



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÂNICA

INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ

Trabalho de Conclusão de Curso

IQWX01

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DO COMPLEXO
[Co(pymimi)₂](ClO₄)₂ CONTRA A LINHAGEM CELULAR A549**

LORENA SALGADO NAVARRO

UFRJ/CCMN/IQ/DQI

MAIO DE 2014

LORENA SALGADO NAVARRO



**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DO COMPLEXO
[Co(pymimi)₂](ClO₄)₂ CONTRA A LINHAGEM CELULAR A549**

Instituto de Química, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Químico com Atribuição Tecnológica.

Orientadora Prof^a. Dr^a. Marciela Scarpellini

RIO DE JANEIRO

2014

NAVARRO, Lorena Salgado.

Síntese, Caracterização e Atividade do Complexo [Co(pymimi)₂](ClO₄)₂ Contra a Linhagem Celular A549 - Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2014.

Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza, Instituto de Química, Departamento de Química Inorgânica, Rio de Janeiro, 2014.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marciela Scarpellini.

1. Hipóxia. 2. Câncer. 3. Complexo-metálico. 4. Complexo de Cobalto. 5. Antitumorais 6. Trabalho de Conclusão de Curso – IQ/UFRJ). I. Marciela Scarpellini (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. III. Título.

LORENA SALGADO NAVARRO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DO COMPLEXO

[Co(pymimi)₂](ClO₄)₂ CONTRA A LINHAGEM CELULAR A549

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Corpo Docente do Instituto de Química, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Químico com Atribuição Tecnológica.

Submetido à seguinte banca:

Prof^a. Dr^a. Zélia Therezinha Custodio Leite (DQA-IQ/UFRJ)

Prof. Dr. Roberto Salgado Amado (DQI-IQ/UFRJ)

Orientada por:

Prof^a. Dr^a. Marciela Scarpellini (DQI-IQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, Maio de 2014

Dedico este trabalho à minha família pelo amor, incentivo, apoio e confiança demonstrados
nesta trajetória.

*“A visão sem ação, não passa de um sonho. A ação sem visão é só um passatempo. A visão
com ação pode mudar o mundo.” Martha Medeiros*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me acompanhar nessa caminhada me dando força a cada dia para continuar e não desistir.

Agradeço à minha família por todo o carinho, paciência e pelos momentos em que eu estava desanimada e meus pais e irmãos souberam as palavras certas que demonstravam apoio e que me incentivavam a me levantar para seguir minha caminhada. Obrigada aos meus pais pela educação e ensinamentos que dedicaram a mim. Luis e Yolanda, amo vocês!

À orientadora e amiga, Prof^a Marciela Scarpellini pelo grande exemplo, pela amizade e carinho, por acreditar no meu potencial e me impulsionar sempre. Admirável pela personalidade e profissionalismo com seus alunos.

Agradeço às minhas grandes amigas Fernanda, Natália, Tatiane e Renata, todas as vezes que realizávamos estudos em grupo, almoços, risadas e pela grande amizade que conquistei graças à faculdade; o apoio delas foi sem dúvida muito importante para mim

Agradeço ao meu namorado por todo o apoio e companheirismo nessa etapa final da conclusão do meu projeto de curso e finalzinho da faculdade, pela paciência e por todo o incentivo.

Agradeço aos professores que colaboraram com ajuda na realização das caracterizações, Professor Carlos Basílio da Universidade Federal de Minas Gerais e Prof. Dr. Marcos Dias Pereira da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ao aluno Andrey Linhares por doar gentilmente o ligante utilizado na síntese do complexo.

A todos do Laboratório de Desenvolvimento de Compostos Bioinorgânicos- LDCB, pela ajuda, em especial para Bianca e Bibiana.

A Sônia Bulhões, funcionária da secretaria do Instituto de Química, carinhosamente chamada de tia Sônia, pela paciência e por ser tão prestativa sempre que precisei.

E por último, mas com igual prestígio assim como todos que foram nomeados nesta mensagem, agradeço a Valeria, a qual me ajudou e incentivou muito, também, a terminar e concluir essa etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	2
LISTA DE TABELAS	3
Tabela 9: Valores de potenciais para o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$ em diferentes velocidades de varredura na escala Ag/AgCl.....	3
RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. ESTRUTURA DOS TUMORES SÓLIDOS E A REGIÃO EM HIPÓXIA.....	5
1.2. OS PRINCIPAIS TRATAMENTOS DO CÂNCER	6
1.3. ESTRATÉGIAS BASEADAS EM HIPÓXIA.....	7
1.4. A QUÍMICA BIOINORGÂNICA E O USO DE COMPLEXOS COMO PDAHs	8
1.5. LINHA DE PESQUISA DO LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS BIOINORGÂNICOS.....	9
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	14
3.1. MATERIAIS UTILIZADOS	14
3.2. SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Co}(\text{PYMIMI})_2](\text{ClO}_4)_2$	14
3.3. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	17
3.3.1. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	17
3.3.2. DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE MONOCRISTAL.....	17
3.3.3. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA	17
3.3.4. CONDUTIVIMETRIA.....	17
3.3.5. VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	18
3.3.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	19
4.2. DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE MONOCRISTAL.....	21
4.3. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	24
4.4. CONDUTIVIDADE MOLAR.....	27
4.5. VOLTAMETRIA CÍCLICA	28
4.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	32
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ε	Absortividade molar em $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
ν	Frequência de estiramento
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
Å	Angstroms
A549	Adenocarcinoma alveolar de células basais de pulmão humano
BAS	Bioanalytical Systems
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
EPH	Eletrodo Padrão de Hidrogênio
Fc^+/Fc	Par redox ferrocínio/ferroceno
IC_{50}	Concentração mínima para inibir 50% da viabilidade celular
i_{pa}	Corrente de pico anódico
i_{pc}	Corrente de pico catódico
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
LDCB	Laboratório de Desenvolvimento de Compostos Bioinorgânicos
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo
PDAHs	Pró-Fármacos Ativados por Hipóxia (<i>Pro-Drugs Activated by Hypoxia</i>)
pymimi	<i>N</i> -((1-metil-1H-imidazol-2-il)metileno)-2-(piridin-2-il)etanamina
TBAPF ₆	Hexafluorofosfato de tetrabutilamônio
UV-Vis	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível
δ	Deslocamento químico
ΔE_p	Varição de potencial
λ	Comprimento de onda em nm

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de uma seção tumoral circundando um capilar e mostrando o decréscimo da concentração de oxigênio com o aumento da distância em relação ao capilar (BUSTAMANTE *et al*, 2009).

Figura 2: Mecanismo de ativação de pró-fármaco em região de hipóxia (adaptado de DENNY, 2001).

Figura 3: Representação estrutural do cátion complexo $[Ga(bhi-NO_2)_2]NO_3$ (PADILHA, D.S.,2014).

Figura 4: Complexo mononuclear $[Co(bha-H)_2]^{+1}$, e $[Co(bepa-H)_2]^{+2}$, como possíveis pró-drogas ativadas por hipóxia (TEXEIRA, E., 2009).

Figura 5: Compostos mononucleares de cobalto com ligantes tridentados (TEXEIRA, E., 2009).

Figura 6: Esquema reacional de síntese e reação do complexo $[Co(pymimi)_2](ClO_4)_2$.

Figura 7: Solução da fonte de metal $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (Azul) e solução do ligante pymimi (Amarelo claro).

Figura 8: Solução contendo o ligante pymimi e a fonte de metal $CoCl_2 \cdot 6H_2O$.

Figura 9: Cristais formados a partir da recristalização do complexo com metanol a quente.

Figura 10: Espectros no infravermelho do ligante pymimi e do complexo $[Co(pymimi)_2](ClO_4)_2$.

Figura 11: Representações gráficas: (a) do cátion complexo $[Co(pymimi)_2]^{2+}$ e (b) da cela cristalina contendo o complexo $[Co(pymimi)_2](ClO_4)_2$ e uma molécula de metanol. Ambas foram geradas pelo programa ORTEP, com 50 % de probabilidade.

Figura 12: Espectro eletrônico do complexo $[Co(pymimi)_2](ClO_4)_2$ em diferentes concentrações, em acetonitrila.

Figura 13: Voltamogramas cíclicos do complexo $[Co(pymimi)_2](ClO_4)_2$, em acetonitrila ($3,73 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), em diferentes velocidades de varredura.

Figura 14: Viabilidade celular da linhagem de câncer de pulmão A549 após o tratamento com o ligante, a fonte de metal e o complexo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos de citotoxicidade dos complexos reduzidos $[\text{Co}(\text{bha-H})_2]^+-1$, e $[\text{Co}(\text{bepa-H})_2]^+-2$ em células de *S. Cerevisiae* (TEXEIRA, E., 2009).

Tabela 2: Valores de viabilidade celular e IC_{50} frente à linhagem celular tumoral B16F10 (TEXEIRA, E., 2009).

Tabela 3: Principais bandas (em cm^{-1}), do espectro no infravermelho para o ligante pymimi e o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$.

Tabela 4: Principais distâncias de ligação para o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$.

Tabela 5: Principais ângulos de ligação para o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$.

Tabela 6: Parâmetros espectrais do complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$ na região do espectro eletrônico.

Tabela 7: Dados de espectroscopia eletrônica do complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$, em acetonitrila.

Tabela 8: Valores esperados de condutividade molar para complexos em acetonitrila, a 25°C e $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (adaptado de GEARY, 1971).

Tabela 9: Valores de potenciais para o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$ em diferentes velocidades de varredura na escala Ag/AgCl.

Tabela 9: Valores de potenciais para o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$ em diferentes velocidades de varredura na escala Ag/AgCl.

RESUMO

NAVARRO, Lorena Salgado. **Síntese, Caracterização e Atividade do Complexo [Co(pymimi)₂](ClO₄)₂ contra a Linhagem Celular A549**. Rio de Janeiro, 2014. Trabalho de Conclusão de Curso – Química Inorgânica, DQI/IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Janeiro 2014.

Nos países desenvolvidos, o câncer é responsável por cerca de 25 % de todas as mortes. Atualmente, os principais tratamentos são a quimioterapia e a radioterapia, que não tem se mostrado totalmente eficientes, sendo uma das causas a presença de uma região em que as células se encontram em *hipóxia*. Estas são células com baixa concentração de oxigênio, que acabam tendo características redutoras. Assim, são alvos para a investigação de novos pró-fármacos, cuja redução seria responsável pela geração das espécies citotóxicas que matariam o tumor de dentro para fora. Complexos de cobalto têm sido muito estudados, devido ao fato de complexos de Co³⁺ poderem atuar como carregadores e/ou desativantes do agente anticâncer, porém quando reduzidos a Co²⁺ nos ambientes em hipóxia devem liberar o fármaco seletivamente. Neste trabalho, realizou-se a síntese e a caracterização de um novo complexo, o [Co(pymimi)₂](ClO₄)₂ a fim de avaliar sua atividade contra células tumorais. A síntese foi realizada utilizando etanol como solvente, CoCl₂•6H₂O como fonte de metal e o ligante pymimi (pymimi= *N*-((1-metil-1H-imidazol-2-il)metileno)-2-(piridin-2-il)etanamina), na proporção 1:2 (cobalto:ligante). O complexo foi caracterizado por análise por difração de raios X de monocristal, espectroscopias nas regiões do ultravioleta-visível (UV-Vis) e do infravermelho (IV), condutivimetria e voltametria cíclica em CH₃CN. A atividade biológica do complexo foi investigada pelo método MTT contra células epiteliais de adenocarcinoma alveolar de células basais de pulmão humano (A549). Apesar dos resultados indicarem que o complexo apresenta baixa letalidade para a linhagem de células testada esta potencial pró-droga pode apresentar-se citostática levando à inibição da proliferação celular.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das causas de maior índice de mortalidade. Em 2008, foi a causa *mortis* de 13% do total de óbitos, aproximadamente 7,6 milhões de pessoas no mundo foram vítimas de tumores malignos. Com estimativa de cerca de 12,7 milhões de novos casos em 2008 e que chegue a 21,4 milhões em 2030, as doenças oncológicas aparecerão no topo dentre as causas de mortalidade, superando as doenças cardiovasculares. Quase dois terços de todos os diagnósticos ocorrem em países de baixa e média renda (World Health Organization, 2010).

Apesar do progresso atingido no tratamento de diferentes tipos de câncer, pesquisadores no mundo inteiro continuam buscando novos métodos para diagnóstico e terapia de tumores malignos (OSINSKY *et al.*, 2003; TEXEIRA, 2009).

1.1. ESTRUTURA DOS TUMORES SÓLIDOS E A REGIÃO EM HIPÓXIA

Para entender como os fármacos geralmente atuam em tumores é necessário entender suas características e estrutura. O câncer é caracterizado pela proliferação desordenada de células que sofreram algum tipo de mutação genética. Estas mutações podem ter origem através da exposição a fatores ambientais ou por fatores hereditários. Os fatores ambientais representam cerca de 80% dos casos. Estes fatores podem ser contaminantes, como agentes químicos (xenobióticos), radiação ionizante e alguns vírus, como os da hepatite B e o HPV (vírus do papiloma humano), que podem contribuir para a formação e propagação da doença (ALMEIDA *et al.*, 2005).

As células tumorais ocupam menos da metade do volume total do tumor e os vasos sanguíneos se entrelaçam dentro da massa tumoral, preenchendo de 1 até 10% do seu volume; o espaço restante é preenchido por uma matriz rica em colágeno que envolve as células e podem separá-las da vascularização. Ainda que o crescimento do tumor seja seguido de uma ativa vascularização, frequentemente a divisão celular ocorre mais rapidamente do que o surgimento de novos vasos sanguíneos (JAIN, 1994 e ALMEIDA *et al.*, 2005). Desse modo, durante o desenvolvimento tumoral, alguns vasos sanguíneos já existentes são obstruídos ou comprimidos. Em seguida, pequenos vasos sanguíneos começam a surgir, um processo conhecido como neovascularização. Sendo assim, algumas áreas são bem

irrigadas e outras possuem pouca ou nenhuma vascularização, fazendo com que a quantidade de oxigênio e de nutrientes em algumas regiões do tumor seja menor do que em tecidos normais (JAIN, 1994).

As células localizadas próximas aos vasos sanguíneos (periferia do tumor) são células bem oxigenadas. As células localizadas no centro do tumor e, portanto, distantes da vascularização, são células anóxicas e necróticas. Já as células existentes entre estas duas regiões são conhecidas como *células em hipóxia*, pois estão localizadas em uma região de baixa concentração de oxigênio (BUSTAMANTE *et al.*, 2009), como representado na Figura 1.

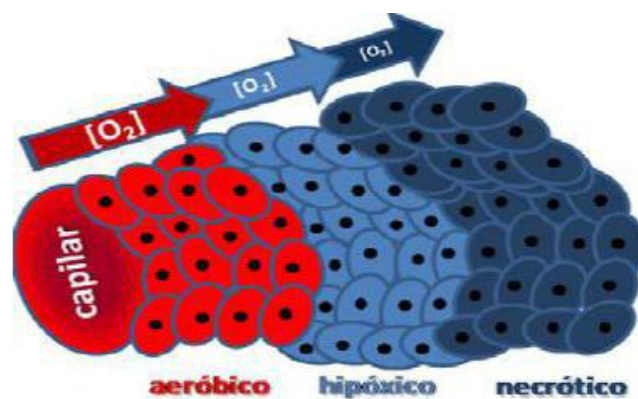


Figura 1: Representação esquemática de uma seção tumoral circundando um capilar e mostrando o decréscimo da concentração de oxigênio com o aumento da distância em relação ao capilar (BUSTAMANTE *et al.*, 2009).

1.2. OS PRINCIPAIS TRATAMENTOS DO CÂNCER

Os dois principais tratamentos de câncer utilizados até o momento são a quimioterapia e a radioterapia. Entretanto, essas duas técnicas não têm se mostrado totalmente eficientes.

No que diz respeito à quimioterapia, a pouca eficiência se justifica, primeiramente, pela dificuldade do fármaco em chegar às células em hipóxia devido à pobre vascularização. Assim, a concentração do fármaco que atinge as células é pequena, de modo que a eficiência do fármaco torna-se reduzida, quando comparada com as regiões oxigenadas (JAIN, 1994 e DENNY, W. A.; WILSON, W. R, 1986).

Além disso, muitos agentes anticâncer requerem oxigênio molecular para atuar, a partir da formação de radicais, gerados por incidência de radiação através de tratamento radioterápico concomitante. A baixa concentração de oxigênio também retarda a divisão celular, de modo que agentes quimioterápicos sejam menos efetivos no combate às células em *hipóxia* (OLIVEIRA, R.B.; ALVES, R.J, 2002).

A eficácia da radioterapia está relacionada com a abundância de oxigênio no tecido alvo. A incidência no tecido oxigenado gera inicialmente radicais que atuam degradando ou desativando moléculas essenciais (HELLMAN, S., ROSENBERG, S. A, 1989). Como as células em hipóxia apresentam relativamente baixa concentração de oxigênio, tais células tornam-se resistentes à radioterapia, pois uma vez que as células em hipóxia apresentam pouco oxigênio, a quantidade de radicais formados é menor e, conseqüentemente, a eficiência da radioterapia é reduzida (DENNY, 2001).

1.3. ESTRATÉGIAS BASEADAS EM HIPÓXIA

A estratégia que tem sido proposta é a de explorar as condições de hipóxia dos tumores sólidos no desenvolvimento de pró-fármacos que apresentem atividade apenas em ambientes redutores. Estudar métodos que tenham como foco a obtenção de agentes que sejam reduzidos apenas nas regiões em hipóxia, sendo esta redução efetivada pelas redutases celulares (enzimas redutoras presentes nas células do organismo) ou por radiação.

Foi proposto então, que esta característica poderia ser explorada no desenvolvimento de agentes tumorais, os quais só se tornariam citotóxicos após ativação metabólica pelas nitroredutases celulares. Estes agentes biorredutíveis deveriam ser substâncias inativas (pró-fármacos) que, in vivo, sofreriam redução dando origem à substância na forma ativa (fármaco) (Figura 2). Estes agentes são classificados como PDAHs (Pró-Fármacos Ativadas por Hipóxia – adaptado do inglês: Pro-Drugs Activated by Hypoxia). (DENNY, 2001; OLIVEIRA et al, 2002; BUSTAMANTE et al, 2009)

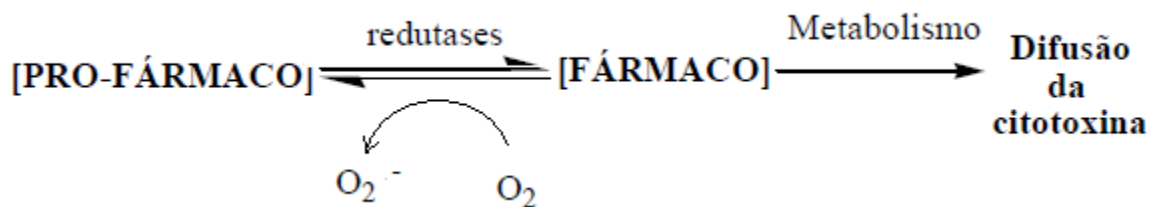


Figura 2: Mecanismo de ativação de pró-fármaco em região de hipóxia (adaptado de DENNY, 2001).

Como comentado anteriormente, a presença de células em hipóxia é característica de tumores sólidos, e geralmente não ocorrem em tecidos normais, assim tais células se tornaram o alvo de novos possíveis tratamentos. Para que haja êxito da atividade das PDAHs, são necessárias três propriedades fundamentais: i) solubilidade e difusão adequadas; ii) redução às espécies reativas somente nas regiões em hipóxia e iii) atividade apenas das espécies reduzidas (DENNY, W. A.; WILSON, W. R, 1986; DENNY, 2001; BUSTAMANTE *et al*, 2009).

1.4. A QUÍMICA BIOINORGÂNICA E O USO DE COMPLEXOS COMO PDAHs

A Química Bioinorgânica estuda as funções, metabolismo e aplicações de íons inorgânicos e seus complexos em sistemas biológicos, correlacionando a atividade biológica apresentada por um sistema inorgânico com suas características estruturais e eletrônicas (QUE JR, L.; BANCI, L, 2002). Um dos principais objetivos da Química Bioinorgânica é o estudo e o auxílio no desenvolvimento de metalofármacos.

Embora complexos sejam utilizados com fins terapêuticos desde tempos remotos, substâncias orgânicas dominam a farmacologia desde o início do século XIX. Contudo, na década de 60, as substâncias inorgânicas voltaram a chamar a atenção com o desenvolvimento e o sucesso do agente anticâncer cisplatina, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂].

A coordenação de fármacos já conhecidos a centros metálicos modifica as suas propriedades farmacológicas permitindo que o fármaco possa ser liberado de modo controlado e em uma situação específica. Tal fato permite que substâncias antes rejeitadas para uso devido à elevada toxicidade voltem a ser utilizadas, já que é possível um maior direcionamento. A escolha do centro metálico e a variação de

ligantes coordenados possibilitam modificar o potencial de redução do composto, de modo que é possível torná-lo seletivo para biorredução em regiões de hipóxia.

1.5. LINHA DE PESQUISA DO LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS BIOINORGÂNICOS

Scarpellini e colaboradores do LDCB têm se dedicado a estudos de complexos como possíveis pró-drogas ativadas por hipóxia, utilizando diversos metais coordenados e diversos ligantes nitrogenados de forma a estudar o comportamento que cada complexo desenvolve como possível pró-droga.

O estudo mais recente reportado foi o de novos complexos de Ga^{3+} contendo ligantes tridentados N_2O -doadores como possíveis metalofármacos antitumorais que tiveram seus testes de viabilidade celular realizados em células de câncer de mama, tendo como resultado de um dos complexos apresentados (Figura 3) $\text{IC}_{50}=76,9 \mu\text{M}$, maior que a droga controle doxorrubicina ($\text{IC}_{50}=35,4\mu\text{M}$), porém menor que o da cisplatina ($\text{IC}_{50}=119,3 \mu\text{M}$), o que sugere a possível viabilidade do uso do mesmo como metalofármaco antitumoral (PADILHA, D.S., 2014)

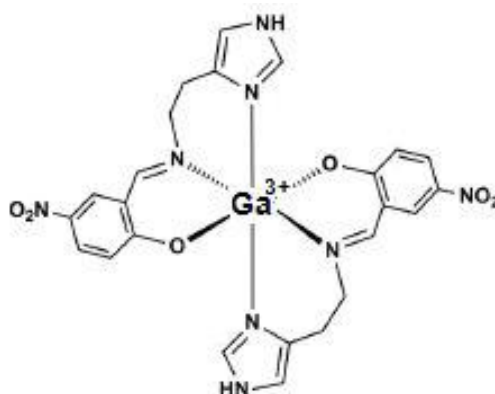


Figura 3: Representação estrutural do cátion complexo $[\text{Ga}(\text{bhi-NO}_2)_2]\text{NO}_3$

(PADILHA, D.S.,2014).

Foram estudados também, por outros colaboradores do laboratório, complexos de cobalto. Foram sintetizados complexos mononucleares de Co^{3+} (Figura 4) como inibidores do crescimento celular de *S. cerevisiae* e observou-se que as formas

reduzidas desses complexos apresentam resultados de $IC_{50} = 0,5 \text{ mM}$, ou seja, menor que o da cisplatina ($0,6 \text{ mM}$) para o mesmo período de exposição (Tabela 1).

Estes dados indicam que os complexos possuem grande potencial como pró-drogas biorredutíveis, uma vez que sua forma oxidada não mostrou atividade expressiva em morte celular e inibição celular, comparada com a sua forma reduzida (TEXEIRA, E., 2009; CASTRO, FREDERICO A. V, 2010).

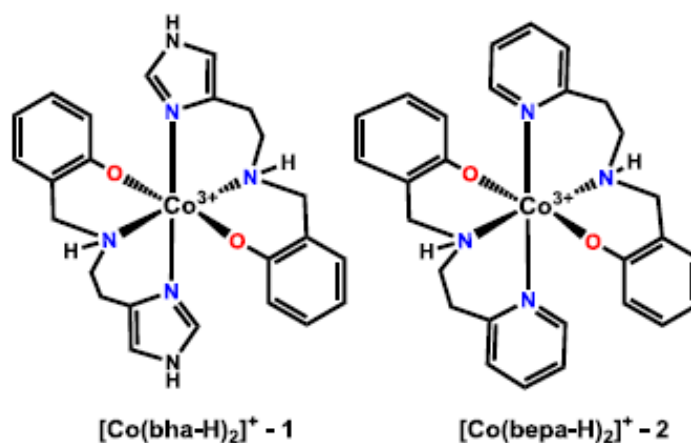


Figura 4: Complexo mononuclear $[Co(bha-H)_2]^+ - 1$, e $[Co(bepa-H)_2]^+ - 2$, como possíveis pró-drogas ativadas por hipóxia (TEXEIRA, E., 2009).

Tabela 1: Efeitos de citotoxicidade dos complexos reduzidos $[Co(bha-H)_2]^+ - 1$, e $[Co(bepa-H)_2]^+ - 2$ em células de *S. Cerevisiae* (TEXEIRA, E., 2009).

Complexos	IC_{50}^a (mM)
Complexo $[Co(bha-H)_2]^+ - 1$	$0,5 \pm 0,01$
Complexo $[Co(bepa-H)_2]^+ - 2$	$0,5 \pm 0,02$
Cisplatina	$0,6 \pm 0,01$

^a 50% inibição do crescimento

Baseado no trabalho anterior, Scarpellini e colaboradores investigaram posteriormente outros compostos mononucleares de Co^{3+} , apresentados na Figura 5, como inibidores de crescimento celular na linhagem de melanoma murino *B16F10*. Os resultados obtidos foram satisfatórios. Como pode ser observada na Tabela 2, a substituição dos grupos na posição *para* do fenol ($-NO_2$ e $-H$) causa

mudanças no potencial redox do complexo, as quais foram avaliadas no ensaio de viabilidade celular (IC_{50}) nesta linhagem tumoral. (TEXEIRA, E., 2009).

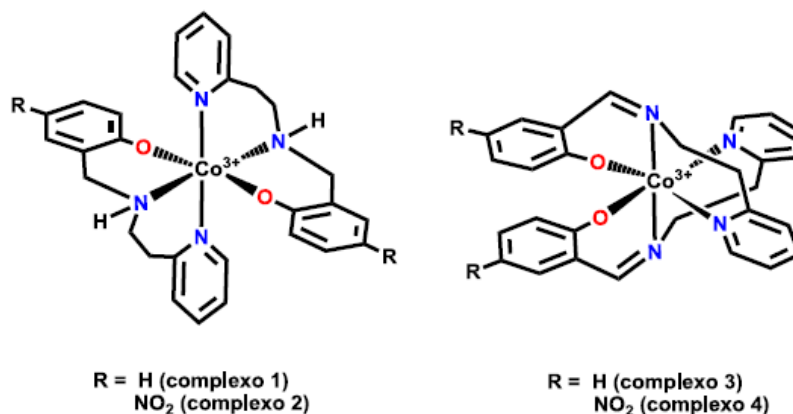


Figura 5: Compostos mononucleares de cobalto com ligantes tridentados
(TEXEIRA, E., 2009).

Tabela 2: Valores de viabilidade celular e IC_{50} frente à linhagem celular tumoral B16F10
(TEXEIRA, E., 2009).

Complexo	% Viabilidade celular em 125 μ M	IC_{50}
1	21,9 \pm 5,30	~60 μ M
2	35,9 \pm 4,49	>60 μ M e <125 μ M
3	52,2 \pm 0,230	~125 μ M
4	30,9 \pm 9,00	>60 μ M e <125 μ M

Os resultados apresentados nos estudos citados acima são alguns dos projetos estudados no laboratório LDCB, que investiga a influência da natureza de grupos substituintes -R, na posição *para* do anel fenólico, em ligantes tridentados, sobre os potenciais de redução e a atividade biológica de complexos de Co³⁺.

Compostos de coordenação contendo ligantes nitrogenados ligados a cobalto, que é o caso de pesquisa deste trabalho de conclusão de curso, têm sido estudados como possíveis pró-fármacos ativados biorredutivamente. Complexos de cobalto têm tido destaque, devido ao fato de complexos de Co³⁺ poderem atuar como carregadores e/ou desativantes do agente anticâncer, que quando reduzidos a Co²⁺

nos ambientes em hipóxia devem liberar o fármaco seletivamente (BUSTAMANTE, 2009).

A ideia é que o complexo de Co^{3+} , em células normais, seja reduzido pelas redutases e prontamente reoxidado, enquanto que, ao atingir as células em hipóxia, não haja a reoxidação de modo a liberar o fármaco. Porém, o método teve sucesso moderado já que o estado $2+$ é muito lábil havendo liberação do fármaco em células normais, antes da reoxidação. Entretanto, complexos com ligantes polinitrogenados, bi- e tridentados, têm sido sintetizados na tentativa de reduzir o potencial dos complexos, estabilizando-os de modo a serem reduzidos efetivamente apenas nas células em hipóxia (WARE D. C. *ET al.*, 2000).

Neste trabalho de conclusão de curso será apresentada a síntese, a caracterização por diversas técnicas e a atividade biológica pelo teste colorimétrico MTT contra células epiteliais de adenocarcinoma alveolar de células basais de pulmão (A549) de um complexo inédito de Co^{3+} com o ligante tridentado pymimi.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Sintetizar, caracterizar e testar a atividade do complexo de cobalto com o ligante pymimi contra células tumorais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o complexo formado entre o ligante pymimi e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Caracterizar o complexo por espectroscopias nas regiões do ultravioleta-visível (UV-Vis) e infravermelho (IV).
- Estudar o comportamento eletroquímico do complexo por voltametria cíclica.
- Realizar testes de cristalização do complexo para obtenção de monocristais adequados para a resolução da estrutura cristalina por difração de raios X.
- Investigar a atividade biológica do complexo contra células tumorais.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS UTILIZADOS

Os seguintes reagentes, materiais e solventes foram utilizados neste trabalho nas sínteses e análises: Etanol (Vetec); Metanol (Vetec); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich); Acetonitrila UV/HPLC (Merck); Perclorato de Sódio (NaClO_4); Isopropanol (Vetec); Éter Etilico PA.

O ligante utilizado na síntese do complexo foi o pymimi [*N*-((1-metil-1H-imidazol-2-il)metileno)-2-(piridin-2-il)etanamina], que foi gentilmente doado pelo estudante Andrey Linhares do laboratório LDCB e foi obtido por metodologia previamente descrita na literatura (GREATTI *et al.*, 2008).

3.2. SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Co}(\text{PYMIMI})_2](\text{ClO}_4)_2$

A síntese do complexo foi realizada utilizando-se etanol como solvente, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como fonte de metal e o ligante pymimi, utilizados na proporção 1:2 (cobalto:ligante) como representado na Figura 6.

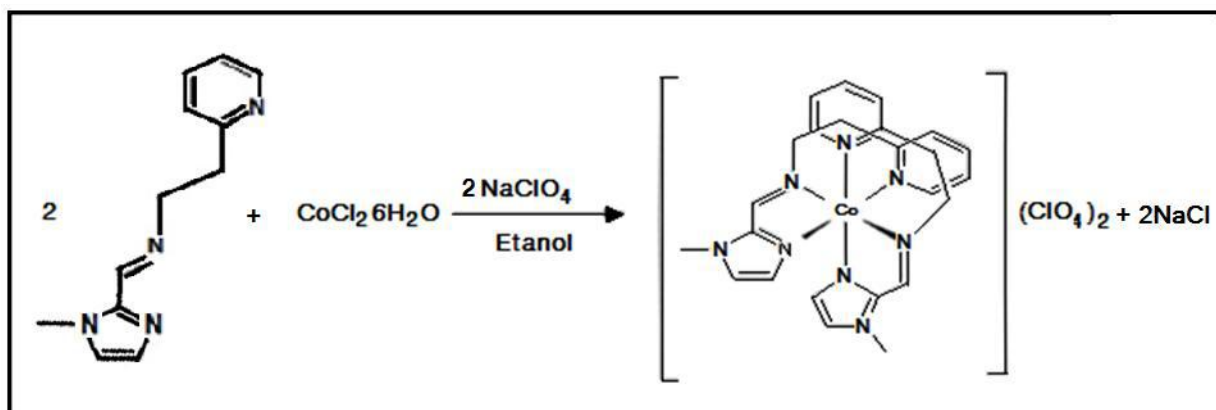


Figura 6: Esquema reacional de síntese e reação do complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$.

Em um béquer de 50 mL, preparou-se uma solução do ligante pymimi (0,4286 g) em 10 mL de etanol e em outro béquer preparou-se uma solução com a fonte do metal $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2379 g) em 10 mL de etanol, como ilustrado a seguir na Figura 7.



Figura 7: Solução da fonte de metal $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Azul) e solução do ligante pymimi (Amarelo claro).

Colocou-se a solução contendo o ligante numa placa com agitação (sem aquecimento) e adicionou-se gota a gota a solução contendo o metal, Figura 8. Ao final da adição deixou-se sob aquecimento a 50°C durante 30 min e obteve-se uma solução de cor laranja-avermelhada.



Figura 8: Solução contendo o ligante pymimi e a fonte de metal $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Adicionou-se uma espátula (aproximadamente 0,8 g) de perclorato de sódio para atuar como contra-íon. Houve a formação de precipitado da mesma cor no fundo do béquer, que foi filtrado com uma filtração simples. Obteve-se uma massa

de 0,3500 g do sólido que precipitou (rendimento de 48,49 %), e uma parte bem pequena teve sua solubilidade testada em diversos solventes para a realização da recristalização, sendo solúvel em metanol a quente (Figura 9).



Figura 9: Cristais formados a partir da recristalização do complexo com metanol a quente.

Do sólido precipitado restante, uma massa de 0,2860 g foi solubilizado em metanol a quente (150 mL), o qual ficou durante 1 hora sob agitação e aquecimento. A solução foi dividida em três béqueres, um foi deixado em estufa de cristalização (Cooled vacuum drying oven VOcool - MEMMERT) à temperatura de 10°C, outro foi deixado na geladeira e o último à temperatura ambiente sobre a bancada; todos protegidos com parafilme tendo alguns furinhos no plástico que permitisse o vapor sair.

Obtiveram-se monocristais da cor laranja, os quais foram lavados com isopropanol gelado e depois foram secos com éter etílico também gelado. Obteve-se uma massa de cristais de:

Cristais do béquer da bancada: 0,0237 g

Cristais do béquer da geladeira: 0,0562 g

Cristais do béquer da estufa: 0,0755 g

No total obtiveram-se cristais cor laranja uma massa de 0,1554 g (rendimento de 54,35%).

3.3. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

3.3.1. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi realizada em um espectrofotômetro Nicolet magna FTIR-760, na região de 4000 a 200 cm^{-1} no laboratório de Instrumentos e Pesquisa do Departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química da UFRJ. As amostras sólidas foram analisadas em pastilhas de KBr e CsI.

3.3.2. DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE MONOCRISTAL

Monocristais do complexo foram escolhidos com auxílio de microscópio, para selecionar aqueles melhor formados. A análise foi realizada pelo Professor Carlos Basílio da Universidade Federal de Minas Gerais; os experimentos foram realizados em um difratômetro Agilent Gemini Ultra A no Laboratório de Cristalografia (LabCri) da Universidade Federal de Minas Gerais. A coleta de dados de difração de raios X de monocristais do complexo foi realizada à temperatura ambiente.

3.3.3. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA

Os espectros eletrônicos na região do ultravioleta-visível foram obtidos em um espectrofotômetro Cary 50-Bio da Varian, no Laboratório de Desenvolvimento de Compostos Bioinorgânicos (LDCB) do Instituto de Química da UFRJ. As análises foram realizadas utilizando-se acetonitrila de grau espectroscópico (UV/HPLC) em cubetas de quartzo, com capacidade para 4 mL e com 1 cm de caminho óptico.

3.3.4. CONDUTIVIMETRIA

As análises de condutividade molar foram efetuadas em um condutivímetro Analyser 650M, no Laboratório de Desenvolvimento de Compostos Bioinorgânicos (LDCB) do Instituto de Química da UFRJ, utilizando-se acetonitrila de grau espectroscópico (UV/HPLC) em concentrações de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As análises foram realizadas, à temperatura de 25°C, após calibração do equipamento com mistura padrão de KCl e NaCl ($1.413 \mu\text{S cm}^{-1}$).

3.3.5. VOLTAMETRIA CÍCLICA

O comportamento redox do complexo foi investigado por voltametria cíclica utilizando-se um potenciostato-galvanostato Epsilon da Bioanalytical Systems (BAS), no Laboratório de Desenvolvimento de Compostos Bioinorgânicos (LDCB) do Instituto de Química da UFRJ. Nos experimentos realizados em soluções de acetonitrila UV/HPLC, com concentrações iguais a $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Foi utilizado hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF_6 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrólito suporte e o experimento foi realizado sob atmosfera de argônio.

Utilizou-se uma célula eletrolítica contendo como eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono vítreo, como eletrodo de referência um pseudo-eletrodo de Ag/AgCl e por último como eletrodo auxiliar, um fio de platina. Para monitorar o eletrodo de referência utilizou-se o par redox ferrocínio/ferroceno como referência interna (GAGNÉ, R.R. *et al.*, 1980), cujos seguintes valores de $E_{1/2}$ e ΔE_p foram observados: Fc^+/Fc : $E_{1/2} = 0,128 \text{ V vs Ag/AgCl}$ e $\Delta E_p = 84 \text{ mV}$.

3.3.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Com o objetivo de avaliar o possível potencial do complexo como pró-droga biorredutível, foram realizados testes biológicos utilizando-se células tumorais. Estes testes foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Dias Pereira (DBQ-IQ/UFRJ). Para avaliar a atividade citotóxica do complexo, o crescimento celular foi determinado através do teste colorimétrico MTT, contra células epiteliais de adenocarcinoma alveolar de células basais de pulmão humano (A549). O teste consiste num ensaio colorimétrico no qual a viabilidade celular é determinada pela dependência mitocondrial na redução de um sal de cor amarela, o sal de tetrazólio, que é reduzido a cristais de cor azul. Entretanto, mais detalhes a respeito do teste não serão discutidos por não terem sido realizados por mim.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Foi realizada a espectroscopia na região do infravermelho de amostras do ligante e do complexo. Os espectros vibracionais foram realizados em pastilha de KBr na faixa de 4.000 a 400 cm^{-1} , nos quais foram observadas bandas características de grupamentos do ligante pymimi. Os espectros estão representados na Figura 10 e as atribuições das bandas estão na Tabela 3.

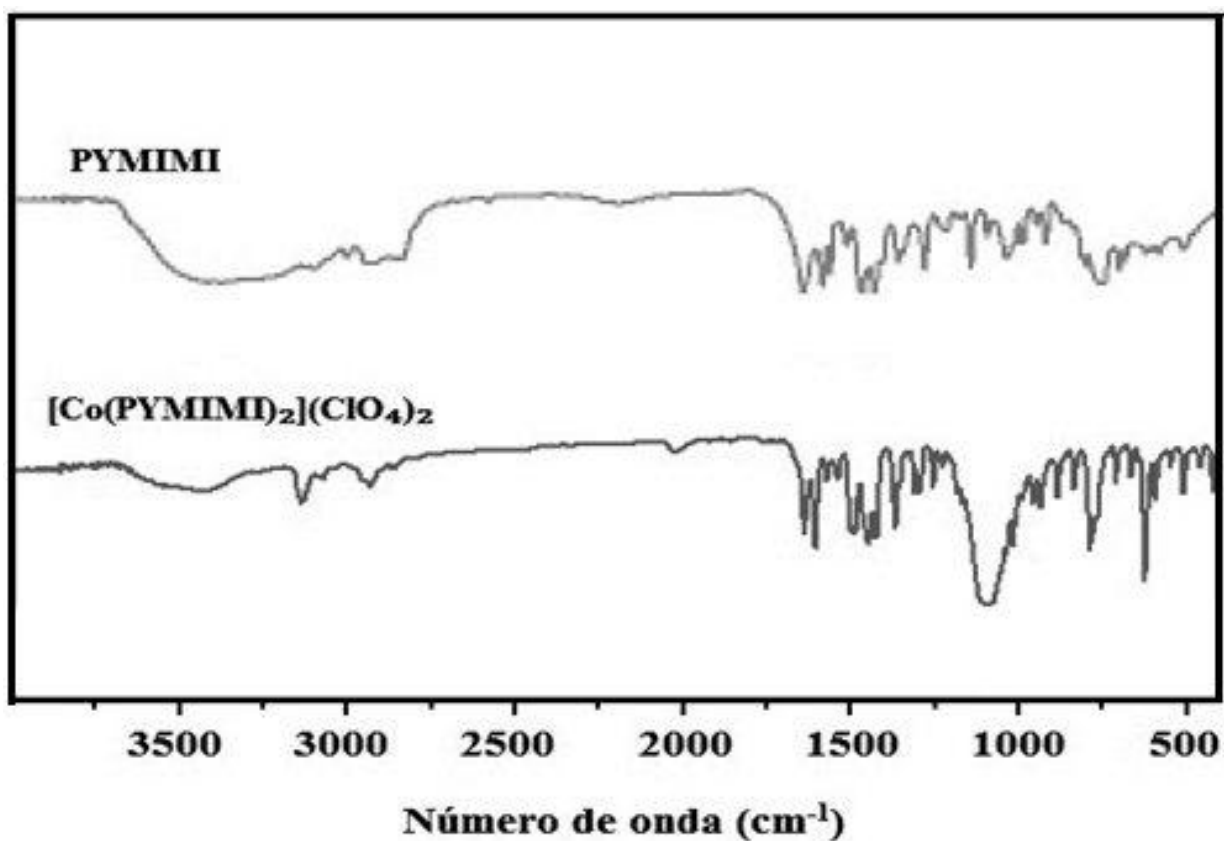


Figura 10: Espectros no infravermelho do ligante pymimi e do complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$.

Tabela 3: Principais bandas (em cm^{-1}), do espectro no infravermelho para o ligante pymimi e o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$.

Atribuição	Bandas do ligante pymimi (cm^{-1})	Bandas do complexo (cm^{-1})
$\nu(\text{O-H})$	3.385	3.435
$\nu(\text{C-H}_{\text{arom}})$	3.009	3.071
$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$ metil	2.950 – 2.871	2.952
$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$ metileno	2.847	2.856
$\nu(\text{C=N})$ imina	1.651	1.637
$\nu(\text{C=N})_{\text{arom}}$	1.592	1.605
$\nu(\text{C=C})_{\text{arom}}$	1.415	1.422
$\nu(\text{Cl-O})$	Ausente	1.097
$\delta(\text{C-H})$ fora do plano	764	785

Pela análise dos resultados mostrados na Tabela 3, observa-se a presença de alargamentos, ou deslocamentos, de bandas características do ligante, e encontradas no espectro do complexo, as quais são atribuídas à coordenação do ligante com o metal. Quando o ligante coordena com o metal este acaba mudando a força de vibração da ligação e, conseqüentemente absorve numa região diferente no infravermelho.

No espectro do complexo, na região entre 3589 e 3.422 cm^{-1} estão as bandas de deformação axial O-H de álcool $\nu(\text{O-H álcool})$, características de etanol e metanol utilizados nas sínteses do ligante e do complexo (SILVERSTEIN *et al.*, 1994).

Com relação à deformação axial $\nu(\text{C=N})$ imina, no espectro do ligante esta banda, característica da imina, se encontra em torno de 1.651 cm^{-1} e sofre um deslocamento para 1.637 cm^{-1} quando coordena com o metal, visto no espectro do complexo.

As ligações C=C de anéis aromáticos apresentam bandas de deformação axial ν (C=N e C=C aromáticos) entre 1605-1422 cm^{-1} para o complexo e para o ligante 1592-1415 cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al.*, 1994).

Pode ser verificada a presença da deformação axial da ligação ν (Cl-O), a qual se encontra ausente no espectro do ligante e presente no espectro do complexo em 1097 cm^{-1} , uma vez que o íon perclorato está presente como contra-íon na formação do complexo.

E por último, a banda que representa a deformação angular da ligação C-H de aromáticos δ (C-H) está em torno de 764 cm^{-1} no espectro do ligante e em 785 cm^{-1} no espectro do complexo após coordenar com o metal.

Todas estas observações sugerem a formação de um complexo de cobalto com o ligante pymimi em que o íon perclorato está presente possivelmente como contra-íon.

4.2. DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE MONOCRISTAL

Foram obtidos monocristais de cor laranja a partir das soluções que foram deixadas cristalizando: na estufa de cristalização à temperatura de 10 °C, na geladeira e sobre a bancada à temperatura ambiente; todos num intervalo de tempo de cinco dias, aproximadamente, após a evaporação lenta da solução de cristalização.

Foram utilizados para a resolução da estrutura cristalina do complexo as amostras cristalizadas a 10 °C (na estufa de cristalização). Uma representação visual para o complexo foi obtida pelo programa cristalográfico ORTEP (FARRUGIA, 1997) e está representada na Figura 11.

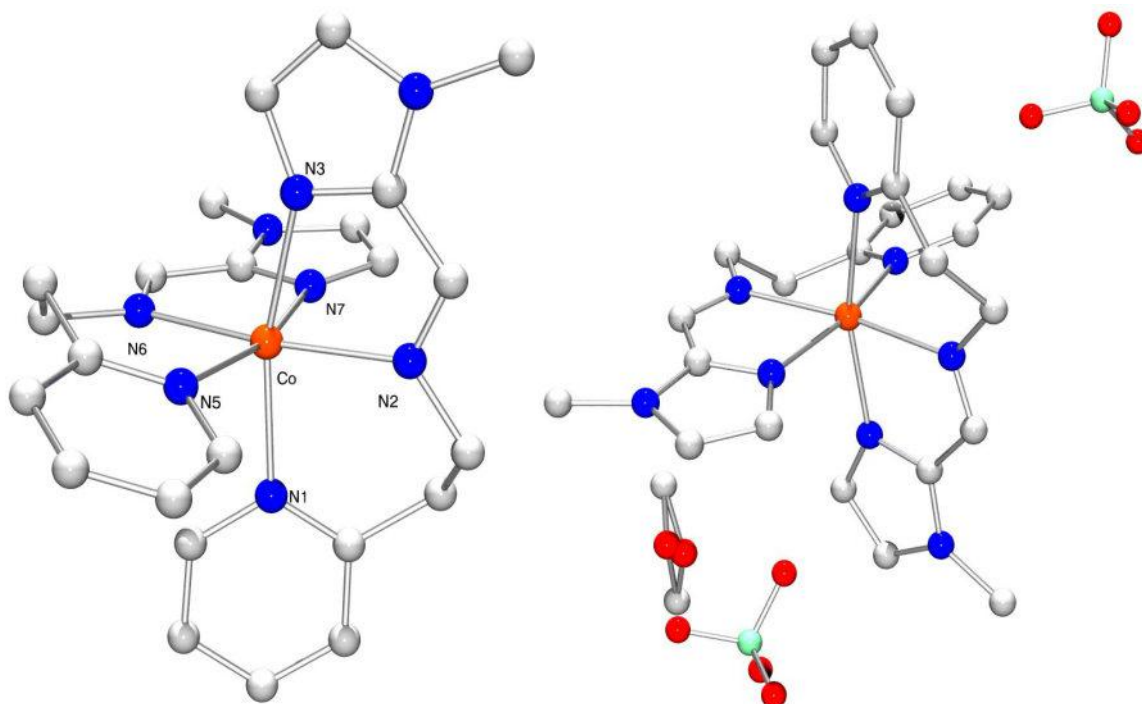


Figura 11: Representações gráficas: (a) do cátion complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2]^{2+}$ e (b) da cela cristalina contendo o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$ e uma molécula de metanol. Ambas foram geradas pelo programa ORTEP, com 50 % de probabilidade.

A estrutura obtida por difração de Raios X de monocristal mostra uma estrutura consistente com a proposta de coordenação, dois ligantes pymimi tridentados coordenados a um centro metálico mononuclear de Co^{2+} formando uma espécie hexacoordenada. Verificou-se que o cobalto está na forma Co^{2+} devido à presença de dois ânions perclorato. Compostos hexacoordenados com ligantes tridentados podem apresentar geometria facial ou meridional. A análise das distâncias de ligação e a representação visual da estrutura cristalina do complexo sugerem que a geometria para este seja da forma *meridional* distorcida. As distâncias de ligação são apresentadas na Tabela 4.

As distâncias de ligação entre carbono e nitrogênio são típicas de iminas ($\text{C}=\text{N}$), como pode ser observado nas ligações $\text{N2}=\text{C18}$ de 1,269 Å de uma molécula do ligante pymimi e a ligação $\text{N6}=\text{C19}$ de 1,265 Å do segundo ligante coordenado ao metal.

Tabela 4: Principais distâncias de ligação para o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$.

Ligação	Distância da ligação (Å)
N1 – Co	2,175
N2 – Co	2,131
N3 – Co	2,182
N5 – Co	2,171
N6 – Co	2,142
N7 – Co	2,129
N2 = C18	1,269
N6 = C19	1,265

Um ponto importante a ser considerado também é a análise dos ângulos de ligação apresentados na tabela 5 mostrando os principais ângulos de ligação da esfera de coordenação, que são diferentes de 90° e 180° , como seria esperado para uma geometria octaédrica perfeita.

Na análise de difração de raios x de monocristal, além de obter o complexo em questão foram visualizados os dois percloratos, como mencionado anteriormente e, além disso, uma molécula de metanol de cristalização. Este metanol está desordenado em duas posições, como pode ser observado na Figura 11.

Através da difração de raios x, foi possível obter a fórmula química completa do complexo, $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$, com massa molar de $718,56 \text{ g mol}^{-1}$, chegando à conclusão que o complexo se trata de um octaedro distorcido com geometria da forma *meridional* distorcida.

Tabela 5: Principais ângulos de ligação para o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$.

Átomo 1	Átomo 2	Átomo 3	Ângulo de ligação ($^\circ$)
N1	Co	N2	87,82(9)
N1	Co	N6	94,6(1)
N1	Co	N7	94,59(9)
N1	Co	N5	90,4(1)
N1	Co	N3	164,7(1)
N2	Co	N6	171,04(9)
N2	Co	N7	93,58(9)
N2	Co	N5	100,8(1)
N2	Co	N3	77,17(9)
N6	Co	N7	77,64(9)
N6	Co	N5	87,8(1)
N6	Co	N3	100,7(1)
N7	Co	N5	164,9(1)
N7	Co	N3	89,40(9)
N5	Co	N3	89,5(1)

4.3. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Foi registrado o espectro eletrônico do complexo utilizando-se como solvente acetonitrila de grau espectroscópico (UV/HPLC) em cubetas de quartzo, com capacidade para 4 mL e 1 cm de caminho óptico. A análise foi feita na região do UV-Vis, entre 200 e 700 nm. Nesta caracterização são observados processos de absorção eletrônica, que ocorrem por mudança do estado energético dos elétrons que pertencem tipicamente aos ligantes.

Com a espectroscopia eletrônica é possível determinar os comprimentos de onda das absorções, calcular os coeficientes de absorvidade molar (ϵ) de cada uma e, então, atribuir os tipos de transições eletrônicas que estão ocorrendo no composto. Os resultados obtidos para o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$ se encontram na Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros espectrais do complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$ na região do espectro eletrônico.

Concentrações do complexo	λ (nm)	Absorvância
$1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	485	0,514
$7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	485	0,395
$5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	485	0,272
$2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	485	0,145
$2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	290	0,704
	272	0,579
$2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	290	0,098
	272	0,080

A partir dos valores obtidos determinou-se o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) fazendo uso da equação da *Lei de Lambert Beer*. $A = b \times \epsilon \times c$

Na equação temos que: A corresponde ao valor de absorvância obtido para cada comprimento de onda, b corresponde ao caminho óptico (1 cm), c é a concentração do complexo utilizada e, o que se deseja determinar, ϵ , que corresponde ao coeficiente de absorvidade molar.

Para o $\lambda = 485 \text{ nm}$

$$0,514 = \epsilon \times 1 \times 1,0 \times 10^{-2}, \text{ portanto, } \epsilon = 51,4$$

$$0,395 = \epsilon \times 1 \times 7,5 \times 10^{-3}, \text{ portanto, } \epsilon = 52,6$$

$$0,272 = \epsilon \times 1 \times 5,0 \times 10^{-3}, \text{ portanto, } \epsilon = 54,4$$

$$0,145 = \epsilon \times 1 \times 2,5 \times 10^{-2}, \text{ portanto, } \epsilon = 58,0$$

$$\epsilon \text{ médio} = 54,1$$

Para o $\lambda = 290 \text{ nm}$

$$0,704 = \epsilon \times 1 \times 2,5 \times 10^{-5}, \text{ portanto, } \epsilon = 28.160$$

$$0,098 = \epsilon \times 1 \times 2,5 \times 10^{-6}, \text{ portanto, } \epsilon = 39.200$$

$$\epsilon_{\text{médio}} = 33.680$$

Para o $\lambda = 272 \text{ nm}$

$$\left. \begin{array}{l} 0,579 = \epsilon \times 1 \times 2,5 \times 10^{-5}, \text{ portanto, } \epsilon = 23.160 \\ 0,080 = \epsilon \times 1 \times 2,5 \times 10^{-6}, \text{ portanto, } \epsilon = 32.000 \end{array} \right\} \epsilon_{\text{m\u00e9dio}} = 27.580$$

Os valores de comprimento de onda, coeficiente de absorvidade molar e as respectivas atribui\u00e7\u00f5es dos tipos de transi\u00e7\u00e3o encontram-se dispostos na Tabela 7 e os espectros eletr\u00f4nicos s\u00e3o apresentados na Figura 12.

Tabela 7: Dados de espectroscopia eletr\u00f4nica do complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$, em acetonitrila.

Comprimento de onda (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$)	Atribui\u00e7\u00e3o
485	54,1	d – d
290	33.680	TCIL
272 (ombro)	27.580	TCIL

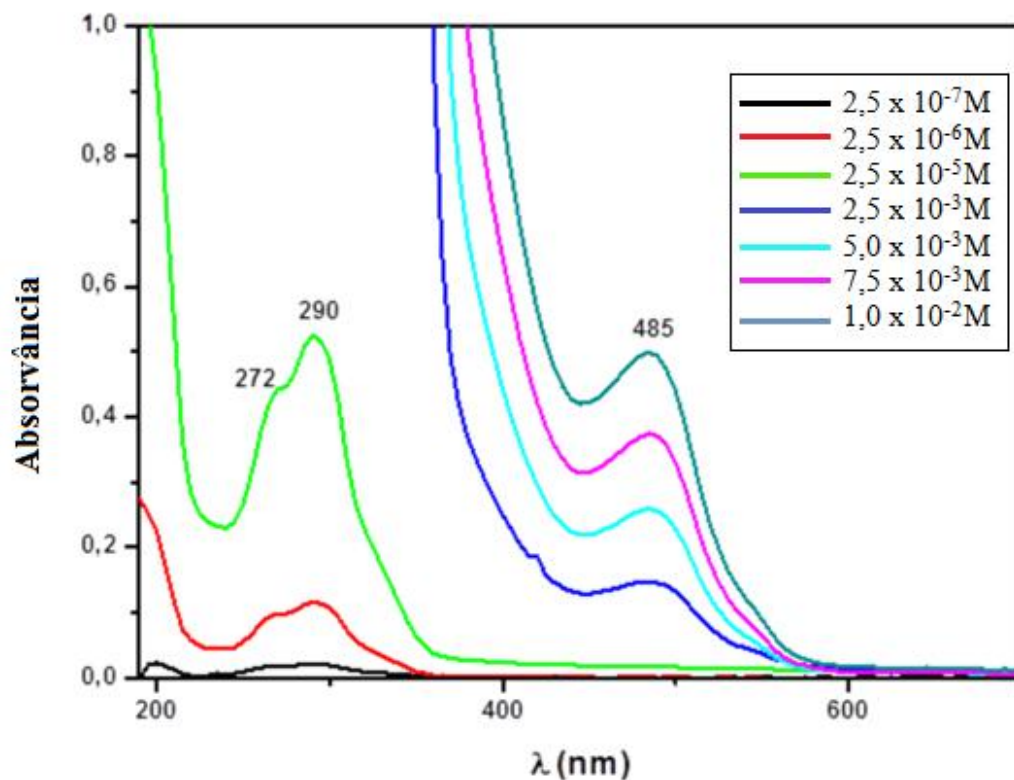


Figura 12: Espectro eletr\u00f4nico do complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$ em diferentes concentra\u00e7\u00f5es, em acetonitrila.

A banda observada em 485 nm ($\epsilon = 54,1 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$) apresenta baixo valor de coeficiente de absorvidade molar e, dessa forma, pode ser identificada como um processo de transferência do campo ligante, ou do tipo d-d, centrada no Co^{2+} . Já as bandas em 290 e 272 nm, que apresentam altos valores de coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon = 33.680 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$ e $\epsilon = 27.580 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$, respectivamente) são características de processos de transferência de carga do tipo intraligante, TCIL.

4.4. CONDUTIVIDADE MOLAR

A condutividade molar foi utilizada como uma ferramenta na caracterização do comportamento eletrolítico do complexo. O valor de condutividade molar permite caracterizar a proporção entre o cátion complexo e o ânion em solução. Esses valores já estão dispostos na literatura, onde estão determinadas as faixas de condutividade de acordo com o solvente orgânico utilizado e os respectivos tipos de eletrólito, como pode ser visto na Tabela 8 (GEARY,1971).

Tabela 8: Valores esperados de condutividade molar para complexos em acetonitrila, a 25°C e $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (adaptado de GEARY,1971).

Tipo de eletrólito			
1 : 1	2 : 1	3 : 1	4 : 1
120 – 160	220 - 300	340 – 420	500

A medida foi realizada em uma solução recém preparada do complexo, em acetonitrila, com concentração igual a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, a 25 °C. O valor de condutividade obtido foi **257 $\mu\text{S cm}^{-1}$** , o que sugere que o eletrólito seja do tipo 2 :1 (dois ânions perclorato para um cátion complexo).

4.5. VOLTAMETRIA CÍCLICA

Com a técnica de voltametria cíclica foi possível estudar o comportamento redox do complexo, o qual foi realizado, em diferentes velocidades de varredura, na faixa de potencial de -1.800 mV a +1.800 mV.

Em voltametria, um sinal de excitação é aplicado sobre uma célula contendo três eletrodos. Como resposta, obtém-se uma corrente que é registrada como uma função do potencial aplicado (SKOOG, *et al.*,2006).

A célula eletroquímica utilizada na voltametria cíclica é constituída de três eletrodos imersos em uma solução contendo o complexo de cobalto, que corresponde ao analito, e um excesso de eletrólito não reativo (neste trabalho, o TBAPF₆), chamado de eletrólito suporte.

Os eletrodos são:

- O eletrodo de trabalho, cujo potencial em relação a um eletrodo de referência varia linearmente com o tempo, nesse trabalho o eletrodo de trabalho é de carbono vítreo.
- O eletrodo de referência tem um potencial que permanece constante durante o experimento; neste trabalho usou-se o de Ag/AgCl. O eletrodo Ag/AgCl é padrão em água, no entanto, a análise foi feita em solvente orgânico, de modo que o eletrodo padrão se torna um pseudo-eletrodo, sendo necessário o uso de um padrão de referência interna para monitorar o pseudo-eletrodo de referência. Neste trabalho, utilizou-se o par redox ferroceno/ferrocínio.
- O terceiro eletrodo é um contra-eletrodo, que é constituído de um fio de platina. Na célula a corrente flui entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo (SKOOG, *et al.*,2006)

O experimento foi conduzido em atmosfera inerte de argônio. A Figura 13 mostra a resposta de corrente quando uma solução $3,73 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ do complexo é sujeita a uma varredura de potencial cíclico. A direção da varredura se iniciou em zero, seguindo em direção ao potencial positivo (varredura anódica).

Os principais parâmetros em um voltamograma cíclico são os potenciais de pico catódico (E_{pc}), de pico anódico (E_{pa}), as correntes de pico catódico (i_{pc}) e a de pico anódico (i_{pa}); pois a partir deles é possível definir a reversibilidade do sistema. Para uma reação reversível de eletrodo, as correntes de pico catódico e anódico são

aproximadamente iguais em valor absoluto, mas de sinais opostos e a diferença entre os potenciais é de $0,0592/n$, onde n corresponde ao número de elétrons envolvidos na reação. Por este motivo, a amostra foi analisada em diferentes velocidades de varredura, sendo os resultados dispostos na Tabela 6 (SKOOG, *et al.*,2006).

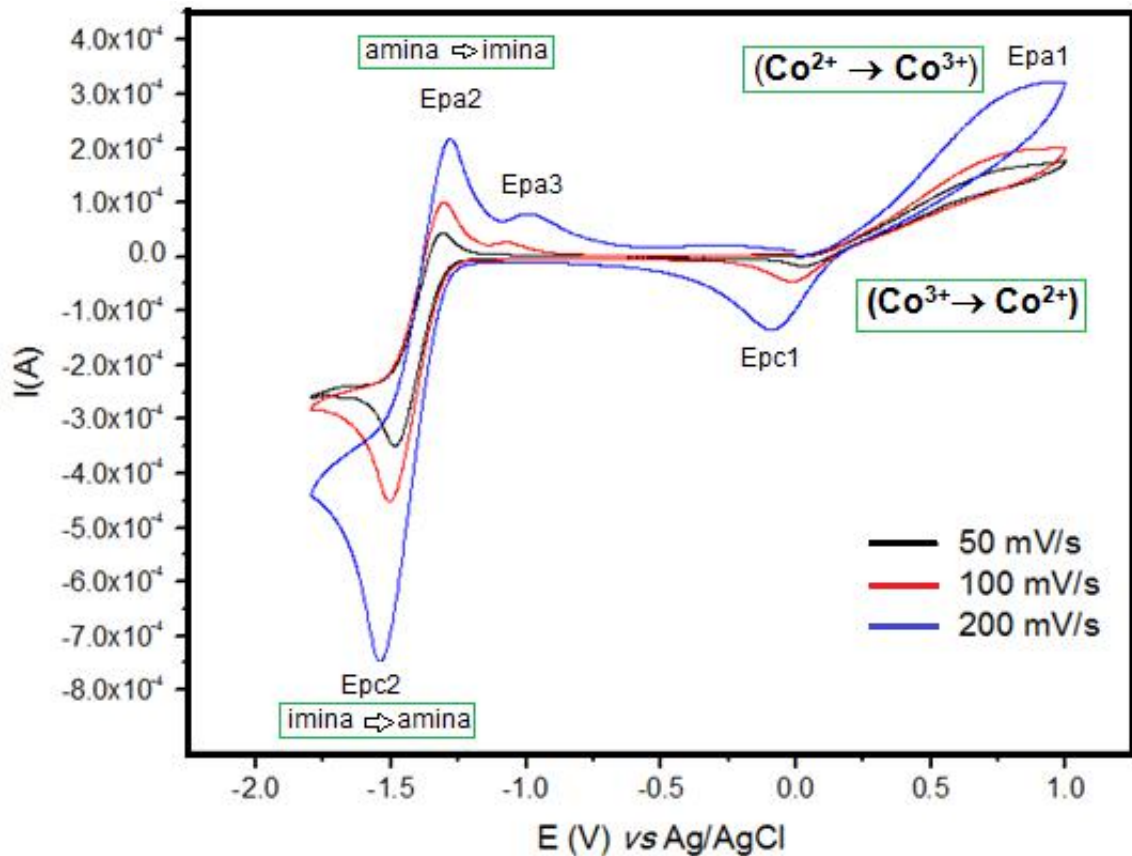


Figura 13: Voltamogramas cíclicos do complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$, em acetonitrila ($3,73 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), em diferentes velocidades de varredura.

O padrão interno utilizado como referência foi o ferroceno, a fim de monitorar o pseudo-eletrodo utilizado. Foi feita a medida para o ferroceno antes de realizar as varreduras para o analito, obtendo-se como resultado um E_{pa} de 170 mV e um E_{pc} de 86 mV.

Para converter o valor de potencial da escala Ag/AgCl para a escala EPH foram feitos os seguintes cálculos:

1º- Calculou-se o valor do potencial de meia onda ($E_{1/2}$) para o ferroceno. O $E_{1/2}$ é calculado a partir da seguinte expressão:

$$E_{1/2} = (E_{pc} + E_{pa}) \div 2$$

$$E_{1/2} \text{ ferroceno} = (86 + 170) \div 2$$

$$E_{1/2} \text{ ferroceno} = 128 \text{ mV vs Ag/AgCl}$$

2º. Esse mesmo cálculo de meia onda ($E_{1/2}$) foi realizado para cada potencial da Tabela 9, de acordo com as velocidades de varredura, como exemplificado abaixo para o caso da velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} temos que:

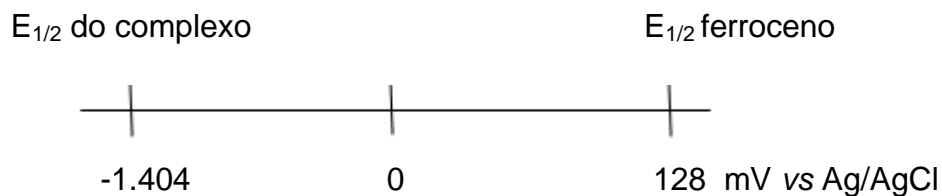
$$E_{1/2} \text{ do complexo} = (E_{pc(2)} + E_{pa(2)}) \div 2$$

$$E_{1/2} \text{ do complexo} = [-1.504 + (-1303)] \div 2$$

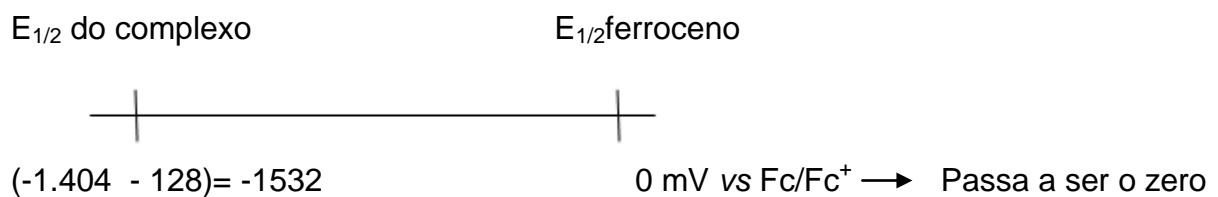
$$E_{1/2} \text{ do complexo} = -1.404 \text{ mV (na escala Ag/AgCl)}$$

E como obtido no primeiro cálculo, $E_{1/2}$ ferroceno = 128 mV vs Ag/AgCl, temos:

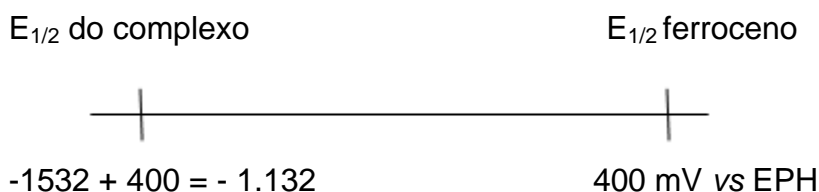
Na escala Ag/AgCl:



Para passar para a escala de Fc/Fc^+ :



Convertendo para a escala de EPH, tem-se:



Desse modo, tem-se que o valor de $E_{1/2}$ para a velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} é igual a **-1.132 mV vs EPH**, o que mostra uma onda *quasi-reversível* atribuído ao processo redox **imina** \rightarrow **amina**, ou seja, referente aos processos E_{pc2} e E_{pa2} , que correspondem à redução do ligante imínico (**pymimi**) para amina (**pymima**) e a posterior oxidação. O mesmo procedimento foi realizado para a conversão dos valores E_{pc1} e E_{pa1} para a escala de EPH e para todas as velocidades de varredura. Os processos E_{pc1} e E_{pa1} devem ser referentes à redução do centro metálico ($\text{Co}^{3+} \rightarrow \text{Co}^{2+}$) e sua respectiva oxidação ($\text{Co}^{2+} \rightarrow \text{Co}^{3+}$).

Na tabela também são apresentados os cálculos dos valores de ΔE_p que são determinados através do cálculo da diferença entre E_{pa} e E_{pc} .

Tabela 9: Valores de potenciais para o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$ em diferentes velocidades de varredura na escala Ag/AgCl.

Velocidade de varredura (mV s^{-1})	$E_{pa(1)}$	$E_{pc(1)}$	$E_{1/2}$	ΔE_p	$E_{pa(2)}$	$E_{pc(2)}$	$E_{1/2}$	ΔE_p	$E_{pa(2)}$
50	738	26	382	712	-1.310	-1.487	-1.399	177	—
100	762	-17	372	779	-1.303	-1.504	-1.404	201	-1.077
200	806	-93	356	899	-1.280	-1.540	-1.410	260	-993

Tabela 10: Valores de potenciais para o complexo $[\text{Co}(\text{pymimi})_2](\text{ClO}_4)_2$ em diferentes velocidades de varredura na escala EPH.

Velocidade de varredura (mV s^{-1})	$E_{\text{pa}(1)}$	$E_{\text{pc}(1)}$	$E_{1/2}$	ΔE_p	$E_{\text{pa}(2)}$	$E_{\text{pc}(2)}$	$E_{1/2}$	ΔE_p	$E_{\text{pa}(2)}$
50	1010	298	654	712	-1038	-1215	-1127	177	–
100	1034	255	645	779	-1031	-1232	-1132	201	-805
200	1078	179	629	899	-1008	-1268	-1138	260	-721

4.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA

A atividade biológica do complexo foi investigada pelo ensaio de redução do MTT contra células epiteliais de adenocarcinoma alveolar de células basais de pulmão humano (A549).

A sobrevivência celular da linhagem tumoral humana A549 de câncer de pulmão foi avaliada após tratamento com o complexo, o ligante pymimi e com a fonte de metal $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, durante 24 h. A sobrevivência celular foi obtida através da determinação da porcentagem das células vivas capazes de metabolizar o MTT, em relação às células não expostas ao tratamento com o complexo (condição controle). O ligante e a fonte de metal foram testados para estabelecer se a atividade citotóxica seria devido ao ligante, ao sal, ou devido à complexação do ligante com o centro metálico.

Na Figura 14 são apresentadas as curvas de sobrevivência celular após o tratamento com o complexo, a fonte de metal e o ligante. Os dados mostram uma redução na sobrevivência celular de maneira dependente da concentração em que o complexo foi adicionado ao meio de cultura com as células de tumor de pulmão humano.

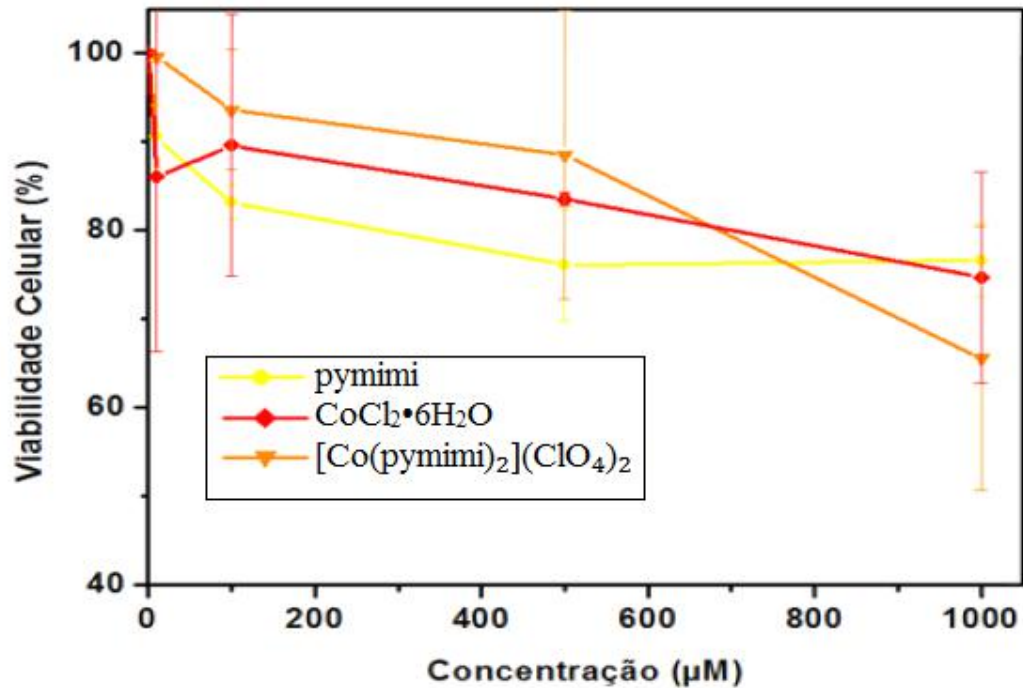


Figura 14: Viabilidade celular da linhagem de câncer de pulmão A549 após o tratamento com o ligante, a fonte de metal e o complexo.

Os resultados de viabilidade celular para 1000µM e 24 h de incubação foram: Pymimi: 76,6 % (4,2); CoCl₂·6H₂O: 74,7 % (12,0) e [Co(pymimi)₂]⁺: 65,6 % (14,8).

Com relação à eficiência destes 3 parâmetros testados em matar as células observou-se um perfil de citotoxicidade decrescente na seguinte ordem: **complexo > CoCl₂·6H₂O > pymimi**. Desta forma, pode-se concluir que desta série, o **complexo** foi o mais tóxico e eficaz em matar as células tumorais, porém foram necessárias altas concentrações para produzir uma redução significativa na sobrevivência das células. Pode-se considerar o ligante e a fonte de metal, CoCl₂·6H₂O, que obtiveram resultados bem próximos um do outro como menos citotóxicos, comparado com o complexo.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos comprovam a obtenção do novo complexo mononuclear cobalto coordenando numa geometria octaédrica distorcida com o ligante pymimi o qual adota uma conformação *meridional*, o complexo **[Co(pymimi)₂](ClO₄)₂**.

Pela análise realizada nos resultados da espectroscopia de infra-vermelho, pode-se concluir a formação de um complexo de cobalto com o ligante pymimi em que o íon perclorato está presente possivelmente como contra-íon. Foi possível observar alargamentos ou deslocamentos das bandas características dos ligantes quando coordenados ao íon metálico Co²⁺, além de bandas características da formação do complexo e da presença do contra-íon.

A partir da análise da técnica de condutividade molar pode-se concluir que o íon Co²⁺ é um eletrólito do tipo 1:2, ou seja, um cátion complexo estabilizado, em solução, por dois ânions perclorato.

O complexo, pelos resultados obtidos da atividade biológica, não tem nenhuma atividade citotóxica significativa, uma vez que mesmo na concentração mais elevada do complexo (1.000 µM) em 24h de incubação, as células apresentaram sensibilidade reduzida. Apesar dos resultados indicarem que o complexo apresenta baixa letalidade para a linhagem de células testadas, este pode apresentar-se citostático levando a inibição da proliferação celular.

O complexo de cobalto obtido já se encontra na forma reduzida, então, de acordo com a estratégia proposta neste trabalho, ele já estaria na forma ATIVA (fármaco), e mesmo assim para essa linhagem celular ele não foi ATIVO. Então podemos concluir também, que pode ser que o complexo seja seletivo para outra linhagem que não seja a de células epiteliais de adenocarcinoma alveolar de células basais de pulmão humano (A549).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C.B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, Vol. 28, No. 1, 118-129, 2005
- BUSTAMANTE, F. L. S.; SOUZA, E. T.; LANZMASTER, M.; SCARPELLINI, M.; Complexos ativados por hipóxia: uma estratégia para o combate ao câncer, *Rev. Virtual Quim.*, 2009, 1 (2), 138-148..
- CASTRO, FREDERICO A. V., Citotoxicidade do lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) em *Saccharomyces cereviceiae*. 2010. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- DENNY, W. A.; Prodrug strategies in cancer therapy, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36 (2001) 577-595.
- DENNY, W. A.; WILSON, W. R., Considerations for the design of nitrophenyl mustards as agents with selective toxicity for hypoxic tumor cells, *Journal of Medicinal Chemistry*, v 29(6), 879-87, 1986
- FARRUGIA, L. J. Ortep-3 for Windows: a version of ORTEO-III with a Graphical User Interface (GUI). *J. of Applied Crystallography*, V. 30, p.565, 1997.
- GAGNÉ, R.R.; KOVAL, C.A.; LISENSKY, G.C.; Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. *Inorganic Chemistry*, v. 19, p. 2854-2855, 1980.
- GEARY, W.J., "The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds", *Coord. Chem. Rev.*, 7,1971, 81-122.
- GREATTI *et al.*, "Synthesis, Structure, and Physicochemical Properties of Dinuclear Ni(II) Complexes as Highly Efficient Functional Models of Phosphohydrolases", *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 1107-19.
- HELLMAN, S., ROSENBERG, S. A., *Cancer Principles and Practice of Oncology*, J. B. Lippincott: Philadelphia, 1989
- JAIN, R K., Barriers to drug delivery in solid tumors, *Scientific American*, v 271(1), 58-65, 1994

- OLIVEIRA, R.B.; ALVES, R.J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Quim. Nova*, v.25, n.6, p.976-984, 2002.
- OSINSKY, S. P.; LEVITIN, I. YA.; SIGAN A. L.; BUBNOVSKAYA, L. N.; GANUSEVICH, I. I.; CAMPANELLA, L.; WARDMAND, P. Redox_Active Cobalt Complexes as Promising Antitumor Agents, *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, v 52(12), 2636-2645, 2003.
- PADILHA, D. S. Síntese e Caracterização de Novos Complexos de Ga³⁺ Como Possíveis Metalofármacos Antitumorais. Dissertação (Mestrado em Ciências - Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- QUE JR, L.; BANCI, L. *Bioinorganic Chemistry. Curr. Opinion in Chemical Biology*.v.6, p.169-170, 2002.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 5a. ed., Guanabara Koogan S.A., 1994. p. 93-119; 193-233.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R., “Fundamentos de Química Analítica”, Tradução da 8ª edição norte-americana, Editora Thomson, 2006.
- TEXEIRA, E. Síntese, Caracterização e Modelagem Molecular de Compostos de Co(III) como Novas Pró-drogas Biorredutíveis. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Bioinorgânica)-Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- WARE D. C.; BROTHERS, P. J.; CLARK G. R.; DENNY, W. A.; PALMER, B. D.; WILSON, W. R., Synthesis, Structures and Hypoxia-selective Cytotoxicity of Cobalt(III) Complexes Containing Tridentate Amine and Nitrogen Mustard Ligands, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 925–932, 2000.
- World Health Organization, 2010. Disponível em http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/index.html