

M. HELENA MENDONÇA DIAS
J. J. R. FRAÚSTO DA SILVA
A. V. XAVIER

CENTRO DE QUÍMICA ESTRUTURAL
Complexo Interdisciplinar
IST, Av. Rovisco Pais
1000 Lisboa — Portugal



COMPLEXOS METÁLICOS DAS TETRACICLINAS

IV — Envolvimento do grupo 4 — Dimetilamónio na coordenação a diferentes iões

Estudos potenciométricos com iodeto de 4-metiltetraciclina, onde a possibilidade de coordenação do azoto em C₄ foi suprimida, comparados com os resultados anteriores para outros análogos da família da tetraciclina, mostram que:

a) Os metais de transição formam predominantemente complexos do tipo $MHL.(H_2O)_x$, sem envolvimento do azoto C₄, enquanto os metais alcalino-terrosos, e (provavelmente) o Mn^{2+} podem interagir com esse átomo formando espécies do tipo MHL e ML.

b) As constantes de estabilidade do iodeto de 4-metil-tetraciclina são apresentadas pela primeira vez.

As constantes anteriormente publicadas para os complexos ML com os metais de transição referem-se a espécies do tipo MHL.OH, que podem dar origem a polímeros, particularmente a espécies diméricas.

Estudos de RMN do mesmo ligando e de tetraciclina, quer livres, quer na presença de iões diamagnéticos (Mg^{2+} , Ca^{2+} , La^{3+} , Sm^{3+}), suportam a hipótese do envolvimento do azoto em C₄ na coordenação a esses iões metálicos, para razões elevadas metal: ligando.

1 — INTRODUÇÃO

Os estudos já efectuados com a tetraciclina (I) e seus análogos não permitem deduzir claramente a forma de coordenação dos iões metálicos, nem a sua posição na molécula do ligando; em particular, não é evidente se o átomo de azoto na posição C₄ está ou não envolvido na coordenação.

A fim de esclarecer este aspecto, de particular importância, entendeu-se útil abordar a questão por uma via química, bloqueando a possibilidade de coordenação do átomo de azoto em C₄ por um grupo metilo e verificando a influência deste facto nas constantes de estabilidade dos complexos formados com os iões alcalino-terrosos e de transição com o composto resultante: um sal (iodeto) de 4-metil-tetraciclina (ver II). Para complementar os resultados obtidos efectuaram-se estudos directos de RMN de vários derivados de tetraciclina com iões lantânídeos e também com Mg^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+} , que dão indicações úteis mas não definitivas sobre os problemas em causa.

2 — SECÇÃO EXPERIMENTAL

2.1 — SÍNTESE DO IODETO DE 4-METIL-TE- TRACICLINA [I]

Dissolveram-se 10 g de tetraciclina base anidra em 200 ml de tetrahydrofurano, adicionando-se em seguida 24 ml de iodeto de metilo. Na solução resultante, ao fim de 10-12 horas começaram a formar-se cristais. A mistura foi deixada em repouso durante 6 dias à temperatura ambiente seguidos de mais 2 dias a 4-5°C.

O precipitado obtido foi então filtrado, lavado primeiro com tetrahydrofurano e depois com éter, e seco. Obtiveram-se cerca de 9 g de produto; por espectroscopia de RMN verificou-se que se tratava do composto desejado, que apresentava no entanto uma ligeira contaminação por tetrahydrofurano.

2.2 — TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS

a) Solução de hidróxido de potássio

A solução de hidróxido de potássio isenta de carbonato, foi preparada a partir de soluções-padrão co-

merciais, diluídas com água desionizada previamente fervida, e a sua normalidade foi controlada por aferição de uma solução padrão de ácido perclórico.

b) Soluções dos iões metálicos

Foram usados nitratos de grau de pureza AnalaR; as soluções dos metais foram aferidas por titulações complexométricas.

c) Força iónica

A força iónica foi mantida num valor 0,1 M por adição de nitrato de potássio de grau de pureza Analar.

d) Água desionizada

A água, previamente destilada, foi passada por uma resina Elgastat.

e) Instrumentos

As medidas de pH e titulações foram efectuadas usando um aparelho medidor Radiometer, pHM4, ao qual se ligaram dois eléctrodos — um eléctrodo de vidro do tipo G2025 B e um eléctrodo de calomelano saturado Radiometer como eléctrodo de referência.

Todas as medições foram efectuadas em células de paredes duplas termostaticamente controladas a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ por circulação de água.

O eléctrodo de vidro foi calibrado em $-\text{Log}[\text{H}^+]$ por titulação de ácido perclórico com uma força iónica 0,1 M em KNO_3 e à temperatura de $25,0^\circ\text{C}$.

f) Técnica

A determinação das constantes de ionização e constantes de estabilidade por titulações potenciométricas foi já descrita em trabalhos anteriores [2].

g) Espectros de RMN

Os estudos de RMN do ^1H e do ^{13}C foram efectuados num espectrómetro Jeol (JNM 100 PFT), equipado com um computador Jeol 980 A.

Quando necessário o pico do solvente (HDO) foi suprimido através da aplicação à amostra de uma segunda frequência de irradiação, f_2 , em adição à frequência de observação, f_1 .

Valores positivos do desvio químico correspondem a desvios para campo mais baixo, referidos ao DTSS (ácido propiónico-2, 2, 3, 3-tetradeutero-3-trimetilsilil, sal dissódico).

Nos espectros de carbono ^{13}C foi usado como solvente uma mistura de DMSO + HOD (70:30), sendo usada a dioxana como referência.

O pH das soluções foi ajustado por adição de NaOD ou DCl; os valores do pH lidos não foram no entanto corrigidos de modo a ter em conta o efeito isotópico.

3 — CÁLCULOS

3.1 — CONSTANTES DE IONIZAÇÃO

O iodeto de 4-metil-tetraciclina comporta-se como um diácido fraco, como se pode ver nas respectivas curvas de titulação (Fig. 5).

Os valores das duas constantes de ionização podem ser calculados a partir dos resultados das titulações potenciométricas usando expressões obtidas a partir de balanços de carga e de massa, tal como já foi descrito em trabalho anterior [3].

Dado que os dois valores de pK diferem de mais de 2,5 unidades logarítmicas, as constantes podem ser calculadas independentemente, de acordo com as expressões

$$k_1 = \frac{R[\text{H}^+]}{(1 - R)} \quad \text{e} \quad k_2 = \frac{(R - 1)[\text{H}^+]}{(2 - R)}$$

onde

$$R = \frac{a C_a + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-]}{C_a}$$

$$a = \frac{\text{n.º de equivalentes de base}}{\text{n.º de moles do ligando}}$$

C_a = Concentração do ligando

3.2 — CONSTANTES DE ESTABILIDADE DOS COMPLEXOS COM IÕES METÁLICOS

a) Os processos de cálculo para as hipóteses de se formarem apenas MHL, apenas ML ou simultaneamente ML e MHL foram já apresentados em trabalho anterior [3].

Também a hipótese que corresponde à formação simultânea de ML e ML_2 se encontra estudada [2].

b) No caso de se formar apenas M_2L a dedução das expressões aplicáveis, seguindo o processo habitual, é a seguinte:

Ligando: LH_2^+ , I^-

Espécies presentes:

LH_2^+ , LH , L^- , M_2L^{3+} , M^{2+} , H^+ , K^+ , NO_3^- , OH^- , I^-

$$C_a = [\text{LH}_2] + [\text{LH}] + [\text{L}] + [\text{M}_2\text{L}] \quad (\text{I})$$

$$C_m = [\text{M}] + 2[\text{M}_2\text{L}] \quad (\text{II})$$

$$[\text{K}^+] = a C_a$$

$$[\text{NO}_3^-] = 2 C_m = 2[\text{M}] + 4[\text{M}_2\text{L}]$$

$$[\text{I}^-] = C_a$$

Pela condição de electroneutralidade

$$\begin{aligned} &[\text{LH}_2^+] + 3[\text{M}_2\text{L}^{3+}] + 2[\text{M}^{2+}] + [\text{H}^+] + [\text{K}^+] = \\ &= [\text{L}^-] + [\text{NO}_3^-] + [\text{OH}^-] + [\text{I}^-] \end{aligned}$$

Substituindo $[\text{K}^+]$, $[\text{NO}_3^-]$ e $[\text{I}^-]$ pelos seus valores e fazendo as necessárias simplificações, obtém-se:

$$a C_a + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] = [\text{LH}] + 2[\text{L}] + 2[\text{M}_2\text{L}] \quad (\text{III})$$

Multiplicando a equação (I) por 2 e subtraindo-lhe a equação (III) obtém-se:

$$(2 - a) C_a - [\text{H}^+] + [\text{OH}^-] = 2[\text{LH}_2] + [\text{LH}] \quad (\text{IV})$$

Substituindo em (IV) $[\text{LH}]$ e $[\text{LH}_2]$ pelos seus valores em função das constantes de ionização k_1 e k_2 obtém-se:

$$[\text{L}] = \frac{(2 - a) C_a - [\text{H}^+] + [\text{OH}^-]}{\beta_H} \quad (\text{V})$$

com

$$\beta_H = \frac{2}{k_1 k_2} [\text{H}^+]^2 + \frac{1}{k_2} [\text{H}^+]$$

Explicitando o valor de $[\text{M}_2\text{L}]$ na equação (I) vem:

$$[\text{M}_2\text{L}] = C_a - [\text{LH}_2] - [\text{LH}] - [\text{L}]$$

Por outro lado

$$C_m = [\text{M}] + 2[\text{M}_2\text{L}]$$

Conjugando estas duas equações obtemos:

$$[\text{M}] = C_m - 2C_a + 2\alpha_H[\text{L}] \quad (\text{VI})$$

com

$$\alpha_H = 1 + \frac{1}{k_1 k_2} [\text{H}^+]^2 + \frac{1}{k_2} [\text{H}^+]$$

Substituindo o valor de $[\text{M}]$ dado por (VI) na expressão de C_m

$$C_m = C_m - 2C_a + 2\alpha_H[\text{LH}] + 2[\text{M}_2\text{L}] \quad \text{donde}$$

$$[\text{M}_2\text{L}] = C_a - \alpha_H[\text{L}] \quad (\text{VII})$$

Com os valores de $[\text{L}]$, $[\text{M}]$ e $[\text{M}_2\text{L}]$ calculamos K_{M_2L} que é como se sabe dado por:

$$K_{M_2L} = \frac{[\text{M}_2\text{L}]}{[\text{M}]^2[\text{L}]} \quad (\text{VIII})$$

c) No caso de se formarem simultaneamente as espécies ML e M_2L podem obter-se valores aproximados das constantes K_{ML} e K_{M_2L} representando graficamente o valor de K_{M_2L} calculado pela equação (VIII) em função de $\frac{1}{[\text{M}]}$. Obtém-se assim uma recta cuja ordenada na origem nos dá K_{M_2L} e cujo coeficiente angular nos dá K_{ML} :

$$\begin{aligned} K_{M_2L}^{(\text{calculado})} &= \\ &= \frac{[\text{M}_2\text{L}]^{real} + [\text{ML}]}{[\text{M}]^2[\text{L}]} = K_{M_2L}^{real} + \\ &+ \frac{1}{[\text{M}]} K_{ML}^{real} \end{aligned}$$

4 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 — TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS

A análise das curvas de titulação de diversos análogos da família da tetraciclina na ausência e presença de metais alcalino-terrosos e de transição suscita dúvidas quanto à correcta interpretação das espécies complexas formadas em solução; em particular e devido à baixa solubilidade dos complexos formados, não é possível seguir o andamento dessas cur-

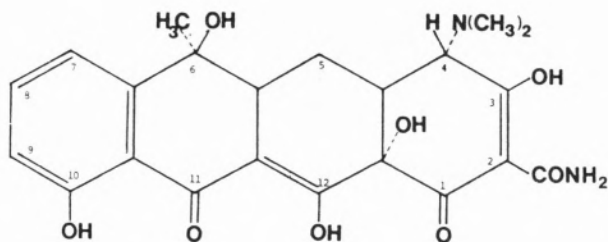


Fig. 1

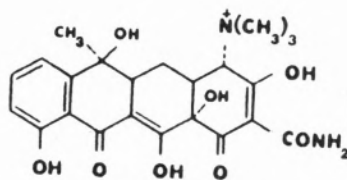
Fórmula estrutural da tetraciclina — I

vas ao longo de uma gama conveniente do grau de neutralização, sobretudo no caso dos metais de transição (ver Figs. 3 e 4).

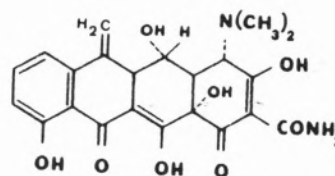
Em trabalho anteriormente publicado [3] postulou-se que os complexos formados seriam do tipo ML e

MHL, quer no caso dos metais alcalino-terrosos, quer no caso dos metais de transição. Com base nesta hipótese deduziram-se as expressões que permitiam calcular as concentrações destas espécies quando presentes simultaneamente, o que conduziu a um método de cálculo iterativo, que se revelou conveniente.

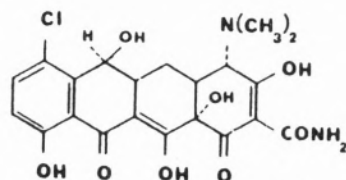
Verificou-se assim que, no caso dos metais alcalino-terrosos os cálculos permitiam determinar, ou apenas K_{ML} ou simultaneamente K_{ML} e K_{MHL} , enquanto para os metais de transição foi por vezes impossível determinar K_{ML} obtendo-se valores de K_{MHL} bastante rigorosos, com desvios padrão médios inferiores ou iguais a 0,05 unidades logarítmicas.



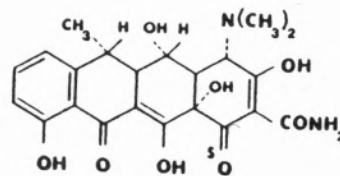
4 — Metil-tetraciclina — II



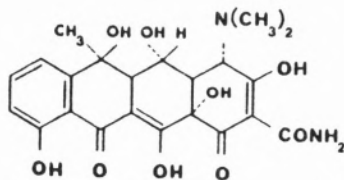
Metaciclina — VI



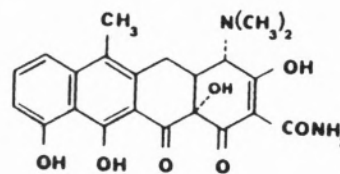
Desmetilclorotetraciclina — III



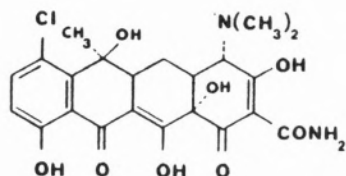
Doxiciclina — VII



Oxitetraciclina — IV



Anidrotetraciclina — VIII



Clorotetraciclina — V

Fig. 2

Fórmulas estruturais de vários análogos da família da tetraciclina

A título de exemplo apresentamos as curvas de titulação dos cloridratos de desmetilclorotetraciclina (Fig. 3) e oxitetraciclina (Fig. 4) com os metais alcalino-terrosos e de transição.

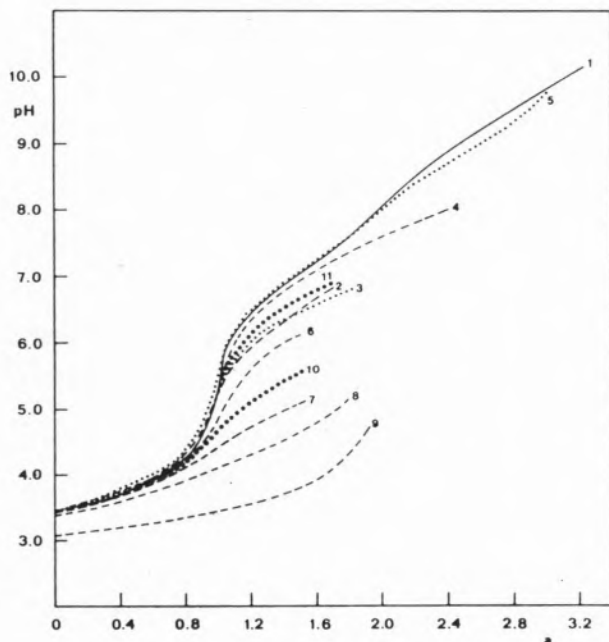


Fig. 3

Curvas de titulação do cloridrato de desmetilclorotetraciclina na ausência e presença de íons metálicos

- 1 - DCTC(HCl); 2 - DCTC(HCl) - Mg^{2+} ; 3 - DCTC(HCl) - Ca^{2+} ;
4 - DCTC(HCl) - Sr^{2+} ; 5 - DCTC(HCl) - Ba^{2+} ; 6 - DCTC(HCl) - Mn^{2+} ;
7 - DCTC(HCl) - Co^{2+} ; 8 - DCTC(HCl) - Ni^{2+} ; 9 - DCTC(HCl) - Cu^{2+} ;
10 - DCTC(HCl) - Zn^{2+} ; 11 - DCTC(HCl) - Cd^{2+} .

Uma simples análise destas duas figuras permite-nos «à priori» algumas considerações. Com efeito nas curvas 2, 3, 4 e 5 da Fig. 3, que correspondem aos metais alcalino-terrosos, verifica-se que a complexação só começa a ocorrer a partir de valores do grau de neutralização $\alpha = 1$ para o Ca^{2+} e Mg^{2+} e ainda mais altos para o Sr^{2+} e Ba^{2+} . Particularmente para o caso do Ba^{2+} verifica-se uma posterior inflexão para $\alpha = 3$, havendo então convergência das curvas do ligando na ausência e presença do íon metálico.

No caso da oxitetraciclina o andamento das curvas na presença dos íons alcalino-terrosos é semelhante mas mais claro.

Quanto aos metais de transição, devido à precipitação dos complexos para valores de α bastante baixos, o andamento das curvas é duvidoso; no entan-

to, no caso da oxitetraciclina com Ni^{2+} e Cu^{2+} , torna-se aparente a existência de uma inflexão para $\alpha = 2$.

Ora, as constantes de estabilidade, no caso dos me-

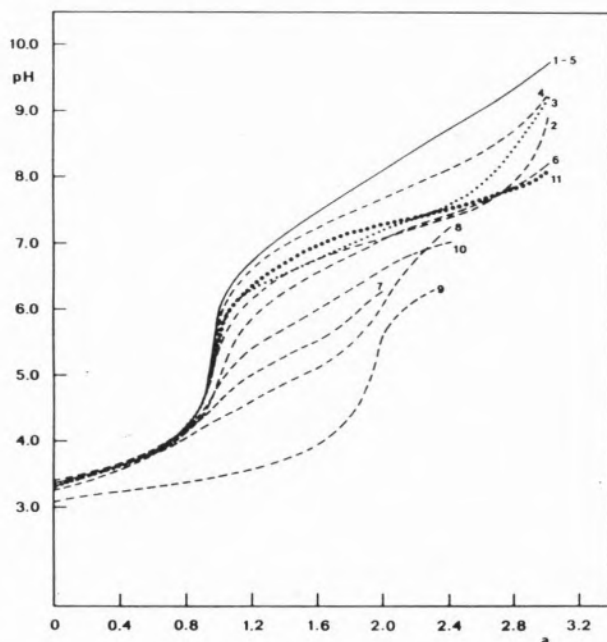


Fig. 4

Curvas de titulação do cloridrato de oxitetraciclina na ausência e presença de íons metálicos

- 1 - OTC(HCl); 2 - OTC(HCl) - Mg^{2+} ; 3 - OTC(HCl) - Ca^{2+} ;
4 - OTC(HCl) - Sr^{2+} ; 5 - OTC(HCl) - Ba^{2+} ; 6 - OTC(HCl) - Mn^{2+} ;
7 - OTC(HCl) - Co^{2+} ; 8 - OTC(HCl) - Ni^{2+} ; 9 - OTC(HCl) - Cu^{2+} ;
10 - OTC(HCl) - Zn^{2+} ; 11 - OTC(HCl) - Cd^{2+} .

tais de transição, foram determinadas usando sempre pontos experimentais que correspondiam a valores de $\alpha < 2$. Este facto levanta dúvidas sobre a interpretação correcta, nestes casos, das espécies formadas.

A análise da Fig. 5, onde se apresentam as curvas de titulação do iodeto de 4-metil-tetraciclina na ausência e presença de metais alcalino-terrosos e de transição permite realmente esclarecer estas dúvidas. Com efeito, neste composto, é manifesto um diferente comportamento, na coordenação, dos metais alcalino-terrosos (e talvez também do Mn^{2+}) e de transição.

Enquanto o andamento das curvas 7 e 8 e provavelmente 9, correspondentes ao Ni^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} é idêntico ao verificado nos dois outros compostos mencionados (cloridratos de desmetilclorotetraciclina

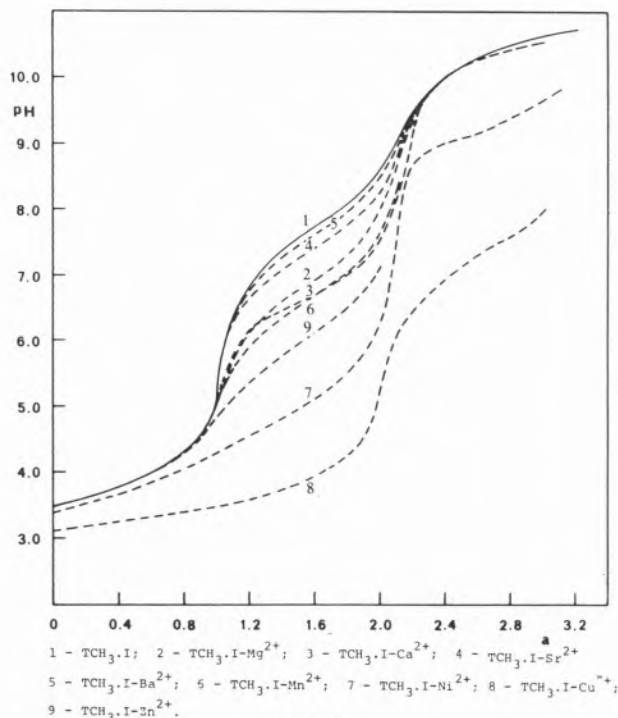


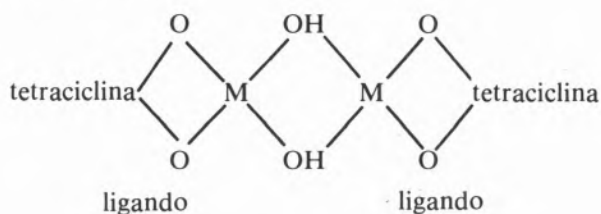
Fig. 5

Curvas de titulação do iodeto de 4-metil tetraciclina na ausência e presença de íons metálicos

na e oxitetraciclina), as restantes, correspondentes aos metais alcalino-terrosos (e também Mn^{2+} -curva 6) são nitidamente diferentes, pois apresentam inflexões nítidas para $a = 2$, confundindo-se depois com a curva do ligando livre. Formam-se pois complexos do tipo ML.

No caso do Cu^{2+} e Ni^{2+} (o do Zn^{2+} não se consegue seguir), verifica-se também uma inflexão para $a = 2$, mas as curvas de titulação, a partir deste valor, continua a apresentar um abaixamento de pH em relação à curva do ligando livre, como acontece nos dois outros compostos anteriores, mas de um modo menos nítido.

Ora, uma vez que não existe mais nenhum próton ácido na molécula do iodeto de 4-metil-tetraciclina, tal facto só pode traduzir ionizações de moléculas de águas coordenadas, que correspondem provavelmente à formação predominante de espécies diméricas do tipo



Não há pois formação de espécies ML e sim de espécies $\text{MHL}\cdot\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MHL}\cdot\text{OH}$, que se polimerizam, e o mesmo deverá acontecer, por analogia, com os restantes ligandos da família já estudados, como adiante se confirma.

Nas tabelas 1, 2 e 3 aprenstam-se os valores das constantes de ionização dos cloridratos de desmetil-clorotetraciclina e oxitetraciclina e do iodeto de 4-metil-tetraciclina, assim como as constantes de formação dos complexos com íons dos metais alcalino-terrosos e de transição.

Como se verifica os nossos cálculos conduzem a admitir para os metais alcalino-terrosos valores de K_{MHL} e K_{ML} para os complexos das várias tetraciclina, mas não para o iodeto de 4-metil-tetraciclina; por outro lado, os valores de K_{MHL} para os metais de transição são sensivelmente iguais num caso e noutro, tendo em conta as diferenças de basicidade, o que confirma a analogia de comportamento de todos os ligandos.

Dado que no iodeto de 4-metil-tetraciclina não é possível o envolvimento, na coordenação, do átomo de azoto em C_4 , que se encontra bloqueado (ver fórmula), o mesmo deverá acontecer com os outros ligandos em relação aos metais de transição, embo-

Tabela 1

CLORIDRATO DE DESMETILCLOROTETRACICLINA

Constantes de ionização

 $t = 25,0^\circ \text{C}; \mu = 0,1\text{M KNO}_3$ $\text{pk}_1 = 3,46; \text{pk}_2 = 6,96; \text{pk}_3 = 8,96$

Constantes de formação com os metais alcalino-terrosos e de transição

 $t = 25,0^\circ \text{C}; \mu = 0,1\text{M KNO}_3$

	Log K_{ML}	Log K_{MHL}
Mg^{2+}	5,15	3,47
Ca^{2+}	5,52	3,29
Sr^{2+}	$4,06 \pm 0,15$	
Ba^{2+}	$3,11 \pm 0,06$	
Mn^{2+}	6,33	3,88
Co^{2+}	8,49	5,02
Ni^{2+}	9,26	5,76
Cu^{2+}	12,14	$7,66 \pm 0,04$
Zn^{2+}	7,56	4,48
Cd^{2+}	4,48	3,07

Tabela 2
CLORIDRATO DE OXITETRACICLINA

Constantes de ionização

$$t = 25,0^{\circ} \text{ C}; \mu = 0,1\text{M KNO}_3$$

$$pk_1 = 3,26; pk_2 = 7,25; pk_3 = 8,73$$

Constantes de formação com os metais alcalinos-terrosos e de transição

$$t = 25,0^{\circ} \text{ C}; \mu = 0,1\text{M KNO}_3$$

	Log K_{ML}	Log K_{MHL}
Mg ²⁺	5,19 \pm 0,04	
Ca ²⁺	4,92 \pm 0,09	
Sr ²⁺	3,99 \pm 0,09	
Ba ²⁺	não forma	
Mn ²⁺	5,76	4,16
Co ²⁺	8,01	5,01
Ni ²⁺	8,50	5,69
Cu ²⁺	11,85	7,83 \pm 0,05
Zn ²⁺	6,69	4,73
Cd ²⁺	4,81	3,30

Tabela 3
IODETO DE 4-METIL-TETRACICLINA

Constantes de ionização

$$t = 25,0^{\circ} \text{ C}; \mu = 0,1\text{M KNO}_3$$

$$pk_1 = 3,64 \pm 0,05; pk_2 = 7,50 \pm 0,04$$

Constantes de formação com os metais alcalino-terrosos e de transição

$$t = 25,0^{\circ} \text{ C}; \mu = 0,1\text{M KNO}_3$$

	Log K_{ML}	Log K_{ML_2}
Mg ²⁺	3,78	2,58
Ca ²⁺	4,0 \pm 0,1	
Sr ²⁺	*	
Ba ²⁺	*	
Mn ²⁺	4,00	3,98
Ni ²⁺	5,88 \pm 0,08	
Cu ²⁺	8,02 \pm 0,06	
Zn ²⁺	4,71	4,57

* Não foi possível calcular os valores das constantes.

ra esse átomo não esteja bloqueado, mas o comportamento com os metais alcalinos-terrosos, lantanídeos e provavelmente Mn²⁺ é diferente.

O facto observado, isto é, o não envolvimento do azoto em C₄ na coordenação aos metais de transição, parece contraditório, na medida em que, em princípio, seria de esperar para estes uma maior afinidade para estes átomos; o facto é que isto não se verifica, contrariamente ao que parece acontecer com os iões dos metais alcalinos-terrosos (e provavelmente com o manganês). Pensa-se que a diferença será resultante da formação preferencial de complexos polinucleares para os metais de transição acima de um certo valor (baixo) de pH. Poderá ainda existir um efeito das dimensões dos iões alcalino-terrosos, que são superiores às dos iões de transição, mas esta explicação por si só é insuficiente, conforme se verifica nos estudos de RMN com Mg²⁺ (ver secção 4.2).

O problema do envolvimento do azoto em C₄ na coordenação dos metais de transição já tinha sido abordado por outros autores.

DELUISIO e MARTIN [9], com base em titulações potenciométricas da tetraciclina e alguns dos seus análogos, na ausência e presença de Cu²⁺, Zn²⁺ e Ni²⁺, concluíram que o centro de coordenação envolvia o azoto em C₄ e um átomo de oxigénio, quer em C₃ quer em C₁₂.

No entanto, estes autores basearam todas as suas conclusões na hipótese de que o protão ligado ao grupo dimetil-amónio era o responsável pela segunda constante de ionização das tetraclinas, o que não está correcto e invalida desde logo as suas conclusões.

Mais tarde, BAKER e BROWN [10] com base nos estudos dos espectros electrónicos de complexos da tetraciclina, anidrotetraciclina e desmetilaminotetraciclina com Co²⁺ e Ni²⁺, concluíram que, uma vez que os espectros de ambos os metais com os três derivados eram idênticos, o azoto em C₄ devia ser excluído como centro de coordenação, assim como os oxigénios em C₁₁ e C₁₂, pois se este grupo estivesse envolvido os espectros electrónicos dos complexos com a tetraciclina e a anidrotetraciclina deveriam ser diferentes. Além disso, e segundo os mesmos autores, os espectros obtidos indicavam que apenas átomos de oxigénio estavam envolvidos na coordenação, o que os levou a postular, para os metais de transição, uma ligação a dois átomos de oxigénio, um do grupo amida em C₂ e outro localizado quer em C₁ quer em C₃.

A importância das dimensões do ião metálico no tipo de complexos formados com os análogos da família da tetraciclina foi também já referido por outros autores. Com efeito, CASWELL e HUTCHISON [6] concluíram que, em solventes apolares, o Ca^{2+} (e igualmente outros iões de dimensões semelhantes ou superiores, tal como Cd^{2+} , Sr^{2+} ou Ba^{2+}) se coordena às tetraciclina de um modo diferente do Mg^{2+} ; os estudos destes autores, usando técnicas de espectroscopia ultravioleta e de dicroísmo circular levou-os a postular que o Ca^{2+} em solventes apolares formava um complexo particularmente estável, envolvendo simultaneamente na coordenação os quatro oxigénios em C_{10} , C_{12} , C_2 e C_3 . Para o Mg^{2+} os autores apenas referem que o complexo não deve diferir do formado em solução aquosa, não explicitando no entanto a sede de coordenação.

MITSCHER *et al.* [7] verificaram que, em solução aquosa e a pH da ordem dos 7,4 ou inferior, o Ca^{2+} e o Mg^{2+} se coordenam de modo semelhante, utilizando como sede de coordenação dois átomos de oxigénio em C_{10} - C_{11} , C_{11} - C_{12} ou C_{12} - C_1 . No entanto, para pH superior a este valor, os resultados obtidos levaram estes autores a propor que o Ca^{2+} se liga entre o átomo de azoto em C_4 e o oxigénio em C_{12a} , enquanto para o Mg^{2+} excluíram este centro por implicar uma grande tensão.

NEWMAN e FRANK [8] efectuaram também estudos em meio apolar, por dicroísmo circular, tendo no entanto chegado a resultados diferentes dos de CASWELL e HUTCHISON [6]. Segundo aqueles autores [8], que estudaram os complexos de Ca^{2+} e Mg^{2+} com tetraciclina, 4-desdimetilaminotetraciclina e 2-cianotetraciclina, o comportamento dos dois iões metálicos em solventes apolares é diferente, formando o Ca^{2+} um complexo 2:1 metal-ligando com a tetraciclina e a 4-desdimetilaminotetraciclina mas não com a 2-cianotetraciclina, e o Mg^{2+} um complexo 1:1 nos três casos. O facto de com a 2-cianotetraciclina e Ca^{2+} se formar apenas o complexo 1:1 mas não o 2:1 levou-os a postular que a sede de coordenação para o segundo ião Ca^{2+} deveria situar-se no anel A; as sedes de coordenação propostas por estes autores para o Ca^{2+} são C_{10} - C_{11} para o primeiro átomo e C_{12} - C_1 para o segundo. Com o Mg^{2+} os espectros com os três análogos eram idênticos, o que excluía da coordenação o azoto em C_4 e os oxigénios C_1 - C_2 ou C_2 - C_3 . Restavam como possibilidades os centros formados por C_{10} - C_{11} , C_{11} - C_{12} e C_{12} - C_1 ; uma vez

que NEWMAN e FRANK [8] concluíram que o Ca^{2+} se ligava aos centros C_{10} - C_{11} e C_{11} - C_1 e uma vez que os complexos com o Mg^{2+} envolvem centros de coordenação diferentes, tal como os autores concluíram da análise dos espectros de dicroísmo circular, isto deixa como única hipótese para o Mg^{2+} uma coordenação aos átomos de oxigénio em C_{11} - C_{12} .

Por simples comparação das curvas 2 e 3 da fig. 5, verifica-se que mesmo com o iodeto de 4-metil-tetraciclina, e em solução aquosa, o Ca^{2+} parece apresentar um comportamento diferente do do Mg^{2+} ; efectivamente isto não acontece apenas com este derivado da família da tetraciclina, mas com todos os estudados, com excepção da oxitetraciclina, o que parece indicar que o Ca^{2+} tem dimensões mais favoráveis para a complexação do que o Mg^{2+} . A diferença de comportamento com a oxitetraciclina pode provir de nesta molécula existir um grupo -OH extra em C_5 , que com o já existente em C_6 poderá fornecer um centro de coordenação adicional para o Mg^{2+} .

De tudo o que foi dito parece poder inferir-se que os metais de transição se ligam, nas tetraciclina, a átomos de oxigénio, podendo os restantes metais envolver uma ligação adicional ao átomo de azoto em C_4 . Isto não acontece no iodeto de 4-metil-tetraciclina, como é obvio.

Propriamente a decisão sobre quais os átomos de oxigénio aos quais se pode dar a coordenação é problema ainda não inteiramente esclarecido. Estudos recentes de outros autores [4,5] usando espectroscopia de RMN em DMSO e DMSO- D_2O , apontam como sede mais provável o oxigénio do grupo amida em C_2 e um outro oxigénio, quer em C_1 quer em C_3 ; esta hipótese, embora não necessariamente incorrecta, está incompleta, como se verá na discussão do nosso trabalho.

4.2. — ESTUDOS DE R.M.N.

Com vista à obtenção de informação estrutural adicional sobre os complexos dos ligandos da família da tetraciclina que permitisse resolver algumas das controvérsias referidas e avançar no conhecimento do problema, efectuaram-se também estudos usando a técnica de espectroscopia de RMN, quer do ^1H quer do ^{13}C .

Os resultados obtidos para a ressonância do protão em D_2O e a pH ~ 3 e para a ressonância do ^{13}C numa

mistura de DMSO + D₂O (70:30), a pH~6, sugerem uma coordenação preferencial através dos 3 átomos de oxigénio simultaneamente disponíveis em C₁₂-C_{12a}-C₁ (trabalho a publicar). No entanto, para razões elevadas metal: ligando, parecem existir interações adicionais, formando-se espécies do tipo M₂: tetraciclina, como se conclui dos estudos efectuados em D₂O e a pH~3. Com efeito, como se verifica na fig. 6, o sinal correspondente ao grupo

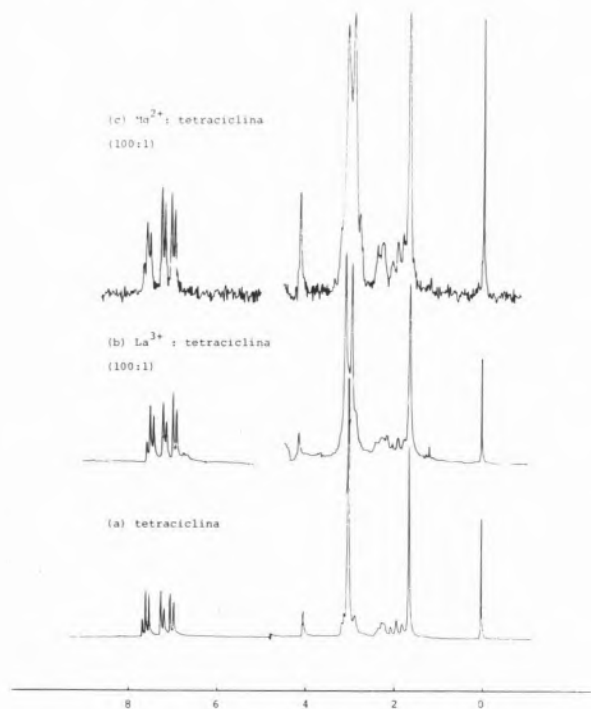


Fig. 6

Espectros de RMN de tetraciclina (HCl) na ausência e presença de iões metálicos

N-(CN₃)₂ em C₄ aparece, no ligando livre, como um pico único; no entanto, por adição de iões diamagnéticos, (Mg²⁺, Ca²⁺, La²⁺, Sm³⁺), verifica-se na região de ressonância do grupo dimetilamónio, o aparecimento de dois novos picos, que vão aumentando de intensidade à medida que aumenta a concentração do ião metálico; para valores elevados dessa concentração os dois picos têm áreas equivalentes. Este facto deverá ser resultado da coordenação do metal entre o azoto em C₄ e um oxigénio, quer em C₃, quer em C_{12a}.

Para confirmar a hipótese de coordenação do azoto em C₄ ao ião metálico, para concentrações elevadas do metal, baixou-se o pH para um valor da ordem de 1; verificou-se de novo o aparecimento de um pi-

co único, o que se justifica pela diminuição da constante de estabilidade condicional do complexo e consequente aumento da concentração do ligando livre. Um aumento posterior do pH conduz novamente ao aparecimento dos dois picos na região do N-(CH₃)₂.

Outra explicação para o aparecimento de dois picos para o grupo dimetilamónio seria uma epimerização do ligando, induzida pelo ião metálico, e conduzindo à formação de 50% de cada um dos epímeros. No entanto, a epimerização é um fenómeno com uma cinética lenta, contrariamente às nossas observações do aparecimento imediato de dois picos por adição de concentrações elevadas de ião metálico. Além disso, a epimerização implicaria a saída do hidrogénio em C₄, que seria substituído por deutério, e o pico correspondente ao H₄ deveria entrar desaparecendo progressivamente, o que não se verifica.

Dos resultados obtidos pode portanto concluir-se que para valores da razão metal-ligando elevados, há uma participação do azoto em C₄ na coordenação aos catiões diamagnéticos mencionados.

Deve referir-se que tal facto não se verifica apenas para a tetraciclina, mas para outros membros da fa-

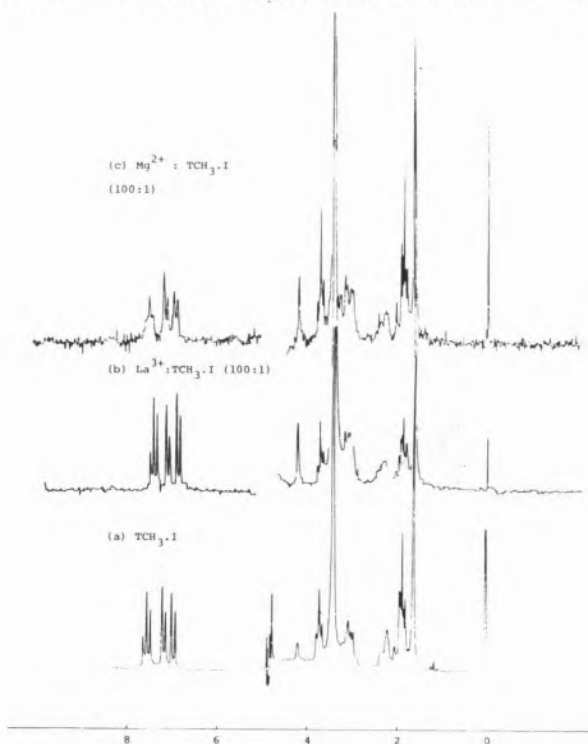


Fig. 7

Espectros de RMN do iodeto de 4-metil-tetraciclina (TCH₃-I) na ausência de iões metálicos

mília como a oxitetraciclina, clorotetraciclina, desmetilclorotetraciclina, metaciclina e doxiciclina (resultados a publicar) o que nos leva a concluir que é um comportamento geral para os membros desta família de compostos com a estrutura em C_4 intacta.

Uma simples comparação do que se passa com os espectros do iodeto de 4-metil-tetraciclina (fig. 7), onde o pico correspondente ao grupo $N-(CH_3)_3$ não se desdobra, mesmo em presença de grandes excessos de ião metálico, reforça a hipótese do envolvimento do azoto em C_4 na coordenação.

5 — CONCLUSÕES

Para finalizar, e como comentário a resultados nossos anteriormente publicados [3], deve salientar-se que, no que respeita aos metais alcalino-terrosos, os resultados apresentados para as constantes de estabilidade reflectem a existência de espécies reais MHL e ML. Quando aos metais de transição, as constantes K_{MHL} reflectem espécies reais, o mesmo não acontecendo com os valores de K_{ML} , que devem ser interpretados como correspondendo a espécies do tipo MHL.OH; não podem no entanto ser tomados como representando equilíbrios reais, já que estas espécies devem dar origem a polímeros e, em particular, como anteriormente se referiu, a espécies diméricas. Infelizmente não é possível estudar em pormenor a formação destas espécies nem determinar as respectivas constantes de formação, pois a solubilidade dos ligandos e a precipitação frequente dos complexos impedem a obtenção dos dados experimentais necessários. Valerá a pena referir ainda que, no decurso dos nossos trabalhos, se verificou que para condições particulares de pH para as quais é possível obter em solução concentrações mais elevadas das tetraciclinas ($pH < 3$ ou > 8), dá-se frequentemente a gelificação das soluções quando em presença de iões metálicos, quer alcalino-terrosos quer lantanídeos. Tal gelificação deve corresponder à formação de polímeros, mas não nos é possível, a partir da observação deste fenómeno, concluir da participação ou não participação directa dos iões metálicos nessa polimerização, nem inferir especialmente a presença de dímeros.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. H. BOOTH et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1654 (1958).
- [2] J. J. R. F. DA SILVA, *Rev. Port. Quím.*, **7**, 230 (1965).
- [3] J. J. R. F. DA SILVA, M. HELENA MENDONÇA DIAS, *Rev. Port. Quím.*, **14**, 159 (1972).
- [4] D. E. WILLIAMSON e G. W. EVERET, JR., *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2397 (1975).
- [5] J. GULBIS e G. W. EVERET, JR., *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 21, 6248 (1975).
- [6] A. H. CASWELL e J. D. HUTCHISON, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **43**, 625 (1971).
- [7] L. A. MITSCHER et al., *Tetrahedron Lett.*, **51**, 5361 (1968).
- [8] E. C. NEWMAN e C. W. FRANK, *J. Pharm. Sci.*, **65**:12, 1728 (1976).
- [9] J. T. DOLVISIO e A. N. MARTIN, *J. Med. Chem.*, **6**, 16, (1963).
- [10] W. A. BAKER e P. M. BROWN, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 1314 (1966).

ABSTRACT

Potenciometric studies of tetracycline-methyl-iodide, where the coordination capabilities of the C_4 nitrogen have been suppressed, compared with previous results for other tetracyclines analogues, show that:

A) Transition metal ions form predominantly MHL.(H₂O)_x complexes, without involvement of the nitrogen atom, whereas alkaline-earth ions and (probably) Mn^{2+} can interact with it and form MHL and ML species.

B) Previously reported constants for ML complexes of transition metals refer to MHL.OH species which are likely to polymerise.

The stability constants of the tetracycline-methyl-iodide metal complexes are reported for the first time.

NMR studies of the same ligand and tetracycline, either free or in the presence of diamagnetic ions (Mg^{2+} , Ca^{2+} , La^{3+} , Sm^{3+}), support the hypothesis of involvement of the C_4 nitrogen in the coordination of metal ions at high metal: ligand ratios.