico *Leucoagaricus gongylophorus*

Com o objetivo de atuar como inseticida na forma de iscas e emulsões, o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) foi avaliado no combate/controlado das formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*. Para efeitos de comparação, os estudos foram realizados também para o ácido isovanílico livre. Neste experimento as formigas foram tratadas e alimentadas com dieta artificial (grupo controle), sulfluramida, ácido isovanílico livre e o complexo. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.1. As taxas de sobrevivência das formigas entre o grupo controle e as tratadas com ácido isovanílico livre não apresentaram diferenças significativas, apresentando baixa eficiência no controle de formigas cortadeiras.

Por outro lado, o complexo foi mais efetivo que o pesticida comercial sulfluramida. Por exemplo, a taxa de mortalidade da formiga *Atta sexdens rubropilosa* foi de 100% frente ao complexo, entre o 6^o e 8^o dia, com concentrações 1,0 e 2,0 mgg⁻¹. A sobrevivência média (S₅₀%) do complexo foi de 2,0 mgg⁻¹ (6^o dia, S₅₀ = 2b), indicando um modo de ação lenta como observado para sulfluramida (0,2 mgg⁻¹, S₅₀ = 5b em 10 dias) e mais letal que a sulfluramida.

Resultados e Discussão

TABELA 4.1: Mortalidade (%) e Média de sobrevivência 50% (S_{50}) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* alimentadas com dieta artificial, com ácido isovanílico livre, complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) e sulfluramida.

Tratamento	% Mortalidade acumulada por dia										
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	S_{50} *
Controle	0	4	4	6	6	8	12	14	22	28	>25 _a
Ácido isovanílico livre	0	0	6	12	18	24	28	32	40	44	>25 _a
complexo (0.20 mgg ⁻¹)	0	2	4	14	18	28	58	76	90	94	13 _b
complexo (1.0 mgg ⁻¹)	6	22	56	90	98	100	100	100	100	100	3 _b
complexo (2.0 mgg ⁻¹)	4	48	78	100	100	100	100	100	100	100	2 _b
Sulfluramida (0.20 mgg ⁻¹)	0	8	20	70	98	100	100	100	100	100	5 _b

* Diferentes letras após S_{50} valores mostram diferença significativa de acordo com o log-rank teste ($P < 0.05$).

A inibição *in vitro* do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbiote das formigas *Atta sexdens rubropilosa*,^{144, 145} foi investigado para os ligantes livres (1,10-fenantrolina e ácido isovanílico) e o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 4.1 e Tabela 4.2. O complexo apresenta atividade fungicida expressiva com a inibição de 100% de crescimento do fungo usando uma concentração de 100,0 mgL⁻¹ do complexo, porém, a 1,10-fenantrolina apresentou uma atividade de inibição de 100%. Mas devido sua insolubilidade, foi impossível realizar qualquer experimento em água.

Resultados e Discussão

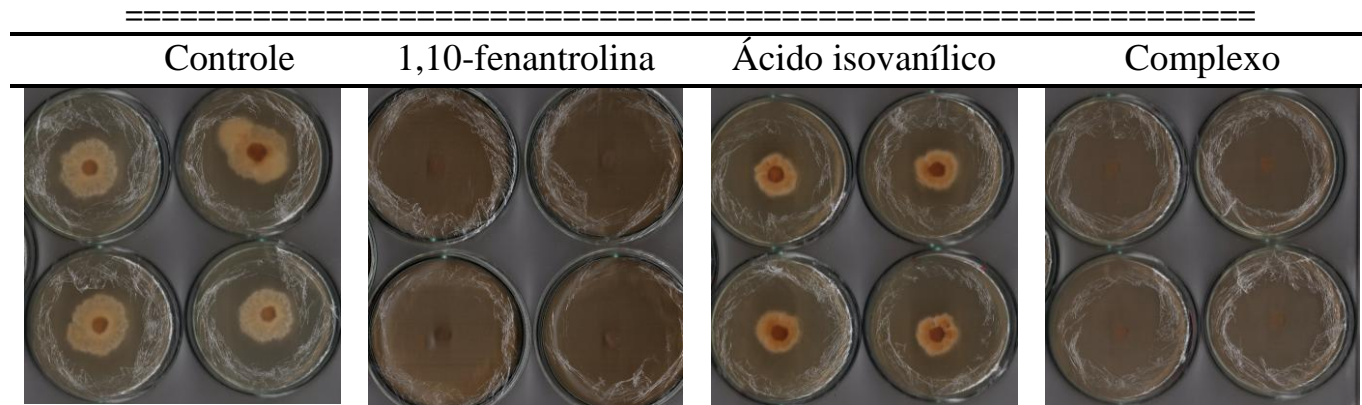


FIGURA 4.1: Crescimento micelial do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias de incubação com 500 μL de metanol como controle, 1,10-fenantrolina, ácido isovanílico livre e complexo *cis*- $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ utilizando uma concentração de 100 mgL^{-1} .

TABELA 5.2: Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias do experimento.

Replicas (Ensaio)	Complexo	Ácido isovanílico	1,10-fenatrolina	*Controle metanol 500 μL
1	0,0	4,60	0,0	6,52
2	0,0	5,00	0,0	8,87
3	0,0	5,07	0,0	8,46
4	0,0	4,85	0,0	9,30
5	0,0	5,00	0,0	7,90
Média das áreas (massa/área)	0,0	4,90	0,0	8,20
SD	0,0	0,19	0,0	1,10
Inibição	100 %	40 %	100 %	-

*controle, 100% metanol_500 μL , referente a amostra: 1,10-fenantrolina, complexo e ácido isovanílico. SD= Desvio Padrão

=====

4.2 Impacto do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) sobre o ambiente aquático

A utilização de agrotóxicos pode provocar a contaminação dos lençóis freáticos por conta da lixiviação dos solos, além de alterar toda vida aquática.¹⁴⁶ Apesar disso, esse tipo de prática agrícola tem sido um modelo recorrente no Brasil. Neste contexto, foram realizados experimentos para verificar o efeito do complexo frente ao ambiente aquático utilizando o peixe zebra (paulistinha)¹⁴⁷. Os peixes foram expostos a uma concentração de 2,0 mgL⁻¹ do complexo pelo período de 96 horas. Após esse tempo, não foram observadas mortalidade nem quaisquer alterações morfológicas ou comportamentais, indicando a não toxicidade do complexo.

Em contrapartida, estudos toxicológicos com os inseticidas comerciais piretróide e organofosforado mostraram que mesmo em baixíssimas concentrações, apresentam elevada toxicidade para o sistema aquático. Isto pode ser evidenciado pelos valores significativos, com uma dose letal (DL₅₀), DL₅₀ = 0,0025-0,0058 e 0,49-1,28 mgL⁻¹ após 96 horas de exposição ao peixe zebra.¹⁴⁸

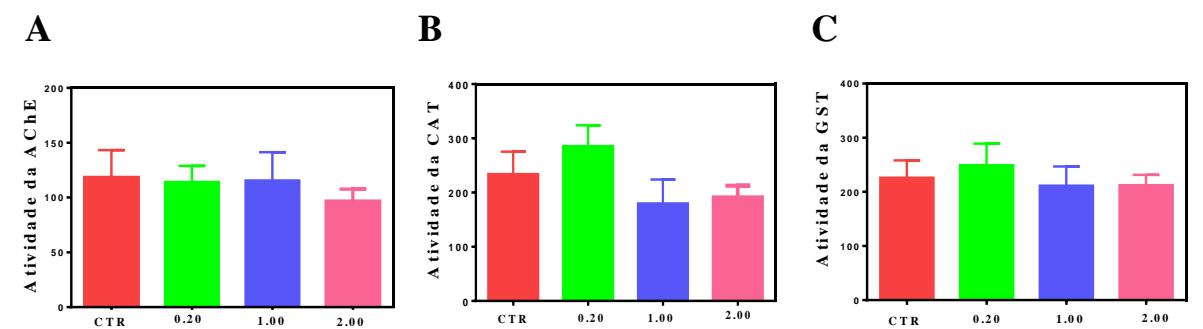
Sabendo-se que a enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e as enzimas catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) do trato digestivo (intestino e fígado) são biomarcadores bioquímicos clássicos do peixe zebra sendo usados como indicadores de contaminação por inseticidas e pesticidas em sistemas aquáticos, foram realizados experimentos para investigar o efeito do complexo nestas condições.¹⁴⁹ As Figuras 4.2 A, B, C mostram que a exposição do peixe zebra ao complexo não afetou a atividade da enzima AChE no cérebro.¹⁵⁰

As enzimas CAT e GST não tiveram alterações em suas atividades no aparelho digestivo, mostrando que o complexo, além de não deixar o peixe estressado, não apresentou qualquer toxicidade em todas as

Resultados e Discussão

concentrações investigadas. Por outro lado, a exposição ao complexo, resultou numa redução significativa da peroxidação lipídica, acompanhada por um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em comparação com o grupo controle, Figura 4.2 D e E.

Estes resultados indicam que o complexo, além de não apresentar toxicidade, pode estar atuando como antioxidante, uma vez que em sua presença ocorre a redução da atividade da lipoperoxidação (LPO) em todas as concentrações estudadas.



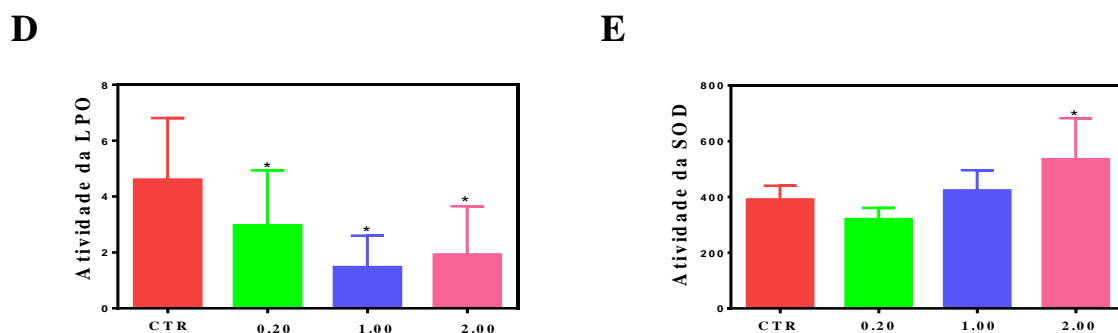


FIGURA 4.2 Atividades das enzimas acetilcolinesterase no cérebro (AChE) (A), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), (B, C), peroxidação lipídica (LPO) (D) e superóxido dismutase (SOD) (E) no trato digestivo do peixe zebra após 96 h de exposição a diferentes concentrações do complexo (0,20, 1,00 e 2,00 mgL⁻¹) e controle (CTR). Os dados são média ± SE, n = 6-10. Não houve diferença significativa no valor médio em relação ao controle (p <0,05). A atividade é expressa em μmol/min/mg de proteína. * = diferença significativa.

4.3 Avaliação do Impacto do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) no o ambiente terrestre

Os experimentos com ratos machos da família Wistar tiveram como objetivo analisar a influência e os efeitos do complexo na capacidade comportamental e bioquímica destes animais. O tratamento crônico foi realizado por 21 dias, com uma dose de 3,0 mgkg⁻¹/dia, sendo a dose total de 62 mgkg⁻¹. Durante este período não foram observados sinais visuais de toxicidade ou alterações comportamentais nos animais investigados.. Comparado ao inseticida fipronil que apresenta uma DL₅₀ de 50 mgkg⁻¹ em ratos por administração via oral pode-se sugerir que o complexo na dose investigada não é tóxico. Vale ressaltar que fipronil danifica o sistema nervoso central do animal ao bloquear a passagem de íons cloreto através dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA).^{151, 152, 153} Considerando a grande capacidade de danos ao sistema nervoso central por

Resultados e Discussão

=====

inseticidas ou fungicidas, reduzindo a capacidade motora ou até mesmo a morte de ratos,^{151, 152, 153} os resultados dos experimentos comportamentais mostrados na Figura 4.3, após o uso do complexo, foram promissores. Pode-se observar alterações comportamentais significativas segundo a análise de variância ANOVA, como por exemplo, um aumento da atividade locomotora espontânea no estudo de campo aberto, Figura 4.3 A. Porém, ao mesmo tempo, observou-se a redução do tempo de escalada no teste de natação forçada, indicando que o complexo poderia ter cruzado a barreira hematoencefálica, Figura 4.3 B.

No teste de labirinto em cruz elevado, Figura 4.3 C, no qual é analisada a ansiedade em ambientes potencialmente perigosos,¹¹⁷ segundo a análise de variância ANOVA, houve um aumento significativo na porcentagem do tempo de permanência no compartimento do braço aberto em comparação com os ratos controle, mostrando que o complexo reduziu a ansiedade dos animais, indicando propriedades características de fármacos do tipo ansiolíticos.^{154, 155, 156}

Na sequência, foram realizadas as análises bioquímicas das amostras cerebrais (hipocampo, córtex frontal e estriado), fígado e dos rins dos ratos investigados. Segundo a análise de variância ANOVA, Figura 4.4, ocorreu um aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) no estriado e glutathione redutase (GSH) no córtex frontal, após o tratamento crônico, indicando que o complexo ultrapassou a barreira hematoencefálica sem apresentar toxicidade para o sistema cerebral, conforme resultado apresentado pela atividade da enzima glutathione S-transferase (GST), principal biomarcador em testes toxicológicos, não apresentar alteração segundo análise de variância ANOVA, em relação ao grupo controle, Figura 4.4.^{157, 158}

As análises bioquímicas dos rins e do fígado mostraram um aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD, Figura 4.4,

Resultados e Discussão

=====

na presença do complexo porém, sem introduzir quaisquer manifestações tóxicas a estes órgãos. Embora a atividade da GST tenha aumentado na amostra de fígado, não ocorreu alteração na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), sendo essa responsável pela paralisação ou até a morte de animais quando na presença de compostos tóxicos.¹⁵⁰ Além disso, a redução da atividade da glutathione redutase (GSH) nos rins, pode estar relacionada com o aumento da atividade antioxidante das enzimas CAT e SOD ou com uma possível ação do complexo como antioxidante secundário.

A enzima SOD atua na defesa contra as espécies reativas do oxigênio (ROS), sendo o radical superóxido catalisado para evitar a formação de espécies mais reativas, como o radical hidroxil (HO[•]).¹⁵⁹ Assim, o aumento da atividade antioxidante da SOD no estriado, sugere que o complexo pode estar atuando como um eliminador do radical superóxido O₂^{•-}.¹⁶⁰

Esses resultados mostram que a redução da LPO no peixe zebra e nos ratos da família Wistar pode estar relacionada com a atividade antioxidante do complexo, uma vez que este atua diretamente na inibição das espécies reativas de oxigênio.

Resultados e Discussão

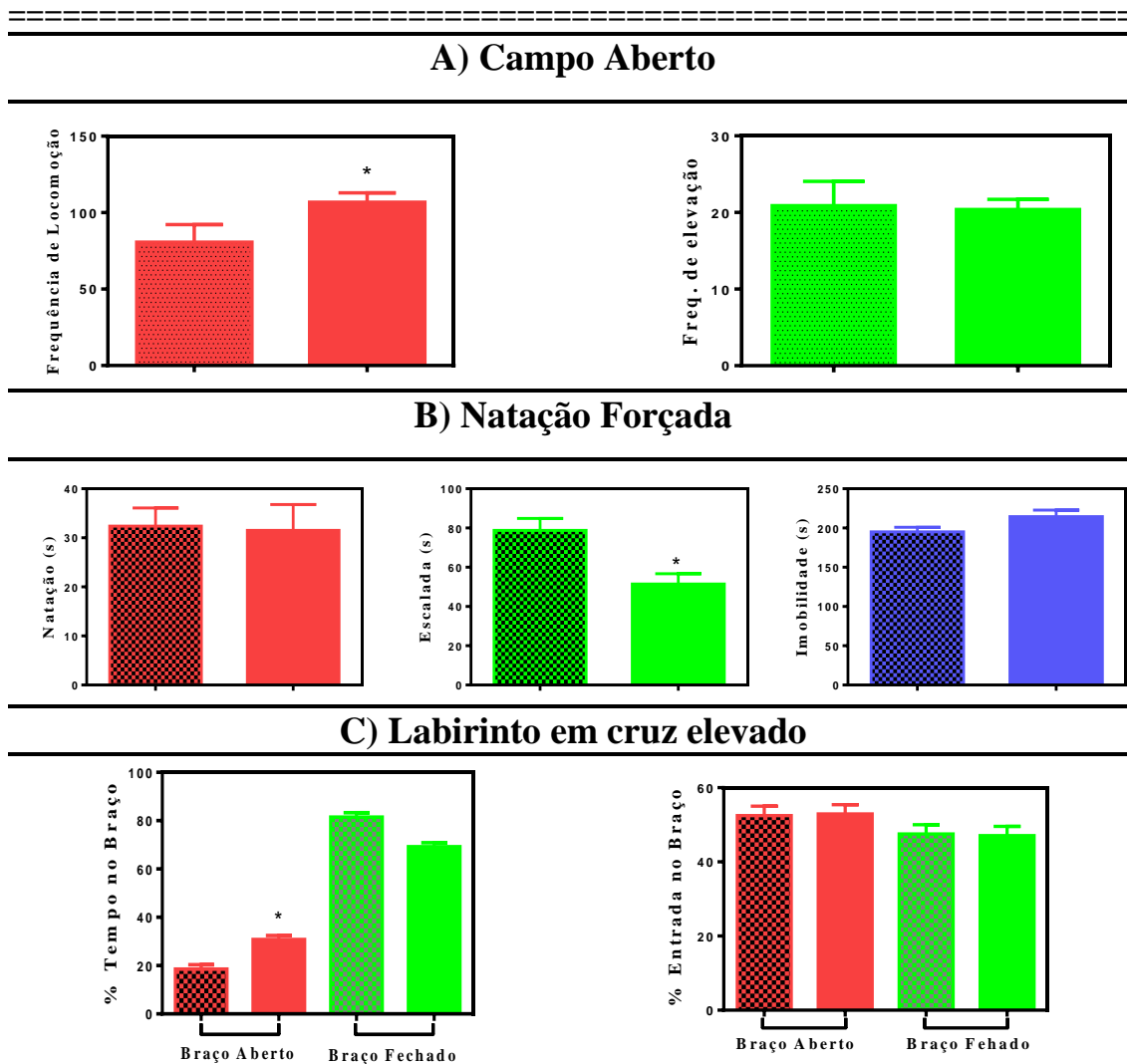


FIGURA 4.3: Teste de locomoção e de ansiedade em ratos machos da família Wistar após 21 dias de exposição a $3,0 \text{ mgkg}^{-1}/\text{dia}$ do complexo e controle (CTR). Os resultados do controle estão representados nas áreas pontilhadas dos gráficos. Os dados são média \pm SEM, $n = 6-10$. Não houve diferença significativa no valor médio em relação ao controle ($p < 0,05$). *diferença significativa entre as amostras.

Resultados e Discussão

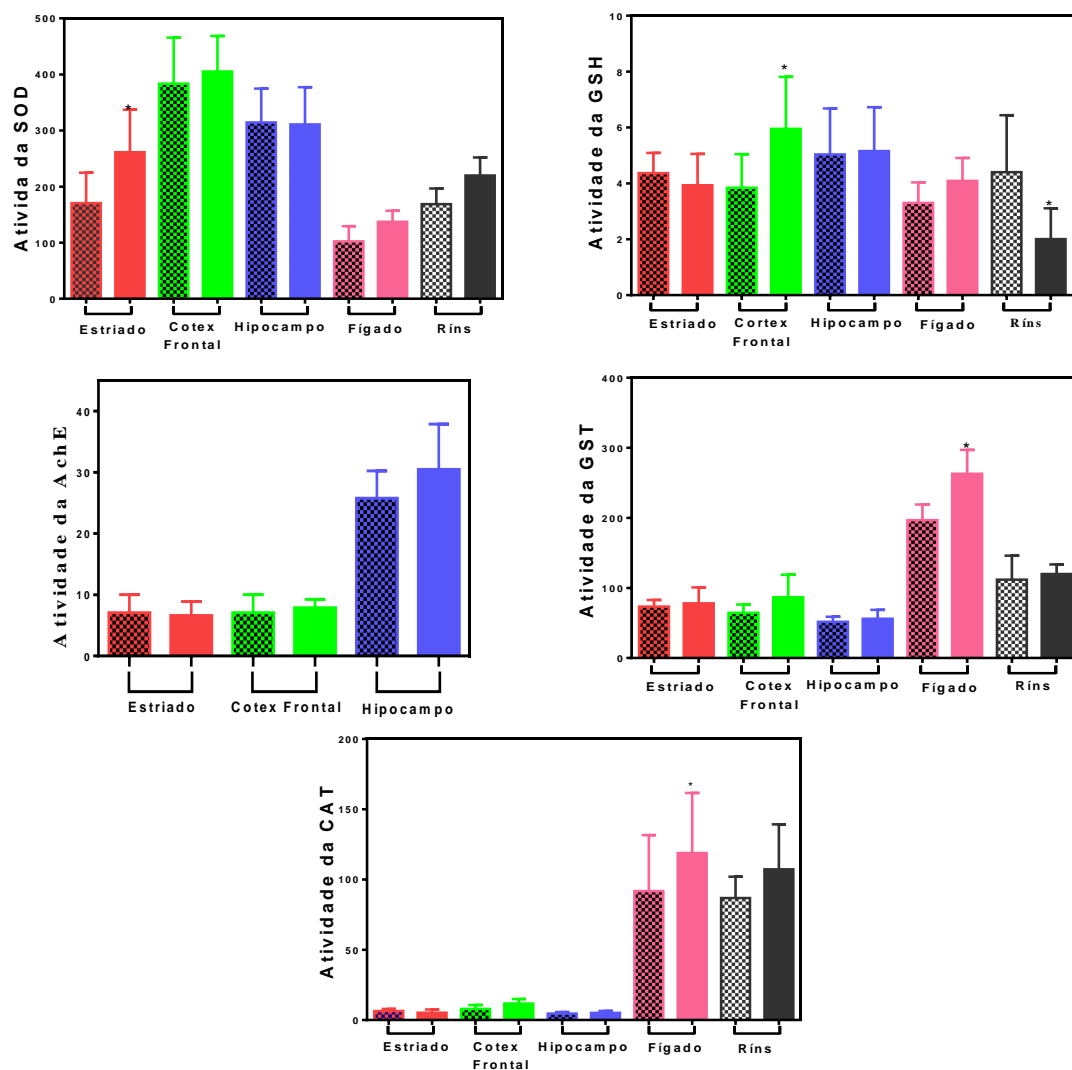


FIGURA 4.4: Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-S-transferase (GST) e glutathiona redutase (GSH) nas regiões do cérebro (hipocampo, estriado e córtex frontal) no fígado e nos rins dos ratos após 21 dias de exposição a $3,0 \text{ mgkg}^{-1}$ por dia do complexo e controle (CTR). A atividade é expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Os resultados do controle são mostrados nas áreas pontilhadas dos gráficos. Os dados são média \pm SE, $n= 6-10$. Não houve diferença significativa no valor médio em relação ao controle ($p < 0,05$). *diferença significativa entre as amostras.

Capítulo 5

Estudo da peroxidação lipídica em amostra de carne suína e propostas de mecanismo de inibição das espécies reativas do Oxigênio

=====

5.0 Estabilidade Oxidativa em Amostras de Carne suína

Os estudos da oxidação lipídica e protéica em alimentos são de grande importância no desenvolvimento do sabor e do odor, além de ser caracterizado pelo consumo de oxigênio durante o tempo de armazenamento.¹⁶¹

A Figura 5.1 compara as curvas médias de consumo de oxigênio determinadas eletroquimicamente para as amostras de lombo (a) e copa lombo (b), contendo $600 \mu\text{molL}^{-1}$ do complexo e com as amostras controle (a+b). As amostras contendo o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) tiveram uma redução na taxa do consumo de oxigênio em função do tempo, de 44 e 57% respectivamente em 180 min. A taxa de consumo de oxigênio foi calculada a partir da equação $v(\text{O}_2) = -\alpha \times [\text{O}_2]_{\text{inicial}} \times 10^6/100$, no qual α é a inclinação (porcentagem por minuto) e $[\text{O}_2]_{\text{inicial}} = 3,88 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ a 37,0 °C em solução tampão MES 50 mmolL^{-1} e pH = 5.70.¹²¹ As curvas de consumo do oxigênio decaíram linearmente ($r^2 > 0,9994$)

Com a presença do complexo, a taxa de consumo do oxigênio ocorreu de forma lenta, apresentando os valores de $2,75 \pm 0,09 \mu\text{molL}^{-1}$ (lombo) e $0,78 \pm 0,05 \mu\text{molL}^{-1} \text{ O}_2 \text{ min}^{-1}$ (copa lombo), mostrando que o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) inibe ou retarda o processo de oxidação lipídica nas amostras estudadas.

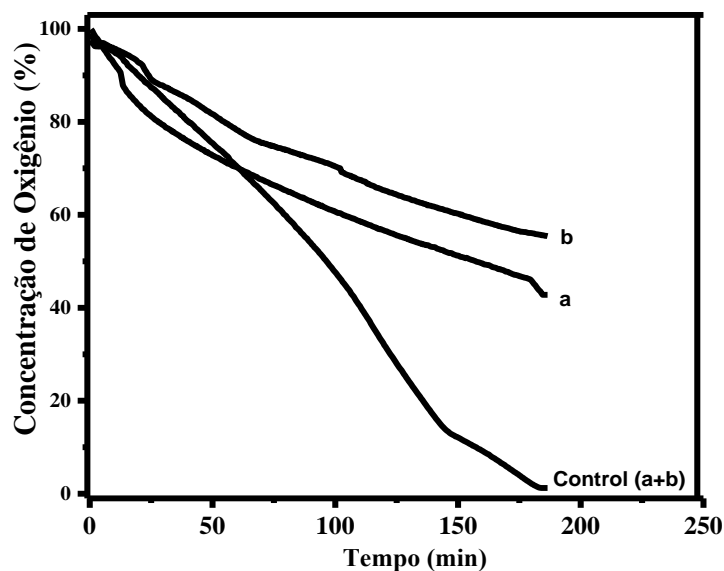


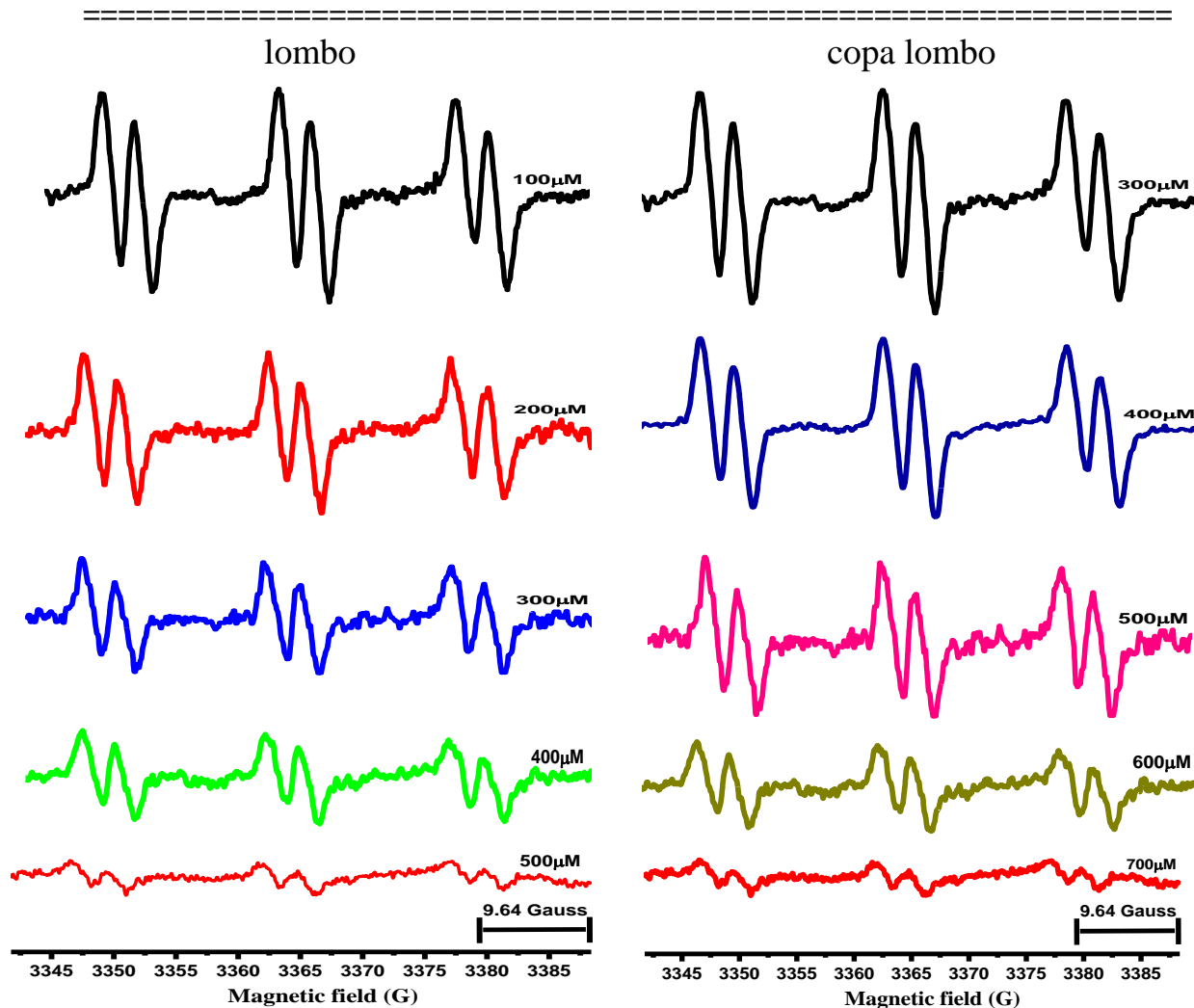
FIGURA 5.3: Taxa de consumo de oxigênio em amostras de carne suína lombo (a) e copa lombo (b) com $n = 4$ na presença de $600 \mu\text{molL}^{-1}$ do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO).

Esses resultados nos motivaram a investigar o impacto do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) diretamente na peroxidação lipídica em amostras de carne suína. Os experimentos foram realizados por espectroscopia de ressonância paramagnética de spin (EPR) empregando o α -(4-piridil-1-óxido)-N-terc-butilnitrona (POBN) como sequestrador de radicais, além de diferentes concentrações do complexo. A Figura 6.2 mostra que para todas as concentrações testadas, o radical adulto/POBN• exibiu a mesma constante de acoplamento hiperfina de $a^{\text{N}}=15,77 \pm 0,08$ e $a^{\text{H}} = 2,86 \pm 0,05$, indicando que os radicais sequestrados foram o peroxil (LOO•) e alcoxil (LO•).¹⁶² Foi observada também, uma redução na intensidade dos sinais do radical adulto/POBN• para ambas as amostras quando o complexo foi investigado nas concentrações de 100 a $700 \mu\text{molL}^{-1}$ (lombo e copa lombo), Figura 6.2. Nessas condições, os valores de IC₅₀ foram 381 ± 6 (lombo) e $525 \pm 7 \mu\text{molL}^{-1}$ (copa lombo).

Resultados e Discussão

Foi analisado também a influência do complexo em inibir a oxidação lipídica durante um determinado período de armazenamento das amostras utilizando a técnica EPR para quantificação dos radicais. Nas amostras controle (lombo-linha preto e copa lombo-linha verde), os resultados mostrados na Figura 5.3, mostram uma oxidação lipídica intensa em função do tempo de reação. A adição de $1,2 \text{ mmolL}^{-1}$ do complexo, produziu uma diferença significativa no processo de inibição da oxidação lipídica durante o tempo de armazenamento. Esses resultados comprovam a eficiência do complexo no processo de inibição da oxidação lipídica, interrompendo as fases de propagação da cadeia, e conseqüentemente, inibindo o radical lipídico L^{\bullet} .^{163, 164 165}

Resultados e Discussão



Valores dos IC_{50} para as amostras de carne de porco

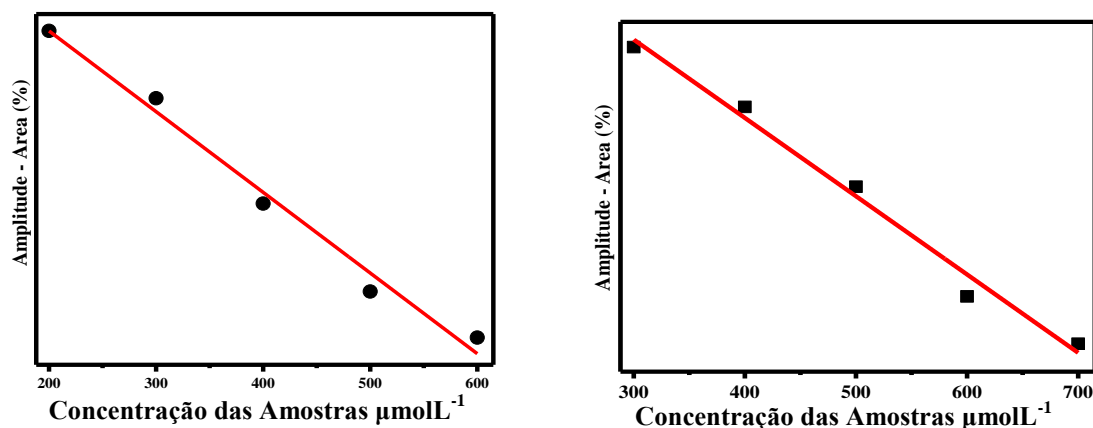


Figura 5.2: Espectros de ressonância paramagnética de spin e gráficos de integral de pico do sinal de EPR versus concentração do complexo obtidos em fase aquosa para as amostras de lombo e copa lombo em solução tampão MES pH 5,7 armazenados no escuro durante 2 horas a 75°C com o

Resultados e Discussão

sequestrador de radicais POBN na presença de diferentes concentrações do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO).

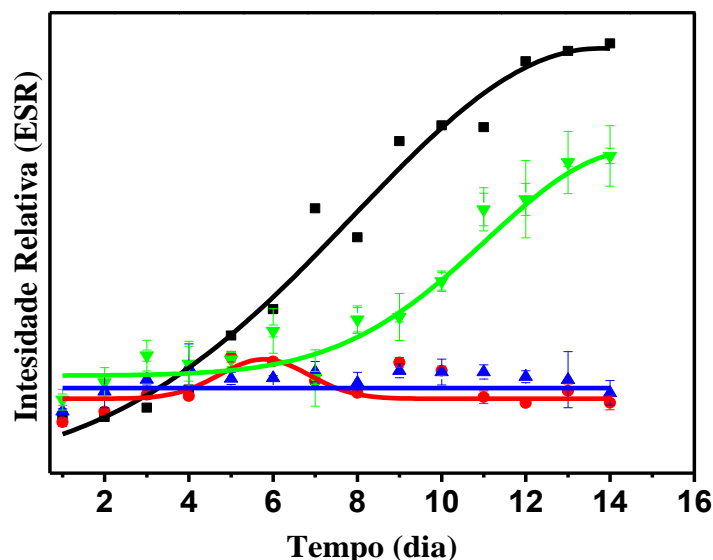


Figura 5.3: Gráfico da intensidade relativa do sinal de EPR do sequestrador de radicais POBN versus tempo obtidos a 70°C durante 14 dias utilizando o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) como antioxidante e as amostras: Controle (lombo (linha preta) e copa lombo (linha verde)), lombo com 1,2 mmolL⁻¹ do complexo (linha azul) e copa lombo com 1,2 mmolL⁻¹ do complexo (linha vermelha).

5.1 Desativação do oxigênio singlete produzido pela fotossensibilização da riboflavina

Riboflavina ou vitamina B2 é encontrada em grandes quantidades em músculos de carne suína. Embora seja uma das vitaminas essenciais para o nosso corpo,¹⁶⁶ quando irradiada ou na presença de luz monocromática (400-500nm), converte o oxigênio molecular (³O₂) em oxigênio singlete (¹O₂), uma forma do oxigênio molecular com alto poder oxidante.^{95, 167}

Resultados e Discussão

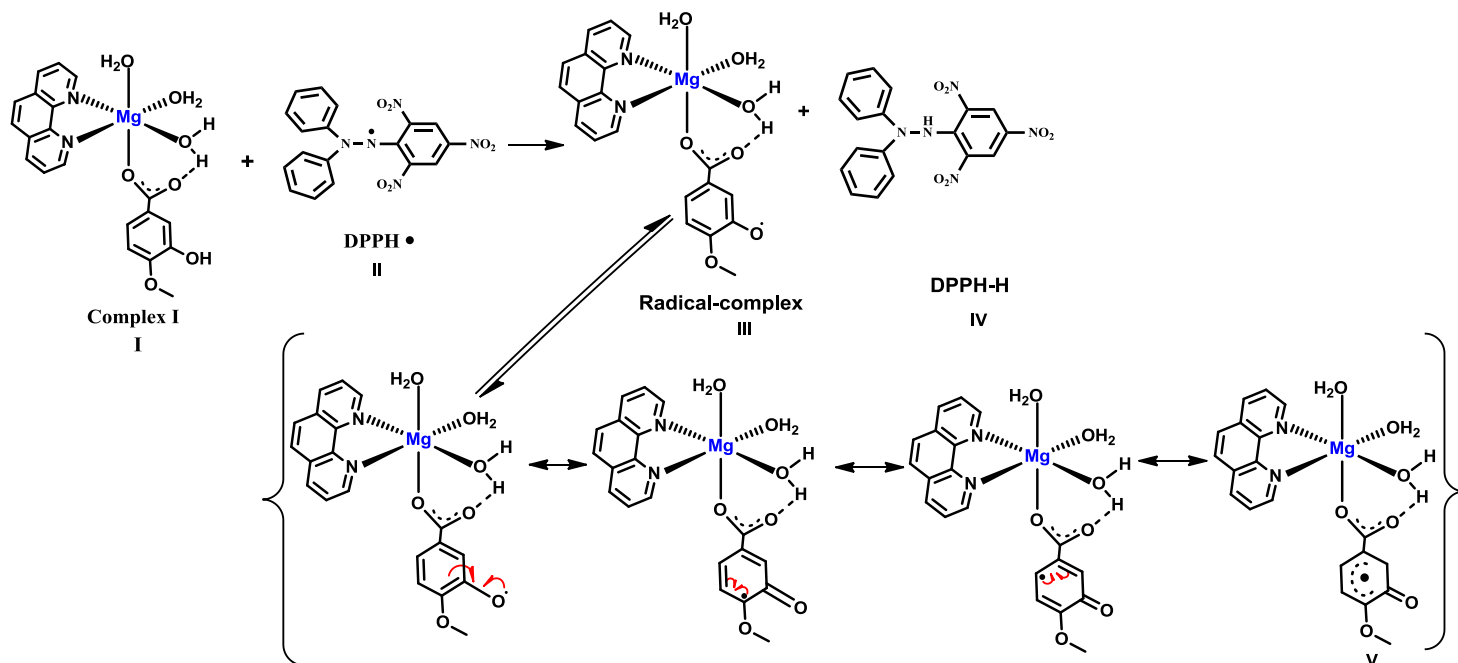
=====

O $^1\text{O}_2$ pode iniciar a oxidação autocatalítica de lipídios não saturados para produzir hidroperóxidos que provoca liberação de odores indesejáveis e sabor desagradável em carne suína fresca.¹⁶⁸ A perda de qualidade do produto leva a implicações econômicas e nutricionais. Com isso, é de grande importância o desenvolvimento de novos compostos antioxidantes que possa atuar como inibidor da peroxidação lipídica em alimentos. O ácido vanílico e o ácido isovanílico são eficientes como antioxidantes na desativação do oxigênio singlete. No entanto, apresentam limitações por conta da baixa solubilidade em água^{169, 170, 171}.

A desativação do $^1\text{O}_2$ pelo complexo e pelo ácido isovanílico livre foi avaliada por EPR usando o sequestrador de oxigênio singlete 2,2,6,6-tetrametil-4-iperidinol (TEMP) para identificação do radical TEMPO formado, (*espécie V*), proposta de mecanismo 5.1. Neste experimento obteve-se os valores de IC_{50} de 129 ± 3 para o complexo e $360 \pm 9 \mu\text{molL}^{-1}$ para o ácido isovanílico livre.

Os valores de IC_{50} obtidos para inibição do radical TEMPO pelo ligante ácido isovanílico livre e complexo foram de 1391 ± 9 e $1200 \pm 12 \mu\text{molL}^{-1}$ respectivamente, mostrando que o ácido isovanílico e o complexo não conseguem inibir o radical estável TEMPO, uma vez que este possui alta estabilidade.¹⁷² Esses resultados mostram que a desativação do $^1\text{O}_2$ ocorre via processo de oxidação conforme o mecanismo proposto na *Via de síntese I*, proposta de mecanismo 5.1, com formação de endoperóxidos (VII) e produto estável benzoquinona (*espécie X*).^{173, 174}

Resultados e Discussão



Proposta de Mecanismo 5.1: Proposta de mecanismo para a inibição do oxigênio singlete e do radical TEMPO usando o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO).

Dois métodos amplamente empregados na investigação da capacidade antioxidante fazem uso dos radicais estáveis DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)] e das técnicas espectroscópicas UV-vis e EPR.^{175, 176}

O DPPH• possui um espectro de EPR caracterizado por cinco linhas e uma constante de acoplamento hiperfino (a_N) de 9 G,¹⁷⁷ Figura 5.4. A capacidade antioxidante do complexo foi avaliada pelas alterações no espectro de EPR do DPPH• frente a diferentes concentrações do complexo (37,50 a 250,0 μmolL^{-1}). Os valores de IC₅₀ foram obtidos pela regressão linear da dupla integração das intensidades dos sinais de EPR do radical DPPH•, utilizando o programa prisma 6.0.

O valor do IC₅₀ de $94,70 \pm 4$ obtido para o complexo, foi 4 vezes superior ao valor de inibição do ácido isovanílico livre ($405,0 \pm 8 \mu\text{molL}^{-1}$). Essa diferença pode estar relacionada com a presença do íon Mg(II) na esfera de coordenação, uma vez que este pode estar contribuindo

Resultados e Discussão

para a estabilização do radical nas estruturas de ressonância,^{182, 183} conforme a proposta de mecanismo 5.2.

O experimento com radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi conduzido por espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Vis, a partir da redução do máximo de absorção⁹⁸⁸ em 734 nm do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ com a presença do complexo, Figura 5.5. A partir destes dados espectroscópicos foi possível calcular os valores de IC_{50} para o ácido isovanílico livre e complexo. Foram utilizados como padrões (controle positivo) os antioxidantes trolox e ácido ascórbico.¹⁷⁸

O complexo apresentou um IC_{50} de $37,15 \mu\text{molL}^{-1}$ contra $81,78 \mu\text{molL}^{-1}$ do ácido isovanílico livre. Podemos considerar um bom resultado frente aos padrões antioxidantes (controle positivo) Trolox e ácido ascórbico, Tabela 5.1.

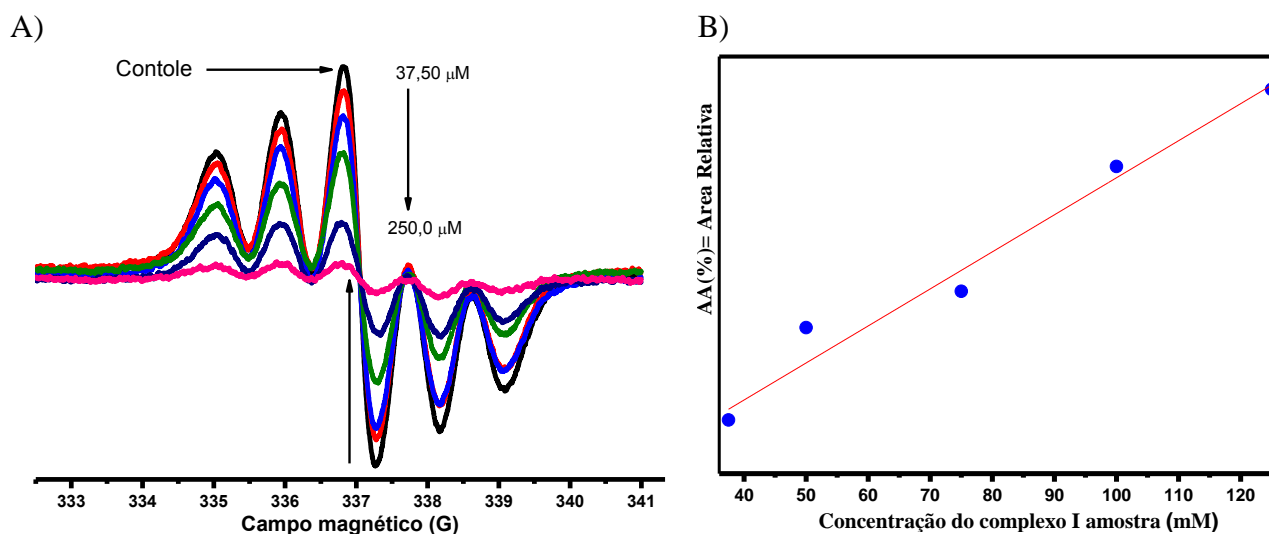
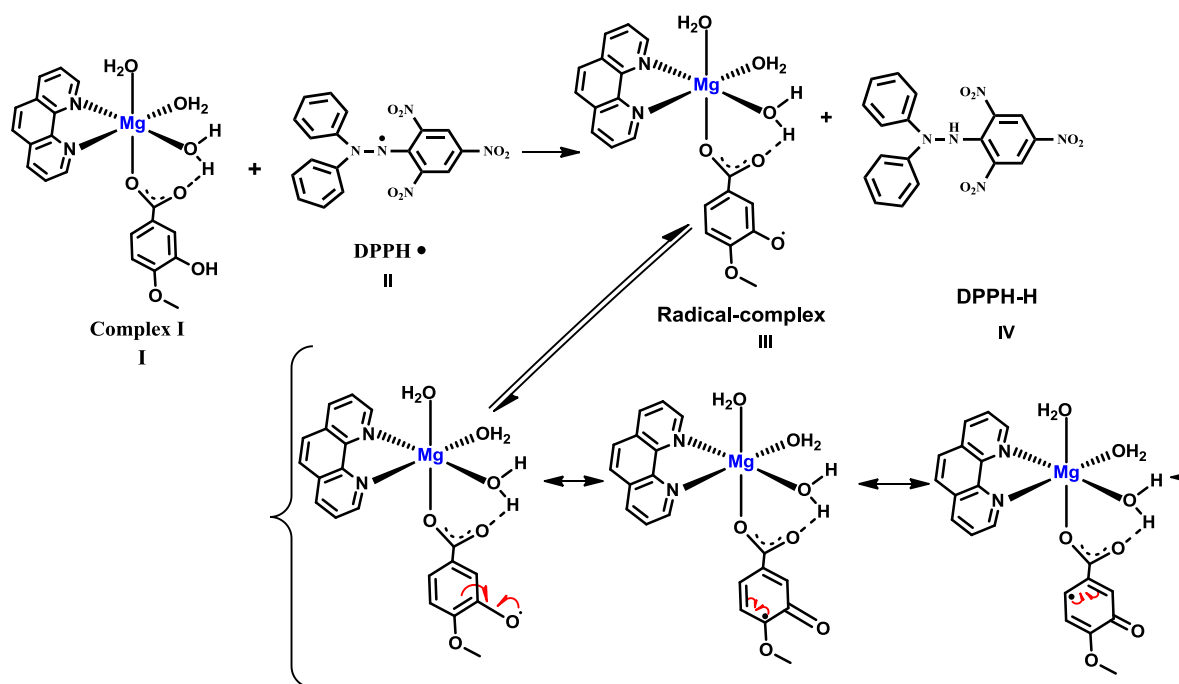


FIGURA 5:4 (A) Espectros de EPR do radical $\text{DPPH}^{\bullet+}$ livre (controle, linha preta) e na presença do complexo $\text{cis-}[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ (linhas coloridas). (B) Gráficos de área do sinal de EPR para o $\text{DPPH}^{\bullet+}$ livre e na presença do complexo $\text{cis-}[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ versus concentração do complexo $\text{cis-}[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$.

Resultados e Discussão



Proposta de mecanismo 5.2: Proposta de mecanismo de inibição do radical estável DPPH[•] pelo complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) por transferência de próton.

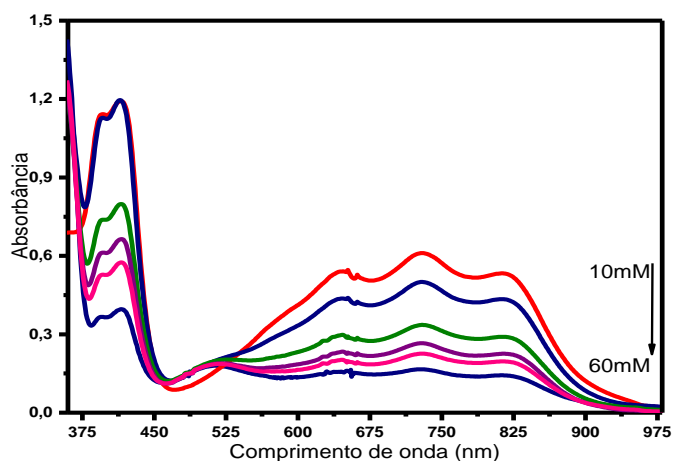
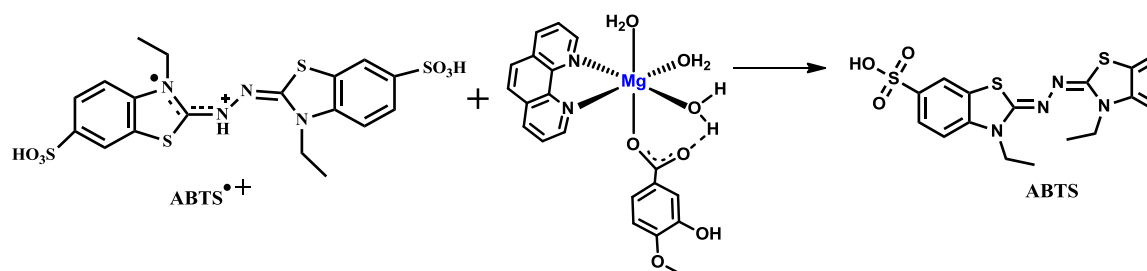


FIGURA 5.5: Espectro de absorção eletrônica UV-vis do radical ABTS^{•+} na presença de diferentes concentrações do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO).

Resultados e Discussão



Proposta de mecanismo 5.3: Mecanismo de inibição do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pelo complexo $\text{cis-}[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$ via processo de transferência de próton.

Tabela 5.2: Valores de IC_{50} para inibição do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pelo complexo $\text{cis-}[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$.

Compostos	IC_{50} (μmolL^{-1})
$\text{cis-}[\text{Mg}(\text{phen})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})_3](\text{CH}_3\text{COO})$	37,20
Ácido isovanílico livre	81,80
Trolox	17,90
Ácido ascórbico	18,30

Foram realizados estudos da capacidade antioxidante de inibição do ânion radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ pelo complexo e ácido isovanílico livre, utilizando o ensaio com a VitB2/MET/NBT.^{179,180} O complexo apresentou uma inibição de 85% (IC_{50} de $64,65 \pm 4 \mu\text{molL}^{-1}$), contra 58% de inibição (IC_{50} de $105,77 \pm 4 \mu\text{molL}^{-1}$) obtido para o ácido isovanílico livre, Figura 5.6. Essa diferença pode estar relacionada a dois fatores:

- 1) A melhora na solubilidade do complexo ($314 \mu\text{g/mL}$), em relação ao ácido isovanílico livre ($240 \mu\text{g/mL}$) em solução aquosa.
- 2) A presença do íon $\text{Mg}(\text{II})$ na esfera de coordenação pode

Resultados e Discussão

estará contribuindo para maior capacidade antioxidante, uma vez que o magnésio atua na estabilização das espécies reativas do oxigênio em processos de transferência de elétrons e prótons.^{181, 182, 183}

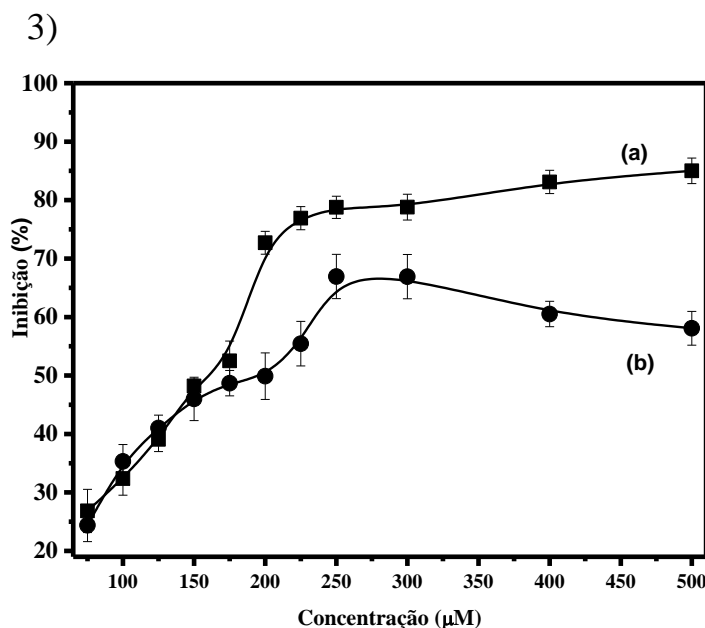


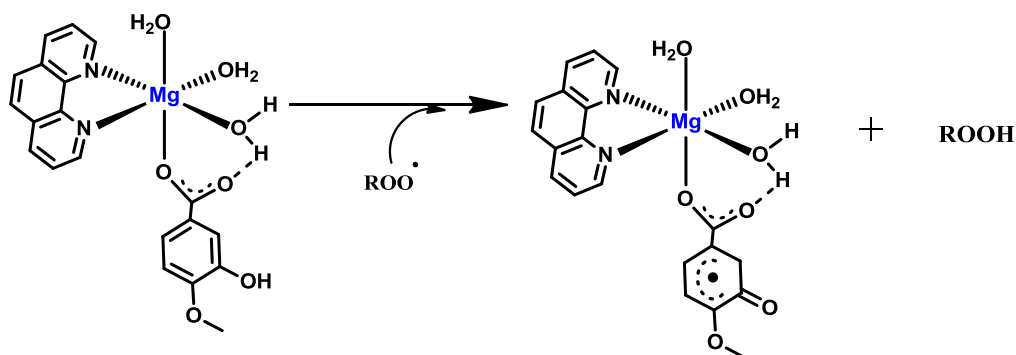
FIGURA 5.6: Porcentagem de inibição do radical superóxido utilizando o complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) (a) e o ácido isovanílico livre (b) pelo o ensaio com a VitB2/MET/NBT.

Para auxiliar na elucidação do mecanismo de reação para a atividade antioxidante observada para o complexo, foram realizados cálculos computacionais de energia de ligação e potencial de ionização (IP) para o complexo e para o ligante ácido isovanílico livre, Figura 5.4 A e B.

O grupo com maior diferença de atividade antioxidante do complexo, em comparação com o ácido isovanílico livre, pode ser observado pela diferença no potencial de ionização ($\Delta IP = 24,37 \text{ Kcal mol}^{-1}$) para o grupo O-H36, do anel benzênico coordenado em comparação ao ácido isovanílico livre (O-H11), Figura 5.4 A e B. Isso, conseqüentemente, leva a um aumento da densidade eletrônica no anel benzênico após a coordenação do íon Mg(II).

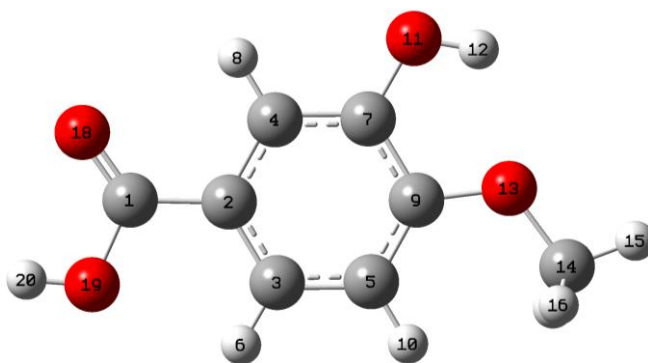
Resultados e Discussão

Por outro lado, o átomo de hidrogênio H37 do grupo hidroxila fenólico localizado ao lado de C29 é acessível à desprotonação, o que facilita o ataque pelo radical peroxil. A proposta de mecanismo 5.4 é baseada na inibição do radical peroxil (ROO•), no qual ocorre a transferência de átomos de hidrogênio do complexo, formando a espécie neutra ROOH através de ligação de hidrogênio. Estes resultados indicam que o fragmento $\{\text{Mg}(\text{phen})\}^{2+}$ aumenta a estabilidade por ressonância do grupo quando é oxidado em processos de transferência de elétron.



Proposta de mecanismo 5.4: Proposta de mecanismo para inibição do radical peroxila pelo complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO).

A)



B)

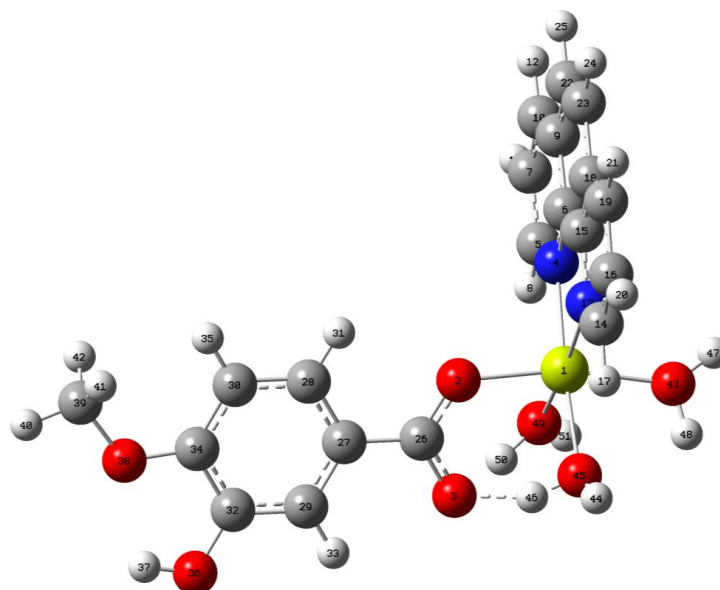


FIGURA 5.7: Estrutura Otimizada (DFT) do ácido isovanílico livre (A) e complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) (B).

Capítulo 6

Conclusões e Perspectivas

6.0 Conclusões e Perspectivas

Os resultados obtidos neste estudo, indicam que complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO) apresenta várias propriedades interessantes para aplicação prática.

1. Simplicidade de síntese dos complexos, solubilidade e estabilidade em solução aquosa quando na presença e ausência de luz, baixo custo que favorecem o armazenamento e produção em larga escala,
2. A ausência de toxicidade tanto no meio aquático quanto terrestre o qual favorecem aplicações em processos que envolvem seres vivos.
3. A atividade inseticida comparável ao inseticida comercial sulfluramida indicam o potencial do complexo para aplicação agrícola.
4. A atividade antioxidante e os resultados de proteção da peroxidação lipídica frente à carne suína indicam o potencial do composto para aplicação na pecuária.

=====

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants . Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. , v. 141, n. June, p. 312–322, 2006.
2. OSELLAME, L. D.; HONS, B. S.; PH, D.; et al. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 26, n. 6, p. 711–723, 2012.
3. BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Rev. Nutr., Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago., 1999.
4. JENSEN, S. J. K. Oxidative stress and free radicals. v. 667, p. 387–392, 2003.
5. CAROCHO M, FERREIRA IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food Chem Toxicol. v. 51C, p. 15-25, 2012.
6. BUETTNER, G. R.; DOHERTY, T. P.; PATTERSON, L. K. The kinetics of the reaction of superoxide radical with Fe (III) complexes of EDTA , DETAPAC and HEDTA. Febs Lett.v. 158, n. 1, p. 0–3, 1983.
7. SCHEIBMEIRA, H.D.; CHRISTENSENA, K.; WHITAKERA, S.H.; JEGAETHESANA, J.; CLANCYB, R.; JANET, D. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. Pierce Intensive and Critical Care Nursing, v.21, p. 24-28, 2005.
8. CADENAS, E. & DAVIES, K.J.A. Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress And Aging. Free Radical Biology & Medicine, v. 29, n. 3/4, p. 222–230, 2000.

Referências Bibliográficas

- =====
9. GUTTERIDGE, J. M. C.; MAIDT, L.; POYER, L. Superoxide dismutase and Fenton chemistry. *Biochem J.* v. 269, p. 169–174, 1990.
 10. THOMAS, C.; MACKEY, M. M.; DIAZ, A. A.; COX, D. P. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Report*, v. 14, n. 3, p. 102–109, 2009.
 11. LLOYD, R. V.; HANNA, P. M.; MASON, R. P. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the fenton reaction. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 22, n. 5, p. 885–888, 1997.
 12. PRATT, D. A.; TALLMAN, K. A.; PORTER, N. E. D. A. Free Radical Oxidation of Polyunsaturated Lipids: New Mechanistic Insights and the Development of Peroxyl Radical Clocks. *ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH* ' 458–467 ' 2011 ' Vol. 44, No. 6v. 44, n. 6, 2011.
 13. STEPHENS, J.W.; KHANOLKAR, M.P.; BAIN, S.C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, v. 202, p. 321–329, 2009.
 14. CERQUEIRA, F. M. et al. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quím. Nova*, v. 30, n. 2, p.441-449, 2007.
 15. Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* v.14 n.4, p. 840-60, 2010.
 16. LOBO, V.; PATIL, PHATAK, CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review.* v. 4, n. 8, p. 118–26, 2010.

Referências Bibliográficas

- =====
17. YANG, X.; LI, Y.; LI, Y.; REN, X.; ZHANG, X.; HU, D. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis : Mechanisms and Therapies. *Frontiers in Physiology*, v. 8, n. August, p. 1–16, 2017.
 18. AHMADINEJAD, F.; MØLLER, S. G.; HASHEMZADEH-CHALESHTORI, M. Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. *Antioxidants*, n. 6, v. 51 p. 1–15, 2017.
 19. Reiter, R. J.; Xian T. Dun; Rosales-Corral, S.; Galano, A.; Zhou X. J.; Xu, B. Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. *Molecules*, n. 23, v. 509, p. 1–25, 2018.
 20. BAEZ, A.; SHILOACH, J. Effect of elevated oxygen concentration on bacteria, yeasts, and cells propagated for production of biological compounds. *Microb Cell Fact*, p. 1–7, 2014.
 21. MACH, W. J.; THIMMESCH, A. R.; PIERCE, J. T.; PIERCE, J. D. Consequences of Hyperoxia and the Toxicity of Oxygen in the Lung. *Nurs Res Pract*, v. 2011, 2011.
 22. ARESE, P.; GALLO, V.; PANTALEO, A.; TURRINI, F. Life and Death of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficient Erythrocytes – Role of Redox Stress and Band 3 Modifications. *Transfus Med Hemother*. p. 328–334, 2012.
 23. ZHANG, Z.; YANG, Z.; ZHU, B.; HU, J.; LIEW, C. W.; ZHANG, Y.; LEOPOLD, J. A.; HANDY, D. E.; LOSCALZO, J.; STANTON, R. C. Increasing Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Activity Restores Redox Balance in Vascular Endothelial Cells Exposed to High Glucose. *PLOS ONE*, v. 7, n. 11, 2012.
 24. CARR, A. C.; ZHU, B.; FREI, B. Potential Antiatherogenic

Referências Bibliográficas

=====
Mechanisms of Ascorbate (Vitamin C) and α -Tocopherol (Vitamin E).
Circulation Research n. Vitamin C, p. 349–354, 2000.

25. ANDRÉA, F.; QUEIROZ, K.; ANDRADE, D.; et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work. Redox Biology, v. 6, p. 617–639, 2015.

26. CARILLON, J.; ROUANET, J.; CRISTOL, J.; BRION, R. Superoxide Dismutase Administration, A Potential Therapy Against Oxidative Stress Related Diseases: Several Routes of Supplementation and Proposal of an Original Mechanism of Action. Pharm Res, v. 30 (11):2718-28. 2013.

27. D, S. R. P. Therapeutic value of oral supplementation with melon superoxide dismutase and wheat gliadin combination. Nutrition, v. 31, n. 3, p. 430–436, 2015.

28. YASUI, K.; BABA, A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. Inflamm Res. v. 55, p. 359–363, 2006.

29. CARILLON, J.; ROUANET, J.; CRISTOL, J.; BRION, R. Superoxide Dismutase Administration, A Potential Therapy Against Oxidative Stress Related Diseases: Several Routes of Supplementation and Proposal of an Original Mechanism of Action. 2011.

30. KUMAR, C. K. A.; TEJASRI, M.; KUMAR, D. S.; et al. Innovative Drug Discovery. Inflamm Res. v. 2, n. 2, 2012.

31. HIGDON, J. V; FREI, B.; HIGDON, J. V; FREI, B. Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43(1):89–143 2003.

Referências Bibliográficas

- =====
32. RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; et al. Oxidative Stress , Prooxidants , and Antioxidants : The Interplay. v. 2014, 2014.
33. OLIVEIRA, R. M. M.; SOUZA DANIEL, J. F. DE; AGUIAR, I. DE; et al. Structural effects on the hesperidin properties obtained by chelation to magnesium complexes. Journal of inorganic biochemistry, v. 129, p. 35–42, 2013.
34. SILVA, D. E. S.; CALI, M. P.; PAZIN, W. M.; et al. Luminescent Ru(II) Phenanthroline Complexes as a Probe for Real-Time Imaging of A β Self-Aggregation and Therapeutic Applications in Alzheimer's Disease. Journal of Medicinal Chemistry, v. 59, n. 19, p. 9215–9227, 2016.
35. ROSE MARIA CARLOS at. al. Processo de preparação de complexos metálicos de hesperidina e hesperitina, complexos metálicos e composições inseticidas para o controle de insetos pragas urbanas, agricultura e da silvicultura. Inventor: da patente nº: BR1020120313804A2 05 de dezembro de 2014.
36. LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K., Fire leaf-cutting ants: biology and management. Westview Press: London, 1986.
37. SOUZA-SILVA, A.; ZANETTI, R.; SANTOS, A.; OLAVO, J.; MATTOS, S. Preferência de formigas cortadeiras por mudas de eucalipto pulverizadas ou imersas em soluções de extrato pirolenhoso em diferentes concentrações Preference of leaf-cutting ants by eucalypts seedlings sprayed or immersed in pyroligneous extract solutions in different concentrations. Scientia Forestalis, Piracicaba, n. 67, p.9-13, abr. 2005.
38. MATRANGOLO, C. A. R.; CASTRO, R. V. O.; DELLA LUCIA, T. M. C.; DELLA LUCIA, R. M.; MENDES, A. F. N.; COSTA, J. M. F. N.;

Referências Bibliográficas

=====

LEITE, H. G. Crescimento de eucalipto sob efeito de desfolhamento artificial. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45, 952–957, 2010.

39. ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, J. C.; RIBEIRO, T.; LEMES, P. G. An Overview of Integrated Management of Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian Forest Plantations. , p. 439–454, 2014.

40. HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O., The ants. Harvard University Press: Cambridge, 1990; p 732.

41. RIBEIRO, G.T.; WOESSNER, R.A. Efeito de diferentes níveis de desfolha artificial, para avaliação de danos causados por saúvas (*Atta* spp.) em árvores de *Gmelina arborea* Linnée e de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barr. e Golf. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 9, 261–272, 1980.

42. Derrogação para uso de Deltametrina, Fenitrothion, Fipronil e Sulfuramida em florestas certificadas FSC® no Brasil. *Documentos Técnicos IPEF*, v.4, n.4, p.1-38, fev. 2016.

43. VASCONCELOS, H. L.; FOWLER, H. G. Foraging and fungal substrate selection by leaf-cutting ants. In: Meer, R.K.V.; Jaffé, K.; Cedeno, A. (Ed.). *Applied myrmecology: a world perspective*. San Francisco: Westview Press, p. 410-9, 1990.

44. SOUZA, M. D. DE; PERES FILHO, O.; CALDEIRA, S. F.; DORVAL, A.; SOUSA, N. J. Desenvolvimento in vitro do fungo simbiote de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) em meio de cultura com diferentes extratos vegetais. *Ciência Rural*, v. 42, n. 9, p. 1603–1609, 2012.

Referências Bibliográficas

- =====
45. CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; et al. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, n. 1983, p. 243–248, 1997.
46. QUINLAN, R. J. The role of fungus in the diet of the leafcutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecological entomology* n. 1 979, 1979.
47. MUIR, D. C. G.; DE WIT, C. A. "Trends of legacy and new persistent organic pollutants in the circumpolar arctic: Overview, conclusions, and recommendations". *Sci. Total Environ.*, 408: 3044, 2010.
48. N, P. D. E. L. E. I.; INICIAL, P. Projeto de lei n.o 4.502, de 2016. , v. 2016, p. 1–24, 2016.
49. AZEVEDO F. R. DE, FREIRE F. S. C. O. Tecnologia de Aplicação de Defensivos Agrícolas. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, pg14, 2006.
50. GUEDES J. V. C. at. al. Sistemas de aplicação e inseticidas no controle de *Anticarsia gemmatalis* na soja. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v.16, n.8, p.910–914, 2012.
51. RANCO, N. H. *Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective.* , p. 238–273, 2013.
52. RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM, Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, v.428, p.493-521, 2004.
53. SZEGEDI, V.; BÁRDOS, G.; DÉTÁRI, L.; TÓTH, A.; BANCZEROWSKIPELYHE, I.; VILÁGI, I. Transient alterations in neuronal and behavioral activity following bensultap and fipronil treatment in rats. *Toxicology.* v.214, p.67-76, 2005.

Referências Bibliográficas

- =====
54. CASTRO, V. L. Biomarcadores e Desenvolvimento Neurocomportamental: Aspectos Experimentais. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, 2006.
55. GHENO, E. M.; ROSEMBERG, D. B.; Souza, O. D, Calabro, L. Zebrafish in Brazilian Science. Zebrafish. v. 13, n. 3, p. 217–225, 2016.
56. STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D. & SINGER, F.,. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*brachydanio rerio*). Nature. 291, 293–296, 1981.
57. SAVERINO C., AND GERLAI R. The social zebrafish: Behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. Behav Brain Res, v. 191, n. 1, p. 77–87, 2009.
58. GHENO, E. M.; ROSEMBERG, D. B. Zebrafish in Brazilian Science : Scientific Production, Impact, and Collaboration Ediane, v. 13, n. 3, p. 217–225, 2016.
59. SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. Braz J Med Biol Res, v. 32, p. 1551–1553, 1999.
60. SILVEIRA, T. R. da; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. Ciência e Cultura, v. 64, n. 2, p. 4- 5, abr./jun. 2012.
61. GERLAI, R.; LEE, V.; BLASER, R.,. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). Pharmacol Biochem Behav,85,752–761, 2006.

Referências Bibliográficas

=====

62. HUVAERE, K.; SKIBSTED, L. H. Flavonoids protecting food and beverages against light. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 2014, n. July, 2014.

63. ANDERSEN LT, LUND MN, GLYAGER R, JENSEN SB, MORTENSEN G AND SKIBSTED L. H. Light-induced deterioration of reduced-fat cream cheese. Relative importance of protein and lipid oxidation. *Milch- wissenschaft* 61:162–165, 2006.

64. ANDERSEN M. L. AND SKIBSTED L. H. Light-induced quality changes in food and beverages, in *Chemical Deterioration and Physical Instability. Food and Beverages*, ed. by Skibsted LH, Risbo J and Andersen ML. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 113–139, 2010.

65. HUVAERE, K.; SINNAEVE, B.; BOCXLAER, J. VAN; SKIBSTED, L. H. Flavonoid deactivation of excited state flavins: Reaction monitoring by mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 36, p. 9261–9272, 2012.

66. CARDOSO, D. R.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Mechanism of deactivation of triplet-excited riboflavin by ascorbate, carotenoids, and tocopherols in homogeneous and heterogeneous aqueous food model systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 55, n. 15, p. 6285–91, 2007.

67. GRIPPA, J. M.; ZAWADZKI, A DE; GROSSI, A B.; SKIBSTED, L. H.; CARDOS. O, D. R. Riboflavin photosensitized oxidation of myoglobin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , v. 62, n. 5, p. 1153–1158, 2014.

68. CARDOSO, D. R.; SCURACHIO, R. S.; SANTOS, W. G.; HOMEM-DE-MELLO, P.; SKIBSTED, L. H. Ribo fl avin-Photosensitized Oxidation

Referências Bibliográficas

=====

Is Enhanced by Conjugation in Unsaturated Lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. p. 4–11, 2013.

69. HUVAERE, K.; SKIBSTED, L. H. Light-induced oxidation of tryptophan and histidine. Reactivity of aromatic N-heterocycles toward triplet-excited flavins. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, n. 23, p. 8049–60, 2009.

70. DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W.W. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*. 298, 2149–2153, 2002.

71. HAN, R.-M.; ZHANG, J.-P.; SKIBSTED, L. H. Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 17, n. 2, p. 2140–60, jan. 2012.

72. BEUTNER, S.; BLOEDORN, B.; FRIXEL, S.; BLANCO, I.H.; BHOFFMANN, T.; MARTIN, H.-D.; MAYER, B.; NOACK, P.; RUCK, C.; SCHMIDT, M.; et al. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: Carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 81, 559–568, 2001.

73. COX, P. A., *Instant Notes. Inorganic Chemistry. Second Edition ed.*; Taylor & Francis: London, 2004.

74. COWAN, J. A., *The biological chemistry of magnesium*. Verlag Chemie: New York, 1995.

75. SHANNON, R. D. "Revised effective ionic-radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides". *Acta Crystallogr. Sect. A*, 32: 751, 1976.

76. BOCK, C. W.; KAUFMAN, A.; GLUSKER, J. P. "Coordination of water to magnesium cations". *Inorg. Chem. V*. 33: 419, 1994.

Referências Bibliográficas

- =====
77. PAYANDEH, J.; PFOH, R.; PAI, E. F. *Biochimica et Biophysica Acta*
The structure and regulation of magnesium selective ion channels. *BBA - Biomembranes*, v. 1828, n. 11, p. 2778–2792, 2013.
78. ROMANI, A. M. P. cellular magnesium homeostasisnih. *Public Access*.
v. 512, n. 1, p. 1–23, 2012.
79. YANG, S. J.; HWANG, S. Y.; BAIK, S. H.; LEE, K.W.; NAM, M.S.;
PARK, Y.S.; WOO, J. T.; KIM, Y.; S. PARK, C.H.; PARK, H. K YIM,
S.-H. YOON, KIM. Serum magnesium level is associated with type 2
diabetes in women with a history of gestational diabetes mellitus: the Korea
National Diabetes Program Study, *J. Korean Med. Sci.* V. 29 n. 1, p. 84–
89, 2014.
80. ABDULSAHIB, H.T. Determination of magnesium in whole blood and
serum of ischemic heart disease (IHD) patients by flame atomic absorption
spectrometry, *Am. J. Anal. Chem.* V.2, n. 8, p. 996–1002, 2011.
81. ZHU, L.; HUANG, J.; HAN, S.-Y.; AN, Z. mer-Triaqua-(1,10-
phenanthroline- κ^2 N,N')(sulfato- κ O)magnesium(II). *Acta Crystallographica*.
v. 64, n. 2003, p. m683, 2008.
82. PETRAT, F.; WEISHEIT, D.; LENSEN, M.; et al. Selective
determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new
fluorescent sensor. *Biochem J.*, v. 147, p. 137–147, 2002.
83. KHACHATRYAN, L. VEJERANO, E. LOMNICKI, S. DELLINGER,
B. Environmentally Persistent Free Radicals (EPFRs)-2. Are Free
Hydroxyl Radicals Generated in Aqueous Solutions? . *Environ. Sci.*
Technol. 45, 8559–8566, 2011.
84. FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G.
E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.;

Referências Bibliográficas

=====

MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J., J. A.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. Gaussian 09, Revision A. 02, Gaussian, Inc.: Wallingford, 2009.

85. LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. "Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density". *Phys. Rev.*, B37: 785, 1998.

86. BECKE, A. D. "Density-Functional Thermochemistry. III. The role of exact exchange". *J. Chem. Phys.*, 98: 5648, 1993.

87. CALVERT, J. G.; PITTS, J. N. *Photochemistry*. 2. ed. New York: Wiley, 1967. p. 779- 789.

88. RABEK, J. F. *Experimental methods in photochemistry and photophysics*. New York: John Wiley, 1982. p. 944-951.

Referências Bibliográficas

- =====
89. CASPAR, J.V.; MEYER, T.J. “Photochemistry of Ru(bpy)₃²⁺. Solvent Effects”. Journal of the American Chemical Society, 105, 5583-5590, 1983.
90. BARQAWI, K.R.; LLOBET, A.; MEYER, T.J. “Synthetic Design of MLCT Excited States. Ligand-Substituted, Mono-2,2'-bipyridine Complexes of Ru(II)”. Journal of the American Chemical Society, 110, 7151-1159, 1988.
91. FLETCHER, K.A.; STOREY, I.A.; HENDRICKS, A.E.; PANDEY, S. “Behavior of the solvatochromic probes Reichardt’s dye, pyrene, dansylamide, Nile Red and 1-pyrenecarbaldehyde within the room-temperature ionic liquid bmimPF₆”. Green Chemistry, 3, 210–215, 2001.
92. EL-DOSSOKI, F.I. Refractive Index and Density Measurements for Selected Binary Protic-Protic, Aprotic-Aprotic, and Aprotic-Protic Systems at Temperatures from 298.15 K to 308.15 K. Journal of the Chinese Chemical Society, 54, 1129-1137, 2007.
93. CRC Handbook of Chemistry, and Physics, 70th Edition, Weast, R C , Ed , CRC Press, Boca Raton, FL, p D-221, 1989.
94. PEREIRA A. V. at al. Determinação da constante de dissociação (ka) do captopril e da nimesulida – experimentos. Quim. Nova, vol. 34, no. 9, 1656-1660, 2011.
95. CARDOSO, D. R. at al. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. Food & Function, v. 3, n. 5, p. 487, 2012.
96. LÜ, J.-M. at. al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. Journal of cellular and molecular medicine, v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010.

Referências Bibliográficas

- =====
97. POLOVKA, M. EPR spectroscopy : A tool to characterize stability and antioxidant properties of foods. v. 45, n. 1, p. 1–11, 2006.
98. ROBERTA RE, et. al. "Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay ". Free Radical Biology and Medicine, 26, 1231-1237, 1999.
99. BUENO, O. C. at al., Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. An. Soc. Entomol. Brasil., 26: 107-113; 1997.
100. ELANDT-JOHNSON, R.; JOHNSON, N. L., Survival models and data analysis. John Wiley and Sons: NewYork, 1980.
101. HILL, A. J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. Toxicol Sci. v. 86, n. 1, p. 6–19, 2005.
- 102 ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 7(2), 88-95, 1961. modified to microplates by Silva de Assis, 1998.
103. BAKER, T. R.; PETERSON, R. E.; HEIDEMAN, W. Using Zebrafish as a Model System for Studying the Transgenerational Effects of Dioxin. Toxicol Sci. v. 138, n. 2, p. 403–411, 2014.
104. GHISI, C.; OLIVEIRA, E. C.; MENDONÇA, T. F.; et al. Chemosphere Integrated biomarker response in cat fi sh *Hypostomus ancistroides* by River , southern Brazil multivariate analysis in the Pirap o. Chemosphere, v. 161, p. 69–79, 2016.

Referências Bibliográficas

- =====
105. CRISTINA, I.; DANTE, L.; PIANCINI, S.; et al. drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 139, n. December 2016, p. 291–300, 2017.
106. GAO, R., YUAN, Z., ZHAO, Z., GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*. v. 45, n. 1, p. 41-45, 1998.
107. AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. v. 105, p. 121-126, 1984.
108. KEEN, J. H., HABIG, W. H., JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*. v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.
109. JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, v. 202, n. 2, p. 384–389, 1992.
110. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, n. (1-2), p. 248-254, 1976.
111. SANTIAGO, R. M.; ZAMINELLI, T.; BASSANI, T. B.; et al. The mechanism of antidepressant-like effects of piroxicam in rats. , v. 6, n. 1, p. 7–12, 2015.
112. WALSH R. N. AT AL. The Open-Field Test: A Critical Review *Psychological Bulletin*, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.
113. RENERIC, J. P. In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may

Referências Bibliográficas

=====

produce greater effects than selective drugs. *Behav Brain Res.* v. 136, n. 2, p. 521-32, 2002.

114. PORSOLT, R. D., ANTON, G., BLAVET, N., JALFRE, M., Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* v. 47, p. 4, p. 379-91, 1978.

115. SANTIAGO, R. M. AT AL. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.* v. 34, p. 1104–1114, 2010.

116. CRYAN, J. F.; MARKOU, A; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in pharmacological sciences.* v. 23, n. 5, p. 238–245, 2002.

117. WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007.

118. LÜ, J. LIN, P. H. YAO Q., Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems Chen, J. *Cell. Mol. Med.* v. 14, p. 840–860, 2010.

119. CHOE, E. MIN, D. B. Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 1–22, 2006.

120. SHAHIDI, F. ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability *Chem. Soc. Rev.* v. 39 4067–79, 2010.

121. CARLSEN, C. U.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Oxidative stability of processed pork. Assay based on ESR-detection of radicals. *Eur. Food Res. Technol. Eur. Food Res Technol.* v. 213, p. 170–173, 2001.

Referências Bibliográficas

- =====
122. XU, Y. GU, Y. QIAN, S.Y. An Advanced Electron Spin Resonance (ESR) Spin-Trapping and LC/(ESR)/MS Technique for the Study of Lipid Peroxidation. *Int. J. Mol. Sci.* v. 13, p. 14648–14666, 2012.
123. KOUTINA, G. JONGBERG, S. SKIBSTED, L.H. Protein and Lipid Oxidation in Parma Ham during Production *J. Agric. Food Chem.* v. 60 p. 9737–9745, 2012.
124. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, Gc.; Morrill, C.T; 3a Ed. Editora Guanabara; Rio de Janeiro 1979.(b) n. Ii, p. 1450–1455, 2005.
125. CAUSA, M. at al. Electronic structure and stability of different crystal phases of magnesium oxide. *Physical Review B.* v. 33, n. 2, p. 1308–1316, 1986 e Silverstein, R. M. at al. C.T; 3a Ed. Editora Guanabara; Rio de Janeiro 1979.(b) n. . Ii, p. 1450–1455, 2005.
126. BARTON, P. G. The Influence on the Binding of Surface Charge of Some Cations *density of phosphatides. *The Journal of biological chemistry.* v. 243, n. 14, p. 3884–3890, 1968.
127. JIAO, D.; KING, C.; GROSSFIELD, A.; DARDEN, T. A.; REN, P.; ENGINEERING, B.; UNI, T.; AUSTIN, T.; J, I. B. M. T. Simulation of Ca^{2+} and Mg^{2+} Solvation Using Polarizable Atomic Multipole Potential. *J. Phys. Chem. B* proaches 2006.
128. ASADA, M.; FUJIMORI, T.; FUJII, K.; KANZAKI, R.; UMEBAYASHI, Y.; ISHIGURO, S. Solvation structure of magnesium , zinc , and alkaline earth metal ions in N , N -dimethylformamide , N , N -dimethylacetamide , and their mixtures studied by means of Raman spectroscopy and DFT calculations – Ionic size and electronic effects on steric congestion. *n. J. Raman Spectrosc.* p. 417–426, 2007.

Referências Bibliográficas

- =====
129. KOSTREWA, D.; WINKLER, F. K.; EMBO, K. S. J. Mg^{2+} Binding to the Active Site of EcoRV Endonuclease : A Crystallographic Study of Complexes with Substrate and Product DNA at 2 Å Resolutions. *Biochemistry*, Vol. 34, No. 2, 1995.
130. MURUGAVEL, R.; KUPPUSWAMY, S.; RANDOLL, S. Cooperative Binding of Phosphate Anion and a Neutral Nitrogen Donor to Alkaline-Earth Metal Ions . Investigation of Group 2 Metal - Organophosphate Interaction in the Absence and Presence of 1,10-Phenanthroline. *Inorganic Chemistry*, Vol. 47, No. 13, 2008.
131. OKAMURA, T.; FURUYA, R.; ONITSUKA, K. Regulation of the Hydrolytic Activity of Mg^{2+} -Dependent Phosphatase Models by Intramolecular NH \cdots O Hydrogen Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* p. 14639–14641, 2014.
132. PERERA, S. A.; SALEMI, L. M.; BARTLETT, R. J. Hyperfine Coupling Constants of Organic Radicals. *J. Chem. Phys.* v. 106, n. 10, p. 4061–4066, 1997.
133. KNAUER, B. R.; NAPIER, J. J. The nitrogen hyperfine splitting constant of the nitroxide functional group as a solvent polarity parameter. The relative importance for a solvent polarity parameter of its being a cybotactic probe vs. its being a model process. *Journal of the American Chemical Society.* v. 98, n. 15, p. 4395–4400, 1976.
134. JANZEN, E. G. Substituent Effects on Electron Spin Resonance Spectra and Stability of Free Radicals. *Accounts of Chemical Research*, v. 2, n. 9, p. 279-, 1969.
135. URSINI, C. V. Ressonância magnética nuclear de platina-195 em compostos organometálicos. *Química Nova*, v. 20, n. 1, p. 72–82, 1997.

Referências Bibliográficas

136. ZEHENTBAUER, F. M.; MORETTO, C.; STEPHEN, R.; et al. Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 121, p. 147–151, 2014.
137. WANG, P.; CHENG, M.; ZHANG, Z. On different photodecomposition behaviors of rhodamine B on laponite and montmorillonite clay under visible light irradiation. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 18, n. 4, p. 308–316, 2014.
138. JURIS, A. et al. “Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Ruthenium”. *Coordination Chemical Reviews*. v. 84, p. 85–277, 1988.
139. DREYSE, P. et. al. "Effect of free rotation in polypyridinic ligands of Ru(II) complexes applied in light-emitting electrochemical cells". *Dalton Transactions*. v. 42, p. 15502-15513, 2013.
140. ROYER, C. A. Fluorescence spectroscopy. *Methods in molecular biology*. Clifton, N. J. v. 40, p. 65–89, 1995.
141. TEALE, F. W. J. fluorescence excitation spectrum of organic compounds in solution. *Transactions of the Faraday Society*, p. 640–648, 1957.
142. CARRONE, G.; GANTOV, F.; SLEP, L. D.; ETCHENIQUE, R. Fluorescent ligands and energy transfer in photoactive ruthenium-bipyridine complexes. *Journal of Physical Chemistry A*, v. 118, n. 45, p. 10416–10424, 2014.
143. KUBIN, R. F.; FLETCHER, A. N. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *Journal of Luminescence*, v. 27, n. 4, p. 455–462, 1982.

Referências Bibliográficas

- =====
144. SILVA, R. DA; LOECK, A.; MAGALHÃES, JULIANA LEIVAS, C. DE; CENTENARO, E. Growth of symbiont fungi of cutter ants of the genus *Acromyrmex* in means of culture with different extracts. *Ciencia Rural*, v. 36, n. 3, p. 725–730, 2006.
145. OUZA, M. D. DE; PERES FILHO, O.; CALDEIRA, S. F.; DORVAL, A.; SOUSA, N. J. Desenvolvimento in vitro do fungo simbiote de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) em meio de cultura com diferentes extratos vegetais. *Ciência Rural*, v. 42, n. 9, p. 1603–1609, 2012.
146. EDWARDS, C. A. *Persistent Pesticides in the Environment*, 2nd ed., CRC Press, Cleveland, OH, 1973, 170.
147. LEE, J. at al. Zebrafish as a Model for Developmental Neurotoxicity Assessment: The Application of the Zebrafish in Defining the Effects of Arsenic, Methylmercury, or Lead on Early Neurodevelopment. *Toxics*. v. 2, n. 3, p. 464–495, 2014.
148. ZHANG, Z. Y, at. all, Acute toxicity to zebrafish of two organophosphates and four pyrethroids and their binary mixtures. *Pest Manag. Sci.* v. 66, n. 1, p. 84–89, 2010.
149. MARTINEZ, C. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. *Uel.Br*, p. 1–19, 2006.
150. FERRARI, A.; VENTURINO, A.; D'ANGELO, A. M. P. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 146, p. 308–313, 2007.
151. Third Reevaluation - Report of the Hazard Identification Assessment Review Committee; HED Doc. No. 014400; U.S. Environmental Protection

Referências Bibliográficas

=====
Agency, Health Effects Division, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, pp 1-24, 2000.

152. CHODOROWSKI, Z.; ANAND, J. S. Accidental dermal and inhalation exposure with fipronil – a case report. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, v. 42, n. 2, p. 189-190, 2004.

153. IKEDA, T.; ZHAO, X.; NAGATA, K.; KONO, Y.; SHONO, T.; YEH, J.; NARAHASHI, T. Fipronil Modulation of gamma-aminobutyric acid A receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 296, n. 3, p. 914-921, 2001.

154. LADER, M. Anxiolytic drugs: dependence, addiction and abuse. *European Neuropsychopharmacology*, v. 4, n. 2, p. 85–91, 1994.

155. PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 24, n. 3, p. 525–529, 1986.

156. PICKLES, A. R.; HENDRIE, C. A. Anxiolytic-induced attenuation of thigmotaxis in the Elevated Minus Maze. *Behavioural Processes*, v. 97, p. 76–79, 2013.

157. PARK, H.; AHN, I. Y.; KIM, H.; LEE, J.; SHIN, S. C. Glutathione S-transferase as a biomarker in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* after exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 150, p. 528–536, 2009.

158. VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a

Referências Bibliográficas

=====
review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149, 2003.

159. TORRES, M. A.; BARROS, M. P.; CAMPOS, S. C. G.; PINTO, E.; RAJAMANI, S.; SAYRE, R. T.; COLEPICOLO, P. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 71, p. 1–15, 2008.

160. BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

161. KOUTINA, G.; JONGBERG, S.; SKIBSTED, L.H. Protein and Lipid Oxidation in Parma Ham during Production *J. Agric. Food Chem.* 60 9737–9745, 2012.

162. SOUSA, E. H.; DE MESQUITA VIEIRA, S. F.; BUTLER, G. J. S.; BASSO, L.A.; SANTIAGO, D.S.; DIÓGENES, I. C. N.; LOPES, L. G. D. F.; SADLER, P. J. $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{isoniazid})]^{3-}$: an Iron Isoniazid Complex with Redox Behavior Implicated in Tuberculosis Therapy *J. Inorg. Biochem.* v. 140, p. 236–244, 2014.

163. SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability *Chem. Soc. Rev.* 39, 4067–79, 2010.

164. AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation : Production , Metabolism , and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. , v. 2014, 2014.

165. REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. Lipid Peroxidation : Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. , p. 3–30, 2012.

Referências Bibliográficas

- =====
166. LEONHARDT, M.; GEBERT, S.; WENK, C. Stability of - Tocopherol , Thiamin , Riboflavin and Retinol in Pork Muscle and Liver during Heating as Affected by Dietary Supplementation. 1996.
167. AUGUSTO, O.; MIYAMOTO, S. Oxygen Radicals and Related Species. , v. 1, 2011.
168. BEKHIT, A. E. A.; HOPKINS, D. L.; FAHRI, F. T.; Ponnampalam, E. N. Oxidative Processes in Muscle Systems and Fresh Meat : Sources , Markers , and Remedies. 2013.
169. TIVERON, A. P.; MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K.B.; VIEIRA, T. M. F. S.; ARCE, M. A. B. R.; ALENCAR, S. M. Antioxidant Activity of Brazilian Vegetables and Its Relation with Phenolic Composition. 2012.
170. KOUTINA, G.; JONGBERG, S.; SKIBSTED, L.H. Protein and Lipid Oxidation in Parma Ham during Production J. Agric. Food Chem. v. 60 9737–9745, 2012.
171. ANANTHARAJU, P. G.; GOWDA, M.G.; VIMALAMBIKE, P. C.; MADHUNAPANTULA, S. V. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. Nutr. J. 2016.
172. SAMUNI, M. A.; BARENHOLZ Y. Stable nitroxide radicals protect lipid acyl chains radiation damage Ayelet. Free Radical Biology & Medicine, , v. 22, n. 7, p. 1165–1174, 1997.
173. JIANG, J. G.; CHEN, J.S.; HUANG, C.M. CHE, Highly efficient oxidation of amines to imines by singlet oxygen and its application in ugi-type reactions, Org. Lett. 11 (2009) 4568–4571.

Referências Bibliográficas

- =====
174. FILATOV, M.A.; SENGE, M.O. Molecular devices based on reversible singlet oxygen binding in optical and photomedical applications, *Mol. Syst. Des. Eng.* (1) 258–272, 2016.
175. XIE, J.; SCHAICH, K. M. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 19, p. 4251–4260, 2014.
176. RIOR, R. O. L. P. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1841–1856 1841 , 2005.
177. GRANADOS-OLIVEROS, G. et al. “Cacalol and cacalol acetate as photoproducers of singlet oxygen and as free radical scavengers , evaluated by EPR spectroscopy and TBARS”. *Royal Society of Chemistry*, 4, 1371-1377, 2014.
178. Arts, M. J. T. J. Haenen, G. R. M. M., Voss, H., & Bast, A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay, *42*, 45–4, 2004.
179. WINTERBOURN, C. C. Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals. *Biochem. J.* 182(2), 625–8, 1979.
180. HAYYAN, M.; HASHIM, M. A.; ALNASHEF, I. M. Superoxide Ion : Generation and Chemical Implications. 2016.
181. HAN, R.-M.; ZHANG, J.-P.; SKIBSTED, L. H. Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 17, n. 2, p. 2140–60, 2012.
182. NAKANISHI, I.; FUKUHARA, K.; SHIMADA, T.; et al. Effects of magnesium ion on kinetic stability and spin distribution of phenoxyl radical

Referências Bibliográficas

=====

derived from a vitamin E analogue: mechanistic insight into antioxidative hydrogen-transfer reaction of vitamin E. Electronic supplementary information available: calcul. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, , n. 9, p. 1520–1524, 2002.

183. NAKANISHI, I.; KAWASHIMA, T.; OHKUBO, K.; et al. Electron-transfer mechanism in radical-scavenging reactions by a vitamin E model in a protic medium. p. 626–629, 2005.

Anexo

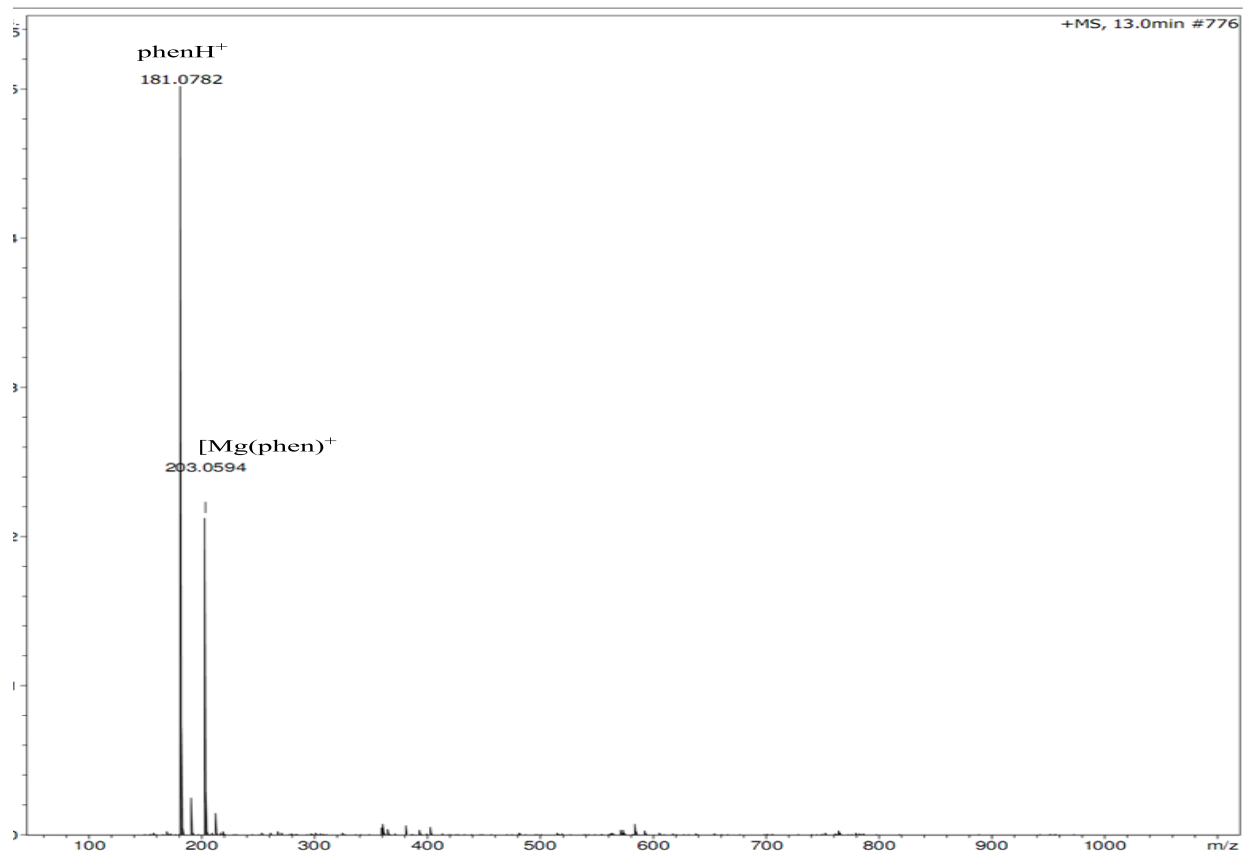


Figura A: Espectro de massas em MeOH ultra puro do aqua-complexo $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{CH}_3\text{COO})_2$.

Referências Bibliográficas

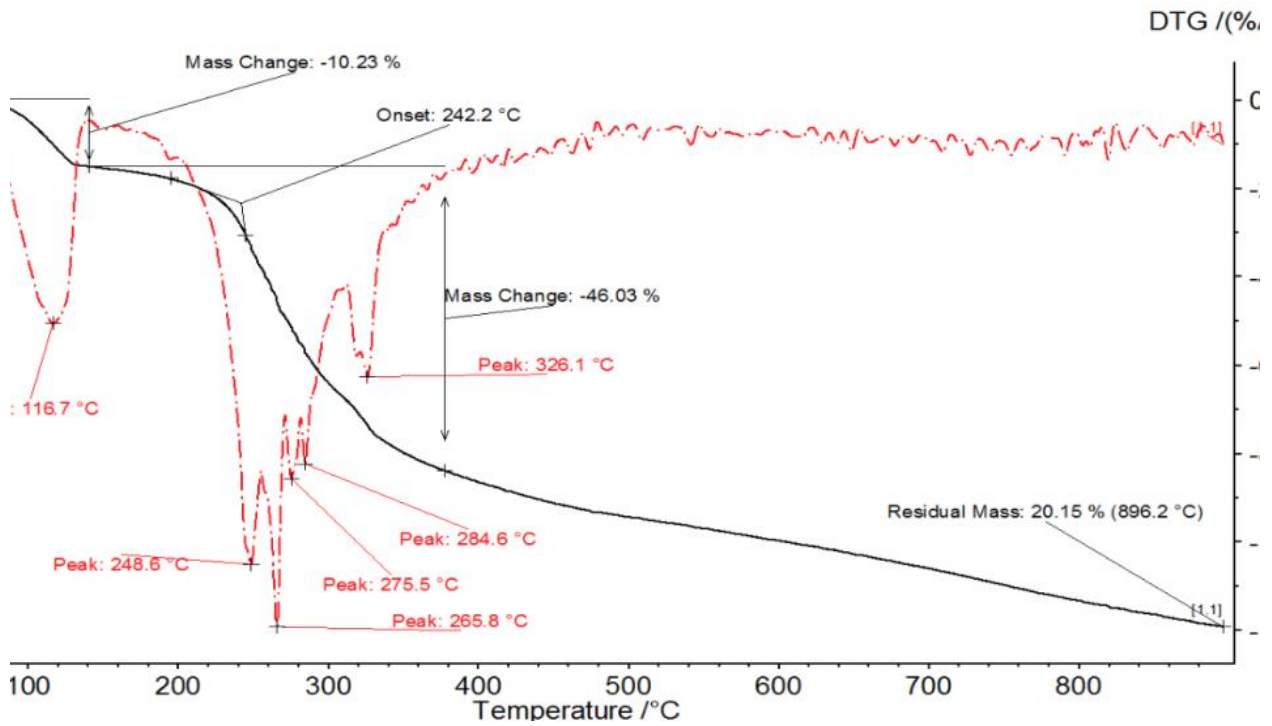


Figura B: Análise termogravimétrica do complexo *cis*-
[Mg(iso)(phen)(H₂O)₃](CH₃COO)

Referências Bibliográficas

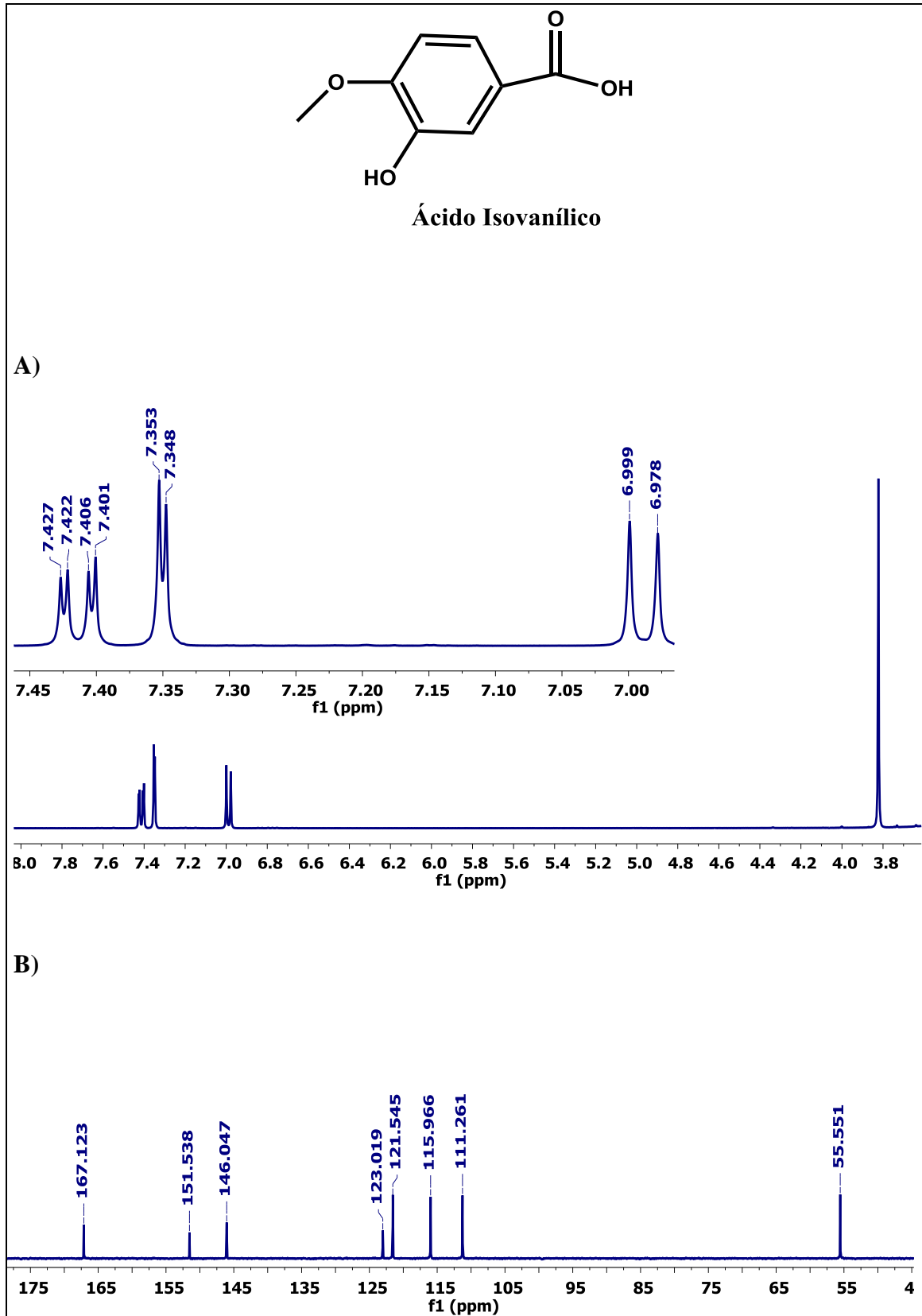
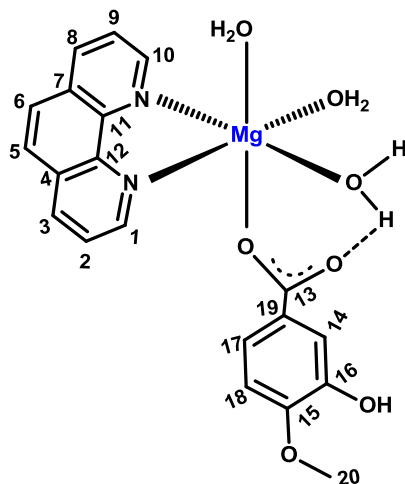


Figura C: Espectro de ^1H e ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) do ligante ácido isovanílico.

Referências Bibliográficas



Complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO)

A)

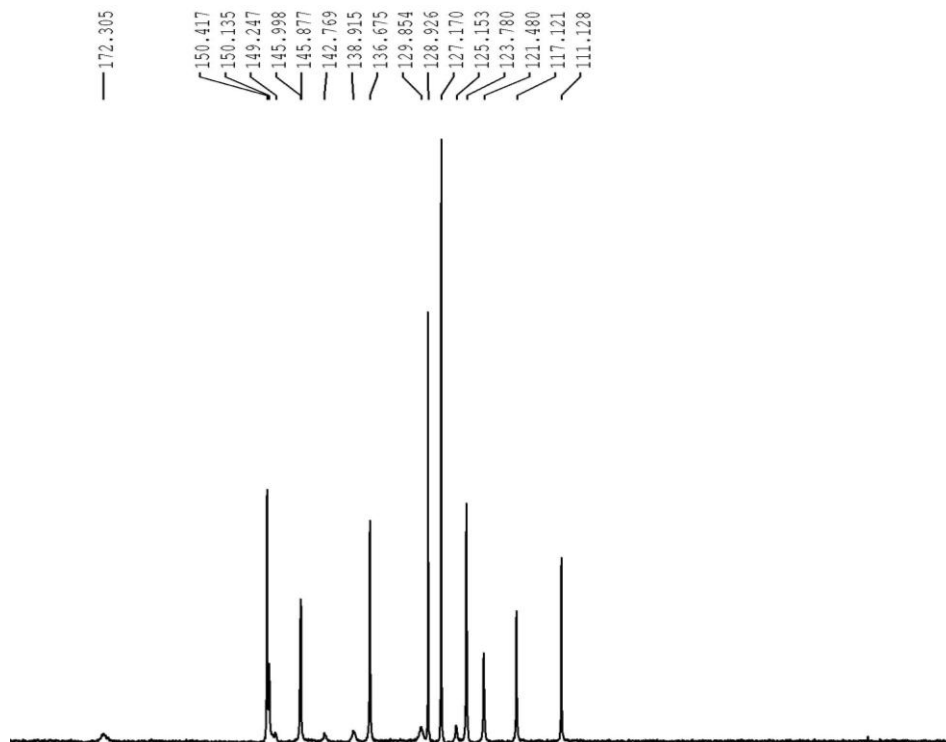


Figura D: Espectro de ¹³C do complexo (600 MHz, MeOD-d₆)

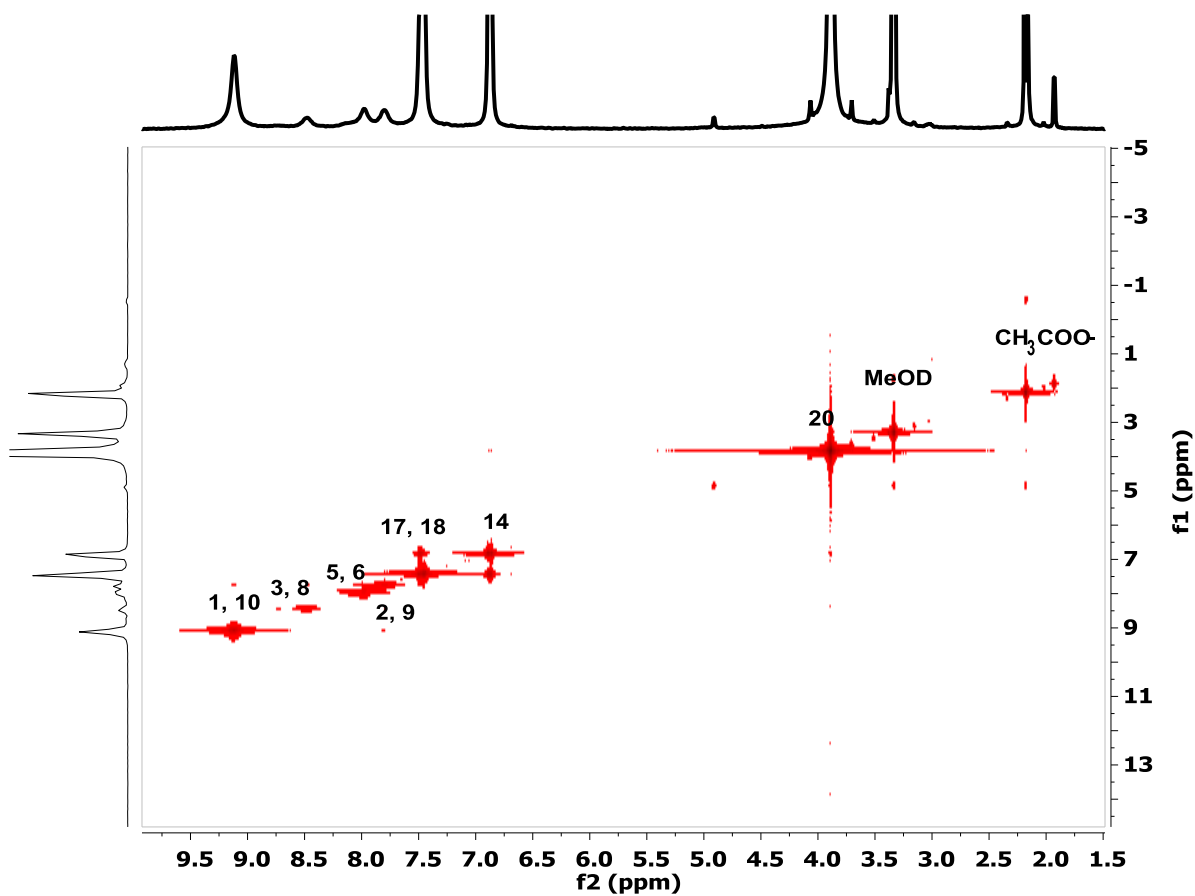


Figura E: RMN de COSY ¹H-¹H do complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO⁻) em MeOD-d₆

Referências Bibliográficas

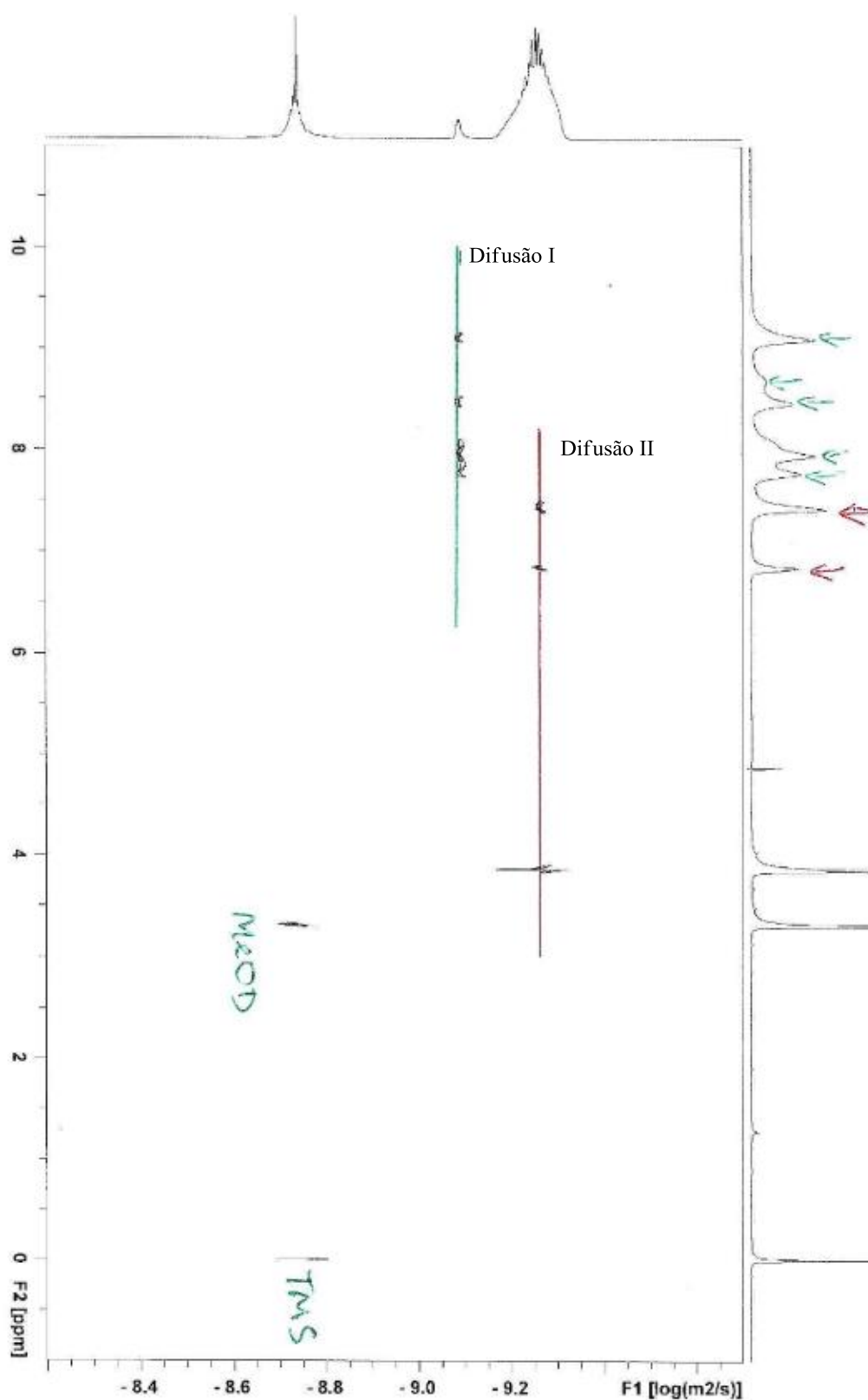


Figura F: Espectro de DOSY em MeOD-d₆ deuterado a 25 ± 1 °C do Complexo *cis*-[Mg(phen)(iso)(H₂O)₃](CH₃COO⁻).

Referências Bibliográficas

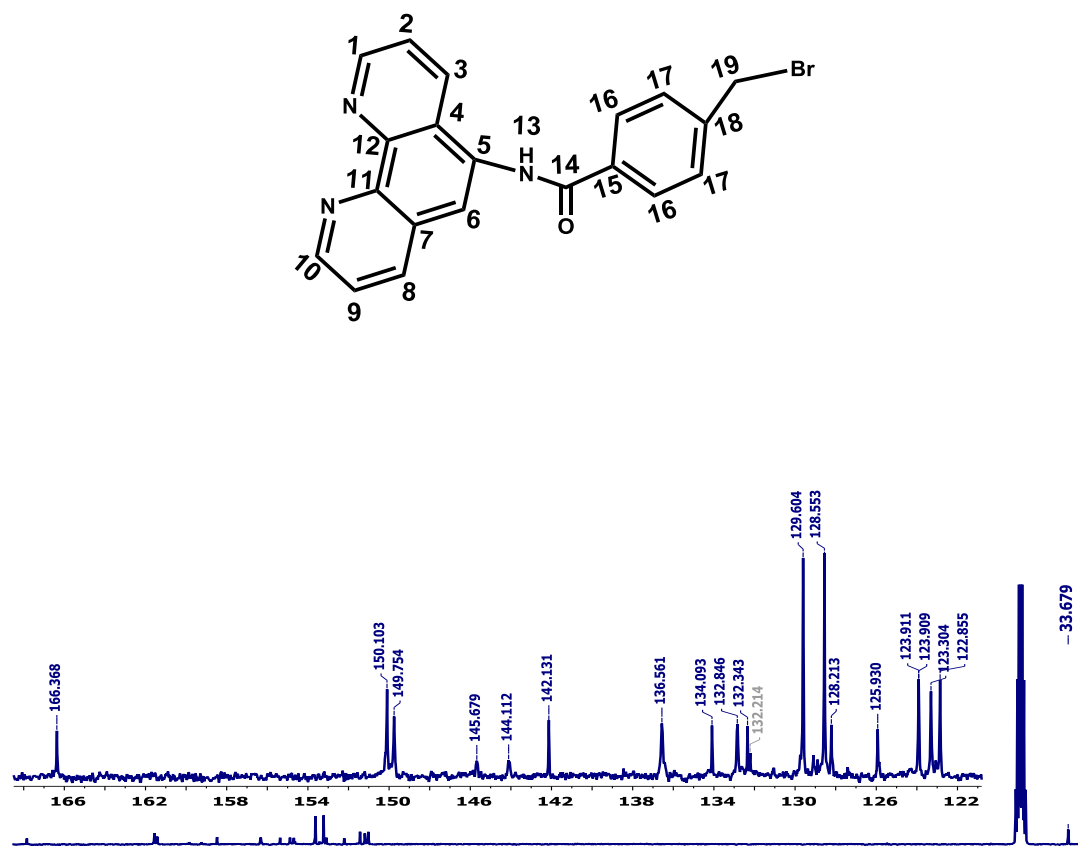
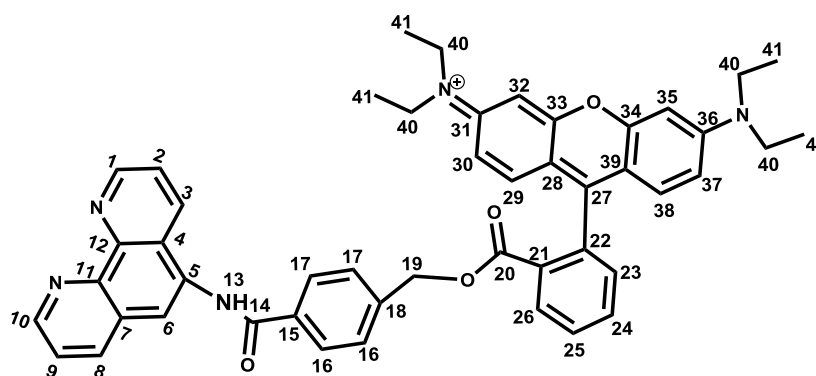
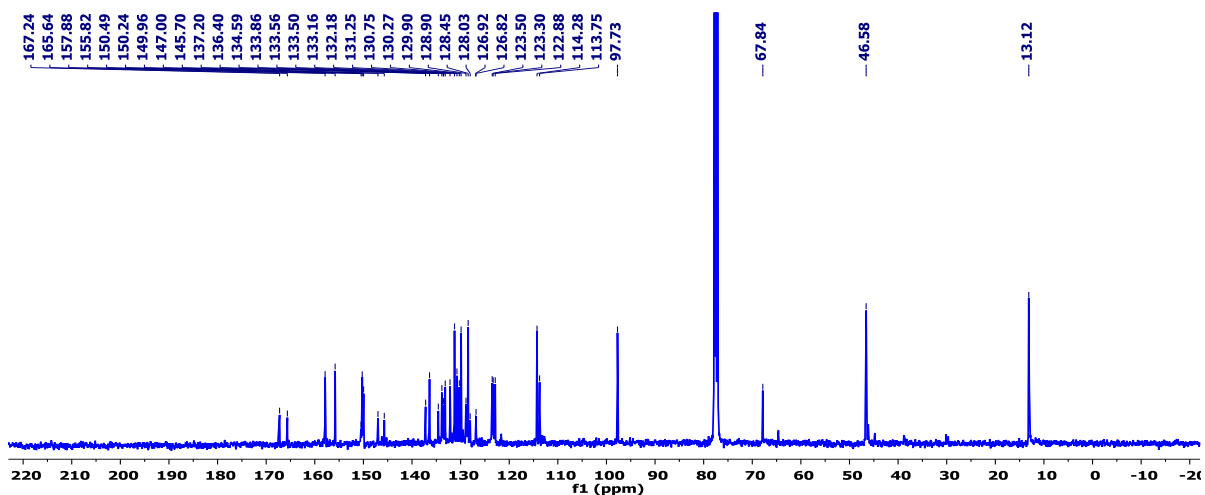


Figura G: Espectro de ^{13}C do ligante 5-amino-1,10-fenantrolina (400 MHz, DMSO- d_6)

Referências Bibliográficas



A) **Ligante RPA**



B)

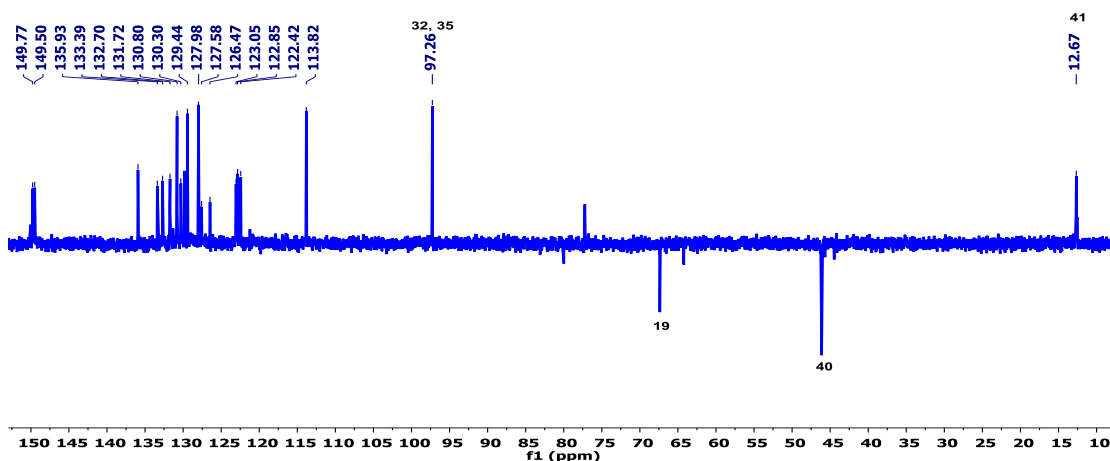
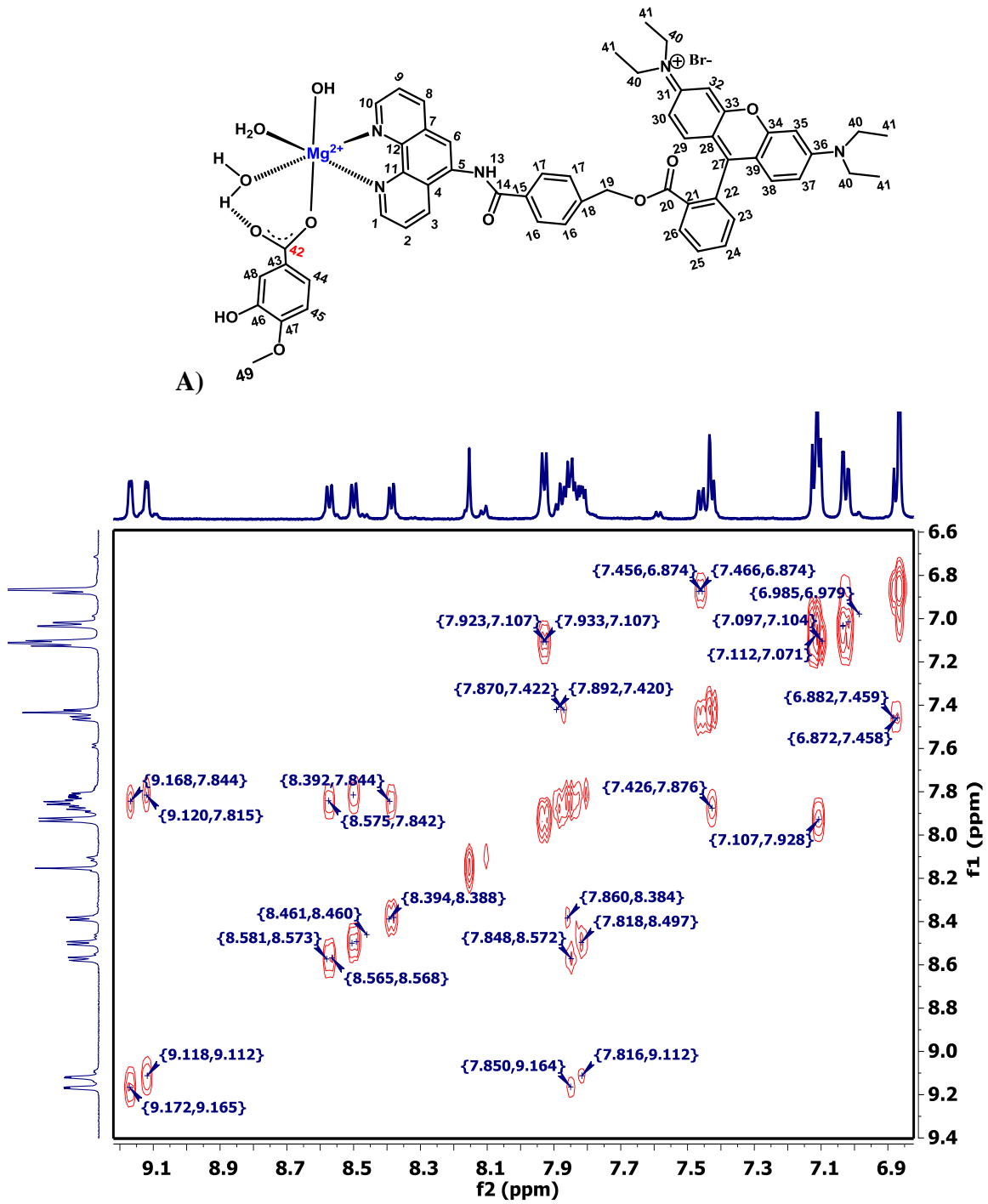


Figura H: Espectro de ^{13}C (A) e dept135(B) - (400 MHz, CDCl_3) do ligante RPA

Referências Bibliográficas



Referências Bibliográficas

B)

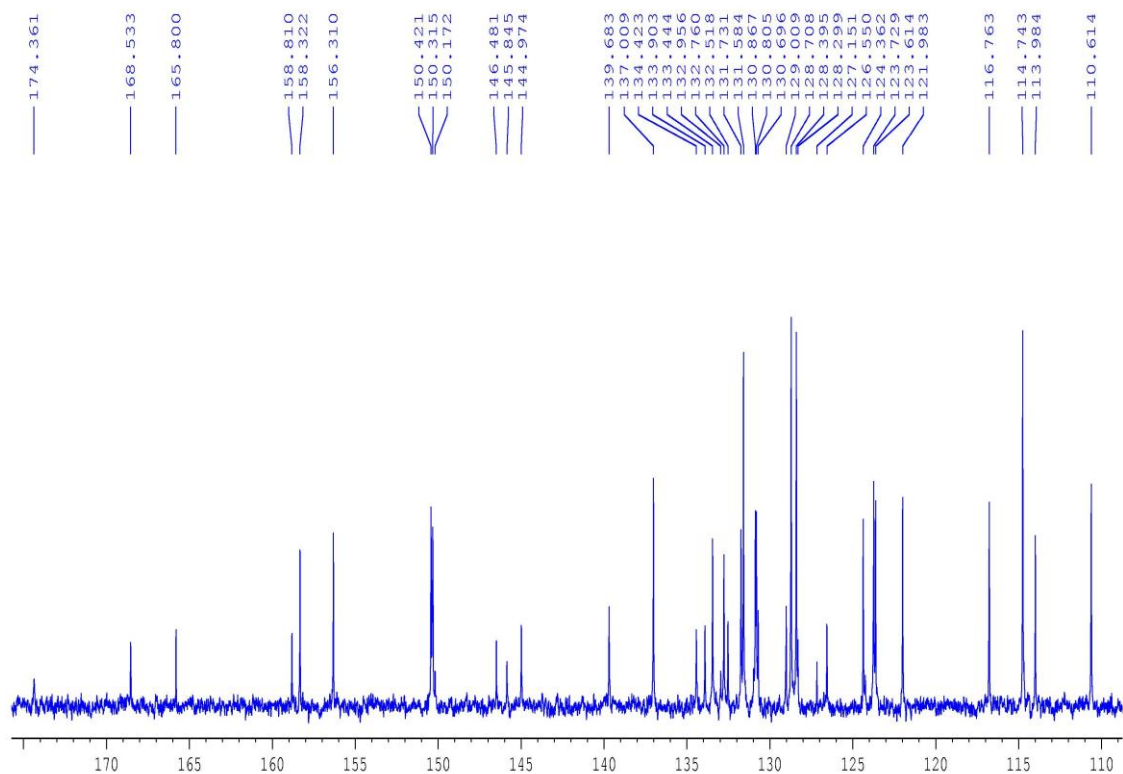


Figura I: Espectro de RMN-COSY (A) e ^{13}C (600 MHz, DMSO-d_6) do Complexo $[\text{Mg}(\text{RPA})(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]$.