

Suéli Bonafim

**ESTUDO DE EQUILÍBRIO DE POSSÍVEIS LIGANTES
INIBIDORES DA ENZIMA INTEGRASE COM OS ÍONS Mg(II)
E Mn(II)**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós Graduação em
Química da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção
do Grau de Mestre em Química.
Área de concentração: Química
Inorgânica
Orientador: Prof.º Dr.º Bruno .

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bonafim, Suéli

ESTUDO DE EQUILÍBRIO DE POSSÍVEIS LIGANTES INIBIDORES
DA ENZIMA INTEGRASE COM OS ÍONS Mg(II) E Mn(II) / Suéli
Bonafim ; orientador, Bruno Szpoganicz - Florianópolis,
SC, 2015.

107 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Integrase. 3. Equilíbrio. 4. Complexos. 5.
HIV. I. Szpoganicz, Bruno . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.

Suéli Bonafim

**ESTUDO DE EQUILÍBRIO DE POSSÍVEIS LIGANTES
INIBIDORES DA ENZIMA INTEGRASE COM OS ÍONS Mg(II) e
Mn(II)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Química na Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 10 de abril de 2015.

Prof. Dr. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.º Dr. Bruno Szpoganicz
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.º Dr. Mauro Scharf
Fundação Universidade Regional de Blumenau

Prof.º Dr. César Vitório Franco
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.º Dr. Valdir Soldi
Instituto Brasileiro de Tecnologia do Couro, Calçado e Artefatos

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Luiz e Terezinha.

AGRADECIMENTOS

- Ao professor e amigo Bruno Szpoganicz, pela orientação de 5 anos. Desde a graduação até o Mestrado o professor Bruno foi um grande apoio e alguém com quem eu pude contar para me ajudar nas mais diversas dificuldades que apareceram no meio acadêmico;
- Aos meus colegas de laboratório, Thiago, Siara, Alexandre, Anderson, Eduardo, Matheus, Bruna e Jeovandro;
- Ao grupo do LACFI por disponibilizar o UV-Vis para que eu conduzisse as titulações espectrofotométricas;
- Ao CNPq pelo suporte financeiro e ao Departamento de Química da UFSC pelo suporte estrutural;
- À minha amada família, minha torre forte, onde sempre encontrei amor, carinho e cuidado quando estes me eram tão necessários. Tenho vocês guardados em meu mais precioso relicário, meu coração, e por isso onde quer que eu vá, lá estarão vocês juntos comigo;
- Ao Guilherme por toda a ajuda nas aplicações de bolsa de Doutorado, traduções, consolo na hora do aperto e apoio neste fim de Mestrado. Mas sobretudo por ter me chamado para um café naquele 1º de abril ocioso e, desde então, ter me chamado para a vida. Obrigada por me inspirar a buscar uma Suéli que estava adormecida e a me dar coragem para construir uma nova. Você e todo o seu amor fazem parte desta construção agora.
- À Camila, pela amizade de anos e por toda assessoria, mesmo à distância, para que o trabalho pudesse ser finalizado. Eu não tenho palavras para dizer o que significou para mim o teu apoio. A tranquilidade que você me passou é de um valor inestimável, então só me resta te agradecer, minha amiga. Muito obrigada!
- Ao Edinho, meu mano querido. Lembro de tudo que passamos juntos e me sinto frustrada por não conseguir digitar em poucos caracteres tudo o que você significa pra mim. A tua presença me enche de luz e alegria; a tua falta me entristece. Para dizer a verdade, acho que isso resume a importância que tens em minha vida. Te quero sempre por perto, mano. Obrigada por ser o responsável de ter colocado um sorriso no meu rosto em grande parte dos meus dias enquanto morei em Floripa;

- Ao Rodrigo, por ter sido uma base forte onde eu sempre soube que poderia encontrar apoio. Você esteve presente na maior parte da minha vida acadêmica ouvindo pacientemente meus lamentos e rindo comigo as minhas alegrias. Em sete anos a sua música esteve presente na minha vida e tenha certeza que ela ecoará dentro de mim pra sempre.

RESUMO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). A epidemia de infecção pelo HIV é considerada uma das maiores pandemias já observada na história. A integrase (IN) é uma enzima essencial no ciclo de vida do HIV e sua inibição é um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos fármacos. Compostos dicetônicos e com grupos catecol vem sendo validados como potenciais inibidores da integrase, portanto, o foco desde projeto foi estudar os equilíbrios envolvidos entre dez ligantes contendo grupos dicetônicos e grupos catecol com os íons Mg(II) e Mn(II) a fim de verificar se o mecanismo de ação destes possíveis fármacos envolve a complexação com sítio ativo da enzima integrase.

Os equilíbrios de formação dos complexos entre os ligantes 5-CITEP, CG-I-83D, CG-I-160, CG-II-38B, CG-II-51, CG-II-133A, CG-II-135A, GS-9137, CG-I-154 e CG-I-139 e os íons Mg(II) e Mn(II) foram determinados em solução através de titulação potenciométrica e espectroscopia UV-Vis.

Para o sistema com o íon Mg(II), ligantes como CG-I-83D, CG-II-51, CG-I-160, CG-I-133A, CG-I-135A, CG-I-139 e CG-I-154 foram os que apresentaram mais afinidade com o metal, formando diferentes espécies do complexo metálico ao longo da faixa de pH, especialmente em pH neutro.

Os estudos com o íon Mn(II) revelaram que ligantes como 5CITEP, CH-I-38B e CH-I-135A tem mais afinidade com este metal em diferentes faixas de pH. O ligante GS-9137 não formou expressivas quantidades de complexos com ambos os íons Mg(II) e Mn(II). As espécies formadas com Mg(II) encontram-se na faixa de pH alcalina, não servindo para o propósito biológico do ligante. Para o sistema com Mn(II) houve a formação de espécies em pH neutro, porém, em pequena quantidade.

Palavras-chave: Integrase. Equilíbrio. Complexos. HIV.

ABSTRACT

The Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) is a disease caused by the Human Immunodeficiency Virus (HIV). The epidemic of HIV infection is considered one of the largest pandemics ever seen in history. Integrase (IN) is an essential enzyme in the life cycle of HIV and its inhibition is an attractive target for the development of new drugs. Dicetonic compounds and molecules containing catechol group has been validated as potential integrase inhibitors, therefore the goal in this project was focused in equilibrium studies involving dicetonics and catechol compounds of ten ligands with Mg(II) ions and Mn(II).

The equilibrium of the complexes formation between the ligands 5CITEP, CG-I-83D, CG-II-51, CG-II-38B, CG-II-51, CG-II-133A, CG-II-135A, GS -9137, CG-I-154 and CG-I-139 ions and Mg(II) and Mn(II) in solution were determined by potentiometric titration and UV-Vis spectroscopy.

For the system with Mg(II) ion, binders such as CG-I-83D, GC-II-51, GC-I-160, CG-I-133A, CG-II-135A, CG-I-139 and CG-I-154 were those that had an affinity for the metal, forming different species of the metal complex throughout the pH range, especially at neutral pH.

Studies with Mn(II) ion revealed that ligands such as 5CITEP, CG-II-38B and CG-II-135A have affinity for this metal in different pH ranges. GS-9137 did not form complexes with significant amounts of both Mg(II) ions and Mn(II). The species formed with Mg(II) are in the alkaline pH range, not intended for the purpose of ligands with biological applications. For the system with Mn(II) species were formed at neutral pH, but in small quantities.

Keywords: Integrase. Equilibrium. Complexes. HIV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vírus HIV (adaptada da referência 7).	26
Figura 2. Ciclo de vida do vírus HIV (Adaptado da referência 8).	27
Figura 3. Estrutura do AZT	28
Figura 4. Novos compostos análogos ao AZT (Adaptado da referência 12).	28
Figura 5. Estrutura representativa da enzima Integrase e seu sítio ativo com o íon Mg(II).	30
Figura 6. Proposta para o processo de integração do material genético viral ao DNA hospedeiro.	31
Figura 7. Estrutura molecular dos inibidores 5CITEP e L-731,988.	32
Figura 8. Mecanismo proposto para a inibição por compostos dicetoácidos.	33
Figura 9. Proposta de quelação aos íons Mg(II) para compostos DKAs.	34
Figura 10. Estrutura molecular do medicamento Raltegravir® com seu grupo DKA em vermelho.	34
Figura 11. Estrutura geral do grupo catecol.	35
Figura 12. Compostos inibidores da integrase derivados do catecol contendo porções bis-arila.	35
Figura 13. Estrutura molecular dos ácidos quínico, cafeico e cafeoilquinico onde R1, R2, R3 e/ou R4 = unidade cafeoila.	36
Figura 14. Estrutura molecular dos ácidos 3,5; 1,5; 4,5 e 3,4 dicafeoil-quínicos.	36
Figura 15. Ligantes estudados neste trabalho: a) CG-I-83D, b) CG-II-51, c) CG-I-160, d) CG-II-38B, e) CG-I-133A, f) CG-I-135A, g) CG-I-139, h) 5CITEP, i) CG-I-154, j) GS-9137.	37
Figura 16. Curva de titulação direta do ligante CG-I-83D na ausência e presença do íon Mg(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-83D; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-83D e 0,05 mmol de Mg(II).	43
Figura 17. Diagrama de distribuição das espécies formadas em uma solução, em função do pH, para o sistema CG-I-83D -Mg(II).	44
Figura 18. Curva de titulação direta do ligante CG-I-83D na ausência e presença do íon Mn(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-83D; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-83D e 0,05 mmol de Mn(II).	45
Figura 19. Diagrama de distribuição das espécies formadas em uma solução, em função do pH, para o sistema CG-I-83D -Mn(II).	46
Figura 20. Espectros eletrônicos obtidos a partir da variação de pH 12 – 14 de uma solução 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ do ligante CG-I-83D.	47

Figura 21. Curva de titulação direta do ligante CG-II-51 na ausência e presença do íon Mg(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-II-51; em vermelho: 0,05 mmol de CG-II-51 e 0,05 mmol de Mg(II).	51
Figura 22. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-II-51-Mg(II).	52
Figura 23. Curva de titulação direta do ligante CG-II-51 na ausência e presença do íon Mn(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-II-51; em vermelho: 0,05 mmol de CG-II-51 e 0,05 mmol de Mn(II).	53
Figura 24. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-II-51-Mn(II).	54
Figura 25. Espectros eletrônicos obtidos a partir da variação de pH 12 – 14 de uma solução 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ do ligante CG-II-51.	55
Figura 26. Curva de titulação direta do ligante 5CITEP na ausência e presença do íon Mg(II). Em preto: 0,05 mmol de 5CITEP; em vermelho: 0,05 mmol de 5CITEP e 0,05 mmol de Mg(II).	58
Figura 27. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema 5CITEP -Mg(II).	59
Figura 28. Curva de titulação direta do ligante 5CITEP na ausência e presença do íon Mn(II). Em preto: 0,05 mmol de 5CITEP; em vermelho: 0,05 mmol de 5CITEP e 0,05 mmol de Mn(II).	60
Figura 29. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema 5CITEP -Mn(II).	61
Figura 30. Curva de titulação reversa do ligante CG-II-38B na ausência e presença do íon Mg(II). Em vermelho: 0,05 mmol de CG-II-38B; em preto: 0,05 mmol de CG-II-38B e 0,05 mmol de Mg(II).	63
Figura 31. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-II-38B-Mg(II).	64
Figura 32. Curva de titulação direta do ligante CG-II-38B na ausência e presença do íon Mn(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-II-38B; em vermelho: 0,05 mmol de CG-II-38B e 0,05 mmol de Mn(II).	65
Figura 33. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-II-38B-Mn(II).	66
Figura 34. Espectros eletrônicos obtidos a partir da variação de pH 12 – 14 de uma solução 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ do ligante CG-I-38B.	67
Figura 35. Curva de titulação direta do ligante CG-I-160 na ausência e presença do íon Mg(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-160; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-160 e 0,05 mmol de Mg(II).	70
Figura 36. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-I-160-Mg(II).	71
Figura 37. Espectros eletrônicos obtidos a partir da variação de pH 12 – 14 de uma solução 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ do ligante CG-I-160.	72

Figura 38. Curva de titulação direta do ligante GS-9137 na ausência e presença do íon Mg(II). Em preto: 0,05 mmol de GS-9137; em vermelho: 0,05 mmol de GS-9137 e 0,05 mmol de Mg(II).....	75
Figura 39. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema GS-9137-Mg(II).....	76
Figura 40. Curva de titulação direta do ligante GS-9137 na ausência e presença do íon Mn(II). Em preto: 0,05 mmol de GS-9137; em vermelho: 0,05 mmol de GS-9137 e 0,05 mmol de Mn(II).....	77
Figura 41. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema GS-9137-Mn(II).....	78
Figura 42. Curva de titulação direta do ligante CG-I-133A na ausência e presença do íon Mg(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-133A; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-133A e 0,05 mmol de Mg(II).....	80
Figura 43. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-I-133A-Mg(II).....	81
Figura 44. Curva de titulação direta do ligante CG-I-135A na ausência e presença do íon Mg(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-135A; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-135A e 0,05 mmol de Mg(II).....	84
Figura 45. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-I-135A-Mg(II).....	85
Figura 46. Curva de titulação direta do ligante CG-I-135A na ausência e presença do íon Mn(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-135A; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-135A e 0,05 mmol de Mn(II).....	86
Figura 47. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-I-135A-Mn(II).....	87
Figura 48. Curva de titulação direta do ligante CG-I-139 na ausência e presença do íon Mg(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-139; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-139 e 0,05 mmol de Mg(II).....	90
Figura 49. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-I-139-Mg(II).....	91
Figura 50. Curva de titulação direta do ligante CG-I-154 na ausência e presença do íon Mg(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-154; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-154 e 0,05 mmol de Mg(II).....	94
Figura 51. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-I-154-Mg(II).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Logaritmos das constantes de equilíbrio das espécies formadas para os sistemas CG-I-83D-Mg(II) e CG-I-83D-Mn(II).	48
Tabela 2. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para o sistema CG-II-51-Mg(II) e CG-II-51-Mn(II).	55
Tabela 3. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para o sistema 5CITEP, 5CITEP-Mg(II) e 5CITEP-Mn(II). .	61
Tabela 4. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas CG-II-38B, CG-II-38B-Mg(II) e CG-II-38B-Mn(II).	67
Tabela 5. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas CG-I-160 e CG-I-160-Mg(II).	72
Tabela 6. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas GS-9137, GS-9137-Mg(II) e GS-9137-Mn(II).	78
Tabela 7. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas CG-I-133A e CG-I-133A-Mg(II).	82
Tabela 8. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas CG-I-135A, CG-I-135A-Mg(II) e CG-I-135A-Mn(II).	87
Tabela 9. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas CG-I-139 e CG-I-139-Mg(II).	91
Tabela 10. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas CG-I-154 e CG-I-154-Mg(II).	95

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-I-83D.....	50
Esquema 2. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-II-51.....	57
Esquema 3. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante 5CITEP.....	62
Esquema 4. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-II-38B.....	69
Esquema 5. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-I-160.....	74
Esquema 6. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante GS-9137.....	79
Esquema 7. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-I-133A.....	83
Esquema 8. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-I-135A.....	89
Esquema 9. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-I-139.....	93
Esquema 10. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-I-154.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas.
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.
AZT	3-azido-2,3-didesoxitimidina.
CG-I-83D	(3E,3'E)-1,2-di(1H-tetrazol-5-yl)ethane-1,2-diyl bis(4-(3,4-dihydroxyphenyl)but-3-enoate).
CG-II-51	2,3-bis(((E)-4-(3,4-dihydroxyphenyl)but-3-enoyl)oxy)succinic acid.
CG-II-38B	2,3-bis((1,2-dihydroxy-1,2-dihydropyridine-4-carbonyl)oxy)succinic acid.
CG-I-160	2,3-bis(((E)-4-(4-carboxy-3-hydroxyphenyl)but-3-enoyl)oxy)succinic acid.
GS-9137	6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-1- (1-hydroxy-3-methylbutan-2-yl) -7-methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid.
CG-II33A	2-((5-(hydroxycarbamoyl)nicotinoyl)oxy)-3-(6-(hydroxycarbamoyl)nicotinoyl)oxy)succinic acid.
CG-I-135A	2-((3,4-dihydroxybenzoyl)oxy)-3-((5-(hydroxycarbamoyl)nicotinoyl)oxy)succinic acid.
CG-I-139	2-((5-(hydroxycarbamoyl)nicotinoyl)oxy)-3-((3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxy)succinic acid.
CG-I-154	2,3-bis((4-carboxy-3-hydroxybenzoyl)oxy)succinic acid.
5CITEP	(Z)-1-(5-chloro-1H-indol-3-yl)-3-hydroxy-3-(1H-tetrazol-5-yl)prop-2-en-1-one.
DKA	Dicetoácidos.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
DP	Desvio Padrão.
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis.
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético.
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
HAART	<i>Highly Active Anti-retroviral Therapy.</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana.
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
IN	Integrase.
RNA	Ácido Ribonucleico.
RT	Transcriptase Reversa.
β	Constante de protonação.
SUS	Sistema Único de Saúde.

UV-Vis

Espectroscopia Ultravioleta-Visível.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.0.1. Dados Epidemiológicos.....	25
1.0.2. O vírus HIV e terapia farmacológica.....	25
1.0.3. A integrase.....	29
1.0.4. Inibidores da integrase.....	32
1.0.4.1. Dicetoácidos.....	32
1.0.4.2. Catecóis.....	34
1.1 OBJETIVOS.....	37
1.1.1 Objetivo Geral.....	37
1.1.2 Objetivo Específico.....	37
2 REAGENTES, METODOLOGIA E INSTRUMENTAÇÃO. 39	39
2.1. Titulações potenciométricas.....	39
2.2. Programa BEST7.....	40
2.3. Titulações Espectrofotométricas.....	40
3. RESULTADOS.....	43
3.1. Ligante CG-I-83D.....	43
3.2. Ligante CG-II-51.....	51
3.3. Ligante 5CITEP.....	58
3.4. Ligante CG-II-38B.....	62
3.5. Ligante CG-I-160.....	70
3.6. Ligante GS-9137.....	75
3.7. Ligante CG-I-133A.....	80
3.8. Ligante CG-I-135A.....	83
3.9. Ligante CG-I-139.....	89
3.10. Ligante CG-I-154.....	93
4. CONCLUSÃO.....	99
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

1. INTRODUÇÃO

1.0.1. Dados Epidemiológicos

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).^{1,2} A epidemia de infecção pelo HIV é considerada uma das maiores pandemias já observada na história. Além disso, esta doença revela-se ser um problema sócio-econômico especialmente para os países em desenvolvimento.³

A transmissão deste vírus pode ocorrer de diversas maneiras, tais como através do contato sexual sem preservativo, transfusão de sangue contaminado, da mãe para o bebê durante a gravidez, no parto ou na amamentação, reutilização de seringas e agulhas, bem como por instrumentos perfurantes não esterilizados.

No mundo inteiro, estima-se que 34 milhões de pessoas estão vivendo com HIV/AIDS segundo a Organização Mundial da Saúde.⁴ No Brasil, estimativas realizadas pelo Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais contabilizam atualmente cerca de 718 mil pessoas infectadas pelo vírus HIV.⁵ É importante destacar que o tratamento a pacientes portadores do vírus HIV no Brasil é uma referência mundial. O Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza atendimento, acompanhamento e medicamentos gratuitos.⁶

Ainda que inúmeros cuidados e campanhas de conscientização para a prevenção da AIDS sejam feitos anualmente em todo o mundo, esta doença continua provocando novas vítimas. Em 2013 mais de 2 milhões de pessoas contraíram o vírus, sendo que, destas, cerca de 240 mil são crianças menores de 15 anos. As mortes em decorrência da AIDS contabilizaram aproximadamente 1,7 milhões de pessoas naquele mesmo ano.⁴

1.0.2. O vírus HIV e terapia farmacológica

O vírus HIV possui duas formas geneticamente distintas, o HIV-1 e o HIV-2. Em relação ao HIV-1, a infecção pelo tipo 2 difere por ter uma evolução mais lenta no organismo hospedeiro, o que diminui a possibilidade de transmissão do vírus.

Como a maioria dos retrovírus, o HIV é esférico. Seu interior contém o material genético que consiste em duas cópias de RNA e as enzimas transcriptase reversa (RT), protease e integrase (IN). (Figura 1).

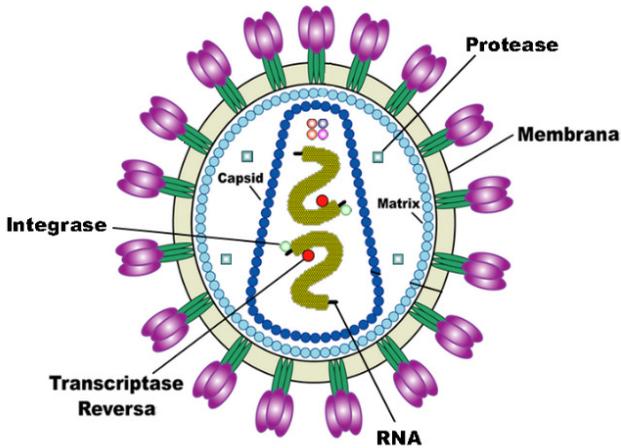


Figura 1. Vírus HIV (adaptada da referência 7).

As enzimas transcriptase reversa, protease e integrase desempenham papéis fundamentais na replicação do vírus dentro da célula infectada. A transcriptase reversa promove a síntese de uma cópia do material genético do vírus. Em seguida, a integrase é responsável por inserir este material no hospedeiro para que, por fim, a protease desenvolva seu importante papel no ciclo de replicação do HIV, mediando a produção de partículas de vírus maduras, com capacidade infecciosa. O ciclo de infecção do HIV é mostrado resumidamente na Figura 2.

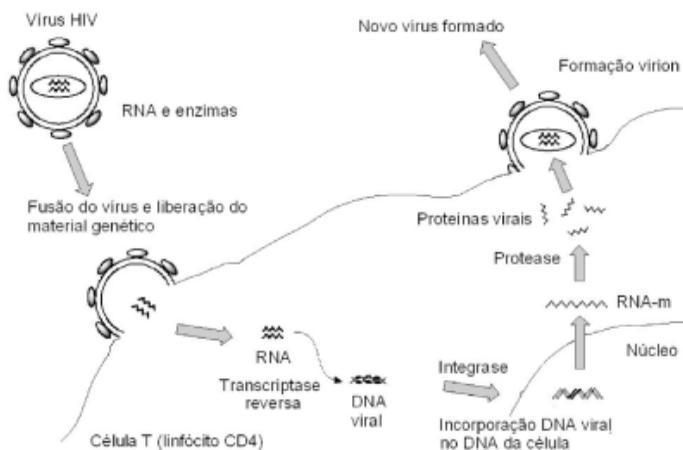


Figura 2. Ciclo de vida do vírus HIV (Adaptado da referência 8).

Infelizmente a medicina ainda não encontrou a cura para a AIDS. Atualmente são utilizados medicamentos que fazem o controle do vírus na pessoa com a doença, embora apresentem alta incidência de desenvolvimento de resistência e de efeitos colaterais, aumentando a necessidade de busca e/ou desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

A atual estratégia utilizada no tratamento da infecção pelo HIV é chamada HAART (*Highly Active Anti-retroviral Therapy*) e é baseada em coquetéis de drogas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA).⁹

A primeira droga aprovada pela FDA foi a zidovudina, (3-azido-2,3-didesoxitimidina), também conhecida por AZT. Em 1964 o AZT, Figura 3, foi sintetizado por Horwitz, onde seu alvo era atividade anticancerígena.¹⁰ No início da década de 70 a atividade antiviral do AZT foi descrita pela primeira vez, sendo em 1985 o primeiro composto a apresentar atividade anti-HIV.¹¹

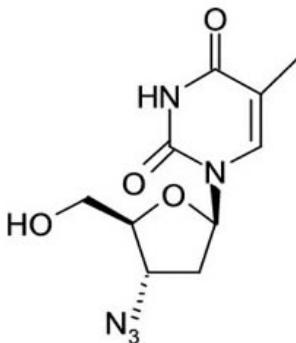


Figura 3. Estrutura do AZT

Após os promissores resultados do AZT como agente anti-HIV (atuando como inibidor da transcriptase reversa), outros compostos semelhantes a ele foram sintetizados com o objetivo de serem mais eficazes, trazendo menos efeitos colaterais. A Figura 4 exemplifica alguns destes compostos, enumerados de **1** a **4**.¹²

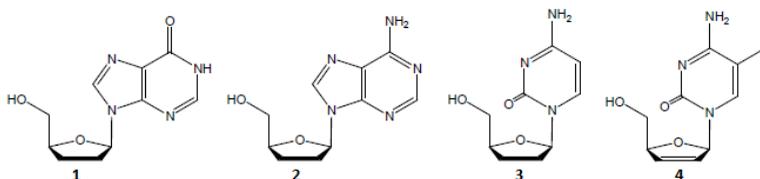


Figura 4. Novos compostos análogos ao AZT (Adaptado da referência 12).

Diversos fármacos vem sendo desenvolvidos desde então, não apenas como inibidores da transcriptase reversa, mas também como inibidores da enzima protease e inibidores da fusão, etapa crucial para a inserção da partícula viral à célula hospedeira. Porém, um dos fatores que dificulta a terapia anti-HIV é a alta incidência de efeitos colaterais causados pelos atuais fármacos. Cerca de 20,5% das causas de falha na aderência à terapia anti-retroviral são referentes aos efeitos colaterais, caracterizando-se principalmente por vômitos, diarreias, náuseas e dores abdominais, além de dores de cabeça e alteração da coloração da pele.¹³

A fim de atenuar possíveis efeitos colaterais, aumentar o potencial de inibição e diminuir o desenvolvimento de resistência do vírus, estudos de novas drogas anti-HIV estão sendo concentrados em outras etapas do ciclo de replicação viral.

A Integrase (IN) é uma enzima essencial no ciclo de vida do HIV e é um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos fármacos. Detalhes de sua estrutura, função e utilização como alvo terapêutico serão discutidos no próximo item.

1.0.3. A integrase

A IN é essencial para a replicação do vírus HIV, sendo responsável por catalisar a inserção do material genético viral no cromossomo do hospedeiro, catalisando duas etapas no ciclo de replicação viral. Primeiramente, ela catalisa a clivagem do 3'-terminal do cDNA viral. Em seguida, a integrase permanece ligada num complexo com o cDNA, chamado de complexo de pré-integração, inserindo o cDNA viral no cromossomo hospedeiro. Este processo é chamado de Etapa de Transferência de Fita.¹⁴

Até o presente momento não foi obtida uma estrutura de toda a IN por cristalografia de Raio-x, uma vez que estudos de sua estrutura completa são dificultados pela propensão da enzima em formar agregados sob condições reacionais.¹⁵ Apenas alguns de seus domínios foram determinados por Raio-x e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).¹⁵⁻¹⁷ Assim, foi possível chegar a uma estrutura do sítio ativo da enzima e alguns de seus resíduos, como é possível ver na Figura 5.¹⁸

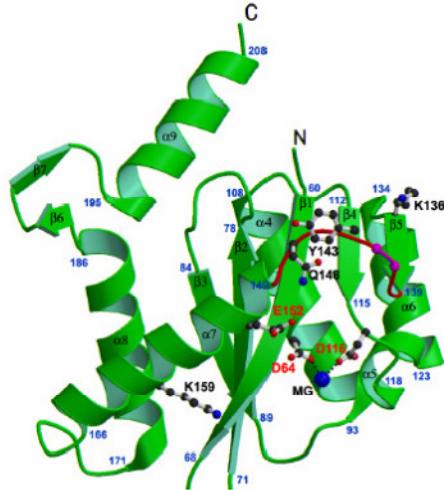


Figura 5. Estrutura representativa da enzima Integrase e seu sítio ativo com o íon Mg(II).

Em sua estrutura, a IN possui dois íons Mg(II) que são essenciais para catalisar a inserção do material genético viral na célula do hospedeiro, sendo este um passo crítico para a infecção do vírus pelo organismo.^{15,16} A participação do centro metálico no processo de inserção do material genético viral ao DNA hospedeiro é proposto na Figura 6.¹⁷

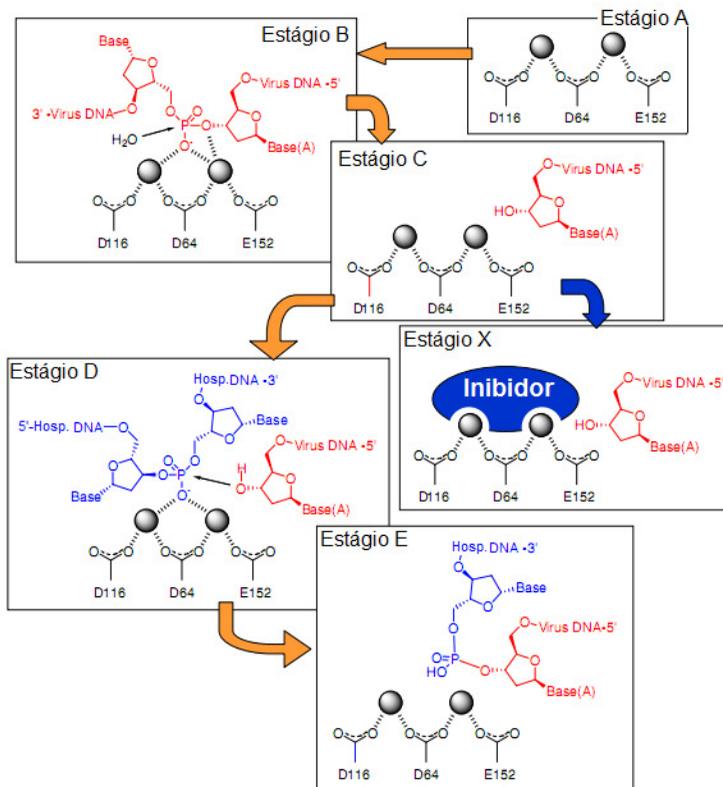


Figura 6. Proposta para o processo de integração do material genético viral ao DNA hospedeiro.

O estágio A representa a enzima integrase com seus dois íons metálicos. Do estágio A para o estágio B ocorre coordenação dos metais da enzima com o centro fosfodiéster do material genético viral. No estágio B para C ocorre a hidrólise do grupamento fosforil com o dinucleotídeo. Em seguida, (estágio C para D) o centro fosforil do DNA hospedeiro é ativado pelos dois íons metálicos da enzima para, posteriormente, (estágio D para E), ocorrer um ataque nucleofílico do dinucleotídeo. Assim, o material genético viral é incorporado ao DNA hospedeiro. No estágio X um inibidor coordena-se com os dois íons metálicos do estágio C bloqueando a ligação da enzima com o DNA hospedeiro.

A IN é um importante alvo para a pesquisa e desenvolvimento de novos antiretrovirais, pois não apresenta similaridade com estruturas celulares de mamíferos, o que auxiliaria no desenvolvimento de drogas mais seletivas e com menor índice de efeitos colaterais.¹⁹

Diversos compostos foram estudados como possíveis inibidores da HIV-IN.²⁰⁻²⁴ Grande parte foi eficaz na inibição da HIV-IN em testes bioquímicos, porém ineficientes na prevenção da replicação viral em cultura de células, possivelmente devido à pouca penetração celular ou à elevada citotoxicidade.²⁵⁻²⁹

1.0.4. Inibidores da integrase

1.0.4.1. Dicetoácidos

Os primeiros inibidores da IN foram sintetizados a partir dos derivados dos 1,3-dicetoácidos (DKAs). As primeiras moléculas DKA relatadas foram 5CITEP e L-731,988, Figura 7, sintetizadas pelas empresas Shionogi & Co e Grupo Merk & Co, respectivamente. Esta classe de compostos é responsável pela inibição da etapa de transferência de fita.



Figura 7. Estrutura molecular dos inibidores 5CITEP e L-731,988.

A Figura 8¹⁵ apresenta o mecanismo proposto para a ação dos DKAs.

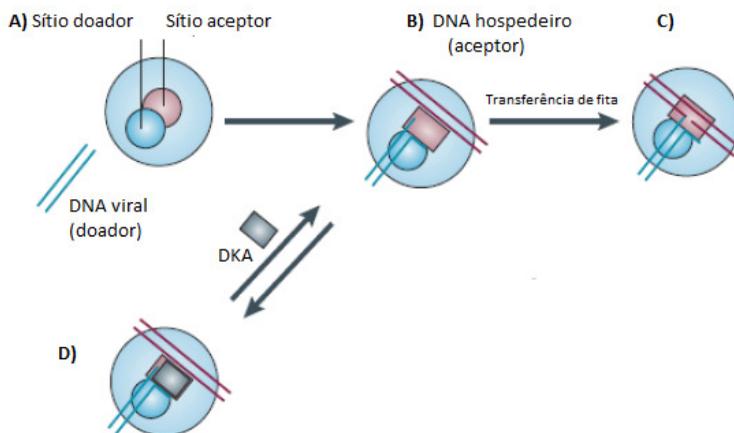


Figura 8. Mecanismo proposto para a inibição por compostos dicetoácidos.

Em A) é apresentada a IN com seus dois sítios ativos, um sítio doador para o DNA viral (em azul) e um sítio receptor para o DNA hospedeiro (em vermelho). Em B) o complexo DNA-IN sofre uma mudança estrutural para que o DNA hospedeiro se ligue ao complexo. Em C) a ligação do DNA hospedeiro no sítio receptor conduz à transferência de fita. Na parte D) um inibidor DKA se liga ao complexo DNA-IN inibindo a etapa de transferência de fita.

A atividade inibidora destes compostos depende de quão fortemente estarão ligados aos íons $Mg(II)$ presentes no sítio ativo da enzima IN. Acredita-se que os DKA agem através do grupo carbonil e do oxigênio da hidroxila, quelando os dois íons $Mg(II)$, Figura 9.³⁰ Muitos estudos sobre a relação da estrutura do ligante com a sua atividade foram conduzidos, focando a substituição dos grupos aril por grupos aromáticos ou heteroaromáticos.³¹⁻³⁵ Entre estes heterocíclicos, a pirimidina foi usada para mimetizar as bases nucleotídicas, o que levou a um aumento significativo da atividade anti-integrase.^{32, 34}

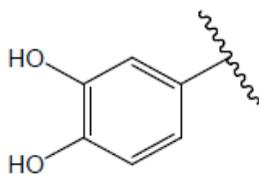


Figura 11. Estrutura geral do grupo catecol.

Outros inibidores da IN com promissores resultados na inibição do vírus HIV *in-vitro* são derivados do catecol. Esses compostos apresentam duas unidades arila, na qual pelo menos uma contém o substituinte 1,2-di-hidroxi, separados por outro grupo funcional (Figura 12).⁴⁵⁻⁵⁰ A quelação com metais divalentes Mg(II) e Mn(II) no sítio catalítico da integrase é o provável modo de ligação desses derivados.⁵¹ O íon Mg(II) está presente naturalmente na estrutura da enzima, ao passo que o íon Mn(II) é utilizado para estudos *in vitro*.⁵²

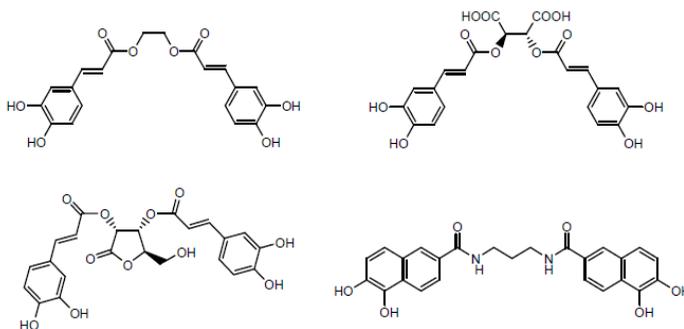


Figura 12. Compostos inibidores da integrase derivados do catecol contendo porções bis-arila.

Os ácidos cafeoil-quinicos (Figura 13) também são compostos que apresentam em suas estruturas o grupo catecol. Estes são metabólitos secundários de uma variedade de plantas, sendo encontrados principalmente em café, batatas, frutas e vegetais.⁵²⁻⁶⁴ Michael Sefkow e colaboradores descreveram a síntese de alguns desses derivados a partir da esterificação do ácido quinico com o ácido cafeico.⁶⁵

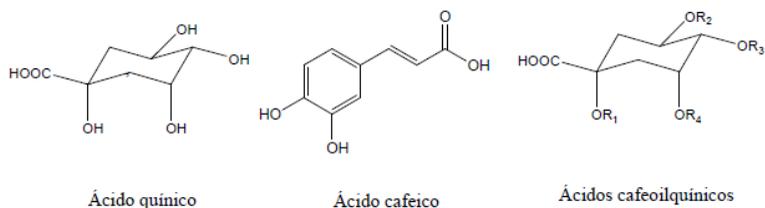


Figura 13. Estrutura molecular dos ácidos quínico, cafeico e cafeoilquínico onde R1, R2, R3 e/ou R4 = unidade cafeoila.

Dentre propriedades biológicas como antibacteriana, antimutagênica, antitumoral e antioxidante, uma das principais propriedades dos ácidos cafeoilquínicos é a inibição *in vitro* da enzima HIV integrase.²⁴ Robinson e colaboradores atestaram que os derivados com dois grupos cafeoila na estrutura apresentaram melhores atividades, destacando-se os derivados ácidos 3,5-dicafeoil-quínico **(a)**, 1,5-dicafeoil-quínico **(b)**, 4,5-dicafeoil-quínico **(c)** e 3,4-dicafeoil-quínico **(d)**, como sendo os mais efetivos para a inibição da IN (Figura 14).²²

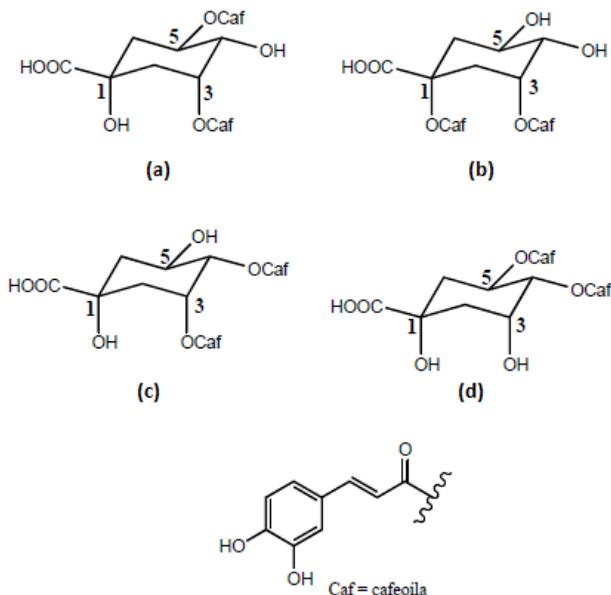


Figura 14. Estrutura molecular dos ácidos 3,5; 1,5; 4,5 e 3,4 dicafeoil-quínicos.

Os dez ligantes utilizados neste trabalho, como mostrados a seguir, também possuem grupos dicetônicos ou catecois. Estudos de equilíbrio foram realizados com estes ligantes e os íons metálicos Mg(II) e Mn(II).

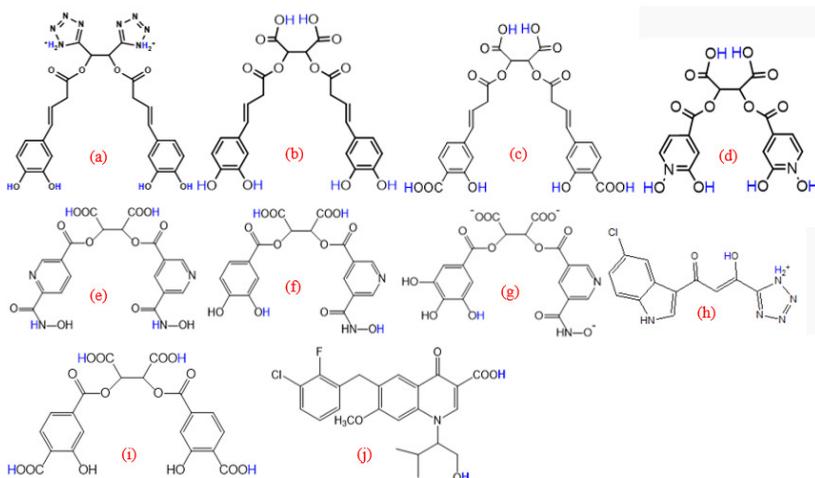


Figura 15. Ligantes estudados neste trabalho: a) CG-I-83D, b) CG-II-51, c) CG-I-160, d) CG-II-38B, e) CG-I-133A, f) CG-I-135A, g) CG-I-139, h) 5CITEP, i) CG-I-154, j) GS-9137.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Medir os equilíbrios de complexação dos ligantes 5-CITEP, CG-I-83D, CG-I-160, CG-II-38B, CG-II-51, CG-II-133A, CG-II-135A, GS-9137, CG-I-154 e CG-I-139 com os íons Mg(II) e Mn(II) e determinar as quantidades das espécies formadas em solução, através de titulação potenciométrica e espectroscopia UV-Vis.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Calcular os pKas dos ligantes 5-CITEP, CG-I-83D, CG-I-160, CG-II-38B, CG-II-51, CG-II-133A, CG-II-135A, GS-9137, CG-I-154 e CG-I-139 através da titulação potenciométrica;

- Realizar titulações espectrofotométricas para a determinação dos pKas muito elevados;
- Determinar as constantes de formação dos complexos formados dos ligantes com os íons Mg(II) e Mn(II);
- Calcular as curvas de distribuição dos complexos formados em função do pH;
- Identificar as espécies formadas em pH biológico.

2. REAGENTES, METODOLOGIA E INSTRUMENTAÇÃO

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes empregados neste trabalho foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação: nitrato de magnésio(II) (Grupo Química); nitrato de manganês(II) (Grupo Química); EDTA (Vetec); indicador preto de eriocromo T (Merk); hidróxido de potássio livre de CO₂ em ampolas (Backer Dilut-It); gás argônio (White Martins); ftalato ácido de potássio (Reagen S.A.); cloreto de potássio (Carlo Herba); etanol absoluto (Carlo Herba); solução de HCl (Carlo Herba);

Os ligantes utilizados neste trabalho foram sintetizados e caracterizados pelo grupo do professor Manfred Reinecke da Texas Christian University e enviados ao nosso grupo de pesquisa para que os estudos de equilíbrio fossem conduzidos.

2.1. Titulações potenciométricas

A técnica de titulação potenciométrica é muito empregada para os estudos de medida de equilíbrio de complexos metálicos em solução. Neste tipo de titulação uma base padronizada é adicionada em incrementos de volume conhecidos a um sistema contendo um ligante de interesse, na ausência e/ou na presença do íon metálico. Os experimentos foram realizados em um sistema etanol/água na proporção 70/30, devido à baixa solubilidade dos ligantes em água. A água usada no sistema foi bidestilada e fervida.

As soluções experimentais foram preparadas com 25 mL da solução etanol/água 70/30, 20 mL de solução de HCl 1×10^{-2} mol.L⁻¹ 70/30 etanol/água, com força iônica 0,1 mol.L⁻¹ (KCl) 0,05 mmol do ligante e KCl suficiente para manter a força iônica em 0,100, em uma célula com capacidade para 60 mL. Para os estudos de equilíbrio dos complexos formados foi adicionado a este sistema mais 0,05 mmol da solução do metal de interesse, respeitando a proporção metal/ligante 1:1.

A célula utilizada em cada sistema era termostatizada a 25,00 ± 0,05 °C refrigerado mecanicamente por um banho de circulação termostatizado (Microquímica Ind. Com. Ltda). As titulações foram realizadas em um titulador automático da Metrohm modelo Titrino Plus 848 acoplado com um eletrodo de vidro combinado do tipo Ag/AgCl previamente calibrado na célula. Soluções diluídas de HCl 0,1 mol.L⁻¹ e KOH isento de CO₂ 0,1 mol.L⁻¹ foram utilizadas como titulantes para a leitura do pH. Todas as titulações foram feitas sob atmosfera inerte, através do fluxo constante de argônio purificado e em triplicata, sendo

que os valores dos pKas apresentados referem-se à média dos experimentos. O pK_w do sistema etanol/água contendo $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{KCl}_{(\text{aq})}$ utilizado para os cálculos foi de 14,52. As soluções de Mg(II) e Mn(II) foram preparadas e padronizadas como consta na literatura.^{66,67}

Como abaixo de pH 2 e acima de pH 11,5 íons hidrogênio e íons hidróxido se tornam responsáveis por frações apreciáveis da condutância, fazendo com que ocorram diferenças significativas na leitura de pH, a faixa de pH que foi estudada nas titulações potenciométricas está compreendida entre 2,5 e 11,5.

2.2. Programa BEST7

Os pKas foram calculados através do programa BEST7⁶⁸ e os diagramas de distribuição de espécies presentes em solução, em função do pH, foram obtidos com o programa SPECIES.⁶⁹ O programa BEST7 utiliza curvas de titulação para determinar as constantes de estabilidade e/ou as constantes de protonação dos ligantes e complexos, bem como a correta concentração do ligante utilizado. A entrada de dados para o programa consiste em fornecer o número de milimoles de cada componente, as constantes de equilíbrio inicialmente estimadas de todas as espécies que podem ser formadas a partir dos componentes da solução e o perfil de pH determinado experimentalmente versus a composição da solução (HCl adicionado). O programa emprega equações de balanço de massa para todas as espécies presentes a cada incremento de ácido adicionado e resolve a concentração de cada espécie presente. As espécies sugeridas são aquelas adquiridas ou observadas a partir de evidências espectrofotométricas e que podem ser justificadas com base em princípios estabelecidos na química de coordenação em solução. Convencionalmente, este programa emprega constantes globais de protonação e de formação de complexos metálicos, designadas por β . Nos cálculos, deve-se sempre buscar a minimização do desvio padrão do sistema entre os valores experimentais de pH encontrados na titulação e os calculados. O desvio padrão é calculado como um fator de peso de modo a aumentar a sensibilidade dos cálculos computacionais nas regiões de tamponamento do sistema, e diminuir a importância das inflexões.

2.3. Titulações espectrofotométricas

A titulação é acompanhada pelas mudanças ocorridas no espectro eletrônico dos ligantes, na região entre 250 e 500nm, com o

aumento contínuo do pH do meio. O experimento foi realizado em cubetas de quartzo em um equipamento Uv-Vis da HP modelo Hewlett Packard 8453 no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais - Departamento de Química da UFSC. As titulações foram realizadas em solução etanol/água na proporção 70/30 em uma concentração do ligante 1×10^{-4} mol.L⁻¹. Trabalhou-se em uma temperatura ambiente de 25 °C e utilizou-se KOH 1M isentos de CO₂ como titulante. Alíquotas da base foram adicionadas à solução de modo a aumentar gradativamente o pH. As determinações dos pKas foram realizadas pelo método gráfico (pH *versus* intensidade) em uma faixa de pH de 12 a 14.

3. RESULTADOS

3.1. Ligante CG-I-83D

As curvas de titulação potenciométrica do ligante CG-I-83D em presença e ausência do íon $Mg(II)$ são mostradas na Figura 16. A presença de tampão nas curvas fornece informações qualitativas sobre espécies que podem estar presentes em solução ao longo da faixa de pH estudada.

O ligante livre apresenta duas regiões tamponadas: entre pH 3 e 5,0, relativo à desprotonação dos grupos tetrazóis e, próximo de 9, relativo à desprotonação do grupo catecol, corroborando com os dados da literatura que sugerem pK_a de 9,25 para a desprotonação do primeiro grupo OH do catecol.⁷¹ A curva envolvendo o sistema metálico está localizada abaixo da curva do ligante livre, em vermelho, indicando que a complexação do íon metálico com os grupos doadores do ligante ocorre em torno de pH 3,5.

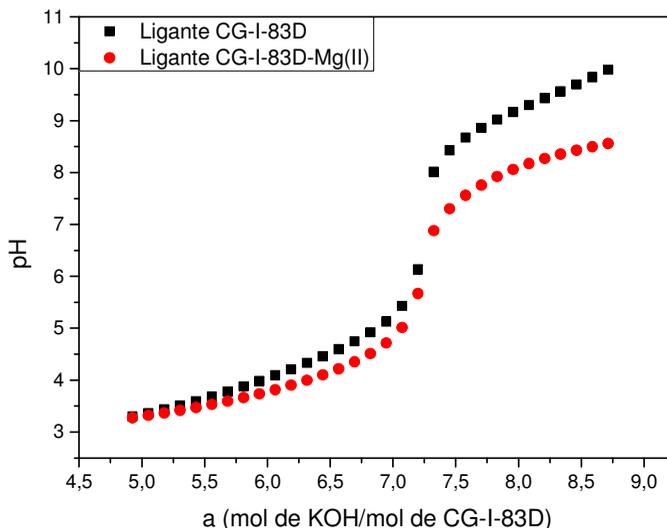


Figura 16. Curva de titulação direta do ligante CG-I-83D na ausência e presença do íon $Mg(II)$. Em preto: 0,05 mmol de CG-I-83D; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-83D e 0,05 mmol de $Mg(II)$.

O diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o sistema CG-I-83D-Mg(II) é mostrado na Figura 17, e aponta as possíveis espécies formadas resultantes da interação do ligante com o íon metálico na faixa de pH estudada. A formação das espécies mononuclear, protonadas e não protonadas, e espécies hidróxidas foi investigada sob condições experimentais desse trabalho.

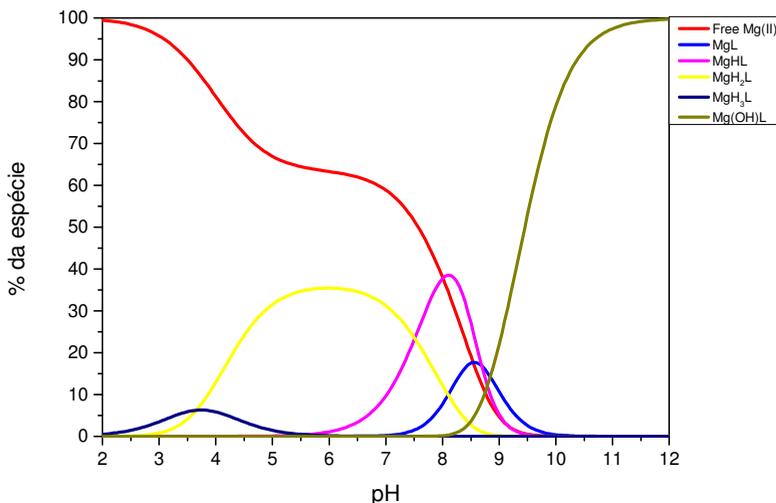


Figura 17. Diagrama de distribuição das espécies formadas em uma solução, em função do pH, para o sistema CG-I-83D -Mg(II).

É possível verificar que à medida que o pH torna-se mais alcalino a concentração de metal livre diminui, ao passo que novas espécies são formadas. A espécie triprotonada MgH_3L está presente entre pH 2,5 e 5, com uma formação máxima inexpressiva de 5% em pH 3,5. A espécie que predomina numa maior faixa de pH é a espécie diprotonada, MgH_2L , compreendendo entre pH 3 até pH 8,5 com seu pico de formação de 35% em pH 6. Em azul observa-se a espécie monoprotonada $MgHL$ formando-se entre pH 6,5 e 9 com um pico de 40% em pH 8. O sistema MgL forma-se de maneira sutil entre pH 7,5 e 9,5 e sua formação máxima atinge os 20% em pH 8,5. Em pH alcalino a espécie predominante é a monohidróxida.

Em termos de utilização deste ligante como inibidor da integrase, é possível observar que há formação de complexo com o íon

Mg(II) em pH biológico, onde tanto a espécie MgHL quanto a MgH_2L encontram-se presentes em $pH \approx 7,2$.

Para o sistema CG-I-83D-Mn(II), Figura 18, foi observada a formação de precipitado na forma de hidróxido de manganês em $pH \approx 9$. O gráfico de distribuição das espécies refere-se a um sistema supersaturado.

Desta forma, as espécies formadas em pH acima de 9 não puderam ser determinadas e os valores apresentados na Tabela 1 referem-se apenas às espécies metal-ligante e às mono, di e triprotonadas. Novamente, o ligante livre apresenta duas regiões tamponadas em pH entre 3 e 5,0 relativo à desprotonação dos grupos tetrazois, e, próximo de 9,5, relativo à desprotonação do grupo catecol. A linha vermelha representa o sistema metálico e seu deslocamento em relação a linha preta sugere a coordenação do Mn(II) aos grupos doadores do ligante.

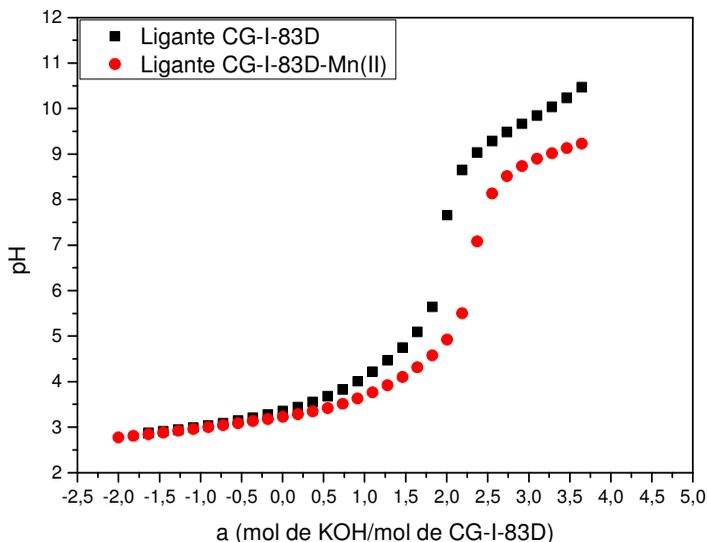


Figura 18. Curva de titulação direta do ligante CG-I-83D na ausência e presença do íon Mn(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-83D; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-83D e 0,05 mmol de Mn(II).

O diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o sistema CG-I-83D-Mn(II) é mostrado na Figura 19. Em pH ácido a espécie diprotonada MnH_2L é predominante, especialmente em $pH \approx 3,5$ onde apresenta-se quase 80% em solução. Com a elevação do pH a espécie $MnHL$ é favorecida com um máximo próximo de 100% em $pH \approx 6,5$. Em valores de pH entre 8 e 10 outras duas espécies são observadas: a formada apenas pelo metal e ligante, MnL , e ainda uma espécie monohidróxida, $Mn(OH)L$, que predomina em valores de pH acima de 9,5.

Para o sistema envolvendo o íon Mn(II) verificou-se que o ligante CG-I-83D forma quase 100% do complexo monoprotonado em pH biológico, sugerindo que os estudos *in vitro* deste ligante com o vírus HIV terão resultados promissores para a inibição da enzima integrase.

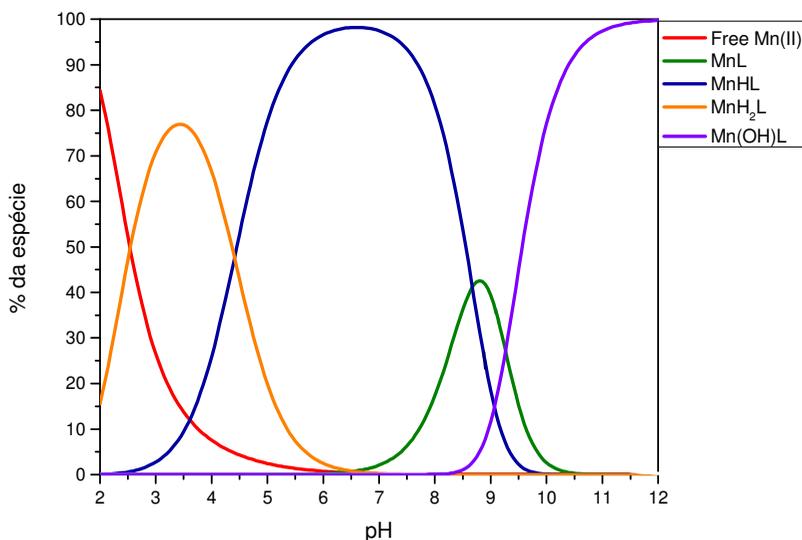


Figura 19. Diagrama de distribuição das espécies formadas em uma solução, em função do pH, para o sistema CG-I-83D -Mn(II).

A titulação espectrofotométrica, Figura 20, foi realizada com o intuito de elucidar os dois últimos pKa's referentes aos grupamentos catecóis do ligante CG-I-83D. Observa-se que com o aumento de pH

ocorre um deslocamento batocrômico. Dois pontos isobésticos, um mal definido em torno de 320 nm e outro bem definido em torno de 440 nm, evidenciam os equilíbrios entre três espécies em solução: as espécies H_2L^{2-} , HL^{3-} e L^{4-} . Os valores de pKas, referentes aos grupos catecois, encontram-se na Tabela 1 e anuem com os valores encontrados na literatura para o grupo catecol.⁷¹

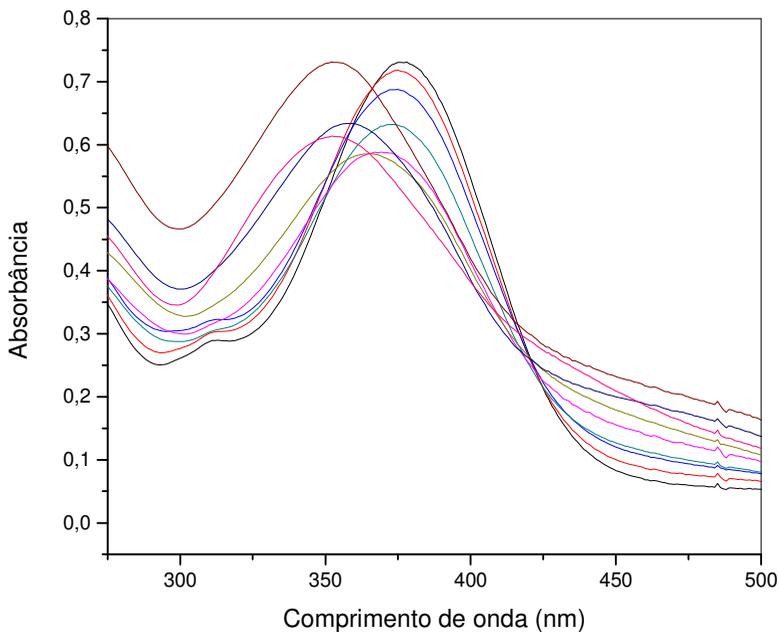


Figura 20. Espectros eletrônicos obtidos a partir da variação de pH 12 – 14 de uma solução 1×10^{-4} mol.L⁻¹ do ligande CG-I-83D.

As constantes de equilíbrio do ligante na ausência e presença dos íons Mg(II) e Mn(II) são apresentadas na Tabela 1. Os valores apresentados referem-se à média de três titulações.

Tabela 1. Logaritmos das constantes de equilíbrio das espécies formadas para os sistemas CG-I-83D-Mg(II) e CG-I-83D-Mn(II).

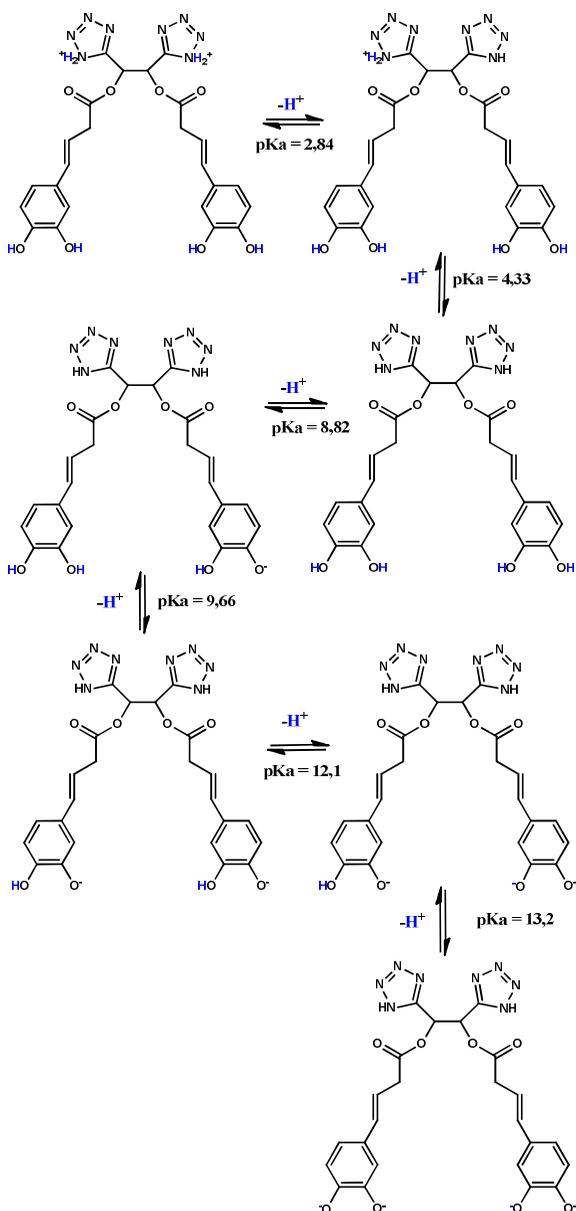
Equilíbrio apenas do ligante	LogK (DP)*
$L + H^+ \rightleftharpoons HL$	13,2 (0,98)
$HL + H^+ \rightleftharpoons H_2L$	12,1 (0,55)
$H_2L + H^+ \rightleftharpoons H_3L$	9,66 (0,72)
$H_3L + H^+ \rightleftharpoons H_4L$	8,82 (0,81)
$H_4L + H^+ \rightleftharpoons H_5L$	4,33 (0,91)
$H_5L + H^+ \rightleftharpoons H_6L$	2,84 (0,46)
Equilíbrio com Mg(II)	
$Mg^{2+} + L \rightleftharpoons MgL$	8,69 (0,79)
$MgL \rightleftharpoons Mg(OH)L + H^+$	-6,55 (0,88)
$MgL + H^+ \rightleftharpoons MgHL$	4,44 (0,67)
$MgHL + H^+ \rightleftharpoons MgH_2L$	3,42 (0,83)
Equilíbrio com Mn(II)	
$Mn^{2+} + L \rightleftharpoons MnL$	11,27 (1,02)
$MnL + H^+ \rightleftharpoons MnHL$	-9,11 (0,80)
$MnHL + H^+ \rightleftharpoons MnH_2L$	8,67 (0,89)
$MnH_2L + H^+ \rightleftharpoons MnH_3L$	4,4 (0,95)

* valores em porcentagem

De acordo com os dados potenciométricos, em pH abaixo de 3 o ligante encontra-se na sua forma completamente protonada, H_6L^{2+} . Com o aumento do pH, o ligante perde os prótons dos nitrogênios amino protonados, referentes a dois grupamentos tetrazóis da molécula para formar as espécies H_5L^+ e H_4L . Acima de pH 8,8 um grupo OH de um dos catecois é desprotonado, gerando a espécie H_3L^- , enquanto que

acima de pH 9,6 outro grupo OH, referente ao segundo catecol, é desprotonado, formando a espécie H_2L^{2-} .

Sob condições mais alcalinas, os outros dois grupos OH restantes são desprotonados, formando as espécies HL^{3-} e L^{4-} . No entanto, estes pKas não podem ser determinados através da potenciometria devido ao erro alcalino que ocorre quando o pH atinge valores muito elevados. Este erro faz com que os valores de pH medidos sejam menores que os valores verdadeiros, uma vez que o eletrodo começa a responder tanto para prótons quanto para os íons monovalentes do titulante.⁷⁰ A titulação espectrofotométrica é muito empregada para a determinação de altos valores de pKas. No Esquema 1 é possível visualizar uma proposta da forma que o ligante assume em cada pKa determinado.



Esquema 1. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-I-83D.

3.2. Ligante CG-II-51

As curvas de titulação potenciométrica do ligante CG-II-51 em presença e ausência do íon $Mg(II)$ são mostradas na Figura 21. O ligante livre também apresenta duas regiões tamponadas: uma em pH entre 3 e 5, relativa à desprotonação dos grupos ácidos e outra próxima de 9, relativa à desprotonação dos grupos catecóis. Ambos os tampões formados encontram-se em regiões muito próximas aos pKas de grupos similares como o ácido acético (pKa 4,76) e, como já mencionado, a primeira desprotonação do grupo catecol (pKa 9,25).^{71,72} A curva envolvendo o sistema metálico está localizada abaixo da curva do ligante livre, indicando a coordenação do íon metálico com os grupos doadores da molécula do ligante.

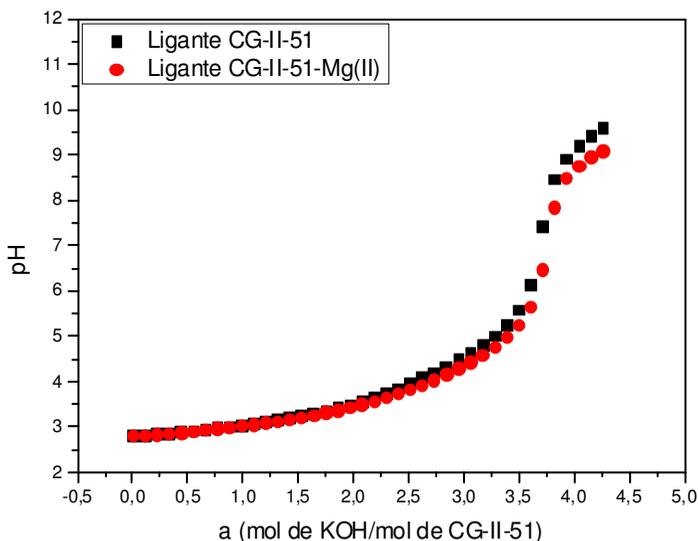


Figura 21. Curva de titulação direta do ligante CG-II-51 na ausência e presença do íon $Mg(II)$. Em preto: 0,05 mmol de CG-II-51; em vermelho: 0,05 mmol de CG-II-51 e 0,05 mmol de $Mg(II)$.

O diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o sistema CG-II-51- $Mg(II)$ é mostrado na Figura 22 e aponta as espécies formadas resultantes da interação do ligante com o íon metálico na faixa

de pH estudado. A formação das espécies mononucleares protonadas e não protonadas, e espécies hidróxidas também foi investigada sob condições experimentais desse trabalho.

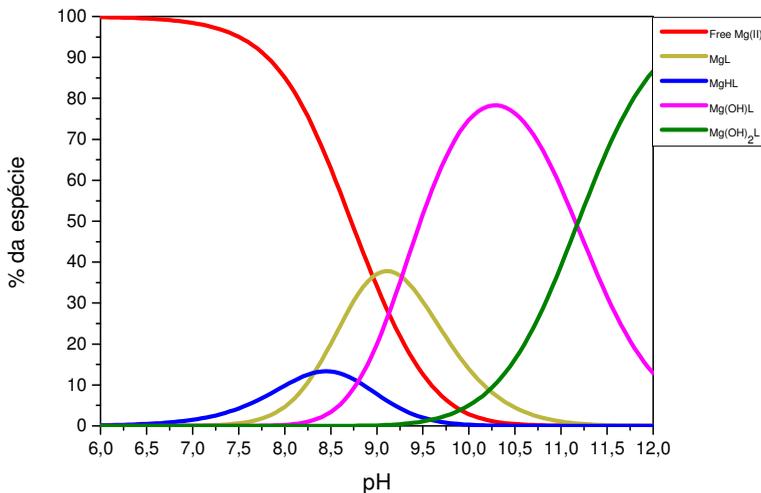


Figura 22. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-II-51-Mg(II).

A porcentagem de metal livre cai gradativamente à medida que novas espécies do complexo são formadas ao longo da faixa de pH. O complexo monoprotonado MgHL tem seu pico de aproximadamente 15% em pH 8,5 enquanto que a espécie MgL tem uma formação mais expressiva de 40% em pH próximo a 9. Em pH 10,5 o complexo monohidróxido Mg(OH)L encontra-se 80% formado enquanto o complexo dihidróxido Mg(OH)₂L predomina com 85% de formação em pH acima de 11,5.

No sistema CG-II-51-Mn(II) (Figura 23) observou-se nitidamente a formação de precipitado em pH \approx 11, referente à formação do hidróxido de manganês e, novamente, as espécies formadas acima deste pH não puderam ser determinadas com exatidão através da titulação potenciométrica em solução. Observa-se ainda o deslocamento entre as curvas do ligante na ausência (linha preta) e na presença do íon Mn(II) (linha vermelha), sendo esta uma evidência de que o metal está se coordenando ao ligante especialmente em pH a partir de 5. A Tabela

2 mostra os valores dos pKas calculados para o ligante na ausência e presença dos metais.

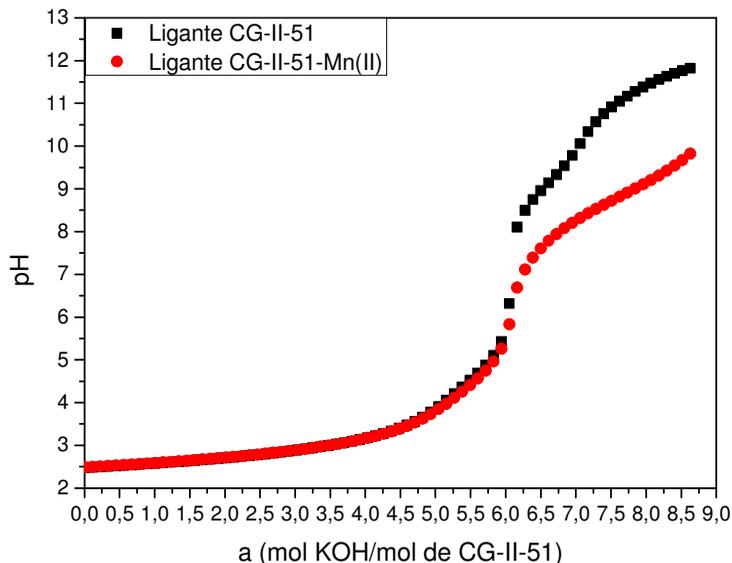


Figura 23. Curva de titulação direta do ligante CG-II-51 na ausência e presença do íon Mn(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-II-51; em vermelho: 0,05 mmol de CG-II-51 e 0,05 mmol de Mn(II).

O diagrama de distribuição de espécies para o sistema CG-II-51-Mn(II) é mostrado a seguir, na Figura 24. Em pH ácido a espécie diprotonada MnH_2L é predominante em torno da faixa de pH 3 a 8 chegando a sua formação máxima de 90% em pH 6. Com o aumento do pH a espécie $MnHL$ é formada e tem seu pico de formação em pH \approx 9,5. Em valores de pH mais elevados, duas outras espécies são formadas: a MnL , com um máximo em torno de 44%, e a espécie monohidróxida, $Mn(OH)L$, que predomina em pH acima de 11.

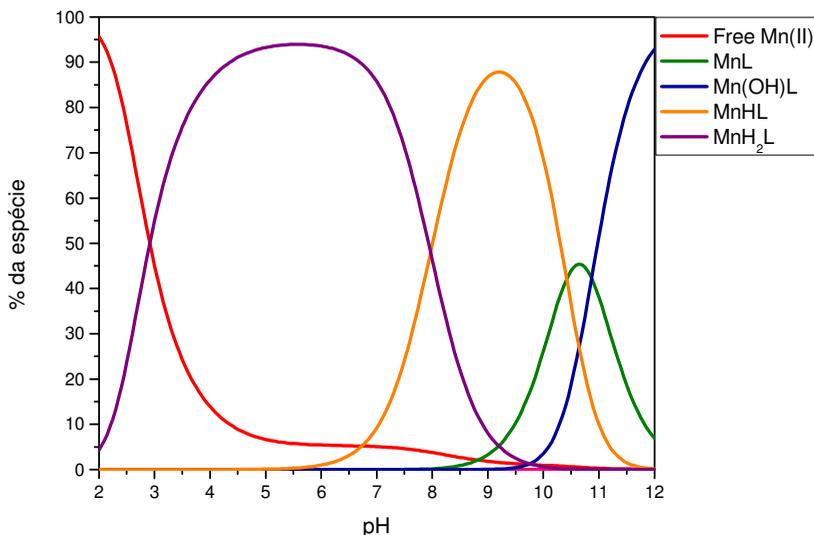


Figura 24. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-II-51-Mn(II).

A titulação espectrofotométrica, Figura 25, também empregada neste ligante, elucidou os dois últimos pKas referentes aos grupamentos catecois do ligante CG-II-51. Observou-se que com o aumento de pH ocorre um deslocamento batocrômico. Dois pontos isobésticos, não bem definidos em torno de 315 nm e outro em 430 nm, evidenciam os equilíbrios entre três espécies em solução: as espécies H_2L^{4-} , HL^{5-} e L^{6-} . Novamente, os valores de pKa encontrados para os grupos catecois estão próximos dos relatados na literatura.⁷¹

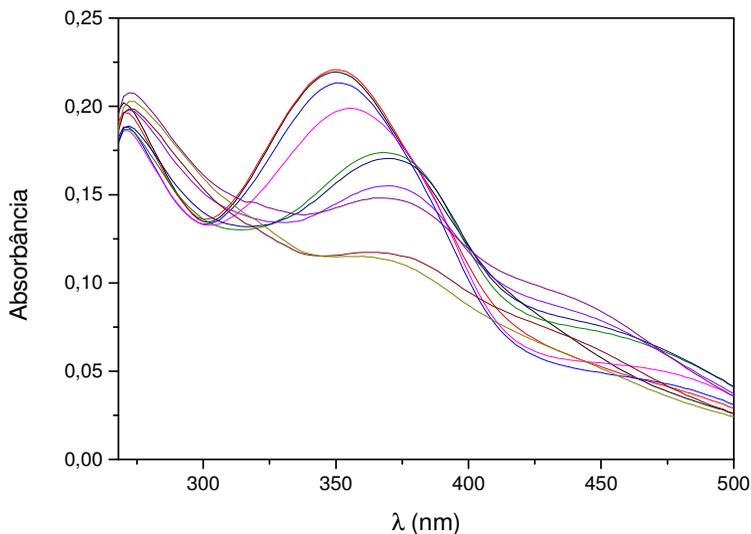


Figura 25. Espectros eletrônicos obtidos a partir da variação de pH 12 – 14 de uma solução 1×10^{-4} mol.L⁻¹ do ligande CG-II-51.

As constantes de equilíbrio deste ligante na ausência e presença do metal são apresentadas na Tabela 2. Os valores apresentados referem-se à média de três titulações.

Tabela 2. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para o sistema CG-II-51-Mg(II) e CG-II-51-Mn(II).

Equilíbrio apenas do ligante	LogK (DP)*
$L + H^+ \rightleftharpoons HL$	13,00 (0,57)
$HL + H^+ \rightleftharpoons H_2L$	11,78 (0,58)
$H_2L + H^+ \rightleftharpoons H_3L$	10,83 (0,65)
$H_3L + H^+ \rightleftharpoons H_4L$	9,31 (0,77)
$H_4L + H^+ \rightleftharpoons H_5L$	4,76 (0,54)

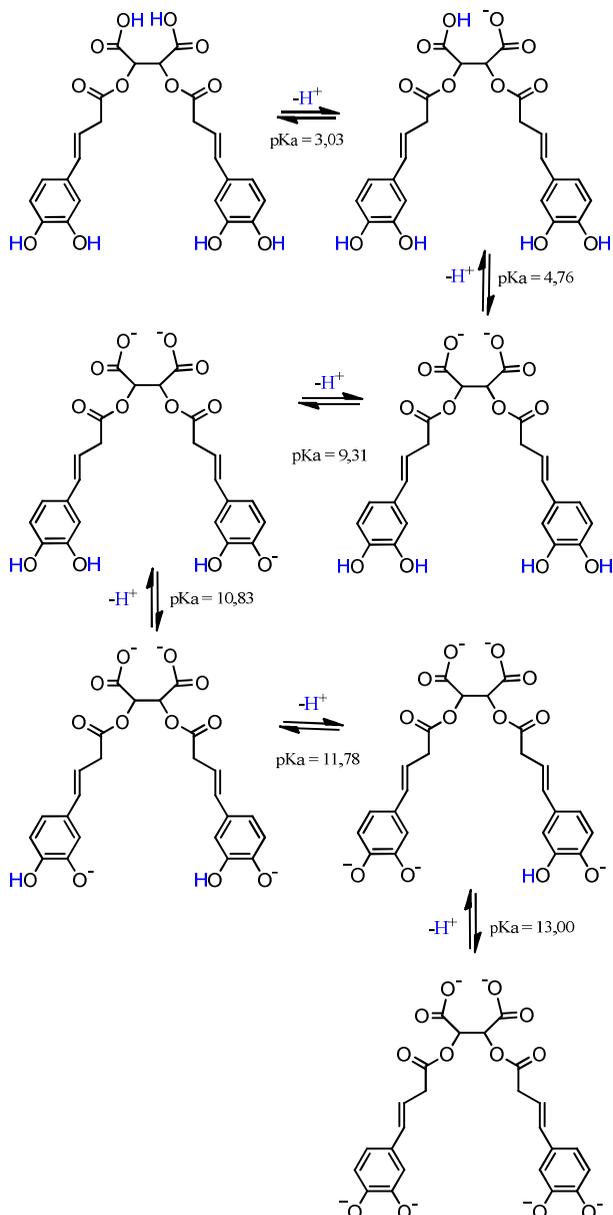
Continua

Continuação

$H_3L + H^+ \rightleftharpoons H_6L$	3.03 (0,87)
Equilíbrio com Mg(II)	
$Mg^{2+} + L \rightleftharpoons MgL$	8,33 (0,77)
$MgL \rightleftharpoons Mg(OH)L + H^+$	-9,27 (0,98)
$Mg(OH)L \rightleftharpoons Mg(OH)_2L + H^+$	-11,17 (0,80)
$MgL + H^+ \rightleftharpoons MgHL$	6,83 (0,98)
Equilíbrio com Mn(II)	
$Mn^{2+} + L \rightleftharpoons MnL$	8.44 (0,95)
$MnL \rightleftharpoons Mn(OH)L + H^+$	-10.87 (1,1)
$MnL + H^+ \rightleftharpoons MnHL$	10.42 (0,63)
$MnHL + H^+ \rightleftharpoons MnH_2L$	7.97 (0,82)

* valores em porcentagem

Observando os estudos de equilíbrio do ligante apenas, em pH em torno de 3 o ligante encontra-se na sua forma completamente protonada, H_6L . Com o aumento do pH, o ligante perde os prótons dos grupos ácidos da molécula, para formar as espécies H_3L^- e H_4L^{2-} . Acima de pH 9,3 um grupo OH de um dos catecois está predominantemente desprotonado, gerando a espécie H_3L^{3-} , enquanto que acima de pH 11,5 outro grupo OH, referente ao segundo catecol, está predominantemente desprotonado, formando a espécie H_2L^{4-} . Sob condições mais alcalinas, os outros dois grupos OH restantes são desprotonados, formando as espécies HL^{5-} e L^{6-} . No entanto, como ocorre com o ligante anterior, estes pKas não podem ser determinados através da potenciometria. Portanto, a espectroscopia no UV-Vis foi empregada para determinar os pKas das espécies HL^{5-} e L^{6-} . Os equilíbrios propostos para as espécies formadas em solução do ligante CG-II-51 são observados no Esquema 2.



Esquema 2. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-II-51.

3.3. Ligante 5CITEP

O ligante 5CITEP também foi titulado em presença e ausência do íon $Mg(II)$, como é mostrado na Figura 26. O ligante livre apresenta duas regiões tamponadas como os ligantes anteriores: uma em pH entre 2,5 e 4,5, relativa à desprotonação do grupo tetrazol, e outra que começa próxima de 9,5, relativa à desprotonação do grupo dicetônico. A curva envolvendo o sistema metálico está localizada abaixo da curva do ligante livre, indicando a coordenação do íon metálico com os grupos doadores do ligante especialmente a partir de pH 6.

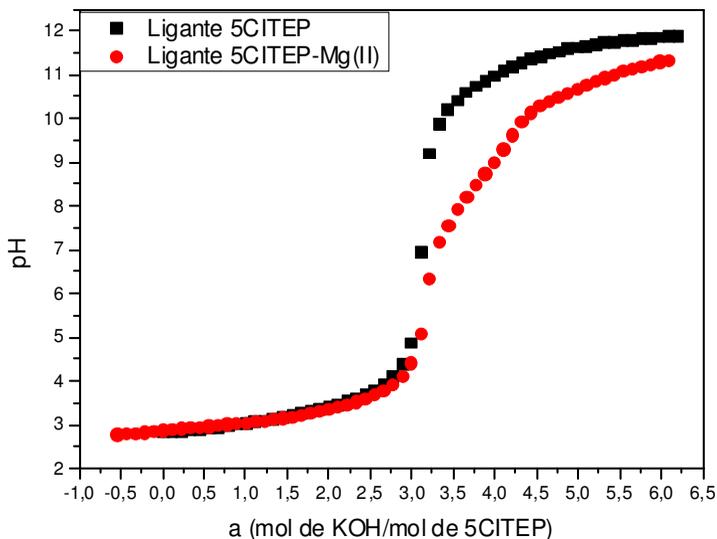


Figura 26. Curva de titulação direta do ligante 5CITEP na ausência e presença do íon $Mg(II)$. Em preto: 0,05 mmol de 5CITEP; em vermelho: 0,05 mmol de 5CITEP e 0,05 mmol de $Mg(II)$.

O diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o sistema 5CITEP- $Mg(II)$ é mostrado na Figura 27, sendo possível visualizar as espécies formadas resultantes da interação do ligante com o íon metálico na faixa de pH estudada. Seguindo a linha de pesquisa dos ligantes anteriormente mostrados, com o 5CITEP também foram

investigadas a formação das espécies mononucleares protonadas, não protonadas e espécies hidróxidas.

Como é possível observar na Figura 27, com o ligante 5CITEP houve a formação de apenas duas espécies: a MgL e Mg(OH)L. A coordenação do íon Mg(II) com o 5CITEP não se mostra muito efetiva, visto que em uma considerável faixa de pH estudada há grande quantidade de metal livre, representada pela linha vermelha. A espécie MgL é formada expressivamente em uma faixa de pH entre 8 e 11, tendo um máximo de 61% em pH \approx 9,5 e a espécie hidróxida Mg(OH)L predomina em pH acima de 10.

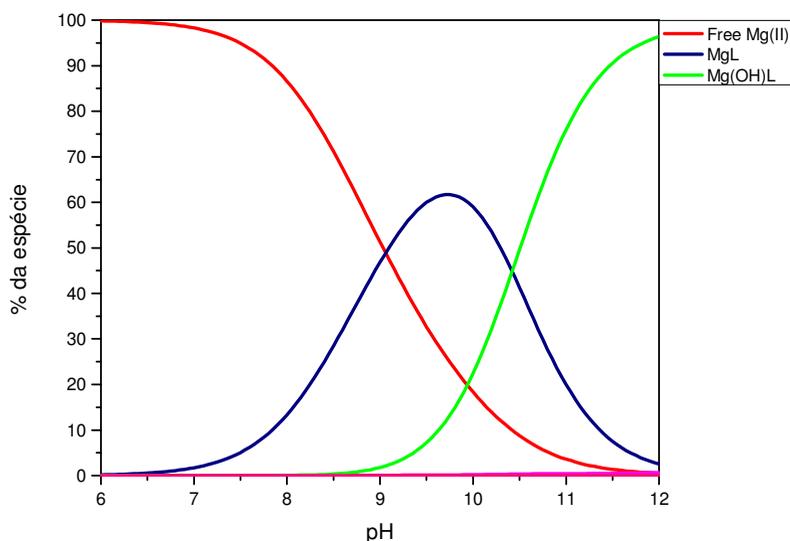


Figura 27. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema 5CITEP -Mg(II).

A formação do complexo metal-ligante ocorre em valores de pH maiores do que 7 e a formação em pH biológico ocorre com menos de 5%.

Os estudos do 5CITEP com o íon Mn(II) foram conduzidos e as curvas de titulação potenciométrica com o ligante na ausência e presença do íon metálico são mostrados na Figura 28. As mesmas duas regiões tamponadas continuam aparecendo na curva em preto, referente

apenas ao ligante, sendo que a primeira diz respeito à desprotonação do grupo tetrazol do ligante e, a segunda, ao grupo dicetônico. O sistema metálico é representado pela linha vermelha, cujo o deslocamento com a linha preta sugere que a coordenação entre metal e ligante começa a ocorrer em $\text{pH} \approx 3$.

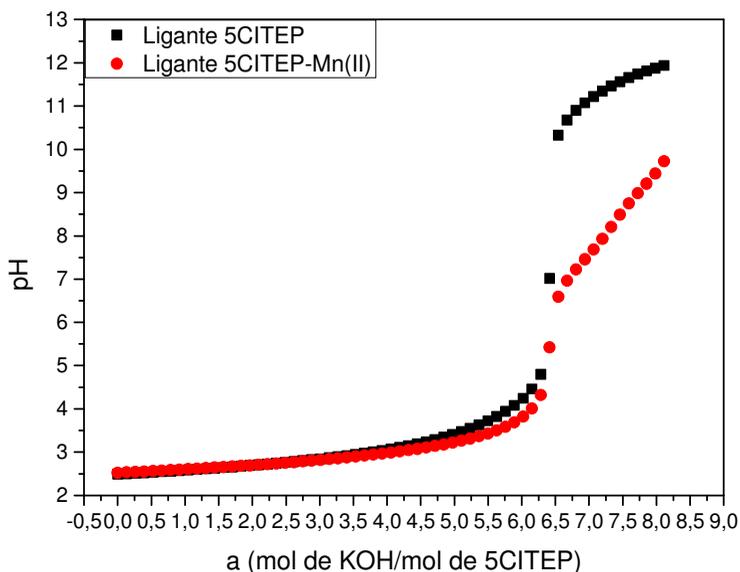


Figura 28. Curva de titulação direta do ligante 5CITEP na ausência e presença do íon Mn(II) . Em preto: 0,05 mmol de 5CITEP; em vermelho: 0,05 mmol de 5CITEP e 0,05 mmol de Mn(II) .

Verifica-se no diagrama de espécies, Figura 29, que o ligante complexa-se melhor com o íon Mn(II) do que com o íon Mg(II) . A diminuição acentuada do metal livre mostra que o complexo metálico é formado ainda na faixa ácida. A espécie MnHL forma-se expressivamente e tem seu pico em $\text{pH} 5$, estando presente quase 70% em solução. O complexo MnL predomina quase 75% em $\text{pH} 8$ e a espécie hidróxida Mn(OH)L domina em 100% a faixa de pH acima de 11.

É importante ressaltar o interesse biológico dos ligantes deste projeto. Portanto, obter complexos metálicos em pH neutro é relevante

para o objetivo do trabalho. Ao contrário do complexo 5CITEP-Mg(II), que não é formado em pH neutro, diferentes espécies do complexo 5CITEP-Mn(II) estão presentes em pH próximo de 7.

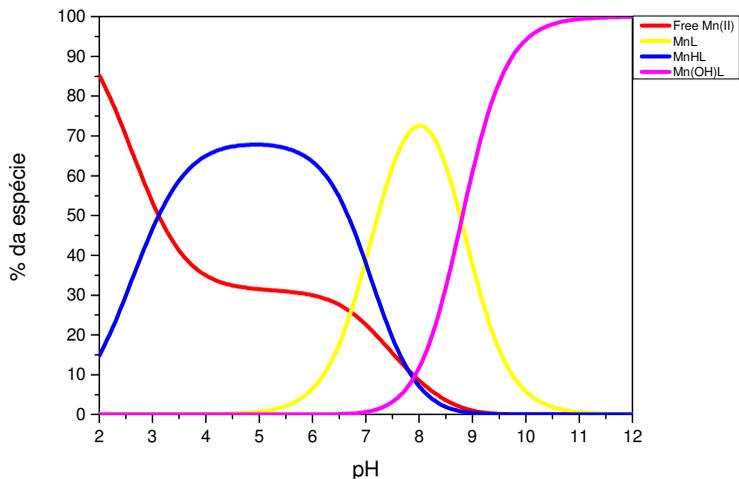


Figura 29. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema 5CITEP -Mn(II).

As constantes de equilíbrio do ligante na ausência e presença dos íons Mg(II) e Mn(II) são apresentadas na Tabela 3. Os valores apresentados referem-se à média de três titulações.

Tabela 3. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para o sistema 5CITEP, 5CITEP-Mg(II) e 5CITEP-Mn(II).

Equilíbrio apenas do ligante	LogK (DP)*
$H^+ + L \rightleftharpoons HL$	11,45 (0,83)
$HL + H^+ \rightleftharpoons H_2L$	3,49 (1,03)
Equilíbrio com Mg(II)	
$Mg^{2+} + L \rightleftharpoons MgL$	6,00 (0,64)
$MgL \rightleftharpoons Mg(OH)L + H^+$	-10,42 (0,98)

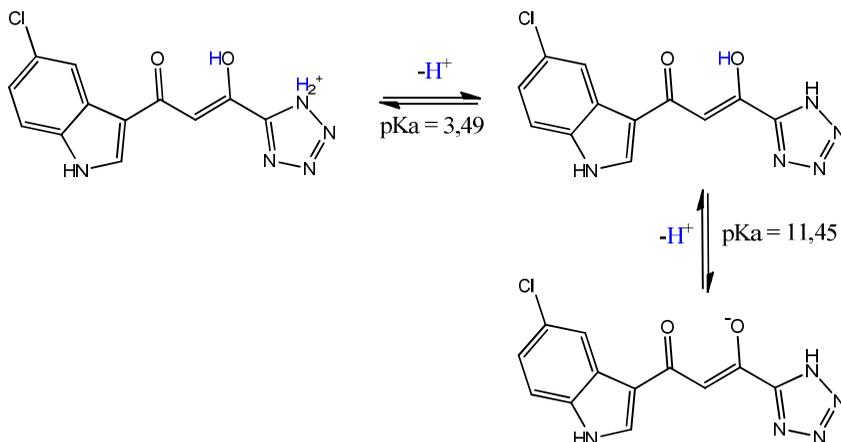
Continua

Continuação

Equilíbrio com Mn(II)	
$Mn^{2+} + L \rightleftharpoons MnL$	9,05 (0,86)
$MnL \rightleftharpoons Mn(OH)L + H^+$	-9,2 (0,63)
$MnL + H^+ \rightleftharpoons MnHL$	6,99 (0,72)

* valores em porcentagem

Observando os resultados dos estudos de equilíbrio, em valores de pH menores do que 3,49 a forma completamente protonada do ligante, H_2L^+ , predomina. Com o aumento do pH, a perda do próton referente ao nitrogênio amino protonado do grupo tetrazol da molécula forma a espécie HL. Acima de pH 11,4, com o grupo OH desprotonado, a espécie L^- predomina. No Esquema 3 é possível visualizar a forma que o ligante assume em função do pH.



Esquema 3. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante 5CITEP.

3.4. Ligante CG-I-38B

Em seguida, as medidas de equilíbrio com o ligante CG-II-38B sozinho e com os íons Mg(II) e Mn(II) foram feitas. As curvas de titulação potenciométrica reversa aparecem na Figura 30. O deslocamento das curvas é um indício que o metal está se coordenando

ao ligante. Na titulação do ligante na ausência do metal é possível verificar duas regiões tamponadas: entre pH 11 e 12, referente aos grupos 2-piridinol-1-óxido, e entre pH 3 e 3,5 referente aos grupos ácidos da molécula. Na titulação do apenas do ligante houve a formação de precipitado em pH $\approx 10,5$, enquanto que na titulação em presença do íon metálico o precipitado foi visualizado em pH $\approx 8,5$.

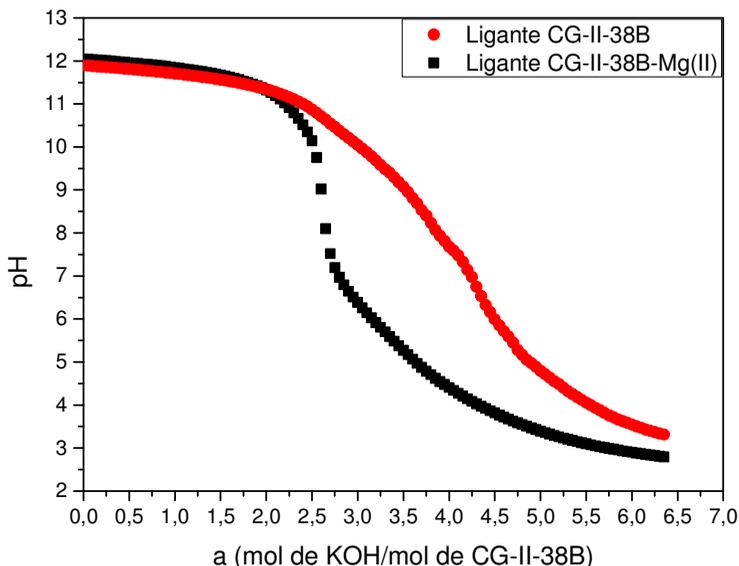


Figura 30. Curva de titulação reversa do ligante CG-II-38B na ausência e presença do íon $Mg(II)$. Em vermelho: 0,05 mmol de CG-II-38B; em preto: 0,05 mmol de CG-II-38B e 0,05 mmol de $Mg(II)$.

No diagrama de distribuição de espécies para o sistema CG-II-38B é possível verificar a formação de quatro espécies diferentes do complexo CG-II-38B- $Mg(II)$. Ao analisar este gráfico, observa-se que a concentração de metal livre decai enquanto que a espécie MgH_2L começa a surgir em pH $\approx 2,5$ chegando à sua formação máxima de 45% em pH 3. A espécie $MgHL$ tem início em pH ≈ 3 e seu máximo atinge pouco mais de 20% em pH 3,7. A formação do complexo MgL é a mais expressiva chegando a quase 100%, em pH 6. A partir de pH 8 a espécie monohidroxida $Mg(OH)L$ predomina em toda a faixa alcalina.

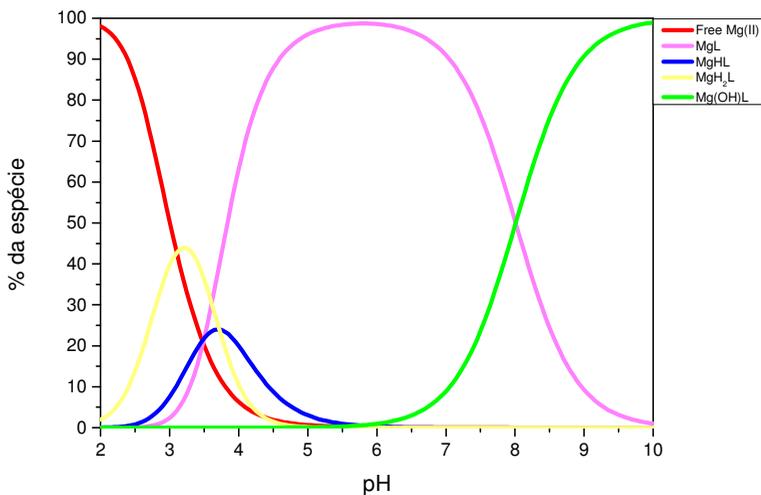


Figura 31. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-II-38B-Mg(II).

Para o sistema CG-II-38B-Mn(II), Figura 32, o deslocamento da curva em vermelho, representando o complexo metálico, indica que a coordenação do metal ao ligante dá-se a partir de $\text{pH} \approx 3$. Em ambas as titulações do ligante, na ausência e na presença do metal, houve precipitação em pH alcalino (a partir de $\text{pH} 10,5$ para o ligante sozinho e a partir de $\text{pH} 9,5$ para o complexo).

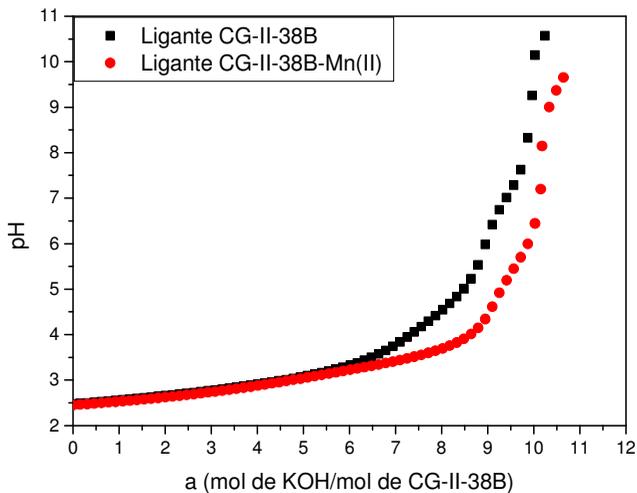


Figura 32. Curva de titulação direta do ligante CG-II-38B na ausência e presença do íon Mn(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-II-38B; em vermelho: 0,05 mmol de CG-II-38B e 0,05 mmol de Mn(II).

A seguir, o gráfico de distribuição das espécies, Figura 33, mostra as espécies formadas entre o íon Mn(II) e o ligante CG-II-38B. O sistema com Mn(II) apresenta espécies formadas ao longo de toda a faixa de pH, ao contrário do sistema com o íon Mg(II) que mostra grande quantidade de metal livre de pH 2 até 11. A linha vermelha indica o Mn(II) livre decaindo à medida que a espécie MnHL é formada, com seu ponto máximo de quase 70% em pH 4,5. O complexo MnL predomina entre pH 5,5 e 9,5 estando 95% presente em solução em pH 7,5. A espécie monohidróxida Mn(OH)L também é formada e em pH 11,5 encontra-se 95% presente em solução.

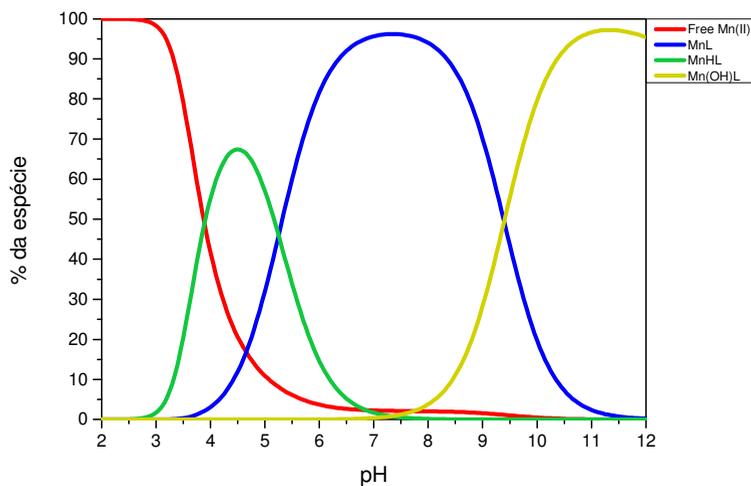


Figura 33. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-II-38B-Mn(II).

A titulação espectrofotométrica foi empregada para este ligante, na ausência dos íons metálicos, a fim de elucidar os pKas que encontram-se em valores de pH muito alcalinos.

A Figura 34 mostra os espectros de UV-Vis dos estudos espectroscópicos empregados para elucidar os dois últimos pKas do ligante situados em regiões muito básicas. À medida que o pH avança para a faixa alcalina ocorre um deslocamento batocrômico dos espectros. Em 291 nm e 345 nm aparecem dois pontos isobésticos mal definidos, sugerindo os equilíbrios envolvidos entre as espécies H_2L^{4-} , HL^{5-} e L^{6-} .

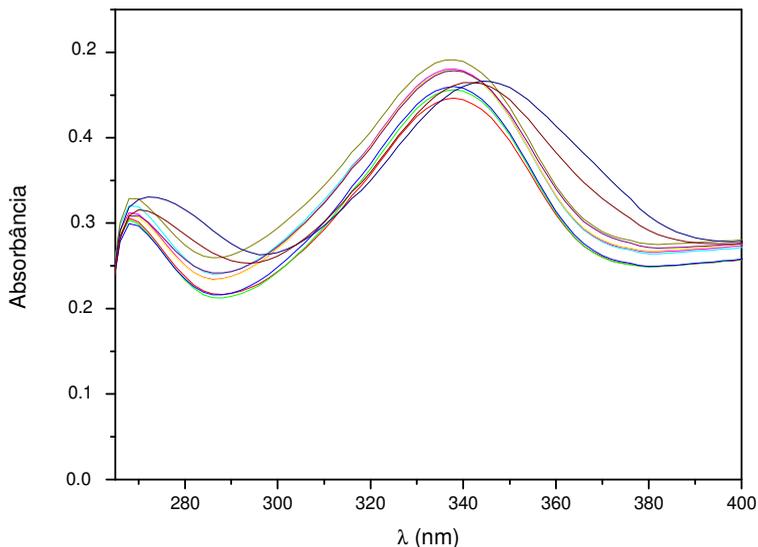


Figura 34. Espectros eletrônicos obtidos a partir da variação de pH 12 – 14 de uma solução 1×10^{-4} mol.L $^{-1}$ do ligante CG-I-38B.

As constantes de equilíbrio do ligante na ausência e presença dos íons Mg(II) e Mn(II) são apresentadas na Tabela 4. Os valores apresentados referem-se à média de três titulações.

Tabela 4. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas CG-II-38B, CG-II-38B-Mg(II) e CG-II-38B-Mn(II).

Equilíbrio apenas do ligante	LogK (DP)*
$L + H^+ \rightleftharpoons HL$	13,35 (0,71)
$HL + H^+ \rightleftharpoons H_2L$	12,4 (0,70)
$H_2L + H^+ \rightleftharpoons H_3L$	6.12 (0,84)
$H_3L + H^+ \rightleftharpoons H_4L$	5.06 (0,59)

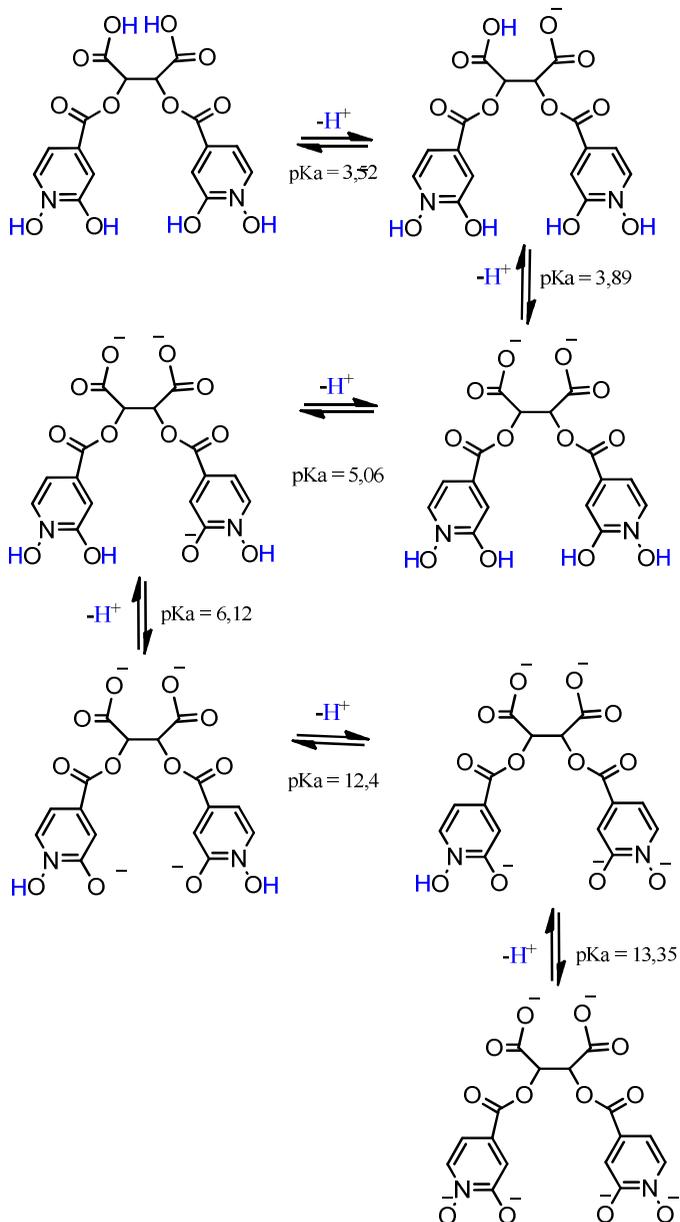
Continua

Continuação

$H_4L + H^+ \rightleftharpoons H_5L$	3,89 (0,71)
$H_5L + H^+ \rightleftharpoons H_6L$	3,52 (0,67)
Equilíbrio com Mg(II)	
$Mg^{2+} + L \rightleftharpoons MgL$	7,3 (0,95)
$MgL \rightleftharpoons Mg(OH)L + H^+$	Precipitou
$MgL + H^+ \rightleftharpoons MgHL$	5,91 (0,63)
$MgHL + H^+ \rightleftharpoons MgH_2L$	3,88 (0,82)
Equilíbrio com Mn(II)	
$Mn^{2+} + L \rightleftharpoons MnL$	7,20 (0,66)
$MnL \rightleftharpoons Mn(OH)L + H^+$	-7,56 (0,98)
$MnL + H^+ \rightleftharpoons MnHL$	5,25 (0,98)

* valores em porcentagem

No esquema 4 é possível visualizar os equilíbrios propostos para o ligante CG-II-38B. A titulação potenciométrica, indica que em pH abaixo de 3,52 o ligante encontra-se na sua forma completamente protonada, H_6L . Com o aumento do pH, o ligante perde os prótons dos ácidos carboxílicos, formando as espécies H_5L^- e H_4L^{2-} . Acima de pH 5 o primeiro grupo OH de uma das porções 2-piridinol-1-óxido é desprotonado, gerando a espécie H_3L^{3-} , enquanto que acima de pH 6,1 outro grupo OH, referente à segunda porção 2-piridinol-1-óxido é desprotonado, formando a espécie H_2L^{4-} . Sob condições mais alcalinas, os outros dois grupos OH restantes são desprotonados, formando as espécies HL^{5-} e L^{6-} .



Esquema 4. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-II-38B.

3.5. Ligante CG-I-160

Os estudos de equilíbrio para o ligante CG-I-160 seguiram a mesma rota dos ligantes anteriores, tanto para o íon $Mg(II)$ quanto para o íon $Mn(II)$. As curvas de titulação potenciométrica para o sistema com magnésio é apresentada a seguir na Figura 35.

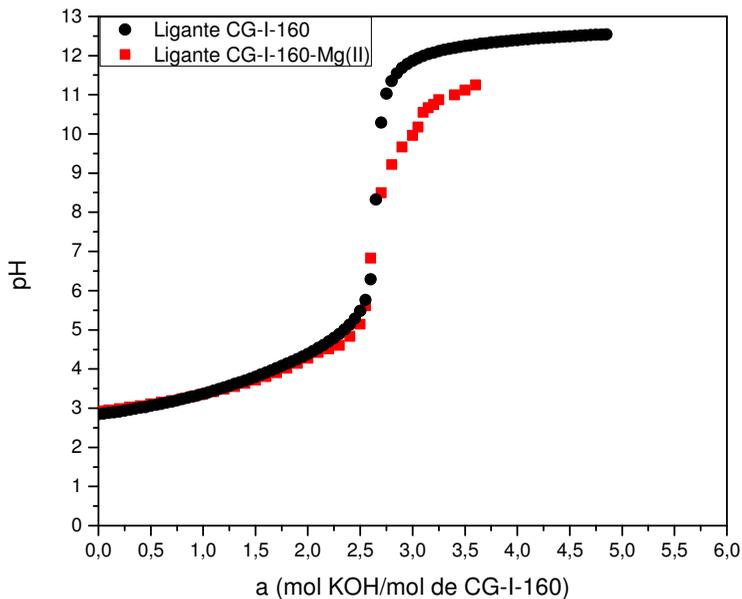


Figura 35. Curva de titulação direta do ligante CG-I-160 na ausência e presença do íon $Mg(II)$. Em preto: 0,05 mmol de CG-I-160; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-160 e 0,05 mmol de $Mg(II)$.

A curva do ligante apresenta duas regiões tamponadas, entre pH 3 e 5, referente aos grupos ácidos da molécula, e entre 11 e 12 referente aos grupos OH da porção salicilato. O deslocamento entre a linha do sistema metálico (em vermelho) e a linha referente apenas ao ligante (em preto) mostra-se pouco acentuado em valores de pH na faixa ácida até neutra, sendo este um indício que neste intervalo de pH o metal está pouco coordenado ao ligante. A partir de pH 8 o deslocamento entre as linhas torna-se maior e, portanto, espera-se que o metal esteja

efetivamente se complexando ao ligante neste pH. O diagrama de distribuição das espécies, Figura 36, confirma esta suposição.

O sistema CG-I-160-Mg(II) apresenta uma formação relativamente pequena das espécies mono, di e tripertonadas do complexo, não passando dos 52%. À medida que o pH avança a espécie MnL predomina em solução chegando próximo a 100% de formação em pH a partir de 5,5. Os estudos com o íon Mn(II) não foram conduzidos devido à falta de ligante.

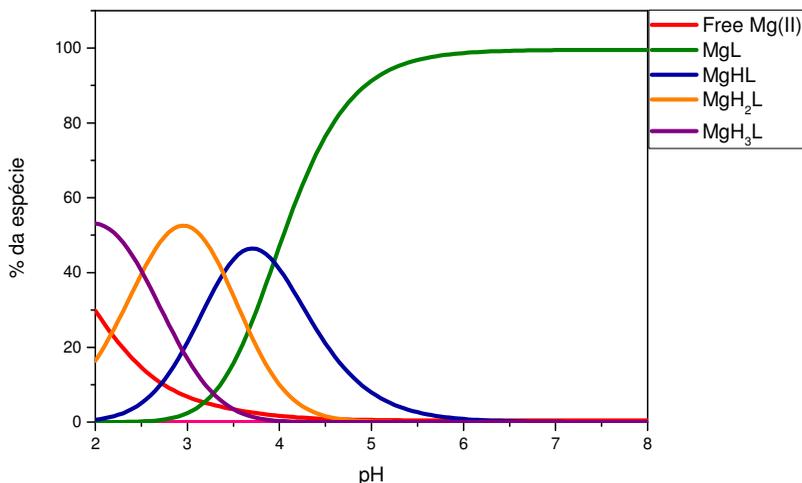


Figura 36. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-I-160-Mg(II).

Os dois pKas do ligante que não puderam ser determinados por potenciometria foram elucidados através da titulação espectrométrica. A Figura 37 apresenta as bandas de UV-Vis de diferentes pHs da solução do ligante. Um ponto isobéstico muito bem definido é visto em 330 nm. Embora o segundo ponto isobéstico não esteja visível, os cálculos da segunda derivada resultaram em dois valores de pKas bastante próximos, como é visto na Tabela 5. Portanto, acredita-se que o fato de haver dois valores muito semelhantes dificulte a visualização de um segundo ponto isobéstico.

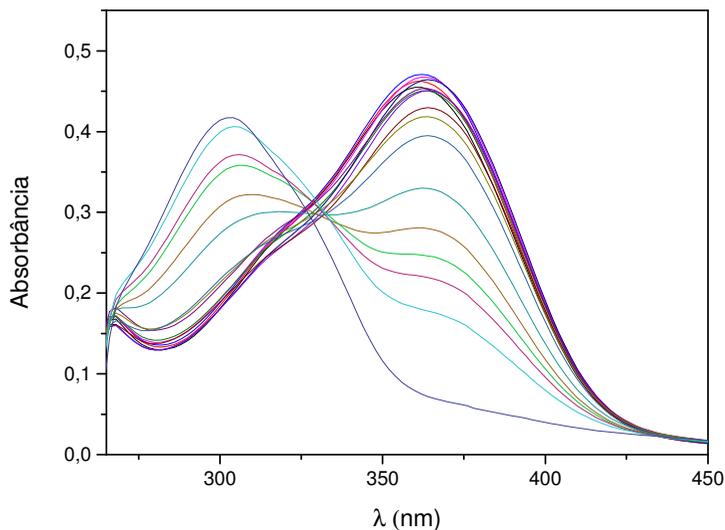


Figura 37. Espectros eletrônicos obtidos a partir da variação de pH 12 – 14 de uma solução $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ do ligante CG-I-160.

Tabela 5. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas CG-I-160 e CG-I-160-Mg(II).

Equilíbrio apenas do ligante	LogK (DP)*
$L + H^+ \rightleftharpoons HL$	12,90 (0,99)
$HL + H^+ \rightleftharpoons H_2L$	12,61 (0,82)
$H_2L + H^+ \rightleftharpoons H_3L$	4,61 (0,81)
$H_3L + H^+ \rightleftharpoons H_4L$	3,86 (0,82)
$H_4L + H^+ \rightleftharpoons H_5L$	2,97 (0,78)
$H_5L + H^+ \rightleftharpoons H_6L$	2,74 (0,65)

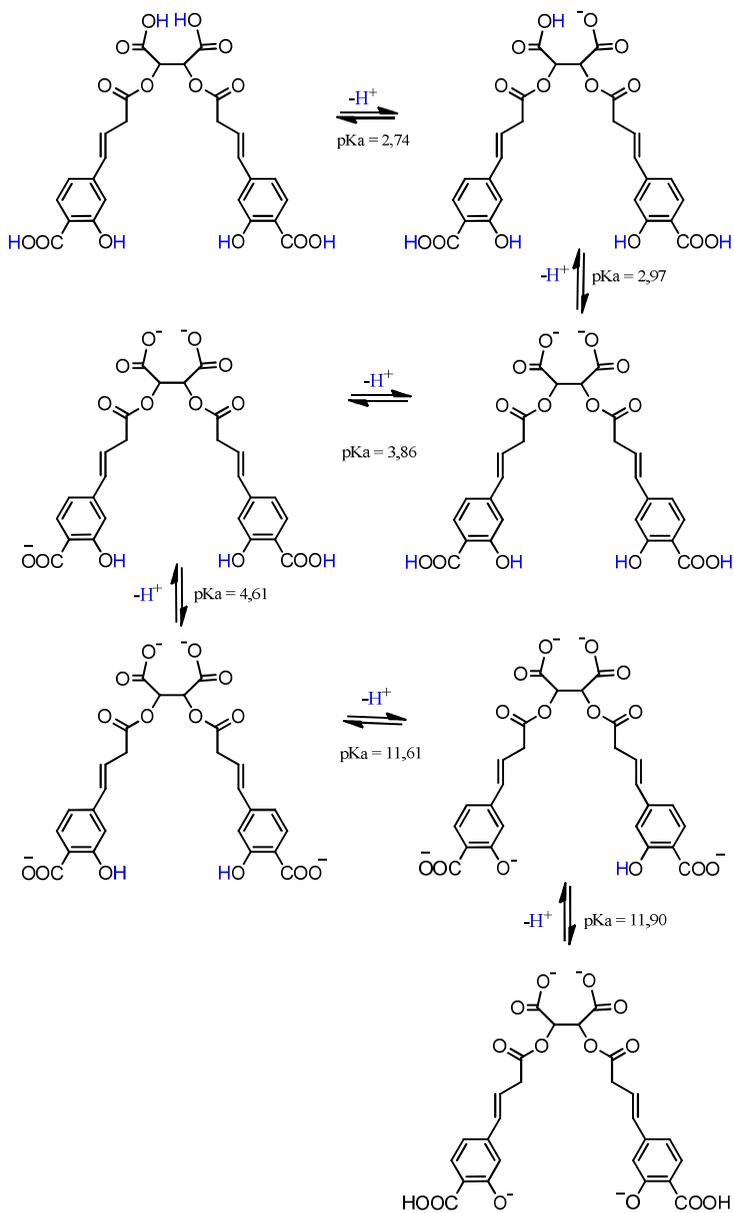
Continua

Continuação

Equilíbrio com Mg(II)	
$\text{Mg}^{2+} + \text{L} \rightleftharpoons \text{MgL}$	6,33 (0,65)
$\text{MgL} \rightleftharpoons \text{Mg(OH)L} + \text{H}^+$	Precipitou
$\text{MgL} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{MgHL}$	3,94 (0,59)
$\text{MgHL} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{MgH}_2\text{L}$	3,38 (0,80)
$\text{MgH}_2\text{L} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{MgH}_3\text{L}$	2,51 (0,81)

* valores em porcentagem

Um esquema propondo os equilíbrios envolvidos para o ligante CG-I-160 é proposto no Esquema 5. Com a titulação potenciométrica, verificou-se que em pH abaixo de 2,74 o ligante encontra-se na sua forma completamente protonada, H_6L . A partir de então o ligante perde seu primeiro próton do ácido carboxílico formando a espécie H_5L^- . Após pH 2,97 o segundo próton é abstraído e a espécie H_4L^{2-} é formada. Propõe-se que as primeiras desprotonações ocorram com os ácidos carboxílicos localizados na parte de cima da estrutura do ligante devido ao efeito retirador de elétrons das carbonilas adjacentes ao grupo ácido. Acima de pH 3,86 o próximo ácido carboxílico é desprotonado e, em seguida, o último ácido carboxílico perde o próton em pH 4,61 formando as espécies H_3L^{3-} e H_2L^{4-} respectivamente. Sob condições mais alcalinas, os outros dois grupos OH restantes são desprotonados, formando as espécies HL^{5-} em pH 12,61 e L^{6-} em pH 12,90.



Esquema 5. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-I-160.

3.6. Ligante GS-9137

As curvas de titulação potenciométrica para o ligante GS-9137 na ausência e presença do íon $Mg(II)$ são mostradas a seguir, na Figura 38. É possível constatar que ambas as curvas, apenas do ligante (em preto) e do ligante com o metal (em vermelho), coincidem em toda a faixa de pH, com apenas um leve deslocamento da linha vermelha em pH acima de 10. Esse comportamento sugere que o metal não está se coordenando ao ligante até pH 10 e, a partir de então, o deslocamento da linha vermelha indica que o complexo pode estar se formando.

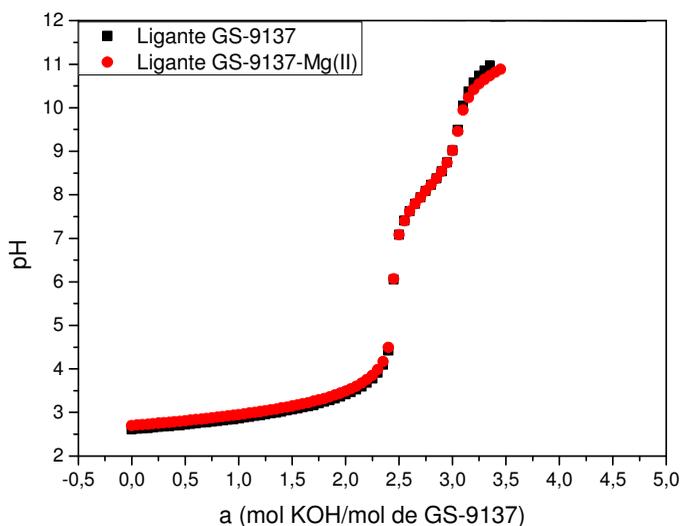


Figura 38. Curva de titulação direta do ligante GS-9137 na ausência e presença do íon $Mg(II)$. Em preto: 0,05 mmol de GS-9137; em vermelho: 0,05 mmol de GS-9137 e 0,05 mmol de $Mg(II)$.

Para elucidar se há alguma espécie do complexo GS-9137- $Mg(II)$ formada em pH alcalino, as curvas de distribuição das espécies foram plotadas e são apresentadas na Figura 39.

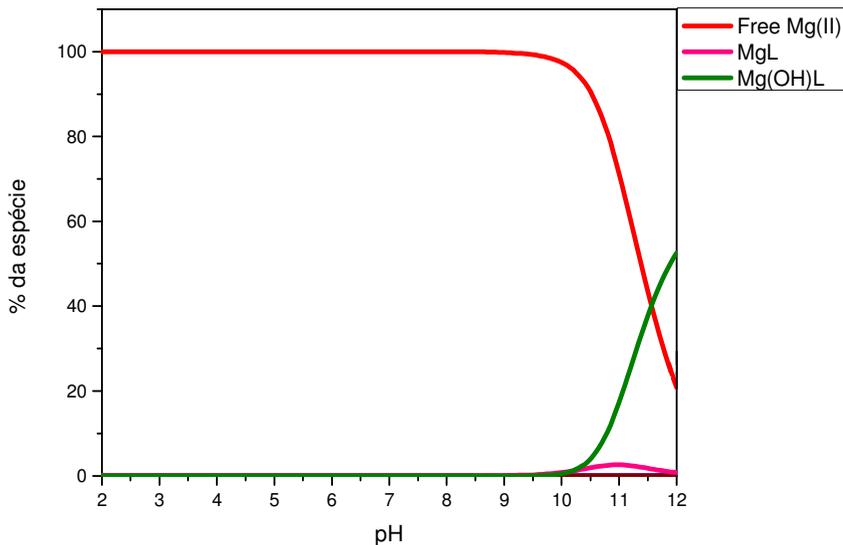


Figura 39. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema GS-9137-Mg(II).

O diagrama de distribuição das espécies corrobora com as curvas de titulação potenciométrica, evidenciando que o metal não está complexado com o ligante em toda a faixa ácida, neutra e parte da alcalina. Observa-se apenas a formação sutil da espécie MgL (em rosa), com um máximo de 5%, e da espécie monohidróxida Mg(OH) que surge a partir de pH 10,5 de modo mais expressivo.

As medidas de equilíbrio para o ligante com o íon Mn(II) também foram conduzidas. As curvas das titulações potenciométricas são mostradas na Figura 40.

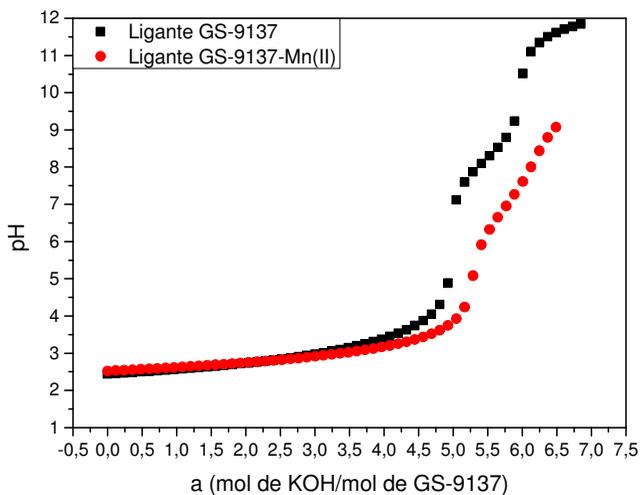


Figura 40. Curva de titulação direta do ligante GS-9137 na ausência e presença do íon Mn(II). Em preto: 0,05 mmol de GS-9137; em vermelho: 0,05 mmol de GS-9137 e 0,05 mmol de Mn(II).

Ao contrário do sistema com Mg(II), as curvas do ligante GS-9137 com o íon Mn(II) apresentam um deslocamento entre si, indicando a coordenação do metal ao ligante. Em $\text{pH} \approx 10$ houve a formação de precipitado e a titulação foi encerrada.

As espécies do ligante com o Mn(II) formadas em solução são mostradas na Figura 41.

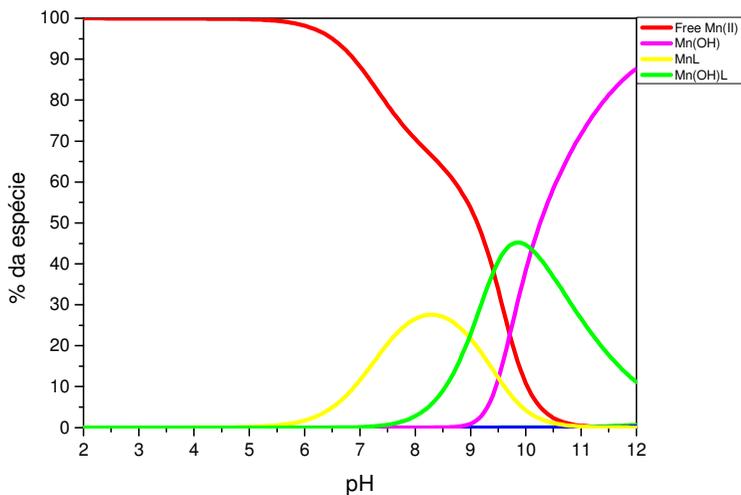


Figura 41. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema GS-9137-Mn(II).

O íon Mn(II) não se coordena bem ao ligante em toda a faixa ácida, neutra e levemente alcalina. Ainda que espécies como MnL e Mn(OH)L sejam formadas, estas não passam dos 45% em solução. O diagrama de espécies sugere que o metal encontra-se na forma hidrolisada em solução a partir de $\text{pH} \approx 10$, portanto, não está coordenado ao ligante.

A Tabela 6 mostra os valores de pKas calculados para o sistema GS-9137 e os íons Mg(II) e Mn(II).

Tabela 6. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas GS-9137, GS-9137-Mg(II) e GS-9137-Mn(II).

Equilíbrio apenas do ligante	LogK (DP)*
$\text{L} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HL}$	7,81 (0,61)
$\text{HL} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L}$	2,40 (0,60)

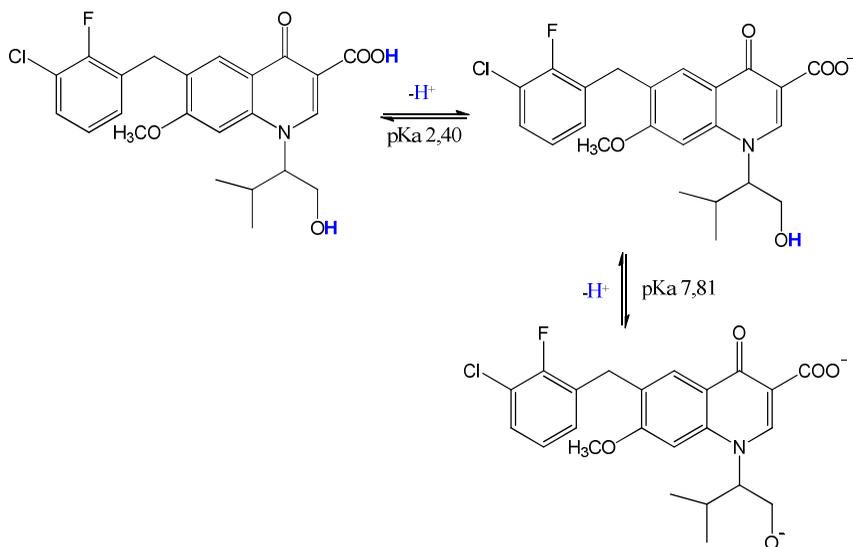
Continua

Continuação

Equilíbrio com Mg(II)	
$Mg^{2+} + L \rightleftharpoons MgL$	2,25 (0,86)
$MgL \rightleftharpoons Mg(OH)L + H^+$	-10,18 (0,70)
Equilíbrio com Mn(II)	
$Mn^{2+} + L \rightleftharpoons MnL$	4,26 (0,70)
$MnL \rightleftharpoons Mn(OH)L + H^+$	-9,00 (0,93)

* valores em porcentagem

Os equilíbrios que ocorrem em solução são propostos no Esquema 6. Em pH abaixo de 2,40 o ligante está totalmente protonado, na forma H_2L . Após este valor de pH o ácido carboxílico é desprotonado gerando a espécie HL^- . O último próton é abstraído da molécula em pH 7,81 e, assim, o ligante encontra-se totalmente desprotonado na forma L^{2-} .



Esquema 6. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante GS-9137.

3.7. Ligante CG-I-133A

Para o sistema CG-I-133A, Figura 42, observa-se na curva em preto que o ligante apresenta duas regiões tamponadas: a primeira referente aos grupos ácidos da molécula e a segunda, aos grupos NH da porção hidroxilamina. A literatura sustenta que a preferência em desprotonar o grupo NH e não OH deve-se ao fato de que após a desprotonação do NH a dupla ligação da carbonila fica deslocalizada, ao passo que se o próton fosse retirado do grupo OH a carga estaria localizada apenas sobre o oxigênio.⁷³ De fato, os valores de pKas calculados neste trabalho corroboram com os dados da literatura para o grupo NH da porção hidroxilamina, como é possível verificar na Tabela 7. Em pH pouco acima de 10 houve a formação de um leve precipitado em solução e, portanto, a titulação foi encerrada. Em vermelho destaca-se a curva de titulação para o sistema metálico. O deslocamento que se inicia em pH $\approx 3,5$ entre ambas as curvas evidencia a coordenação do íon Mg(II) ao ligante. Em pH próximo a 9 houve a formação de precipitado e a titulação foi cancelada.

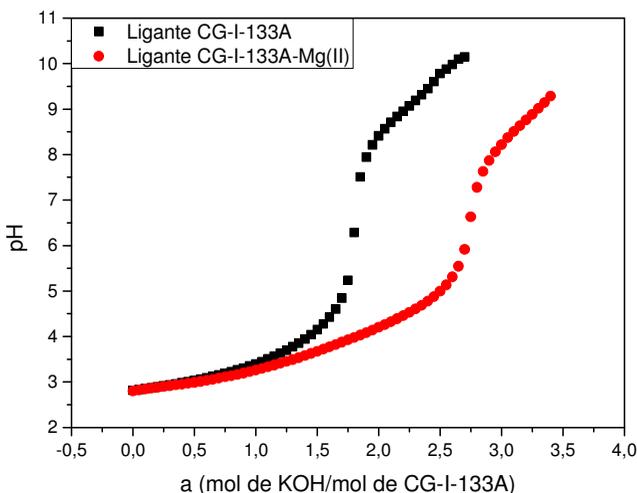


Figura 42. Curva de titulação direta do ligante CG-I-133A na ausência e presença do íon Mg(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-133A; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-133A e 0,05 mmol de Mg(II).

O diagrama de distribuição das espécies, Figura 43, mostra as espécies formadas em solução ao longo da faixa de pH. Ao analisá-lo, constata-se que a formação da espécie MgL é bem expressiva em pH 5,5 a 11,5 com um máximo de 100% em pH 7,5 a 9. Outras espécies como a monoprotonada MgHL e a monohidróxida Mg(OH)L também se formam, mas de modo menos acentuado, atingindo um máximo de 30% e 50% respectivamente. Os estudos com o íon Mn(II) e a titulação espectrofotométrica não foram conduzidos devido à falta de ligante.

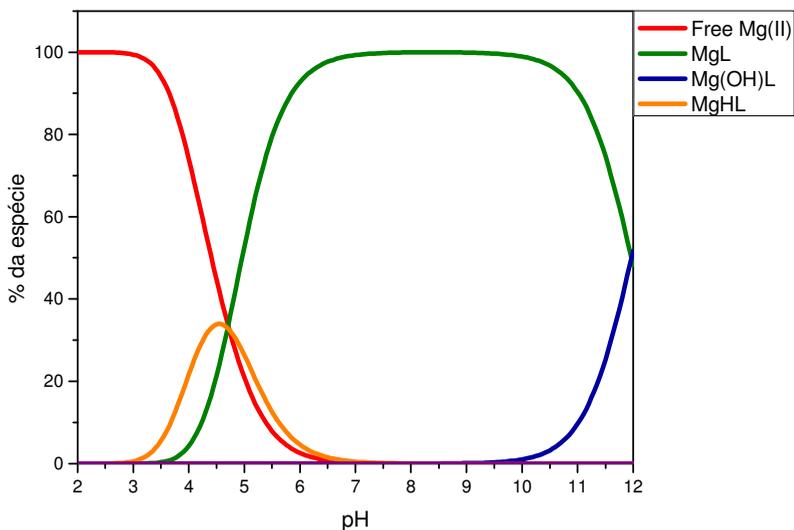


Figura 43. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-I-133A-Mg(II).

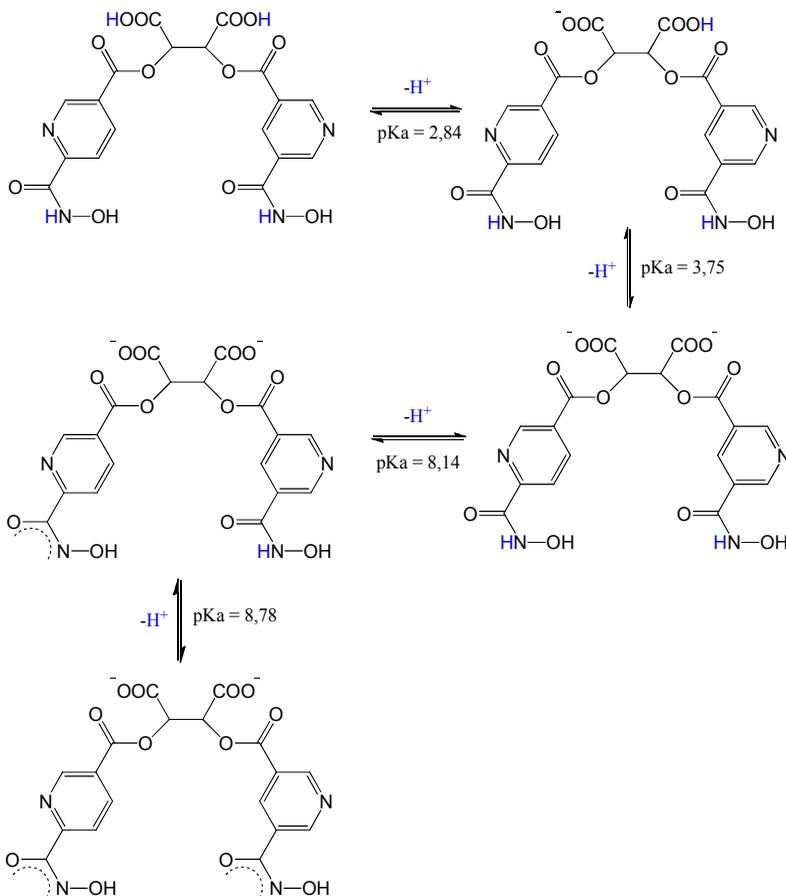
A Tabela 7 apresenta os valores de pKas encontrados para o sistema CG-I-133A na ausência e presença do íon metálico.

Tabela 7. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas CG-I-133A e CG-I-133A-Mg(II).

Equilíbrio apenas do ligante	LogK (DP)*
$L + H^+ \rightleftharpoons HL$	8,78 (0,60)
$HL + H^+ \rightleftharpoons H_2L$	8,14 (0,62)
$H_2L + H^+ \rightleftharpoons H_3L$	3,75 (0,99)
$H_3L + H^+ \rightleftharpoons H_4L$	2,84 (0,80)
Equilíbrio com Mg(II)	
$Mg^{2+} + L \rightleftharpoons MgL$	11,32 (0,73)
$MgL \rightleftharpoons Mg(OH)L + H^+$	Precipitou
$MgL + H^+ \rightleftharpoons MgHL$	4,7 (0,81)

* valores em porcentagem

Em seguida, o Esquema 7 propõe os equilíbrios envolvidos para o ligante CG-I-133A. Em pH abaixo de 2,84 o ligante encontra-se na sua forma completamente protonada, H_6L . Com o aumento do pH, o ligante perde os prótons dos ácidos carboxílicos, formando as espécies H_5L^- e, a partir de pH 3,75, a espécie H_4L^{2-} . Acima de pH 8,14 o primeiro grupo NH de uma das hidroxilaminas é desprotonado, gerando a espécie H_3L^{3-} , enquanto que acima de pH 8,78 outro grupo NH, referente à segunda porção hidroxilamina é desprotonado, formando a espécie H_2L^{4-} .



Esquema 7. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-I-133A.

3.8. Ligante CG-I135A

Abaixo seguem os estudos com o ligante CG-I-135A. A Figura 44 mostra as curvas de titulação potenciométrica do ligante na ausência e presença do íon Mg(II). A curva em preto, referente ao ligante apenas, apresenta duas regiões tamponadas: entre pH 2,5 e 5 referente aos grupos ácidos da molécula e entre pH 9 e 10 referente ao primeiro OH do grupo catecol e ao OH da porção hidroxilamina. Em pH $\approx 10,5$ a solução da cela apresentava-se turva, indicando a formação de

precipitado. A curva em vermelho, referente ao sistema com Mg(II) mostra-se deslocada da curva preta, indicando a complexação do íon Mg(II) com o ligante. Já em pH próximo a 8 a solução apresentava nitidamente a formação de precipitado.

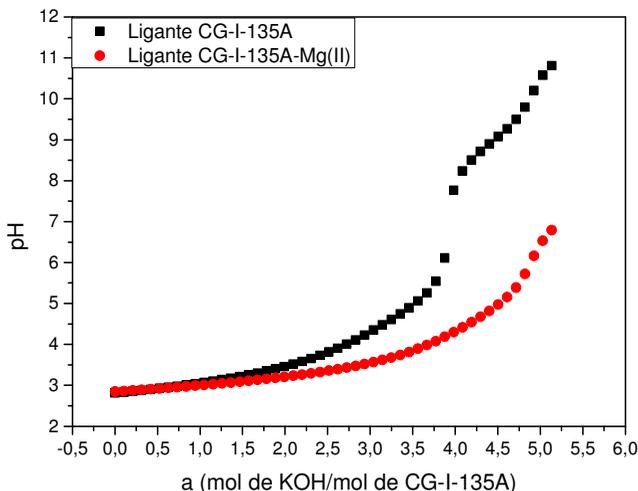


Figura 44. Curva de titulação direta do ligante CG-I-135A na ausência e presença do íon Mg(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-135A; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-135A e 0,05 mmol de Mg(II).

Com o diagrama de espécies determinado, Figura 45, observa-se que o metal livre decai à medida que novas espécies são formadas. Em pH ácido o complexo diprotonado predomina chegando a um pico cerca de 60% em pH 3,5. O complexo monoprotonado forma-se expressivamente acima dos 80% em pH 5,5 e a partir da região neutra à alcalina a espécie MgL é a predominante.

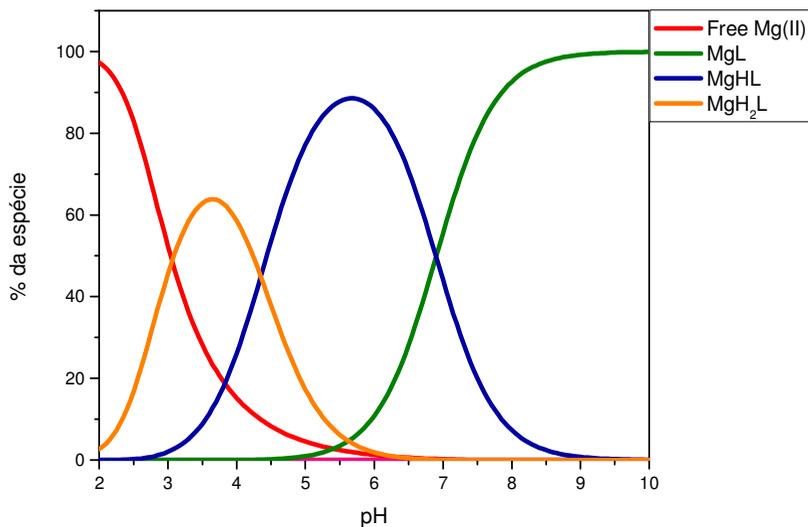


Figura 45. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-I-135A-Mg(II).

Para o sistema com o íon Mn(II), Figura 46, também houve a formação de precipitado, ocorrendo em $\text{pH} \approx 8,5$. O deslocamento entre as curvas é um indício de que o metal está complexando com o ligante.

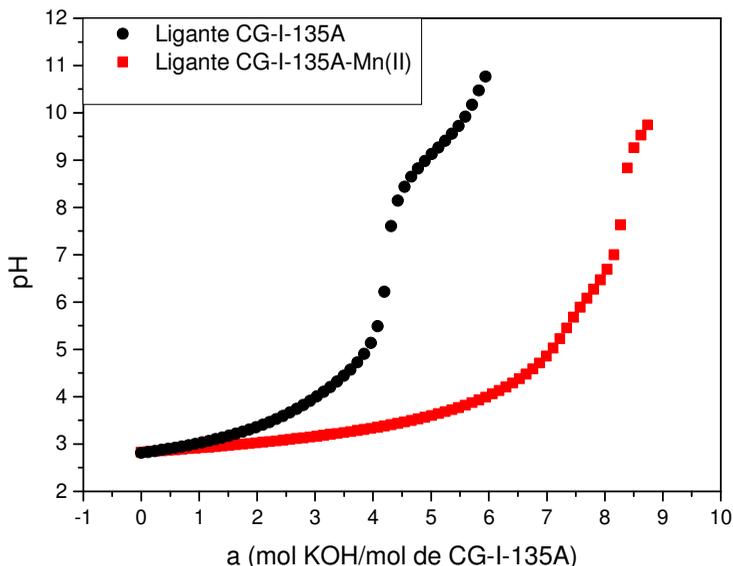


Figura 46. Curva de titulação direta do ligante CG-I-135A na ausência e presença do íon Mn(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-135A; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-135A e 0,05 mmol de Mn(II).

O manganês forma diversas espécies em solução, sendo a monoprotonada, a metal-ligante e a hidróxida as mais formadas. Em pH 4 o complexo MnHL encontra-se 100% presente em solução, enquanto que em pH 7,5 é a espécie MnL que atinge esta porcentagem. Na faixa alcalina o complexo Mn(OH)L predomina como é possível verificar na Figura 47.

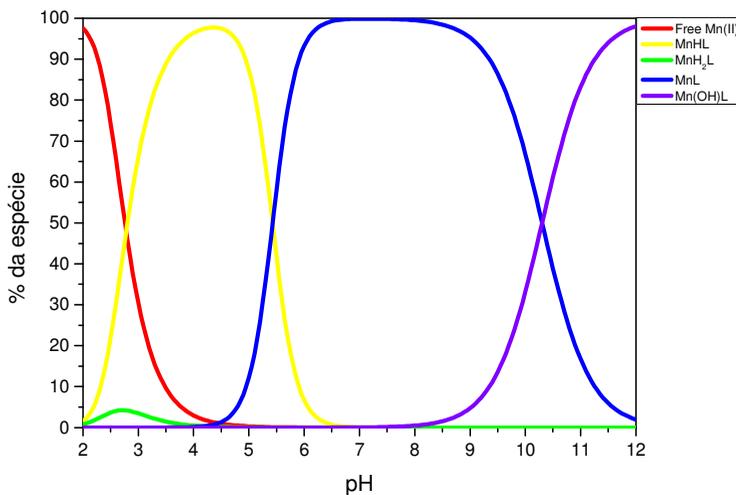


Figura 47. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-I-135A-Mn(II).

A seguir, a Tabela 8 mostra os valores de pKas determinados para os sistemas CG-I-135A, CG-I-135A-Mg(II) e CG-I-135A-Mn(II). Os estudos de espectroscopia para a determinação do último pKa, referente ao grupo OH do catecol não puderam ser conduzidos devido à falta de ligante.

Tabela 8. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas CG-I-135A, CG-I-135A-Mg(II) e CG-I-135A-Mn(II).

Equilíbrio apenas do ligante	LogK (DP)*
$L + H^+ \rightleftharpoons HL$	11,9 (0,87)
$HL + H^+ \rightleftharpoons H_2L$	8,61 (0,72)
$H_2L + H^+ \rightleftharpoons H_3L$	4,43 (0,70)
$H_3L + H^+ \rightleftharpoons H_4L$	3,08 (0,81)

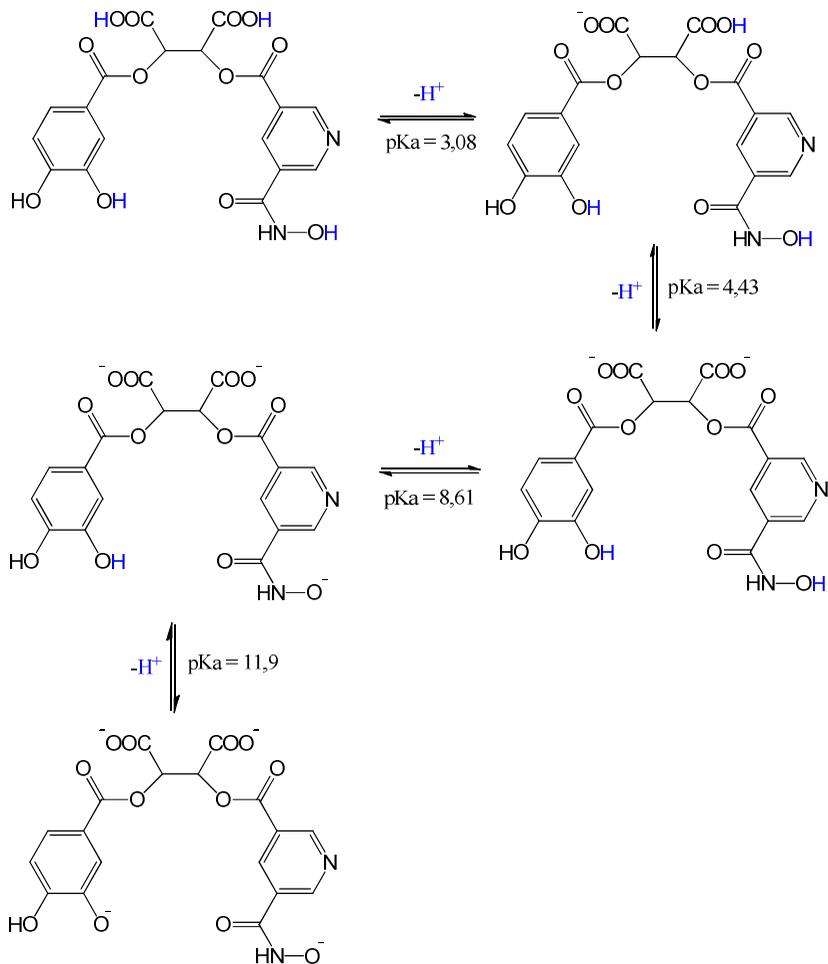
Continua

Continuação

Equilíbrio com Mg(II)	
$Mg^{2+} + L \rightleftharpoons MgL$	10,84 (0,94)
$MgL \rightleftharpoons Mg(OH)L + H^+$	Precipitou
$MgL + H^+ \rightleftharpoons MgHL$	6,91 (0,82)
$MgHL + H^+ \rightleftharpoons MgH_2L$	4,33 (0,59)
Equilíbrio com Mn(II)	
$Mn^{2+} + L \rightleftharpoons MnL$	9,56 (0,77)
$MnL \rightleftharpoons Mn(OH)L + H^+$	Precipitou
$MnL + H^+ \rightleftharpoons MnHL$	5,22 (0,90)
$MnHL + H^+ \rightleftharpoons MnH_2L$	3,72 (0,93)

* valores em porcentagem

O esquema 9 propõe os equilíbrios envolvidos para o ligante CG-I-135A.



Esquema 8. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-I-135A.

3.9. Ligante CG-I-139

Na Figura 48 o ligante CG-I-139 apresenta duas regiões tamponadas: em pH 2,5 a 4, referente aos grupos ácidos da molécula; em pH 9 a 10 referente aos grupos OH das porções hidroxilamina e pirogalol. A titulação com o íon $Mg(II)$ foi conduzida e, ao compará-la

com a curva da titulação apenas do ligante, nota-se o deslocamento entre as curvas, indicando a coordenação do íon $Mg(II)$ ao ligante. Em pH próximo a 8,5 já havia a formação de precipitado e a titulação foi encerrada.

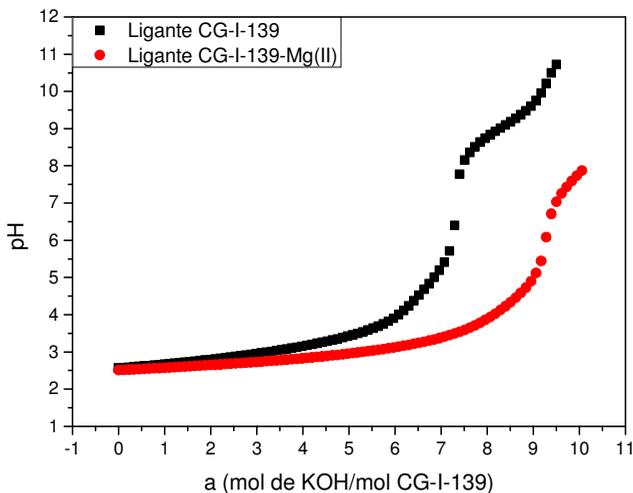


Figura 48. Curva de titulação direta do ligante CG-I-139 na ausência e presença do íon $Mg(II)$. Em preto: 0,05 mmol de CG-I-139; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-139 e 0,05 mmol de $Mg(II)$.

As curvas de distribuição das espécies, Figura 49, mostram o $Mg(II)$ livre decaindo ao passo que os complexos mono, di e triprotonados são formados em toda a faixa ácida, neutra e levemente alcalina, bem como a espécie metal-ligante que predomina em pH acima de 8,5.

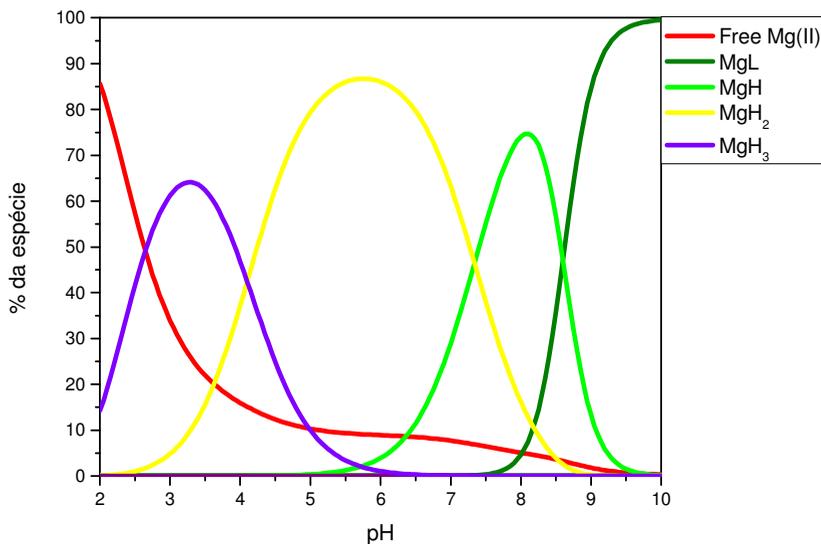


Figura 49. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-I-139-Mg(II).

A Tabela 9 mostra os valores de pKas calculados para os sistemas CG-I-139 e CG-I-139-Mg(II). Ambos os estudos espectroscópicos e com o íon Mn(II) não foram conduzidos devido à falta de ligante.

Tabela 9. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas CG-I-139 e CG-I-139-Mg(II).

Equilíbrio apenas do ligante	LogK (DP)*
$L + H^+ \rightleftharpoons HL$	9,23 (0,68)
$HL + H^+ \rightleftharpoons H_2L$	8,09 (0,95)
$H_2L + H^+ \rightleftharpoons H_3L$	4,72 (0,94)
$H_3L + H^+ \rightleftharpoons H_4L$	3,5 (0,94)

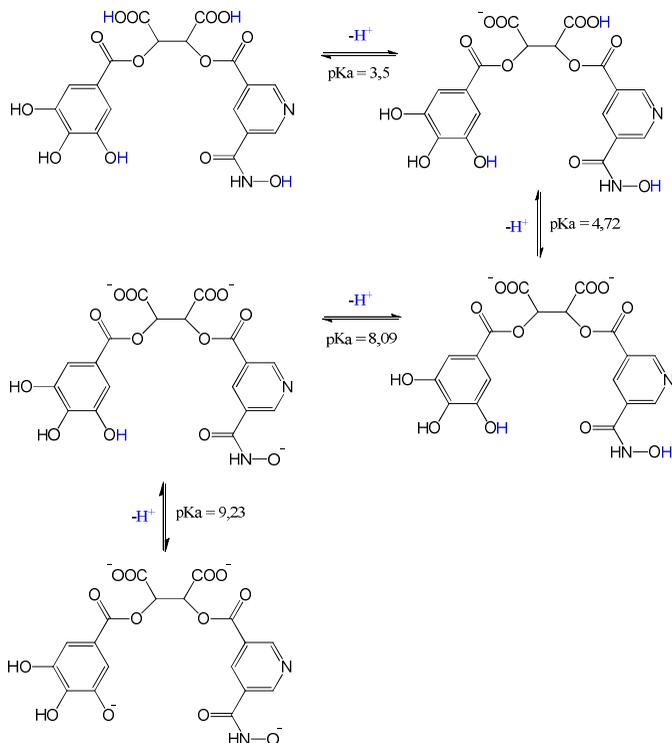
Continua

Continuação

Equilíbrio com Mg(II)	
$\text{Mg}^{2+} + \text{L} \rightleftharpoons \text{MgL}$	8,41 (0,67)
$\text{MgL} \rightleftharpoons \text{Mg(OH)L} + \text{H}^+$	Precipitou
$\text{MgL} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{MgHL}$	6,55 (0,62)
$\text{MgHL} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{MgH}_2\text{L}$	7,33 (0,59)
$\text{MgH}_2\text{L} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{MgH}_3\text{L}$	4,11 (0,83)

* valores em porcentagem

Abaixo, o Esquema 9 propõe os equilíbrios envolvidos no ligante CG-I-139.



Esquema 9. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-I-139.

3.10. Ligante CG-I-154

Por fim, o ligante CG-I-154 teve seus estudos conduzidos, tanto na ausência como na presença do íon metálico. A seguir, na Figura 50, as curvas de titulação potenciométrica para ambos os sistemas são mostradas. A linha em preto remete à titulação apenas do ligante e apresenta uma região tamponada bem prolongada, de pH 2,5 a 4,5, referente aos grupos ácidos da molécula, enquanto que outra região tamponada começa a formar-se em pH pouco acima de 11. No entanto, para evitar leituras alteradas devido ao erro alcalino, a titulação foi encerrada em pH 11,5.

A curva em vermelho, referente ao sistema contendo o íon Mg(II) apresenta-se deslocada em relação à curva em preto, o que sugere a complexação do íon ao ligante. Em pH 9,5 já havia a clara formação de precipitado e a titulação foi cancelada.

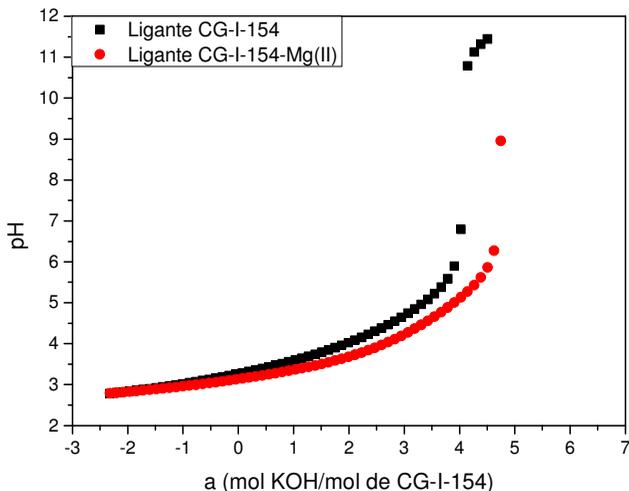


Figura 50. Curva de titulação direta do ligante CG-I-154 na ausência e presença do íon Mg(II). Em preto: 0,05 mmol de CG-I-154; em vermelho: 0,05 mmol de CG-I-154 e 0,05 mmol de Mg(II).

Para verificar as espécies formadas em solução, o diagrama de distribuição das espécies foi plotado e a Figura 51 mostra as curvas referentes a cada sistema em solução. Em pH ácido o metal encontra-se complexado com o ligante formando a espécie MgH_3L . Em pH 3 há o pico de 60% de formação da espécie diprotonada enquanto que em pH 4 complexo monoprotonado está cerca de 30% em solução. A espécie que predomina na longa faixa acima de 4 em diante é a MgL , chegando Ao máximo de formação em pH 7.

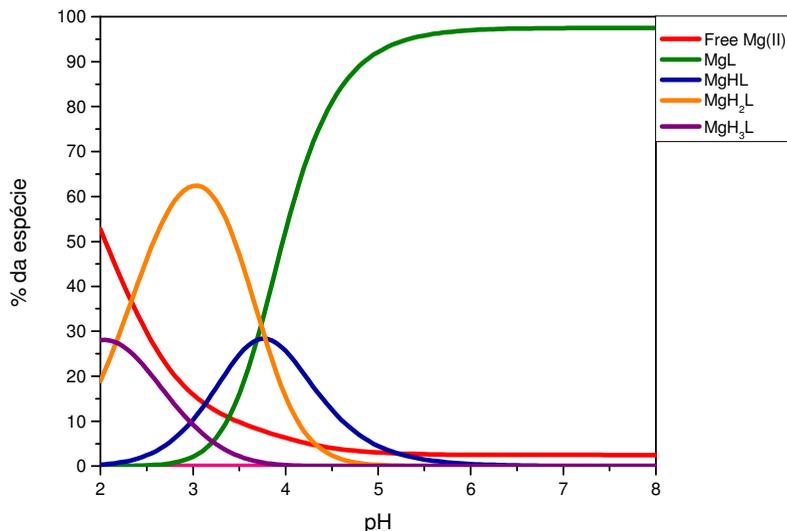


Figura 51. Diagrama de distribuição das espécies formadas em solução, em função do pH, para o sistema CG-I-154-Mg(II).

A Tabela 10 mostra os equilíbrios envolvidos no sistema CG-I-154 e CG-I-154-Mg(II). Os estudos envolvendo o íon Mn(II), bem como os estudos espectroscópicos não foram conduzidos devido à falta de ligante.

Tabela 10. Logaritmos das constantes de estabilidade das espécies formadas para os sistemas CG-I-154 e CG-I-154-Mg(II).

Equilíbrio apenas do ligante	LogK (DP)*
$L + H^+ \rightleftharpoons HL$	4,73 (0,61)
$HL + H^+ \rightleftharpoons H_2L$	3,91 (0,95)
$H_2L + H^+ \rightleftharpoons H_3L$	3,20 (0,73)
$H_3L + H^+ \rightleftharpoons H_4L$	2,88 (0,85)

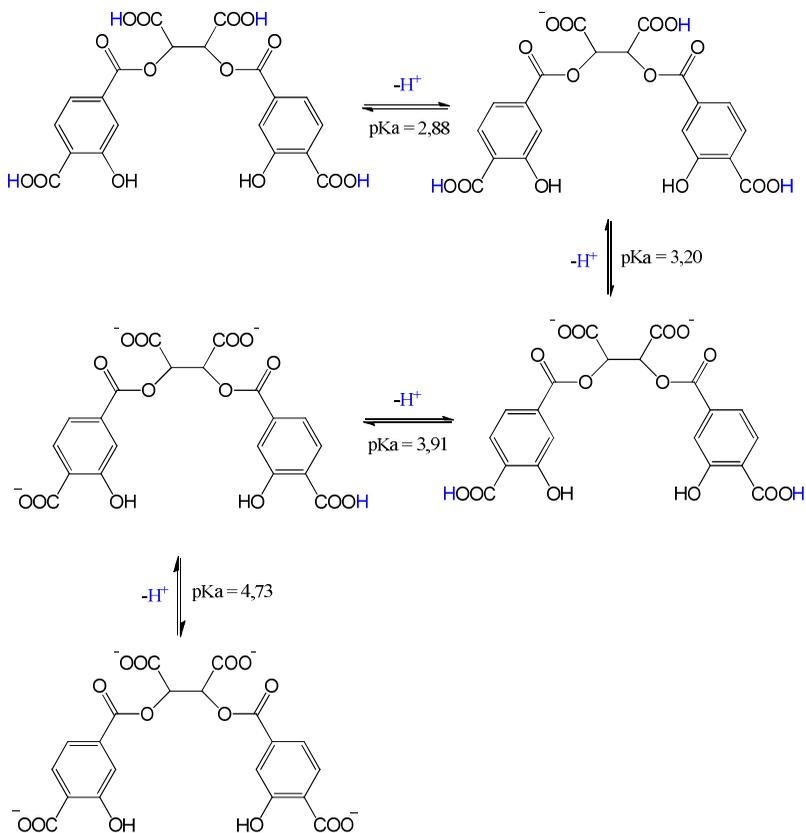
Continua

Continuação

Equilíbrio com Mg(II)	
$\text{Mg}^{2+} + \text{L} \rightleftharpoons \text{MgL}$	6,47 (0,72)
$\text{MgL} \rightleftharpoons \text{Mg(OH)L} + \text{H}^+$	Precipitou
$\text{MgL} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{MgHL}$	3,78 (0,93)
$\text{MgHL} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{MgH}_2\text{L}$	3,60 (0,66)
$\text{MgH}_2\text{L} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{MgH}_3\text{L}$	2,18 (0,86)

* valores em porcentagem

No Esquema 10 foram propostos os equilíbrios envolvidos no sistema CG-I-154.



Esquema 10. Proposta dos equilíbrios observados para o ligante CG-I-154.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho estudou-se a coordenação de íons Mg(II) e Mn(II) com dez ligantes sintéticos promissores de serem inibidores da enzima integrase: 5-CITEP, CG-I-83D, CG-I-160, CG-II-38B, CG-II-51, CG-II-133A, CG-II-135A, GS-9137, CG-I-154 e CG-I-139

Os equilíbrios das espécies formadas em diferentes faixas de pH foram estudados e caracterizados por titulação potenciométrica e, com alguns ligantes, por titulação espectrofotométrica, sendo possível determinar os pKas de cada ligante e a formação dos complexos metálicos.

Para o sistema com o íon Mg(II), ligantes como CG-I-83D, CG-I-160, CG-I-133A, CG-I-135A, CG-I-139 e CG-I-154 apresentaram grande afinidade com o metal, formando diferentes espécies do complexo metálico ao longo da faixa de pH, especialmente em pH neutro. Desta forma, tais ligantes podem, potencialmente, ser promissores inibidores da integrase, quelando-se com o íon Mg(II) presente no sítio ativo da enzima.

Os estudos com o íon Mn(II) revelaram que ligantes como CG-I-83D, CG-II-51, 5CITEP, CG-II-38B e CG-I-135A formam complexos com o metal em diferentes faixas de pH, inclusive em pH biológico. Ainda que os ligantes que tiveram ambos os estudos conduzidos (tanto com o íon Mg(II) quanto com o íon Mn(II)) complexem bem o Mg(II), a complexação com o Mn(II) mostrou-se mais forte, como esperado para um metal de transição. Portanto, para fins de estudo biológico *in vitro*, espera-se que os ligantes CG-I-83D, CG-II-51, 5CITEP, CG-II-38B e CG-I-135A sejam capazes de formar complexos em grande quantidade e fortemente quelados ao íon Mn(II) em pH biológico.

O ligante GS-9137 não formou expressivas quantidades de complexos com ambos os íons Mg(II) e Mn(II).

Futuros estudos biológicos com os dez ligantes poderão fornecer informações sobre a importância da complexação do centro bimetálico de Mg(II) da integrase no mecanismo de ação destes possíveis inibidores. E a complexação com o íon Mn(II) pode elucidar a participação destes complexos nos estudos *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COFFIN J., HAASE A., LEVY J. A., MONTAGNIER L., OROSZLAN S., TEICH N. *et al.* What to call the AIDS virus?. **Nature**, v. 321, p. 10, 1986.
2. COFFIN J., HAASE A., LEVY JA, MONTAGNIER L, OROSZLAN S, TEICH N. *et al.* Human immunodeficiency viruses. **Science**, v. 232, p. 697, 1986.
3. UNAIDS, **AIDS EPIDEMIC UPDATE**. Disponível em: <<http://www.unaids.org>>, acesso em setembro de 2014.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Global Summary of the AIDS Epidemic**. Disponível em: <http://www.who.int/hiv/data/epi_core_dec2014.png?ua=1>, acesso em setembro de 2014.
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Programa Nacional de DST e AIDS: Boletim Epidemiológico-Aids e DST**. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55559/_p_boletim_2013_internet_pdf_p__51315.pdf>, acesso em setembro de 2014.
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Direitos Fundamentais da Pessoa Portadora do Vírus HIV**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/direitos-fundamentais>>, acesso em setembro de 2014.
7. CARVALHO, L. L. **Modelagem molecular de uma série de compostos inibidores da enzima integrase do vírus HIV-1**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
8. VAISHNAV, Y. N.; WONG-STALL, F. Proteoglycans: Structures and Interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 577. 1991.
9. RICHMAN D. D. Principles of HIV resistance testing and overview of assay performance. **Antiviral Therapy Journal**; v. 5, p. 27, 2000.
10. HORWITZ JP, CHUA J., NOEL M., NUCLEOSIDES V. The monomesylates of 1-(2'-deoxy- β -D-lyxofuranosyl) thymine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 29, p. 2076 1964
11. DE SOUZA, M. V. N.; DE ALMEIDA, M. V. Fuzeon, o primeiro medicamento de uma nova classe anti-HIV denominada inibidores de fusão. **Química Nova**, v. 26, p. 366, 2003.
12. JUNIOR, C. O. R. Síntese de candidatos a novos inibidores da enzima HIV-integrase. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Juíz de Fora, 2010.

13. DE MELO, E. B.; BRUNI, A. T.; FERREIRA, M. M. C. Inibidores da HIV-integrase: potencial abordagem farmacológica para o tratamento da AIDS **Química Nova**, v. 29, p. 555, 2006.
14. POMMIER, Y.; DUBEY, S.; SATYANARAYANA, Y. D.; LAVANIA, H. Development of integrase inhibitors for treatment of AIDS: an overview. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 1159, 2007.
15. POMMIER, Y.; JOHNSON A., A.; MARCHAND, C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. **Nature**, v. 4, p. 236, 2005.
16. CRAIGIE, R.; WANG J.; LING H.; YANG W. Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. **The EMBO Journal**, v. 20, p. 7333, 2001.
17. MIKOL, V.; CLÉMENT-MELLA, C.; MAIGNAN, S.; GUILLOTEAU, J. P., ZHOU-LIU, Q. Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 8233, 2000.
18. CHIU T. K., DAVIES D. R., Structure and function of HIV-1 integrase. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 965, 2004.
19. YOUNG, S. D. Advances in Antiviral Drug Design. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 4, p. 402, 2001.
20. THOMAS, M.; BRADY, L. HIV integrase: a target for AIDS therapeutics. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 167, 1997.
21. KAWASUJI, T; FUJI, M; YOSHINAGA, T; SATO, A; FUJIWARAB, T; KIYAMA, R. A platform for designing HIV integrase inhibitors. Part 2: a two-metal binding model as a potential mechanism of HIV integrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 8420, 2006.
22. ROBINSON, W. E.; CORDEIRO, M.; MITCHELL, W. M.; REINCKE, M. G.; ABDEM-MALEK, S.; JIA, Q.; CHOW, S. A. Dicaffeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV) integrase: Inhibition of the core catalytic domain of HIV integrase. **Molecular Pharmacology**, v. 50, p. 846, 1996.
23. POMMIER, Y.; MARCHAND, C.; NEAMATI, N. Retroviral integrase inhibitors year 2000: update and perspective. **Antiviral Research**, v. 47, p. 139, 2000.
24. KIM, S. N.; LEE, J. Y.; KIM, H. J.; SHIN, C.; PARK, H.; LEE, Y. S. Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of caffeoylglucosides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 1879, 2000.

25. HWANG, D. J.; KIM, S. N.; CHOI, J. H.; LEE, Y. S. Dicafeoyl- or digalloyl pyrrolidine and furan derivatives as HIV integrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, p. 1429, 2001.
26. PLUYMERS, W.; NEAMATI, N.; PANNECOUQUE, C.; FIKKERT, V.; MARCHAND, C.; BURKE JR, T. R.; POMMIER, Y.; SCHOLS, D.; DE CLERCQ, E.; DEBYSER, Z.; WITVROUW, M. Viral entry as the primary target for the anti-HIV activity of chicoric acid and its tetra-acetyl esters. **Molecular Pharmacology**, v. 58, p. 641, 2000.
27. LEE, J. Y.; YONN, K. J.; LEE, Y. S. Catechol-substituted L-chicoric acid analogues as HIV integrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 4331, 2003.
28. COSTI, R.; DISANTO, R.; ARTICO, M.; ROUX, A.; RAGNO, R.; MASSA, S.; TRAMONTANI, E.; LA COLLA, M.; LODDO, R.; MARONGUI, M. E.; PANI, A.; LA COLLA, P. 6-Aryl-2, 4-dioxo-5-hexenoic acids, novel integrase inhibitors active against HIV-1 multiplication in cell-based assays. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 1745, 2004
29. XU, Y. W.; ZHAO, G. S.; SHIN, C. G.; ZANG, H. C.; LEE, C. K.; LEE, Y. S. Caffeoyl naphthalenesulfonamide derivatives as HIV integrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 3589, 2003
30. GOLDGUR, Y.; DYDA, F.; HICKMAN, A. A.; JENKINS, T. M.; CRAIGIE, R.; DAVIES, D. R. Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: Na active site that binds magnesium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 9150, 1998.
31. FUJISHITA, T.; YOSHINAGA, T. WO Patent **9950245**, 1999.
32. KAWASUJI, T.; YOSHINAGA, T. WO Patent **2001017968**, 2001.
33. SELNICK, H. G.; HAZUDA, D. J.; EGBERTSON, M.; GUARE, J.P., JR.; WAI, J. S.; YOUNG, S. D.; CLARK, D. L.; MEDINA, J.C. WO Patent **9962513**, 1999.
34. YOUNG, S. D.; EGBERTSON, M.; PAYNE, L. S.; WAI, J. S.; FISHER, T. E.; GUARE, J. P., JR.; EMBREY, M. W.; TRAN, L.; ZHUANG, L.; VACCA, J. P.; LANGFORD, M.; MELAMED, J.; CLARK, D. L.; MEDINA, J. C.; JAEN, J. WO Patent **9962520**, 1999.
35. FUJISHITA, T.; YOSHINAGA, T.; SATO, A. WO Patent **0039086**, 2000.
36. NAIR, V.; CHI, G.; PTAK, R.; NEAMATI, N. J. HIV Integrase Inhibitors with Nucleobase Scaffolds: Discovery of a Highly Potent anti-HIV Agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 445, 2006.
37. ZHUANG, L.; WAI, J. S.; VACCA, J. P. Desing and synthesis of 8-Hydroxy-[1,6]Naphthyridines as novel inhibitors of HIV-1 integrase in

- vitro and in infected cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 453, 2003.
38. EMBREY, M. W.; HAZUDA, D. J.; ZHUANG, L.; VACCA, J. P. A series of 5-(5,6)-dihydrouracil substituted 8-hydroxy-[1,6]naphthyridine-7-carboxylic acid 4-fluorobenzylamide inhibitors of HIV-1 integrase and viral replication in cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 4550, 2005.
39. GUARE, J. P.; WAI, J. S.; GOMEZ, R. P.; ANTHONY, N. J.; JOLLY, S. M.; VACCA, J. P.; HAZUDA, J. D. A series of 5-aminosubstituted 4-fluorobenzyl-8-hydroxy-[1,6]naphthyridine-7-carboxamide HIV-1 integrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2900, 2006.
40. SUMMA, V.; PETROCCHI, A.; MATASSA, V. G.; GARDELLI, C.; MURAGLIA, E.; ROWLEY, M.; PAZ, O. G.; LAUFER, R.; MONTEAGUDO, E.; PACE, P. 4,5-dihydroxypyrimidine Carboxamides and *N*-alkyl-5-hydroxypyridinone carboxamides are potent, selective HIV integrase inhibitors with good pharmacokinetic profiles in preclinical species. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 6646, 2006.
41. PACE, P.; GOMEZ, R. P.; ANTHONY, N. J.; JOLLY, S. M.; VACCA, J. P.; HAZUDA, J. D. Dihydroxypyrimidine-4-carboxamides as novel potent and selective HIV integrase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 2225, 2007.
42. GARDELLI, C.; GOMEZ, R. P.; ANTHONY, N. J.; JOLLY, S. M.; VACCA, J. P.; HAZUDA, J. D. Discovery and synthesis of HIV integrase inhibitors: development of potent and orally bioavailable *N*-methyl pyrimidones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 4953, 2007.
43. SUMMA, V. *et al.* Development of 2-*t*-butyl-*N*-methyl pyrimidones as potent inhibitors of HIV integrase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 2709, 2008.
44. SUMMA, V.; EMBREY, M. W.; HAZUDA, D. J.; ZHUANG, L.; VACCA, J. P. Discovery of raltegravir, a potent, selective orally bioavailable HIV-1 inhibitor for the treatment of HIV-AIDS infection. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 5843, 2008.
45. DUBEY, S.; SATYANARAYANA, Y. D.; LAVANIA, H.; Development of integrase inhibitors for treatment of AIDS: An overview. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 1159, 2007.

46. HWANG, D. J.; KIM, S. N.; CHOI, J. H.; LEE, Y. S. Dicafeoyl- or digalloyl pyrrolidine and furan derivatives as HIV integrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, p. 1429, 2001.
47. KING, P. J.; MA, G.; MIAO, W.; JIA, Q.; MCDUGALL, B. R.; REINECKE, M. G.; CORNELL, C.; KUAN, J.; KIM, T. R.; ROBINSON JR, W. E.; J. Structure-activity relationships: analogues of the dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 497, 1999.
48. LIN, Z.; NEAMATI, N.; ZHAO, H.; KIRYU, Y.; TURPIN, J. A.; ABERHAM, C.; STREBEL, K.; KOHN, K.; WITVROUW, M.; PANNECOUQUE, C.; DEBYSER, Z.; CLERCQ, E. D.; RICE, W. G.; POMMIER, Y.; BURKE JR, T. R. Chicoric acid analogues as HIV-1 integrase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 1401, 1999.
49. MAURIN, C.; BAILLY, F.; MBEMBA, G.; MOUSCADET, G. F.; COTELLE, P. Design, synthesis, and anti-integrase activity of catechol-DKA hybrids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 2978, 2006.
50. CHARVAT, T. T.; LEE, D. J.; ROBINSON, W. E.; CHAMBERLIN, A. R. Design, synthesis, and biological evaluation of chicoric acid analogs as inhibitors of HIV-1 integrase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 4552, 2006.
51. PEÇANHA, E. P.; ANTUNES, O. A. C.; TAMURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Química Nova**, v. 25, p. 1108, 2002.
52. ENGELMAN A., CRAIGIE R. Efficient magnesium-dependent human immunodeficiency virus type 1 integrase activity. **Journal Virology**, v. 69, p. 5908, 1995.
53. DE MELO, E. B.; BRUNI, A. T.; FERREIRA, M. M. C. Inibidores da HIV-integrase: potencial abordagem farmacológica para o tratamento da AIDS. **Química Nova**, v. 29, p. 555, 2006.
54. KIM, S. N.; LEE, J. Y.; KIM, H. J.; SHIN, C.; PARK, H.; LEE, Y. S. . Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of cafeoylglucosides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 1879, 2000.
55. PLUYMERS, W.; NEAMATI, N.; PANNECOUQUE, C.; FIKKERT, V.; MARCHAND, C.; BURKE JR, T. R.; POMMIER, Y.; SCHOLS, D.; DE CLERCQ, E.; DEBYSER, Z.; WITVROUW, M. Viral entry as the primary target for the anti-HIV activity of chicoric acid and its tetra-acetyl esters. **Molecular Pharmacology**, v. 58, p. 641, 2000.

56. LEE, J. Y.; YONN, K. J.; LEE, Y. S. Catechol-substituted L-chicoric acid analogues as HIV integrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 4331, 2003.
57. COSTI, R.; DISANTO, R.; ARTICO, M.; ROUX, A.; RAGNO, R.; MASSA, S.; TRAMONTANI, E.; LA COLLA, M.; LODDO, R.; MARONGUI, M. E.; PANI, A.; LA COLLA, P. 6-aryl-2,4-dioxo-5-hexenoic acids, novel integrase inhibitors active against HIV-1 multiplication in cell-based assays. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 1745, 2004.
58. XU, Y. W.; ZHAO, G. S.; SHIN, C. G.; ZANG, H. C.; LEE, C. K.; LEE, Y. S. Caffeoyl naphthalenesulfonamide derivatives as HIV integrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 3589, 2003.
59. SEFKOW, M.; First Efficient Synthesis of Chlorogenic Acid. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2001, p. 1137, 2001.
60. SOTRIFER, C. A.; NI, H.; MCCOMMON, J. A. Active site binding modes of HIV-1 integrase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 4109, 2000.
61. KING, P. J.; LEE, D. J.; REINKE, R. A.; VICTORIA, J. G.; BEALE, K.; ROBINSON JR, W. E. Human immunodeficiency virus type-1 integrase containing a glycine to serine mutation at position 140 is attenuated for catalysis and resistant to integrase inhibitors. **Virology**, v. 306, p. 147, 2003.
62. LEE, D. J., ROBINSON JR., W. E. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase: resistance to diketo acid integrase inhibitors impairs HIV-1 replication and integration and confers cross-resistance to L-chicoric acid. **Virology**, v. 78, p. 5835, 2004.
63. CARNAT, A., HEITZ, A., FRAISSE, D., CARNAT, A. P., LAMAISON, J. P. Major dicaffeoylquinic acids from *Artemisia vulgaris*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 587, 2000.
64. MARIA, C. A. B.; TRUGO, L. C.; MIRANDA, L. S. M. The Content of Individual Caffeoylquinic Acids in Edible Vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 12, p. 289, 1999.
65. Li, Y.; BUT, P. P. H.; OOI, V. E. C. Antiviral activity and mode of action of caffeoylquinic acids from *Schefflera heptaphylla* (L.) Fordin **Antiviral Research**, v. 68, p. 1, 2005.
66. SEFKOW, M.; KELLING, A.; SCHILDE, U. First Efficient Syntheses of 1-, 4 and 5-Caffeoylquinic Acid. **European Journal of Chemistry**, v. 2001, p. 2735, 2001.
67. BIEDERMANN, W.; SCHWARZENBACH, G.; *Chimia* (Switz.), v.2, p.1. 1948.

68. SCHWARZENBACH, G., *Komplexon-Methoden*, Siegfried and Co., Zofingen, 1948.
69. MARTELL, A. E., MOTEKAITIS, R. J. *Determination and Use of Stability Constants*. 2ed., New York. VCH Publishers. 1992.
70. MOTEKAITIS, R. J.; MARTELL, A. E.; BEST – A new program for rigorous calculation of equilibrium parameters of complex multicomponent systems, **Canadian Journal of Chemistry**, v. 82, p.299-308, 1985.
71. SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER F.J.; CROUCH, S.R., *Fundamentos de Química Analítica*, Tradução da 8ª edição Norte-Americana, Thomson Learning, São Paulo, p. 1124. 2006.
72. SCHWEIGERT, N., HUNZIKER, R., ESCHER, B.I., AND EGGEN, R. I. L. The acute toxicity of (chloro-) catechol and (chloro-) catechol/copper combinations in *Escherichia coli* corresponds to the membrane toxicity of these compounds. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 239, 2001.
73. SERJEANT, E. P., AND DEMPSEY, B., *Ionization Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, **Pergamon, Oxford**, 1979.
74. (a) K. K. GHOSH, P. TAMRAKAR, S. K. RAJPUT, **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, p. 3053, 1999. (b) K. K. Ghosh and P. Tamrakar, **Indian Journal of Chemistry**, v. 40, p. 524, 2001.