

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
(UENF)**

CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS

BRUNA FIGUEREDO LOPES

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTINEOPLÁSICA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS E DE
COORDENAÇÃO DE COBRE: INFLUÊNCIA DO NAFTOL E DA
CUMARINA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES
2012**

BRUNA FIGUEREDO LOPES

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTINEOPLÁSICA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS E DE
COORDENAÇÃO DE COBRE: INFLUÊNCIA DO NAFTOL E DA
CUMARINA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Christiane Fernandes Horn

CAMPOS DOS GOYTACAZES
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

22/2012

Lopes, Bruna Figueredo

Síntese, caracterização e avaliação da atividade antineoplásica de compostos orgânicos e de coordenação de cobre: influência do naftol e da cumarina na atividade biológica / Bruna Figueredo Lopes. – Campos dos Goytacazes, 2012.

xxvii, 232 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas. Campos dos Goytacazes, 2012.

Orientador: Christiane Fernandes Horn.

Área de concentração: Síntese.

Bibliografia: f. 219-232.

1. Composto de coordenação de cobre 2. Naftol 3. Cumarina 4. Atividade antineoplásica 5. Células leucêmicas I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas II. Título.

CDD 547.2

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTINEOPLÁSICA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS E DE
COORDENAÇÃO DE COBRE: INFLUÊNCIA DO NAFTOL E DA
CUMARINA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA**

BRUNA FIGUEREDO LOPES

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Christiane Fernandes Horn

Aprovada em 17 de fevereiro de 2012.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Dias Pereira - UFRJ

Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues de Oliveira - UENF

Prof. Dr. Luis César Passoni - UENF

Prof. Dra. Christiane Fernandes Horn – UENF (Orientadora)

***Aos meus pais, Clodoaldo e
Maria Izaac, pelo eterno
incentivo e dedicação.***

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Este trabalho não poderia ter sido realizado sem a colaboração e o apoio técnico:

Da Profa. Dra. Christiane Fernandes Horn, do Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CCT/UENF);

Do Prof. Dr. Adolfo Horn Jr., do Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CCT/UENF);

Do Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro do Laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LBR/UENF);

Do Prof. Lorenzo do Canto Vinsentin, do LRX da UFF;

Do Prof. David H. Russell, da Texas A&M University, Estados Unidos;

Do Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais da UENF;

Dos órgãos de fomento CNPq, CAPES, FAPERJ e INCT Catálise.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me conduzido e me dado forças para prosseguir;

À minha família pela incessante torcida e confiança. Amo a todos;

À Tia Geu, eterna colaboradora e incentivadora;

Ao meu amor pela paciência, companheirismo e otimismo diante das dificuldades;

À Profa. Dra. Christiane Fernandes Horn pela valiosa orientação e amizade;

Ao Prof. Dr. Adolfo Horn Jr. por todo auxílio e orientações;

Ao Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro, pelo auxílio e pela receptividade em seu grupo de pesquisa;

Aos professores da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) que tanto me incentivaram a prosseguir na pesquisa acadêmica;

Aos amigos do laboratório de química Camila, Glaucia, Karen, Leo, Luíza, Marcione, Monique, Rafaela, Ruty, Sarah e Samila;

Aos amigos do laboratório de biologia Layla, Franz, Thais e Wiliam.

A todos que contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada.

“Não te julgues um monopólio de tudo o que há de bom e certo no mundo. Se és portador de um dote especial qualquer, não te ponhas, por causa disso, acima dos outros, não és raridade nenhuma e nem queiras ser.”

Autor desconhecido

RESUMO

As neoplasias malignas estão relacionadas a um grande número de casos de óbitos em todo o mundo. No Brasil foram registrados 321 mil novos casos de câncer e 190 mil óbitos em decorrência desta patologia em 2008. A química medicinal vem contribuindo de forma cada vez mais crescente para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antineoplásica. Atualmente, cerca de 85% dos fármacos comercialmente disponíveis são de origem sintética. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antineoplásica de novos compostos orgânicos e de coordenação de cobre, contendo os grupos naftol e cumarina em suas estruturas, frente a duas linhagens de células leucêmicas humanas, U937 e THP-1. Os ligantes foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho e RMN ^1H e de ^{13}C . Os compostos de coordenação de cobre foram caracterizados por espectroscopias de infravermelho e eletrônica, análise elementar (CHN), voltametria cíclica, condutivimetria e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS). O teste viabilidade celular (MTT) mostrou que todos os compostos orgânicos (L1-L8) e de coordenação (C1-C8) sintetizados foram citotóxicos para ambas as linhagens estudadas, exceto o ligante L6. Observou-se que, de forma geral, os compostos orgânicos (L1-L4) e de coordenação de cobre (C1-C4) contendo o grupo naftol apresentaram maiores atividades biológicas. Estes compostos mostram-se promissores, uma vez que foram mais seletivos para as células tumorais do que para as células normais do sangue periférico (PBMC). Já os compostos contendo os grupos cumarínicos foram tão ativos frente as linhagens neoplásicas quanto frente as célula normais, o que demonstrou baixa seletividade. Dentre todos os compostos avaliados, o complexo C1 e o ligante L1, obtidos a partir do α -naftol, apresentaram elevadas atividades antineoplásicas, sendo que o complexo C1 mostrou-se mais ativo do que a cisplatina frente a linhagem THP-1 e tão ativo quanto a cisplatina frente a linhagem U937. Todos os compostos com naftol em suas estruturas induziram morte celular por apoptose em todas as linhagens neoplásicas estudadas, o que foi confirmado por diferentes métodos como microscopia de fluorescência

e avaliação do ciclo celular e do potencial mitocondrial de membrana por citometria de fluxo. A avaliação do potencial de membrana mitocondrial, para os compostos com naftol em suas estruturas, sugere que a apoptose pode estar sendo deflagrada pela via mitocondrial, corroborando com os resultados de viabilidade celular (MTT). Este trabalho fornece subsídio para futuros testes “*in vitro*” e “*in vivo*” uma vez que foram sintetizados compostos orgânicos (L1, L2 e L4) e de coordenação (C1, C2, C3 e C4) que exercem seu efeito citotóxico por meio da indução da apoptose.

Palavras-chave: Compostos de coordenação de cobre, naftol, cumarina, atividade antineoplásica, células leucêmicas.

ABSTRACT

The cancer is related to a large number of deaths worldwide. In Brazil were registered 321 thousand cancer cases and 190 thousand deaths due to this disease in 2008. The medicinal chemistry has been contributing ever-increasing development of new anticancer drugs. Currently, about 85% of commercially available drugs are of synthetic origin. The objective of this study was the development, characterization and evaluation of the antineoplastic activity of new organic compounds and copper complexes, containing naphthol and coumarin groups in their structures, against two human leukemia cell lines, U937 and THP-1. The ligands were characterized by infrared spectroscopy and ^1H and ^{13}C RMN. The copper coordination compounds were characterized by infrared and electronic spectroscopies, elemental analysis (CHN), cyclic voltametry, conductivimetry and *electrospray* ionization mass spectrometry (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS). The cell viability assay (MTT) showed that all synthesized organic (L1-L8) and coordination compounds (C1-C8) were cytotoxic against both strains studied, except the ligand L6. It was observed, in general, that organic compounds (L1-L4) and copper coordination (C1-C4) containing the naphthol groups showed higher biological activities. These compounds with naphthol in its structure have shown promise, since they were more selective for cancer cells than to peripheral blood mononuclear cell (PBMC). However, compounds containing coumarin groups were as active as for neoplastic cells to PBMC, which showed low selectivity. Among all compounds evaluated, the complex C1 and the ligand L1, obtained from α -naphthol, showed high antineoplastic activities, and complex C1 was more active than cisplatin for THP-1 and as active as cisplatin for U937. All compounds with naphthol in their structures induced apoptosis in all cell lines studied, which was confirmed by different methods such as fluorescence microscopy and evaluation of the cell cycle and mitochondrial membrane potential assay by flow cytometry. The evaluation of the mitochondrial membrane potential for the compounds with naphthol in its structures indicates that apoptosis can be triggered by mitochondrial pathway, corroborating the results of cell viability assay (MTT). This work provides further testing "in vivo"

and “in vitro” since they were synthesized organic compounds (L1, L2 and L4) and copper complexes (C1, C2, C3 and C4) that exert their antiproliferative effect through induction of apoptosis.

Keywords: Copper coordination compounds, naphthol, coumarin, antineoplastic activity, leukemia cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência e mortalidade para todos os tipos de cânceres (exceto câncer de pele-não melanoma), no mundo em 2008 (IARC, 2010a).	30
Figura 2. Taxa de incidência e mortalidade para os cânceres mais freqüentes no mundo, em 2008 (IARC, 2010b).	31
Figura 3. Taxa de incidência e mortalidade para os cânceres mais freqüentes no Brasil, em 2008 (IARC, 2010c).	31
Figura 4. Taxas de mortalidades causadas por neoplasias malignas no Brasil, por 100 mil habitantes (SIM/MS, 2009).	32
Figura 5. Esquema geral de desenvolvimento de células do sistema imune (GOLAN <i>et al.</i> , 2009).	33
Figura 6. Atividade dos complexos Ciclina-CDK de mamíferos ao longo do ciclo celular e os pontos de verificação e checagem (LODISH <i>et al.</i> , 2005). ...	39
Figura 7. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose adaptado de Hengartner (2000).	43
Figura 8. Relação entre o ciclo celular e a ação de alguns agentes citotóxicos (RANG <i>et al.</i> , 2004; GOODMAN & GILMAN, 2005).	46
Figura 9. Estrutura de alguns fármacos antimetabólitos usados no tratamento de neoplasias malignas (THOMAS, 2007)	47
Figura 10. Estrutura de alguns antibióticos citotóxicos (ALMEIDA <i>et al.</i> , 2005).	48
Figura 11. Estrutura de algumas fármacos antimitóticos (AVENDAÑO & MENÉNDEZ, 2008).	49
Figura 12. Estruturas de algumas mostardas nitrogenadas (a) e nitosurréias (b) (GOODMAN & GILMAN, 2005).	50
Figura 13. Proposta de mecanismo de formação de ligação cruzada entre agente alquilante e o DNA (THOMAS, 2007).	50
Figura 14. Bioativação intracelular da cisplatina (AVENDAÑO & MENÉNDEZ, 2008).	52
Figura 15. Interação da cisplatina com o DNA e proteínas (JONES & THORNBACK, 2007).	53
Figura 16. Estrutura da carboplatina e oxaliplatina (AVENDAÑO & MENÉNDEZ, 2008).	54
Figura 17. Estrutura da mostarda de enxofre da mecloretamina adaptado de Bennion & David-Bajar (1994).	55
Figura 18. Classificação dos ligantes múltiplos (LM), Adaptado de MORPHY & RANKOVIC (2008) e CONTERAS & SIPPL (2008).	57
Figura 19. Estrutura do propranolol, cumarina, varfarina e dicumarol (GOODMAN & GILMAN, 2005).	58

Figura 20. Compostos orgânicos e de coordenação com atividade antitumoral avaliados pelo grupo de Bioinorgânica da Universidade Estadual do Norte Fluminense, (BMPA) bis-(2-piridilmetil)amina, (HBPA) (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (BULL, 2008).	59
Figura 21. Composto orgânico (a) desenhado a partir do propranolol e composto de coordenação de cobre obtido a partir do ligante planejado (b). ..	60
Figura 22. Composto orgânico (a) desenhado a partir da varfarina e composto de coordenação de cobre obtido a partir do ligante planejado (b).....	61
Figura 23. Espectro de infravermelho para o precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3), obtido em filme.....	94
Figura 24. Espectro de RMN ¹ H do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3), obtido em CDCl ₃	95
Figura 25. Espectro de RMN ¹³ C do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3), obtido em CDCl ₃	96
Figura 26. Espectro de infravermelho para o precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4), obtido em pastilha de KBr.	98
Figura 27. Espectro de RMN ¹ H do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4), obtido em CDCl ₃	100
Figura 28. Espectro de RMN ¹³ C do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4), obtido em CDCl ₃	100
Figura 29. Espectro de infravermelho para o precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5), obtido em pastilha de KBr.....	102
Figura 30. Espectro de RMN ¹ H do precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5), obtido em DMSO-d ₆	104
Figura 31. Espectro de RMN ¹³ C do precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5), obtido em DMSO-d ₆	104
Figura 32. Espectro de infravermelho para o precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6), obtido em pastilha de KBr.....	106
Figura 33. Espectro de RMN ¹ H do precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6), obtido em CDCl ₃	108
Figura 34. Espectro de RMN ¹³ C do precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6), obtido em CDCl ₃	109
Figura 35. Espectro de infravermelho para o ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L1), obtido em filme.....	111
Figura 36. Espectro de RMN ¹ H do ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L1), obtido em CDCl ₃	113
Figura 37. Mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L1.....	115
Figura 38. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L1.....	115
Figura 39. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L1.....	115
Figura 40. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L1.....	116

Figura 41. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L1.....	116
Figura 42. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L1.	116
Figura 43. Espectro de infravermelho para o ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L2), obtido em filme.....	118
Figura 44. Espectro de RMN ¹ H do ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L2), obtido em CDCl ₃	120
Figura 45. Mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L2.....	122
Figura 46. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L2.....	122
Figura 47. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L2.	122
Figura 48. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L2	123
Figura 49. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L2.....	123
Figura 50. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L2	123
Figura 51. Espectro de infravermelho para o ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3), obtido em pastilha de KBr.	124
Figura 52. Estrutura de raios X do ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3).....	126
Figura 53. Espectro de RMN ¹ H do ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3), obtido em CDCl ₃	129
Figura 54. Espectro de RMN ¹³ C do ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3), obtido em CDCl ₃	130
Figura 55. Mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L3.....	132
Figura 56. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L3.....	132
Figura 57. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L3.....	132
Figura 58. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L3.	133
Figura 59. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L3.....	133
Figura 60. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L3.	133
Figura 61. Espectro de infravermelho para o ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4), obtido em filme.....	135
Figura 62. Espectro de RMN ¹ H do ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4), obtido em CDCl ₃	136

Figura 63. Espectro de RMN ¹³ C do ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4), em CDCl ₃	137
Figura 64. Mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L4.	139
Figura 65. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L4.	139
Figura 66. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L4.	139
Figura 67. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L4.	140
Figura 68. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L4.	140
Figura 69. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L4.	140
Figura 70. Espectro de infravermelho para o ligante 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5), obtido em filme.	141
Figura 71. Espectro de RMN ¹ H do ligante 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5), obtido em CDCl ₃	143
Figura 72. Espectro de infravermelho para o ligante 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxi]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L6), obtido em filme.	145
Figura 73. Espectro de RMN ¹ H do ligante 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxi]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L6), obtido em CDCl ₃	147
Figura 74. Espectro de infravermelho para o ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7), obtido em filme.	149
Figura 75. Espectro de RMN ¹ H do ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7), obtido em CDCl ₃	151
Figura 76. Espectro de RMN ¹³ C do ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7), obtido em CDCl ₃	152
Figura 77. Espectro de infravermelho para o ligante 7-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxi]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L8), obtido em filme.	154
Figura 78. Espectro de RMN ¹ H do ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L8), obtido em CDCl ₃	156
Figura 79. Espectro de RMN ¹³ C do ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L8), obtido em CDCl ₃	157
Figura 80. Espectros de infravermelho dos complexos (a) [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O (C1) e (b) [Cu(L3)Cl]Cl. 3H ₂ O (C3), obtidos em pastilha de KBr.	160
Figura 81. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo os complexos C1 (a) e C3 (b).	163
Figura 82. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo os complexos C1 (a) e C3 (b) para o íon de m/z 512.	164

Figura 83. Voltamograma cíclico para os complexos C1 (a) e C3 (b). Eletrodo de trabalho: Carbono Vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: platina; eletrólito suporte: Perclorato de lítio 0,1 mol.L ⁻¹ . Os dados para o ferroceno, padrão interno, foram obtidos em separado devido a sobreposição do sinal deste com os exibidos pelos complexos C1 e C3.	165
Figura 84. Espectros eletrônicos dos complexos C1 (a) e C3 (b), obtidos em metanol.	166
Figura 85. Espectros de infravermelho dos complexos (a) [Cu(L2)Cl]Cl.0,5H ₂ O (C2) e (b) [Cu(L4)Cl]Cl.2H ₂ O (C4), obtidos em pastilha de KBr.	169
Figura 86. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para o complexo C2.	171
Figura 87. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para o complexo C4.	171
Figura 88. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) do cátion de <i>m/z</i> 497, relativo ao complexo C2.	172
Figura 89. Voltamograma cíclico para os complexos (a) C2 e (b) C4. Eletrodo de trabalho: Carbono Vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: platina; eletrólito suporte: Perclorato de lítio 0,1 mol.L ⁻¹ . Os dados para o ferroceno, padrão interno, foram obtidos em separado devido a sobreposição do sinal deste com os exibidos pelos complexos C2 e C4.	173
Figura 90. Espectros eletrônicos dos complexos C2 (a) e C4 (b), obtidos em metanol.	174
Figura 91. Espectros de infravermelho dos complexos (a) [Cu(L5)Cl]Cl.2,5H ₂ O (C5) e (b) [Cu(L7)Cl] Cl. 2,5H ₂ O (C7), obtidos em filme.	176
Figura 92. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para os complexos C5 (a) e C7 (b).	178
Figura 93. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) do cátion de <i>m/z</i> 530, relativo ao complexo C5.	179
Figura 94. Voltamograma cíclico para os complexos (a) C5 e (b) C7. Eletrodo de trabalho: Carbono Vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: platina; eletrólito suporte: Perclorato de lítio 0,1 mol.L ⁻¹ . Os dados para o ferroceno, padrão interno, foram obtidos em separado devido a sobreposição do sinal deste com os exibidos pelos complexos C5 e C7.	180
Figura 95. Espectros eletrônicos dos complexos C5 (a) e C7 (b), obtidos em metanol.	181
Figura 96. Espectros de infravermelho dos complexos (a) [Cu(L6)Cl]Cl.4H ₂ O (C6) e (b) [[Cu(L8)Cl] Cl.4H ₂ O (C8), obtidos em pastilha de KBr.	182
Figura 97. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para os complexos C6 (a) e C8 (b).	185
Figura 98. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) do cátion <i>m/z</i> 515 do complexo C6.	186
Figura 99. Voltamograma cíclico para os complexos C6 (a) e C8 (b). Eletrodo de trabalho: Carbono Vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar:	

platina; eletrólito suporte: Perclorato de lítio 0,1 mol.L⁻¹. Os dados para o ferroceno, padrão interno, foram obtidos em separado devido a sobreposição do sinal deste com os exibidos pelos complexos C5 e C7..... 187

Figura 100. Espectros eletrônicos dos complexos C6 (a) e C8 (b), obtidos em metanol. 188

Figura 101. Avaliação da viabilidade celular da linhagem U937, pelo ensaio do MTT (n=3), após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 e L8) e de coordenação (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8). O sal de cobre (CuCl₂) e o DMSO (<0,2%) não afetaram significativamente a viabilidade celular. O símbolo (*) representa os valores estatisticamente significantes em relação às células controle pelo teste de Tukey (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001). 191

Figura 102. Avaliação da viabilidade celular da linhagem THP-1, pelo ensaio do MTT (n=3), após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 e L8) e de coordenação (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8). O sal de cobre (CuCl₂) e o DMSO (<0,2%) não afetaram significativamente a viabilidade celular. O símbolo (*) representa os valores estatisticamente significantes em relação às células controle pelo teste de Tukey (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001). 192

Figura 103. Estrutura do ligante HL (3-(--(4,6-dimetil-2-pirimidinilimino)metil-2-naftol) utilizado para obtenção de composto de coordenação de cobre ativo frente a células de melanoma (OSOWOLE *et al.*, 2011). 196

Figura 104. Avaliação da viabilidade celular das células humanas normais do sangue periférico (PBMC), pelo ensaio do MTT (n=3), após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos (L1, L2, L4 e L5) e de coordenação (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8). O sal de cobre (CuCl₂) e o DMSO (<0,2%) não afetaram significativamente a viabilidade celular. O símbolo (*) representa os valores estatisticamente significantes em relação às células controle pelo teste de Tukey (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001). 198

Figura 105. Porcentagem de apoptose induzida pelos compostos orgânicos (L1, L2 e L4,) e de coordenação (C1, C2, C3, C4 e Cisplatina) em células leucêmicas da linhagem U937 (n=2). O sal de cobre (CuCl₂) e o DMSO (<0,2%) não induziram morte celular nas células neoplásicas . O símbolo (*) representa os valores estatisticamente significantes em relação às células controle pelo teste de Tukey (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001). 203

Figura 106. Porcentagem de apoptose induzida pelos compostos orgânicos (L1, L2 e L4,) e de coordenação (C1, C2, C3 e C4) em células leucêmicas da linhagem THP-1 (n=2). O sal de cobre (CuCl₂) e o DMSO (<0,2%) não induziram morte celular nas células neoplásicas . O símbolo (*) representa os valores estatisticamente significantes em relação às células controle pelo teste de Tukey (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001). 204

Figura 107. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem U937, após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos (L1, L2 e L4) e de coordenação (C1, C2, C3 e C4). Células controle (Branco) não foram submetidas a tratamento. As células foram coradas com iodeto de propídio. 207

Figura 108. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem THP-1, após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos (L1, L2 e L4) e de coordenação (C1, C2, C3 e C4). Células controle (Branco) não foram submetidas a tratamento. As células foram coradas com iodeto de propídio. 208

Figura 109. *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células (U937) submetidas a incubação de 36 horas com compostos orgânicos (L1, L2 e L4) e de coordenação (C1, C2, C3 e C4).
..... 211

Figura 110. *Dot-plot* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células (THP-1) submetidas a incubação de 36 horas com compostos orgânicos (L1, L2 e L4) e de coordenação (C1, C2, C3 e C4).
..... 212

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Rota sintética do precursor P1 (NEVES et al., 1993).	68
Esquema 2. Rota sintética do precursor P2 (NEVES et al., 1995).	69
Esquema 3. Rota sintética do precursor P3.	70
Esquema 4. Rota sintética do precursor P4.	70
Esquema 5. Rota sintética do precursor P5.	71
Esquema 6. Rota sintética do precursor P6.	72
Esquema 7. Rota sintética do composto L1.	72
Esquema 8. Rota sintética do composto L2.	73
Esquema 9. Rota sintética do composto L3.	74
Esquema 10. Rota sintética do composto L4.	75
Esquema 11. Rota sintética do composto L5.	76
Esquema 12. Rota sintética do composto L6.	77
Esquema 13. Rota sintética do composto L7.	78
Esquema 14. Rota sintética do composto L8.	79
Esquema 15. Rota sintética para obtenção do complexo C1.	79
Esquema 16. Rota sintética para obtenção do complexo C2.	80
Esquema 17. Rota sintética para obtenção do complexo C3.	81
Esquema 18. Rota sintética para obtenção do complexo C4.	81
Esquema 19. Rota sintética para obtenção do complexo C5.	82
Esquema 20. Rota sintética para obtenção do complexo C6.	82
Esquema 21. Rota sintética para obtenção do complexo C7.	83
Esquema 22. Rota sintética do complexo C8.	84
Esquema 23. Representação da redução do MTT a formazam pela succinato desidrogenase mitocondrial.....	86
Esquema 24. Preparação do ensaio de viabilidade celular (MTT) empregando-se placa de 96 poços.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oncogenes relacionados a neoplasias humanas (BOIM <i>et al.</i> , 2003).....	37
Tabela 2. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3), com suas respectivas atribuições.....	94
Tabela 3. Dados para os espectros de RMN (RMN ¹ H e RMN ¹³ C) e atribuições para o precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3).....	97
Tabela 4. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4), com suas respectivas atribuições.....	99
Tabela 5. Dados para os espectros de RMN (RMN ¹ H e RMN ¹³ C) e atribuições para o precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4).....	101
Tabela 6. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5), com suas respectivas atribuições.	103
Tabela 7. Dados de análise elementar (C, H e N) para o precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5).....	103
Tabela 8. Dados para os espectros de RMN (RMN ¹ H e RMN ¹³ C) e atribuições para o precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5).....	105
Tabela 9. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6), com suas respectivas atribuições.	107
Tabela 10. Dados de análise elementar (C, H e N) para o precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6).....	107
Tabela 11. Dados para os espectros de RMN (RMN ¹ H e RMN ¹³ C) e atribuições para o precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6).....	109
Tabela 12. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 1-[2-hidroxi-benzil(2-piridilmetil)amino]-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L1), com suas respectivas atribuições.	111
Tabela 13. Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C do ligante L1 e as correlações observadas no espectro de HMQC (¹ J _{CH}) e HMBC (² J _{CH} e ³ J _{CH}).....	114
Tabela 14. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L2), com suas respectivas atribuições.	118
Tabela 15. Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C do ligante L2 e as correlações observadas no espectro de HMQC (¹ J _{CH}) e HMBC (² J _{CH} e ³ J _{CH}).....	121
Tabela 16. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 1-[2-hidroxi-benzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3), com suas respectivas atribuições.	125
Tabela 17. Dados de análise elementar (C, H e N) para o ligante 1-[2-hidroxi-benzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3).	126
Tabela 18. Parâmetros cristalográficos para o ligante 1-[2-hidroxi-benzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3).	127
Tabela 19. Principais comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) para o ligante 1-[2-hidroxi-benzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3).	128

Tabela 20. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do ligante L3 e as correlações observadas no espectro de HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) e HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$).....	131
Tabela 21. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4), com suas respectivas atribuições.	135
Tabela 22. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do ligante L4 e as correlações observadas no espectro de HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) e HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$).....	138
Tabela 23. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5), com suas respectivas atribuições.....	142
Tabela 24. Dados dos espectros de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e atribuições para o ligante 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5).....	144
Tabela 25. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxipropoxi]-2H-2-croman-2-ona (L6), com suas respectivas atribuições.	146
Tabela 26. Dados para os espectros de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e atribuições para o ligante 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxipropoxi]-2H-2-croman-2-ona (L6).....	148
Tabela 27. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7), com suas respectivas atribuições.....	150
Tabela 28. Dados de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e atribuições para o ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7).....	153
Tabela 29. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 7-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxipropoxi]-2H-2-croman-2-ona (L8), com suas respectivas atribuições.	155
Tabela 30. Dados de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e atribuições do ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L8), em CDCl_3	158
Tabela 31. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos complexos $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (C1) e $[\text{Cu}(\text{L3})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (C3), com suas respectivas atribuições.	160
Tabela 32. Dados de análise elementar (C, H e N) e de condutivimetria, realizada na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ M em metanol, para os complexos $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (C1) e $[\text{Cu}(\text{L3})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (C3).....	162
Tabela 33. Valores de E_p referentes aos processos anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) observados para os complexos C1 e C3.....	165
Tabela 34. Dados de espectroscopia eletrônica dos ligantes L1 e L3 e dos complexos C1 e C3 e suas respectivas atribuições.	167
Tabela 35. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos complexos $[\text{Cu}(\text{L2})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (C2) e $[\text{Cu}(\text{L4})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (C4), com suas respectivas atribuições.	169
Tabela 36. Dados de análise elementar (C, H e N) e de condutivimetria, realizada na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ M em metanol, para os complexos C2 e C4.	170
Tabela 37. Valores de ΔE_p e $E_{1/2}$ referentes aos pares redox observados para os complexos C2 e C4.....	173

Tabela 38. Dados de espectroscopia eletrônica dos ligantes L2 e L4 e dos complexos C2 e C4 e suas respectivas atribuições.	174
Tabela 39. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos complexos $[Cu(L5)Cl]Cl \cdot 2,5H_2O$ (C5) e $[Cu(L7)Cl] Cl \cdot 2,5H_2O$ (C7), com suas respectivas atribuições.	176
Tabela 40. Dados de análise elementar (C, H e N) e de condutivimetria, realizada na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ M em metanol, para os complexos C5 e C7.	177
Tabela 41. Valores de ΔE_p referentes aos processos anódico e catódico observados para os complexos C5 e C7.	180
Tabela 42. Dados de espectroscopia eletrônica dos ligantes L5 e L7 e dos complexos C5 e C7 e suas respectivas atribuições.	181
Tabela 43. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos complexos $[Cu(L6)Cl]Cl \cdot 4H_2O$ (C6) e $[Cu(L8)Cl] Cl \cdot 4H_2O$ (C8), com suas respectivas atribuições.	183
Tabela 44. Dados de análise elementar (C, H e N) e de condutivimetria realizada na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ M em metanol, para os complexos C6 e C8.	184
Tabela 45. Valores de ΔE_p e $E_{1/2}$ referentes aos processos redox mais intensos para os complexos C6 e C8.	187
Tabela 46. Dados de espectroscopia eletrônica dos ligantes L6 e L8 e dos complexos C6 e C8 e suas respectivas atribuições.	188
Tabela 47. Valores de IC_{50} dos compostos sintetizados frente as linhagens U937 e THP-1.	194
Tabela 48. Valores de IC_{50} obtidos para os compostos em estudo frente as células normais do sangue periférico (PBMC).	199

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	→	Deslocamento químico em ressonância magnética nuclear e deformação angular no plano de C-H _{aromático}
β -anel	→	Deformação do anel de aromáticos, aromáticos polinucleares e heteroaromáticos
γ -CH	→	Deformação C-H fora do plano de aromáticos, aromáticos polinucleares e heteroaromáticos.
ANOVA	→	Análise de Variância Entre Grupos
AMPc	→	Adenosina monofosfato cíclico
APAF-1	→	Fator-1 ativador de protease apoptótica
ATCC	→	American Type Culture Collection
ATP	→	Adenosina Tri-Fosfato
C1	→	[Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O
C2	→	[Cu(L2)Cl]Cl.0,5H ₂ O
C3	→	[Cu(L3)Cl]Cl. 3H ₂ O
C4	→	[Cu(L4)Cl]Cl.2H ₂ O
C5	→	[Cu(L5)Cl]Cl.2,5H ₂ O
C6	→	[Cu(L6)Cl]Cl.4H ₂ O
C7	→	[Cu(L7)Cl] Cl. 2,5H ₂ O
C8	→	[Cu(L8)Cl] Cl. 4H ₂ O
CCT	→	Centro de Ciência e Tecnologia
CDCl ₃	→	Clorofórmio deuterado
CDK	→	Quinase dependente de ciclina
DAPI	→	Dicloridrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol
DISC	→	Complexo sinalizador indutor de morte
D-MEM/F12	→	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

DMSO-d6	→	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	→	Ácido desoxirribonucleico
DNase	→	Desoxirribunuclease
EDTA	→	Ácido etilenodiamino tetracético
ESI(+)-MS	→	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
FADD	→	Proteína adaptadora (Fas) com domínio de morte
Hoechst	→	(2'-(4-hidroxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol)
IC ₅₀	→	Concentração que lesa ou provoca morte de 50% da população celular
INCA	→	Instituto Nacional do Câncer
JC-1	→	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina
KBr	→	Brometo de potássio
L1	→	1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(1-naftiloxi)-2-propanol
L2	→	1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol
L3	→	1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol
L4	→	1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol
L5	→	4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona
L6	→	4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxi]propoxi}-2H-2-croman-2-ona
L7	→	7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona
L8	→	7-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxi]propoxi}-2H-2-croman-2-ona
MgSO ₄	→	Sulfato de magnésio
MTT	→	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tretazólico

NaBH ₄	→	Borohidreto de sódio
NaCl	→	Cloreto de sódio
P1	→	Precursor (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina
P2	→	Precursor bis-(2-piridilmetil)amina
P3	→	Precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano
P4	→	Precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona
P5	→	Precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona
P6	→	Precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona
pb	→	Pares de base
PBMC	→	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	→	Tampão salino fosfato
pH	→	Potencial hidrogeniônico
PI	→	Iodeto de propidio
PMM	→	Potencial de membrana mitocondrial
PPM	→	Partes por milhão
RMN ¹³ C	→	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	→	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNAse	→	Ribonuclease A
rpm	→	Rotações por minuto
SEB	→	Enterotoxina B de staphylococcus
THP-1	→	Linhagem celular humana estabelecida de leucemia monocítica aguda
TLC	→	Cromatografia em camada delgada
TNF	→	Fator de necrose tumoral
TNFR	→	TNF receptor
U937	→	Linhagem celular humana estabelecida de linfoma histiocítico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
1.1. CÂNCER: INCIDÊNCIA E MORTALIDADE	29
1.2. LEUCEMIAS	33
1.3. O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER	35
1.3.1. Genes relacionados às neoplasias.....	36
1.3.2. Apoptose e o controle das neoplasias	40
1.4. FARMACOLOGIA ANTINEOPLÁSICA	44
1.5. PLANEJAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS	54
2. OBJETIVO	63
2.1. OBJETIVO GERAL.....	63
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
3. MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	65
3.1.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	65
3.1.2. Espectroscopia de infravermelho.....	65
3.1.3. Difração de raios X.....	66
3.1.4. Análise elementar.....	66
3.1.5. Condutimetria.....	66
3.1.6. Espectroscopia eletrônica	66
3.1.7. Voltametria Cíclica	67
3.1.8. Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS)	67
3.2. SÍNTESES	68
3.2.1. Síntese dos compostos orgânicos.....	68
3.2.1.1. Síntese do (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1).....	68
3.2.1.2. Síntese do bis-(2-piridilmetil)amina (P2)	68
3.2.1.3. Síntese do 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3).....	69
3.2.1.4. Síntese do 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4).....	70
3.2.1.5. Síntese do 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5).....	71
3.2.1.6. Síntese do 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6).....	71
3.2.1.7. Síntese do 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L1)	72

3.2.1.8. Síntese do 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L2)	73
3.2.1.9. Síntese do 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3)	74
3.2.1.10. Síntese do 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4)	74
3.2.1.11. Síntese do 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5)	75
3.2.1.12. Síntese do ligante 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxipropoxi]-2H-2-croman-2-ona (L6)	76
3.2.1.13. Síntese do 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7)	77
3.2.1.14. Síntese do ligante 7-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxipropoxi]-2H-2-croman-2-ona (L8)	78
3.2.2. Síntese dos compostos de coordenação	79
3.2.2.1. Síntese do complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O (C1)	79
3.2.2.2. Síntese do complexo [Cu(L2)Cl]Cl.0,5H ₂ O (C2)	80
3.2.2.3. Síntese do complexo [Cu(L3)Cl]Cl. 3H ₂ O (C3)	80
3.2.2.4. Síntese do complexo [Cu(L4)Cl]Cl.2H ₂ O (C4)	81
3.2.2.5. Síntese do complexo [Cu(L5)Cl]Cl.2,5H ₂ O (C5)	81
3.2.2.6. Síntese do complexo [Cu(L6)Cl]Cl.4H ₂ O (C6)	82
3.2.2.7. Síntese do complexo [Cu(L7)Cl] Cl. 2,5H ₂ O (C7)	83
3.2.2.8. Síntese do complexo [Cu(L8)Cl] Cl. 4H ₂ O (C8)	83
3.3. TESTES BIOLÓGICOS	84
3.3.1 Diluição e armazenamento dos compostos orgânicos e de coordenação	84
3.3.2. Cultura das células	84
3.3.2.1. Cultura das linhagens de células neoplásicas	84
3.3.2.2. Cultura das linhagens de células normais do sangue periférico (PBMC)	85
3.3.3. Padronização da concentração da cultura celular	85
3.3.4. Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio)	86
3.3.5. Avaliação do mecanismo de morte celular	88
3.3.5.1. Microscopia de fluorescência	88
3.3.5.2. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1)	88

3.3.5.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (JC-1).....	89
3.3.6. Análise estatística.....	90
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS	92
4.1.1. Caracterização das moléculas orgânicas.....	92
4.1.1.1. Caracterização do (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1).....	92
4.1.1.2. Síntese do bis-(2-piridilmetil)amina (P2)	93
4.1.1.3. Caracterização do 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3)	93
4.1.1.4. Caracterização do composto 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4)	97
4.1.1.5. Caracterização do composto 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5)	102
4.1.1.6. Caracterização do 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6).....	106
4.1.1.7. Caracterização do composto 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L1)	110
4.1.1.8. Caracterização do composto 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L2).....	117
4.1.1.9. Caracterização do composto 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3)	124
4.1.1.10. Caracterização do composto 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4).....	134
4.1.1.11. Caracterização do composto 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5).....	141
4.1.1.12. Caracterização do composto 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxipropoxi]-2H-2-croman-2-ona (L6)	145
4.1.1.13. Caracterização do composto 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7).....	149
4.1.1.14. Síntese do ligante 7-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxipropoxi]-2H-2-croman-2-ona (L8)	154
4.1.2. Caracterização dos compostos de coordenação	159
4.1.2.1. Caracterização dos isômeros [Cu(L1)Cl]Cl.2H ₂ O (C1) e [Cu(L3)Cl]Cl. 3H ₂ O (C3).....	159
4.1.2.2. Caracterização dos isômeros [Cu(L2)Cl]Cl.0,5H ₂ O (C2), e [Cu(L4)Cl]Cl.2H ₂ O (C4).....	168
4.1.2.3. Caracterização dos isômeros [Cu(L5)Cl]Cl.2,5H ₂ O (C5) e [Cu(L7)Cl]Cl. 2,5H ₂ O (C7).....	175
4.1.2.4. Caracterização dos isômeros [Cu(L6)Cl]Cl.4H ₂ O (C6) e [Cu(L8)Cl]Cl. 4H ₂ O (C8)	182

4.2. RESULTADOS BIOLÓGICOS	189
4.2.1. Avaliação da viabilidade celular	189
4.2.2. Avaliação do mecanismo de morte celular	200
4.2.2.1. Microscopia de fluorescência	200
4.2.2.2. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo	205
4.2.2.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)	209
4.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	213
5. CONCLUSÕES	216
6. REFERÊNCIAS	219

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer compreende um grupo de doenças que se caracteriza pela perda do controle do crescimento, divisão e disseminação de um grupo de células. O termo câncer é derivado da palavra latina “cancrum” que significa caranguejo, uma analogia a capacidade das células cancerígenas em se disseminar e desenvolver metástase. O câncer é uma neoplasia (novo crescimento) maligna caracterizada por células com baixo grau de diferenciação e principalmente por células indiferenciadas, denominadas anaplásicas, pouco semelhante ao tecido de origem e com alta capacidade de disseminação. Em contrapartida, as neoplasias benignas são formadas por células bastante diferenciadas, semelhante ao tecido de origem, com crescimento lento e não disseminado. Embora um tumor benigno não apresente características invasivas, os tumores malignos não reconhecem limites anatômicos normais, possuem elevada capacidade de metastatizar para outras regiões levando a perda da funcionalidade de células e tecidos, comprometendo o funcionamento geral do organismo (KUMAR *et al.*, 2005; COTRAN *et al.*, 2000). O câncer é uma doença cuja incidência mundial vem crescendo significativamente e o estudo dos fatores predisponentes como também dos processos bioquímicos relacionados a esta patologia são imprescindíveis para o planejamento racional de novos fármacos anticancerígenos.

1.1. CÂNCER: INCIDÊNCIA E MORTALIDADE

O câncer é uma doença de difícil tratamento sendo considerado um dos principais problemas mundiais de saúde. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer - IARC) em 2008 foram registrados 12,700 milhões de novos casos com 7,6 milhões de óbitos, em todo o mundo (IARC, 2010a).

O aumento da expectativa de vida associado ao envelhecimento da população contribuiu para o aumento da incidência de doenças crônico degenerativas, destacando-se as doenças vasculares e o câncer. O crescimento das taxas de

incidência e mortalidade decorrente do câncer tem relação, também, com a maior exposição das pessoas a fatores de riscos (padrão de vida, condições de trabalho, hábitos alimentares e de consumo) associados ao crescente processo de urbanização e industrialização (INCA, 2006).

O câncer constitui atualmente um problema de saúde pública tanto para os países desenvolvidos quanto para as nações em desenvolvimento. Regiões muito desenvolvidas e industrializadas, como América do Norte e Europa, apresentam as maiores taxas mundiais de incidência de câncer (Figura 1), entretanto apresentam os maiores índices de cura, podendo chegar a mais de 60%. Esta situação não se repete nas regiões menos desenvolvidas, como América Central e grande parte da África (Figura 1), que apesar de apresentarem menor incidência desta doença possuem elevado índice de mortalidade (IARC, 2010a).

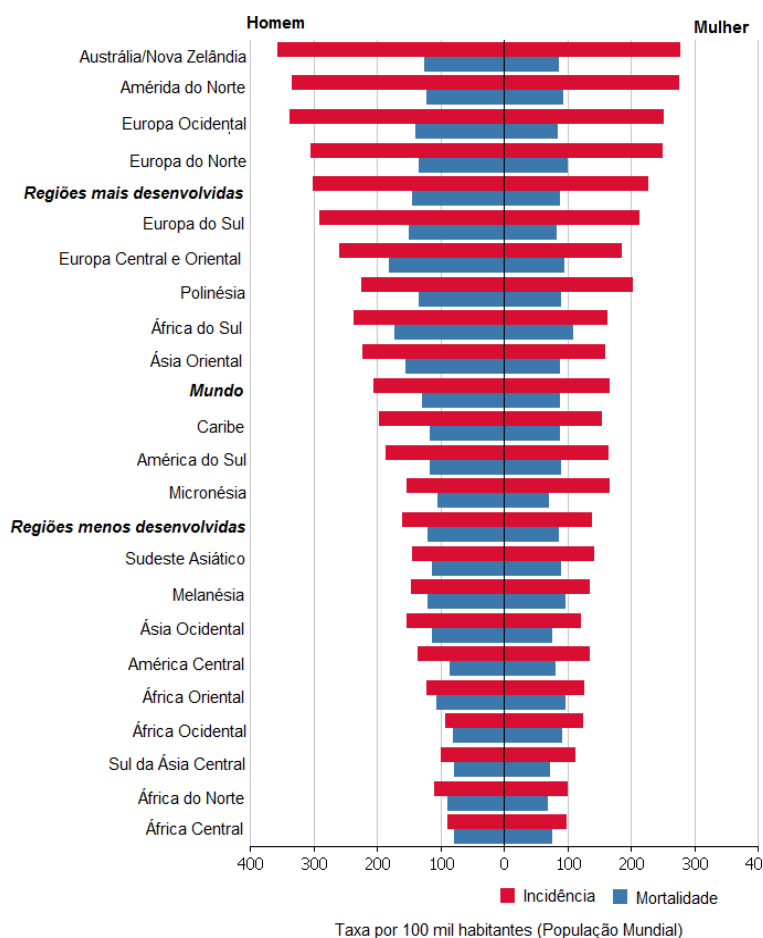


Figura 1. Incidência e mortalidade para todos os tipos de cânceres (exceto câncer de pele-não melanoma), no mundo em 2008 (IARC, 2010a).

De maneira global a taxa de mortalidade causada pelo câncer é muito elevada. Analisando-se os tipos mais freqüentes de câncer no mundo (Figura 2) e no Brasil em 2008 (Figura 3), observa-se que cânceres como os de mama e o de próstata apresentam uma boa estimativa de cura, em contrapartida, os cânceres de pulmão, estômago, fígado, esôfago, pâncreas e leucemia apresentam elevados índices de mortalidade (IARC, 2010bc), o que evidencia a necessidade de constante pesquisas sobre esta patologia e a busca de terapias mais eficientes.

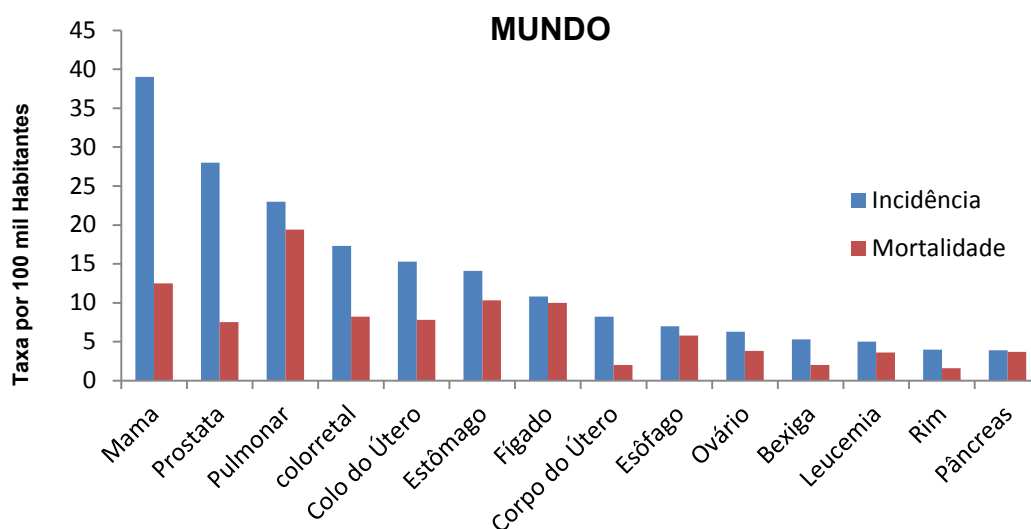


Figura 2. Taxa de incidência e mortalidade para os cânceres mais freqüentes no mundo, em 2008 (IARC, 2010b).

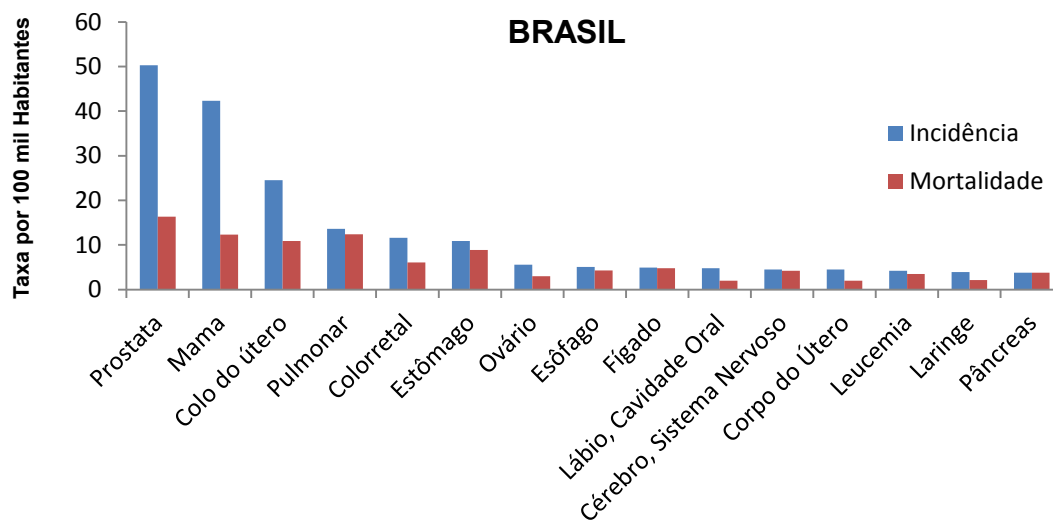


Figura 3. Taxa de incidência e mortalidade para os cânceres mais freqüentes no Brasil, em 2008 (IARC, 2010c).

No Brasil houve um aumento progressivo da mortalidade causada pelo câncer (Figura 4) sendo esta patologia responsável por 14,8% de todos os óbitos em 2007 (INCA, 2011). Segundo a IARC (2010c) foram registrados 321 mil novos casos de câncer no Brasil em 2008 sendo que 190 mil pessoas vieram a óbito.

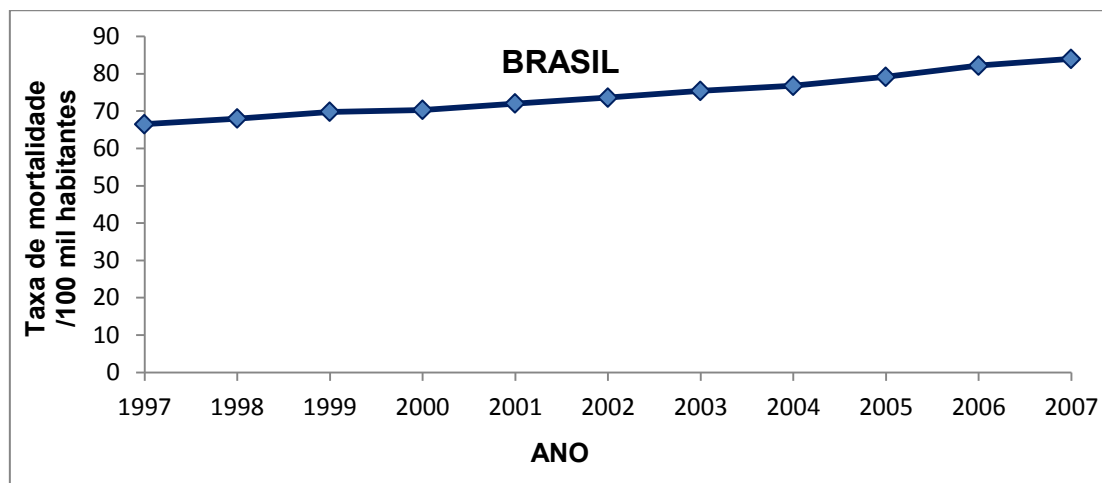


Figura 4. Taxas de mortalidades causadas por neoplasias malignas no Brasil, por 100 mil habitantes (SIM/MS, 2009).

O alto índice de mortalidade observado para as neoplasias malignas elevam os esforços da comunidade científica na busca das causas responsáveis pelo desenvolvimento do câncer. Hoje já se sabe que esta doença está relacionada a uma multiplicidade de fatores, dentre eles sociais, econômicos, alimentares e genéticos. Muito se discute da importância do fator genético sobre a suscetibilidade de um indivíduo desenvolver câncer, entretanto acredita-se que as interações entre todos os fatores citados, associados ao modo de vida e ao ambiente, possam determinar o aparecimento desta doença (INCA, 2006). O câncer é uma patologia que pode acometer os mais variados tipos de células e tecidos, como o tecido hematopoiético (sanguíneo) (KUMAR *et al.*, 2005). Em virtude do elevado índice de mortalidade relacionada às leucemias, neste trabalho foram investigados a atividade antineoplásica de compostos orgânicos e de coordenação frente a linhagens de linfoma histiocítico (U937) e de leucemia monocítica aguda (THP-1), descritas brevemente a seguir.

1.2. LEUCEMIAS

As leucemias são neoplasias malignas que acometem as células do sangue e tem a sua origem na medula óssea (COTRAN *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2005). As células maduras do sistema hematopoiético (sistema sanguíneo) se originam da célula tronco pluripotente que reside na medula óssea. Inicialmente, a célula-tronco (Figura 5) se diferencia em dois tipos, a célula pluripotente mielóide, comprometida com a formação da linhagem hematológica mielóide (hemácias, plaquetas, granulócitos e monócitos), e a célula pluripotente linfóide que se diferencia em células linfóides como os linfócitos B e T (GOLAN *et al.*, 2009).

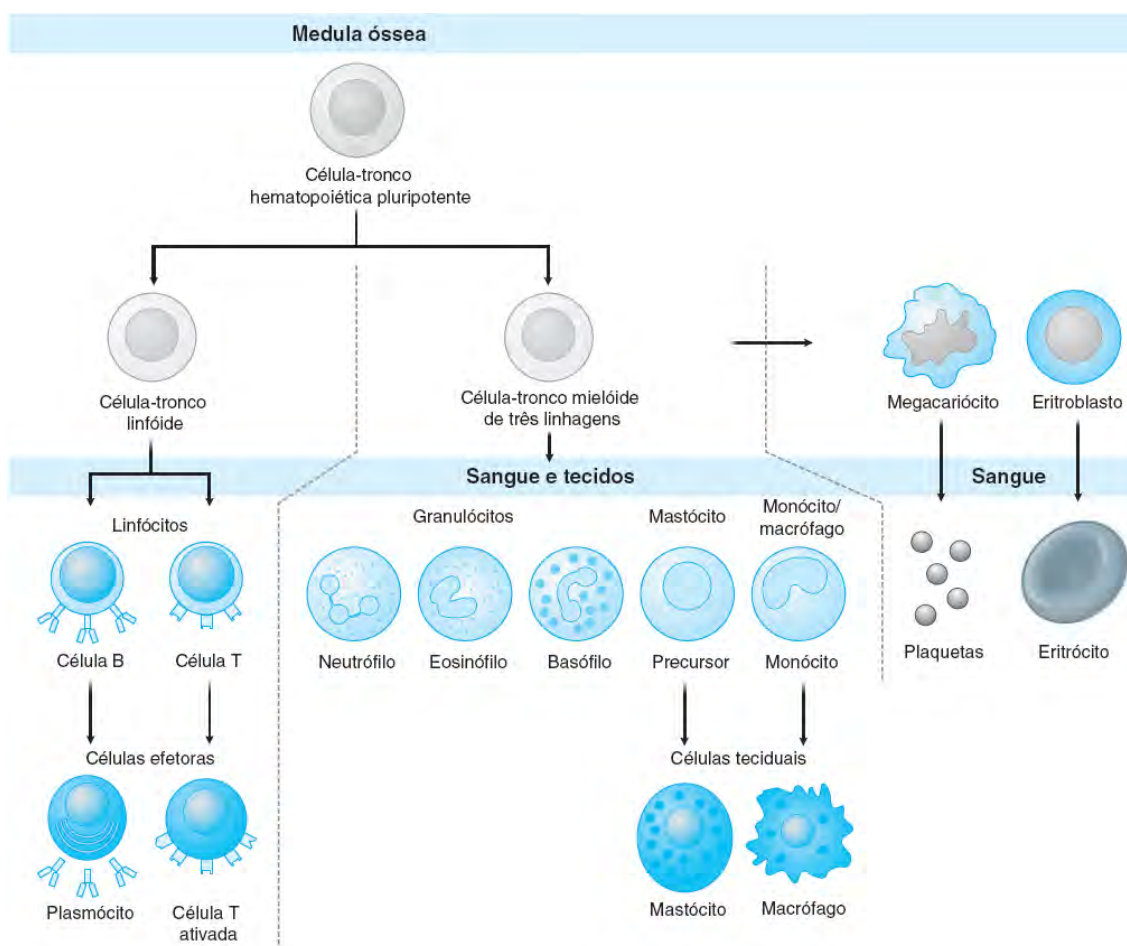


Figura 5. Esquema geral de desenvolvimento de células do sistema imune (GOLAN *et al.*, 2009).

As leucemias são geralmente caracterizadas pela produção descontrolada de leucócitos anormais na medula óssea, o que compromete a formação e maturação das células normais. A leucemia mielóide tem a sua origem nas células da linhagem mielóide e a leucemia linfóide se origina de células da linhagem linfóide, nos dois casos observa-se um grande número de células neoplásicas no sangue periférico. Os linfomas são originados de células da linhagem linfóide e correspondem a proliferações na forma de massa tecidual principalmente nos linfonodos, que muitas vezes se manifestam como um quadro leucêmico, acompanhado de extenso comprometimento da medula óssea, o que acarreta na presença de células neoplásicas no sangue periférico. As células leucocitárias (linfócitos, granulócitos e monócito, ver Figura 5) são responsáveis pelas respostas imunológicas o que aumenta o risco de infecções potencialmente graves em pacientes com leucemia (COTRAN *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2005).

Conforme o tipo celular envolvido e o estágio de maturação as leucemia podem ser classificadas em aguda, caracterizada por rápida proliferação de células imaturas denominadas blastos, e crônicas, caracterizado por crescimento de células maduras bem diferenciadas. Assim as leucemias podem ser classificadas em leucemias mielocíticas (mieloblásticas) agudas, leucemias mielocíticas crônicas, leucemias linfocíticas (linfoblásticas) agudas e as leucemias linfocíticas crônicas. Entretanto, existem patologias raras como o linfoma histiocítico, distúrbio proliferativo dos histiócitos e macrófagos (origem mielóide), que se manifestam na forma de linfoma maligno com infiltração na medula óssea (COTRAN *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2005). As leucemias são constituídas principalmente por células das linhagens leucocitárias e os fatores predisponentes são os mesmos envolvidos nos outros tipos de neoplasias, que de forma geral, tem a sua origem na lesão do DNA.

1.3. O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER

A grande maioria dos cânceres surge a partir de uma sequência de mutações em mais de um gene relacionado com a a regulação e controle da proliferação celular (ALBERTS *et al.*, 2010, LODISH *et al.*, 2005). A lesão genética é o centro da carcinogênese e fatores externos (químicos, radiações, infecções) ou internos (mutações herdadas ou que podem ocorrer durante o metabolismo, pela ação de hormônios e condições imunológicas) podem atuar de forma sequencial ou em conjunto conferindo a uma célula transformada a capacidade de crescimento autônomo e invasivo, levando a promoção do câncer (COTRAN *et al.*, 2000; CASSIDY, *et al.*, 2002). A carcinogênese é um processo complexo que pode ser dividido nas fases de iniciação, promoção e progressão. A iniciação envolve uma mudança genética irreversível, geralmente uma mutação em um único gene. A promoção corresponde a fase de proliferação descontrolada levando a um aumento populacional das células neoplásicas. Na fase de progressão ocorre a acumulação de mais mutações genéticas a qual leva ao desenvolvimento da malignidade (MARTINEZ *et al.*, 2003).

Sugere-se que o desenvolvimento da malignidade das neoplasias sejam decorrentes de seis alterações fisiológicas fundamentais como a auto-suficiência na sinalização do crescimento, insensibilidade a fatores inibidores de crescimento, evasão do programa de morte celular programada (apoptose), potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada e invasão tecidual e metástase. Cada uma dessas características fisiológicas adquiridas leva ao desenvolvimento do tumor e dificultam, com êxito, a ação de mecanismos de defesas das células e tecidos (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Todos estes fatores levam a perda do controle do ciclo celular, principal característica das neoplasias malignas.

1.3.1. Genes relacionados às neoplasias

As principais classes de genes envolvidos na carcinogênese incluem os proto-oncogenes, genes que controlam diretamente a proliferação celular, os genes supressores de tumor e os genes de reparo do DNA (NUSSBAUM *et al.*, 2002; BOIN *et al.*, 2003). Os genes relacionados ao controle do ciclo celular não são mais suscetíveis a alterações genéticas do que os demais genes de uma célula, entretanto lesões nestes genes favorecem a proliferação celular descontrolada (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Os proto-oncogenes são parte normal do material genético que desempenham um papel essencial no controle da proliferação celular e codificação dos fatores de crescimento, assim, qualquer alteração na estrutura ou na expressão desses genes altera a função normal da célula (CASSIDY, *et al.*, 2002; BOIM *et al.*, 2003). Um proto-oncogene pode se tornar um oncogene a partir de lesões genéticas (mutações) que conferem autonomia de crescimento para a célula ao afetar um ou mais dos mecanismos de transdução de sinais da divisão celular (RANG *et al.*, 2004).

Um dos primeiros proto-oncogenes descoberto foi o gene da família *Ras*, mutante derivado de uma linhagem celular de carcinoma de bexiga (NUSSBAUM *et al.*, 2002). Os oncogenes da família *Ras* codificam proteínas G que são moléculas acopladas a receptores de membrana responsáveis pela transdução de sinais para o interior celular. O ciclo celular é regulado externamente a partir de receptores acoplados a proteína G que é uma proteína composta das subunidades $G\alpha$ -GDP e $G\beta\gamma$. A partir de um estímulo extracelular o receptor de membrana catalisa a substituição do GDP (subunidade $G\alpha$) por GTP, na proteína G, que adquire a forma ativa responsável por estimular a adenilato ciclase a elevar a concentração intracelular de AMPc (Adenosina monofosfato cíclico), que por sua vez, promove a ativação da proteína quinase A (PKA) (DORSAN & GUTKIND, 2007; OLDHAM & HAMM, 2008). A PKA leva a ativação do fator de transcrição CREB que regula a expressão de ciclinas (D e E), importantes para a regulação do ciclo celular (NEW & WONG, 2007). O proto-oncogene *Ras* codifica uma

proteína G mutada incapaz de converter o GTP a GDP, permanecendo ativada, sinalizando constantemente a divisão celular. Esses genes são ativados por mutações de ponto, alteração de uma única base nitrogenada na seqüência de DNA do gene (RANG *et al.*, 2004; NUSSBAUM *et al.*, 2002; BOIM *et al.*, 2003).

Na leucemia mielóide crônica e em um subgrupo de leucemia linfoblástica aguda o proto-oncogene *c-abl* é translocado de seu sítio normal no cromossomo 9 para o cromossomo 22, denominado comossomo Philadelphia (Ph1), onde se funde com gene *bcr* (COTRAN *et al.*, 2000; BOIM *et al.*, 2003). Alguns oncogenes relacionados a neoplasias humanas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Oncogenes relacionados a neoplasias humanas (BOIM *et al.*, 2003).

Oncogene	Tumor
bl	Leucemia mielóide crônica e linfocítica aguda
bcl-1	Linfomas de célula B e mielomas múltiplos
bcl-2	Linfomas indiferenciados e foliculares
bcl-3	Leucemias linfocíticas crônicas de célula B
neu/erb-B2	Carcinoma de mama, ovário e estômago
gip	Carcinoma de ovário e glândula adrenal
gsp	Adenoma de hipófise; carcinoma de tireóide
Ki-ras	Leucemia mielóide aguda e linfoblástica; carcinoma de tireóide; melanoma

Enquanto os proto-oncogenes codificam proteínas que promovem a divisão celular, os genes supressores tumorais codificam proteínas que freiam o crescimento celular, conseqüentemente, tanto os proto-oncogenes quanto os genes supressores tumorais atuam regulando o ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 2010; LODISH *et al.*, 2005).

O ciclo celular pode ser dividido em duas etapas, a interfase, onde se observa o crescimento celular e duplicação de cromossomos e organelas, e a mitose propriamente dita, período no qual o material duplicado será dividido para as duas células filhas. Assim as duas fases mais importantes do ciclo celular são a fase S, onde ocorre a síntese de DNA e a fase M, onde se observa a mitose (BOIM *et al.*, 2003).

A maioria das células requerem muito mais tempo para crescer e dobrar sua massa de proteínas e organelas do que para replicar seu DNA e se dividir. Para tanto, fases intermediárias de crescimento são inseridas no ciclo celular como a fase G_1/G_0 , onde ocorre síntese de RNA e de proteínas para que seja dado início a fase de síntese do DNA, e a fase G_2 , onde também se observa síntese de RNA e de proteínas, além de estruturas essenciais ao início da divisão celular. As fases G_1 , S e G_2 (Figura 6) em conjunto são chamadas de interfase e podem ocupar 23 horas de um ciclo de 24 horas, em uma célula humana proliferando em cultura, restando uma hora para a fase M (mitose). A fase G_1 do ciclo celular é mais do que uma fase de crescimento, neste período ocorre uma análise dos ambientes interno e externo, apenas quando as condições são favoráveis esta fase atinge o ponto de restrição (ponto de verificação do início) a partir do qual a célula se torna comprometida em iniciar o ciclo celular. Quando as condições são desfavoráveis a célula permanece nas fases iniciais de G_1 ou se direcionam à fase G_0 (Figura 6), um estado de repouso especializado (ALBERTS *et al.*, 2010).

Internamente, o ciclo celular é regulado pela atividade das proteínas quinases e ciclinas (Figura 6). As ciclinas são proteínas sintetizadas durante o ciclo celular (Figura 6) que ativam as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) por fosforilação em sítios específicos. Uma vez cumprida as suas funções as quinases são destruídas regulando assim os principais eventos do ciclo celular. A ativação das CDKs promovem a liberação de fatores de transcrição com ativação de genes e síntese proteica essenciais ao ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 2010; LODISH *et al.*, 2005).

O gene supressor tumoral mais frequentemente alterado em neoplasias malignas (aproximadamente 50%) é o gene *Tp53*, responsável pela codificação da proteína p53, um importante regulador do ciclo celular (NOVÁK *et al.*, 2002). Para que erros durante a divisão celular não se propaguem, o ciclo celular apresenta pontos de verificação e controle fundamentais para que ocorra o processo de reparo. A proteína p53 atua nos pontos de checagem G_1/S , ou ponto de restrição, verificando se a célula está em condições de iniciar a síntese de DNA, e atua também no ponto de checagem G_2/M verificando se a duplicação do DNA ocorreu de forma eficiente. Caso haja erros durante o

processo de divisão celular, a proteína p53 induz a codificação da proteína p21 que inibe o início da síntese de DNA (ponto de checagem G_1/S) e início da mitose (ponto de checagem G_2/M), paralisando o ciclo para que o reparo seja realizado (NOVÁK *et al.*, 2002; VERMEULEN *et al.*, 2003).

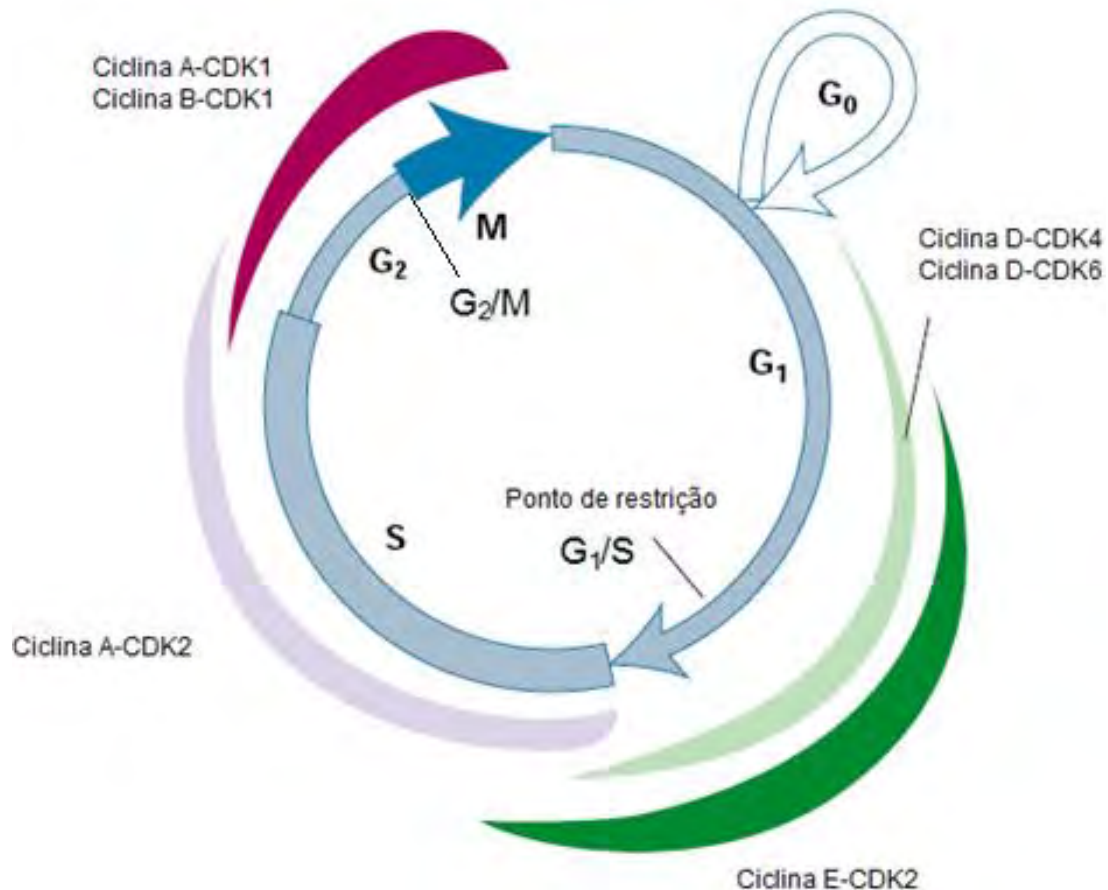


Figura 6. Atividade dos complexos Ciclina-CDK de mamíferos ao longo do ciclo celular e os pontos de verificação e checagem (LODISH *et al.*, 2005).

Outro gene supressor tumoral relacionado a neoplasias é o gene do retinoblastoma (*Rb*) que codifica a proteína Rb. Quando a proteína Rb sofre fosforilação pelas ciclinaD-CDK4 e ciclinaE-CDK2 ocorre a liberação do fator de transcrição E2F responsável pela expressão de genes que codificam as ciclinas A e E. Mutações que levam a transcrição de uma proteína Rb modificada pode promover a liberação constante do fator E2F com conseqüente estimulação do ciclo celular (WEINBERG, 1995; SOUCEK *et al.*, 1997; CONNELL-CROWLEY *et al.*, 1997; NOVÁK *et al.*, 2002). O ciclo celular

também sofre a ação de moduladores negativos como as proteínas das famílias INKs (p15, p16, p18 e p19) e CIP (p21, p27 e p57) que inibem a formação do complexo ciclina/CDK o que compromete o processo de divisão celular (NOVÁK *et al.*, 2002; VERMEULEN *et al.*, 2003).

As células possuem um complexo sistemas de reparo do DNA. A fita complementar de DNA, cópia intacta da mesma informação, é utilizada para restaurar a sequência de nucleotídeos na fita danificada, entretanto, alterações potencialmente perigosas podem afetar as duas fitas de DNA. Esse sistema de reparo compreende um complexo sistema enzimático que atua conforme o tipo de lesão. Mutações em genes que codificam proteínas de reparo do DNA estão associados a diversos tipos de cânceres como câncer do cólon, de pele, leucemia, linfoma, câncer de mama e de ovário (ALBERTS *et al.*, 2010).

Lesões que não podem ser reparadas desencadeiam o processo de morte celular programada, a apoptose, induzida pela proteína p53. A função promotora da apoptose por este gene compreende uma das ações mais importantes do organismo na proteção contra o câncer (NOVÁK *et al.*, 2002; VERMEULEN *et al.*, 2003).

1.3.2. Apoptose e o controle das neoplasias

A apoptose é um processo bioquimicamente orientado de morte celular como resposta a estímulos específicos (como o fator de necrose tumoral TNF e o ligante FAS) ou em resposta a diversas formas de dano celular ou estresse (GERSCHENSON & ROTELLO, 1992; SMITH *et al.*, 1994; NAGATA, 1994). Esta forma de morte celular programada recebeu maior atenção após a identificação da fragmentação do DNA em 180-200pb, o que não é observado na necrose, sugerindo ação de endonucleases e de complexos processos bioquímicos (HANNUN, 1997). A apoptose apresenta fundamental importância para o controle das neoplasias uma vez que falhas nesse processo podem promover a sobrevivência e acúmulo de células transformadas levando a formação de tumores (FISCHER & SCHULZE-OSTHOFF, 2005).

Diferente da necrose, que causa respostas potencialmente grave como a inflamação, a apoptose constitui uma forma eficiente de morte sem comprometimento dos tecidos adjacentes. Tanto a via extrínseca quanto a via intrínseca de sinalização da apoptose dependem de uma cascata enzimática mediada por caspases. As caspases (caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10) correspondem a uma família de proteases sintetizadas na célula como precursores inativos, pró-caspases (zimogênio), que após sofrerem clivagem proteolítica (Figura 7) promovem a iniciação e regulação da via da apoptose (ALBERTS *et al.*, 2010).

A via extrínseca da apoptose (Figura 7) é ativada por proteínas sinalizadoras extracelulares que se ligam a receptores de morte na superfície externa da membrana celular. Receptores de morte pertencem a superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR). O receptor FAS (CD95) é um dos receptores TNFR mais estudado relacionado à indução de apoptose (LOCKSLEY *et al.*, 2001; ROUVIER *et al.*, 1993). Esses receptores de superfície celular transmitem sinais de apoptose quando ativados por ligantes específicos, ativando imediatamente a cascata de caspase. Quando estes receptores são ativados por seus ligantes ocorre uma aproximação de três moléculas receptoras (trimerização) e formação de cluster, chamado domínio de morte, que se liga a uma molécula de proteína adaptadora chamada FADD. Essa proteína possui um domínio efetor de morte que se liga a pró-caspase 8 e forma o complexo indutor de morte (DISC) (Figura 7). Com a formação do DISC as caspases iniciadoras (caspases 8 e 10) são clivadas e se tornam ativas para efetuar a clivagem das caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) que irão desencadear o processo de apoptose (FISCHER & SCHULZE-OSTHOFF, 2005; DASH, 2011; STEFAN *et al.*, 2007).

A morte celular programada também pode ocorrer pela via intrínseca, ou mitocondrial, que é iniciada por múltiplas formas de estresse celular como radiação e agentes químicos. Este fatores induzem a transcrição da proteína p53, que por sua vez promove a transcrição de proteínas pró-apoptóticas (Bak e Bad) da família Bcl-2 (KNUDSON *et al.*, 1995; FISCHER & SCHULZE-OSTHOFF, 2005; JIANG *et al.*, 2007; ADAMS & CORY, 2001; STRASSER *et al.*, 2000). Esta família se subdivide em duas classes, os membros anti-

apoptóticos como Bcl-2 e Bcl-xl (fatores de sobrevivência) e os membros pró-apoptóticos (fatores de morte) como Bax, Bak e Bad. As proteínas da família Bcl-2 atuam no controle da apoptose através das interações mútuas entre os membros pró e anti-apoptóticos (HUANG & STRASSER, 2000; ANTONSSON, 2001; BONER, 2003; JIANG *et al.*, 2007).

A via mitocondrial (Figura 7) geralmente é ativada em resposta a sinais extracelulares e a injúrias internas como danos ao DNA (HENGARTNER, 2000) cujas respostas são reguladas pelos membros da família Bcl-2, presentes na membrana mitocondrial externa, onde regulam o extravasamento do citocromo c para o citoplasma. Entretanto, estas proteínas também podem ser encontradas no citosol, na forma inativa, que são direcionadas para a mitocôndria a partir de sinais pró-apoptóticos. O citocromo c é uma proteína aceptora de elétrons (transportadora de elétrons), presente nas cristas mitocondriais, que faz parte da cadeia respiratória responsável pela produção aeróbica de ATP (GROSS *et al.*, 1999; PUTHALAKATH *et al.*, 1999; ADAMS & CORY, 1998; ANTONSSON *et al.*, 2000).

O citocromo c da mitocôndria, que extravasa para o citoplasma (Figura 7), forma um complexo oligomérico com a proteína Apaf-1, chamado de apoptossomo, que promove a ativação catalítica da caspase-9. De forma semelhante à caspase 8, a caspase 9 cliva e ativa a caspase 3 promovendo a morte celular por apoptose. Além do citocromo c, também são liberados da mitocôndria outras proteínas como a SMAC/DIABLO, responsável pela inibição de proteínas inibidoras de caspases (IAPs). A via mitocondrial também pode ser ativada pela via extrínseca por meio da clivagem da proteína Bid (um membro pró-apoptótico da família Bcl-2) mediado pela caspase 8. Uma vez clivada, a tBid induz a liberação do citocromo c, formação do apoptossomo e ativação de caspases efetoras, amplificando os sinais de morte gerados pelos receptores de morte (LORENZO *et al.*, 1999; FISCHER & SCHULZE-OSTHOFF, 2005).

As células em apoptose apresentam alterações morfológicas e bioquímicas características que podem ser utilizadas para a sua identificação. Estas alterações incluem condensação da cromatina, formação de prolongamentos da membrana chamados *blebbing*, fragmentação do DNA, externalização de

fosfatidilserina e formação dos corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por macrófagos, sendo removidos sem causar processo inflamatório (SARASTE & PULKKI, 2000; ZIEGLER & GROUSCURTH, 2004; ALBERTS, *et al.*, 2010).

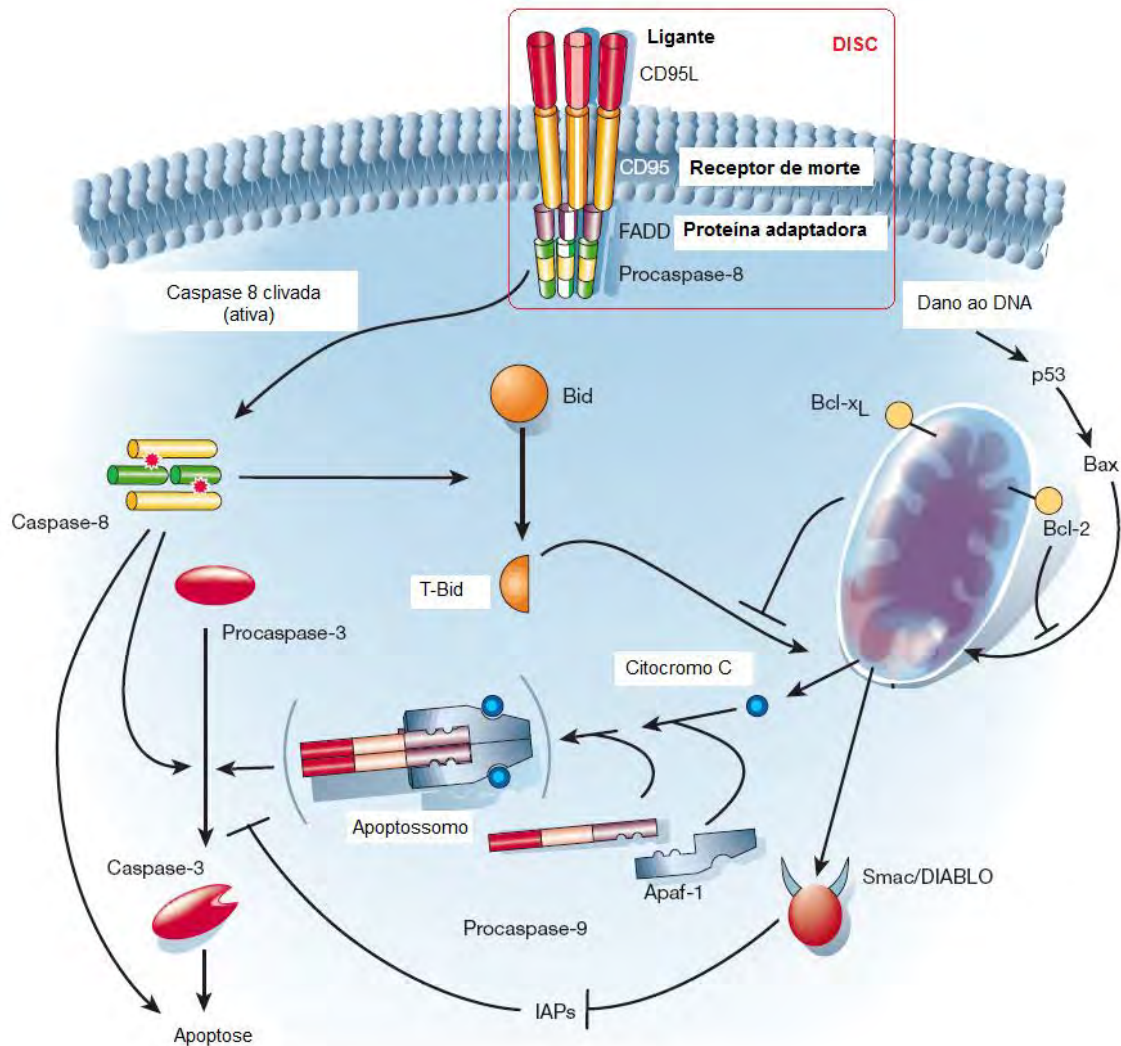


Figura 7. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose adaptado de Hengartner (2000).

Recentemente, acentuados progressos na bioquímica, biologia molecular e genética vem permitindo elucidar o mecanismo de morte celular. O estudo da apoptose inicialmente foi possível através avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A clivagem do DNA, que produz fragmentos de tamanhos variáveis porém sempre múltiplos de 200 pares de

base, pode ser detectada por eletroforese em gel. A fosfatidilserina, expressa na membrana externa das células apoptóticas, pode ser identificada pelo marcador específico anexina V e dosado por citometria de fluxo. Morfologicamente, células apoptóticas podem ser quantificadas e identificadas por corantes fluorescente como laranja de acridina e brometo de etídio, outros corantes também podem ser utilizados, como iodeto de propídio, hoechst (corante fluorescente) e DAPI (corante fluorescente) para quantificação por citometria de fluxo (OTSUKI *et al.*, 2003; ALBERTS, *et al.*, 2010). Todas estas técnicas oferecem subsídios para a investigação “in vitro” da atividade biológica de novos candidatos a fármacos.

A elucidação dos processos moleculares e bioquímicos envolvidos no mecanismo de morte celular programada impulsionou as pesquisas na busca de quimioterápicos promotores da apoptose, o que evidencia a sua importância para a terapia farmacológica do câncer. O conhecimento das vias de sinalização da apoptose tem permitido o planejamento racional de novos fármacos anti-cancerígenos. Trabalhos mostram que quimioterápicos com diferentes estruturas e mecanismo de ação induzem a morte celular por apoptose como a dexametasona, vincristina, cisplatina, ciclofosfamida e 5-fluorouracil. (KERR *et al.*, 1994; REED, 1995; D’AMICO & MCKENNA, 1994).

1.4. FARMACOLOGIA ANTINEOPLÁSICA

Nos últimos 50 anos o tratamento do câncer tem contado principalmente com a quimioterapia, radioterapia e cirurgia, que em conjunto tem apresentado excelentes resultados como nas neoplasias hematológicas e tumores sólidos (HANNUN, 1997; MURAD & KATZ, 2000). No caso das leucemias o transplante de medula também tem sido utilizado em associação à quimioterapia e à radioterapia (BARBOSA *et al.*, 2000; OLIVIERI *et al.*, 2008; FARIAS *et al.*, 2010). Em quadros avançados, quando o tumor se disseminou a partir do seu local de origem, a quimioterapia tem um papel crescente nos esforços para aliviar sintomas e prolongar a vida (NYGREN, 2001). Cada um destes tratamentos tem como objetivo erradicar completamente a doença, o

que geralmente ocorre por meio da terapia combinada, onde são associados mais de um tipo de tratamento (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A química medicinal tem como objetivo a busca de novos fármacos com toxicidade seletiva, de forma que o fármaco seja mais específico para as células cancerosas do que para as células normais. O alvo da maioria dos quimioterápicos são as células em divisão, agindo em sua maioria na proliferação celular (ciclo celular) e na promoção da apoptose. Deve ser considerado também que tecidos normais que apresentam elevada taxa de crescimento como medula óssea, folículos pilosos e mucosa gastrointestinal também podem ser afetados, o que causa reações adversas severas como náuseas, perda de cabelo e maior susceptibilidade às infecções (GOLAN, *et al.*, 2009; GOODMAN & GILMAN, 2005; RANG *et al.*, 2004).

A ação dos fármacos também depende das características das neoplasias, tumores de pequeno tamanho e de intenso crescimento respondem de forma mais favorável à quimioterapia do que tumores grandes e de crescimento lento. Embora tumores primários respondam bem ao tratamento, as células metastáticas geralmente respondem de forma precária levando a um prognóstico desfavorável (GOLAN *et al.*, 2009). Esses dados reforçam a necessidade da detecção precoce da doença, o que aumenta consideravelmente a probabilidade de cura.

A maioria dos quimioterápicos tem como objetivo principal eliminar todas as células neoplásicas e, independente da via de atuação, estes fármacos promovem algum tipo de lesão no DNA, deflagrando o processo de morte celular programada (RANG *et al.*, 2004; GOODMAN & GILMAN, 2005). De forma geral os quimioterápicos clinicamente empregados agem nas células em divisão. Os antineoplásicos que atuam em qualquer fase do ciclo celular das células em divisão são denominados ciclo-específicos. Os fármacos que agem apenas em uma fase específica do ciclo celular são denominados fase-específicos. Os agentes não-ciclo-específicos são aqueles que tem a capacidade de agir nas células tumorais que estão atravessando o ciclo celular ou em repouso no estágio G₀. A Figura 8 mostra a relação entre alguns antineoplásicos e a sua atuação no ciclo celular. Os quimioterápicos também podem ser classificados segundo o mecanismo de ação em antimetabólitos,

antibióticos citotóxicos, produtos naturais vegetais e agentes alquilantes e correlatos (RANG *et al.*, 2004).

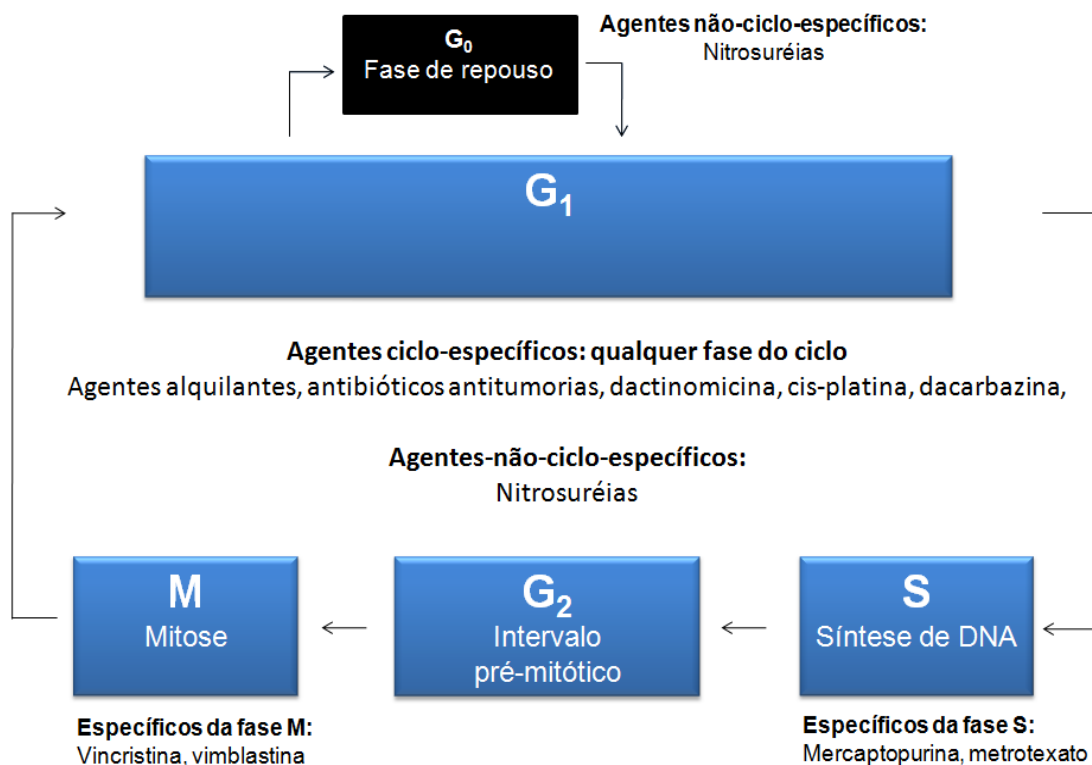


Figura 8. Relação entre o ciclo celular e a ação de alguns agentes citotóxicos (RANG *et al.*, 2004; GOODMAN & GILMAN, 2005).

Os fármacos antimetabólitos (Figura 9) correspondem a uma classe de agentes que interferem na síntese do DNA como os análogos do folato (metotrexato), os análogos das pirimidinas (fluorouracil, tomudex e citarabina) e os análogos das purinas (6-mercaptopurina, tioguanina, fludarabina, pentostatina e clabridina) (RANG *et al.*, 2004; THOMAS, 2007). Estes compostos atuam inibindo enzimas envolvidas na síntese e no metabolismo do DNA comprometendo a sua replicação (RANG *et al.*, 2004). Trabalhos têm mostrado aumento dos níveis de proteína p53 e de ruptura na fita de DNA em células humanas tratadas com antimetabólitos, o que sugere que estes agentes promovem a morte celular por apoptose (FRITSCHÉ *et al.*, 1993; NELSON & KASTAN, 1994).

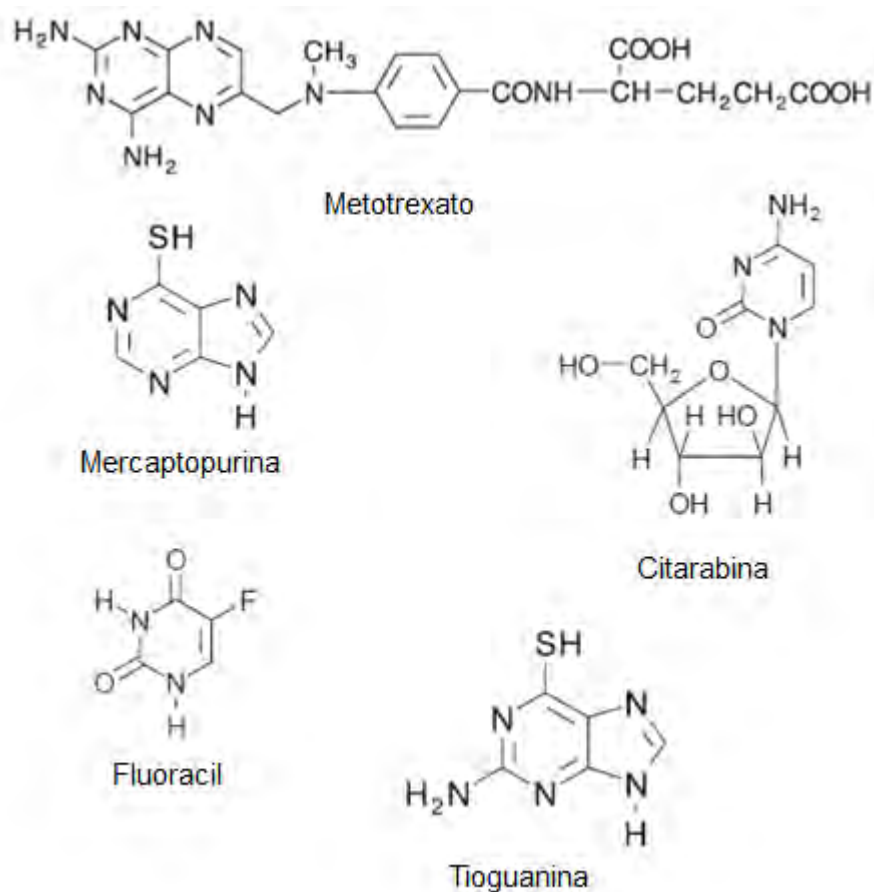


Figura 9. Estrutura de alguns fármacos antimetabólitos usados no tratamento de neoplasias malignas (THOMAS, 2007)

Os antibióticos citotóxicos (Figura 10) são compostos naturais que de forma geral interferem na função da topoisomerase II. As topoisomerasas são enzimas que participam da replicação do DNA. Em tecidos tumorais a expressão das topoisomerasas é maior do que nas células de metabolismo normal o que as tornam um alvo importante para o controle das neoplasias (KELLNER *et al.*, 2000). As antraciclina estão entre os antibióticos citotóxicos de maior utilidade clínica contra o câncer. Embora diversos mecanismos pareçam estar envolvidos com sua atividade, a capacidade das antraciclina de provocar lesão no DNA resulta mais provavelmente de sua intercalação no DNA, o que interfere na ação da topoisomerase II, resultando em lesões do DNA como cisão das fitas e por fim em morte celular. As principais antraciclina utilizadas clinicamente são a doxorrubicina, idarrubicina, epirrubicina, daunorrubicina, mitoxantona e dactinomomicina (RANG *et al.*, 2004; GOODMAN & GILMAN, 2005).



Figura 10. Estrutura de alguns antibióticos citotóxicos (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os produtos naturais vegetais (Figura 11) são antimetabólicos que agem na fase M do ciclo celular e tem como maiores representantes os alcalóides vincristina e vimblastina extraídos da planta *Catharanthus roseus* (*Vinca rosea*), introduzidos na quimioterapia do câncer no final da década de 60. A vimblastina é empregada no tratamento de certos tipos de linfomas e de câncer testicular metastático e geralmente é utilizada em associação com outras drogas, com diferentes mecanismos de ação, como a cisplatina. A vimblastina em doses terapêuticas provoca náuseas, vômitos e mielossupressão (reação adversa mais severa). A vincristina desempenha um importante papel na quimioterapia das leucemias pediátricas e tem como efeitos adversos náuseas, vômitos e mielossupressão, sendo esta mais leve do que a provocada pela vimblastina. Compostos semi-sintéticos derivados desses alcalóides estão em uso clínico como a vindesina (Figura 11), utilizada no tratamento de melanoma e carcinomas de pulmão e a vinorelbina (Figura 11), usada no tratamento do câncer de mama metastático e ovariano. Os agentes antimetabólicos se ligam à tubulina inibindo a sua polimerização em microtúbulos, impedindo a formação do fuso mitótico o que paralisa a divisão celular (RANG *et al.*, 2004; GOODMAN & GILMAN, 2005; AVENDAÑO & MENÉNDEZ, 2008; GOLAN *et al.*, 2009).

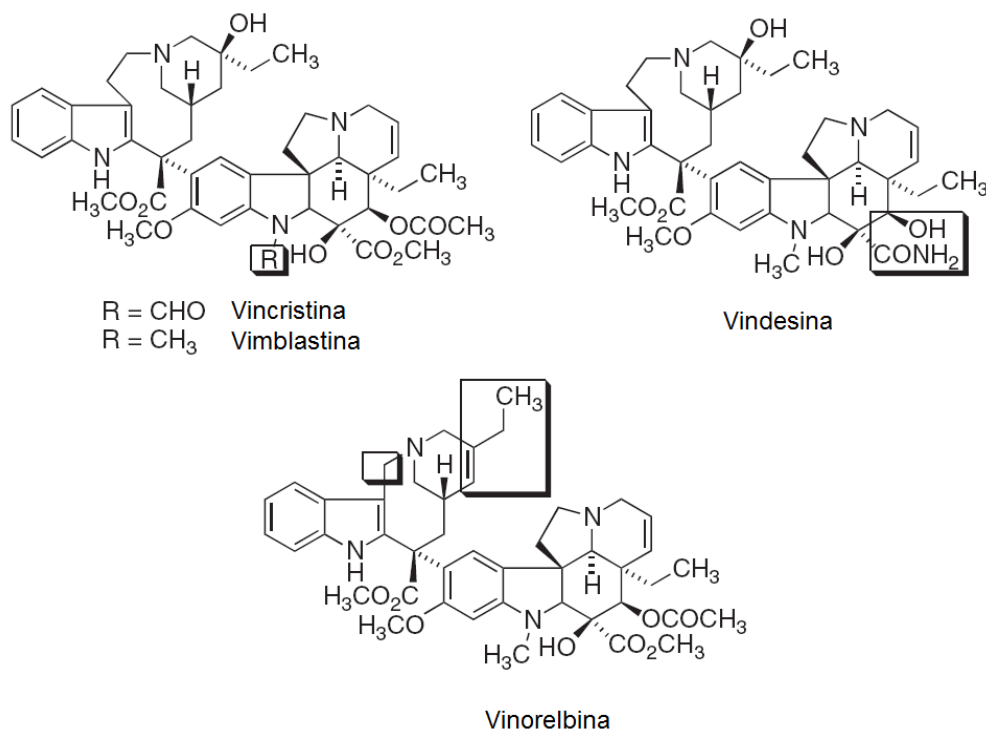


Figura 11. Estrutura de algumas fármacos antimitóticos (AVENDAÑO & MENÉNDEZ, 2008).

Os agentes alquilantes (Figura 12) são utilizados há 60 anos e as classes mais importantes em uso clínico são as mostardas nitrogenadas (ciclofosfamida, mecloretamina, melfalana, clorambucil e tiotepa) e as nitrossuréias (carmustina, mitomicina, dacarbazina, procarbazina e altretamina), que atuam em qualquer fase do ciclo celular, porém, são mais efetivos nas fases G₁ e S (ABRAHAM, 2003; GOODMAN & GILMAN, 2005; AVENDAÑO & MENÉNDEZ, 2008).

Os agentes alquilantes são geralmente agentes eletrófilos ou dão origem a eletrófilos que possuem a capacidade de se ligar covalentemente ao DNA introduzindo um grupo alquil. Nas mostardas nitrogenadas ocorre a formação do íon aziridina por uma substituição nucleofílica interna de um átomo de cloro (Figura 13). Em seguida ocorre um ataque nucleofílico do nitrogênio 7 (N7) de um resíduo de guanina sobre este íon. Uma vez que os agentes alquilantes são bifuncionais ocorre a formação do íon aziridina na outra cadeia deste agente que se liga de forma cruzada ao DNA (THOMAS, 2007). O nitrogênio 7 (N7) da guanina, por ser um nucleófilo forte, constitui o principal alvo molecular para a alquilação no DNA, embora o oxigênio 6 (O6) da guanina, o N1 e N3 da adenina, o N3 da citosina e o fosfato também possam ser alvos de alquilação

(BAKHTIAR & OCHIAI, 1999; RANG, *et al.*, 2004; GOODMAN & GILMAN, 2005; GOLAN, *et al.*, 2009).

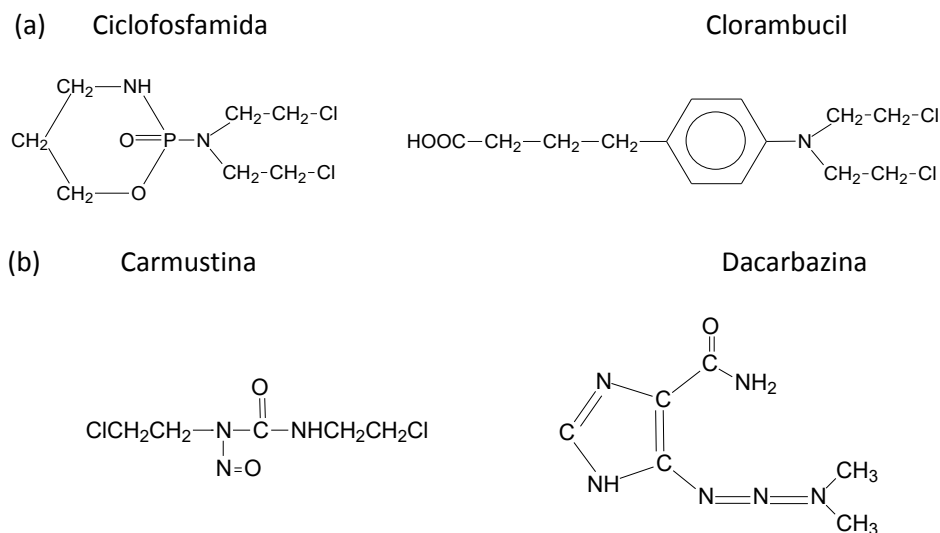


Figura 12. Estruturas de algumas mostardas nitrogenadas (a) e nitosurréias (b) (GOODMAN & GILMAN, 2005).

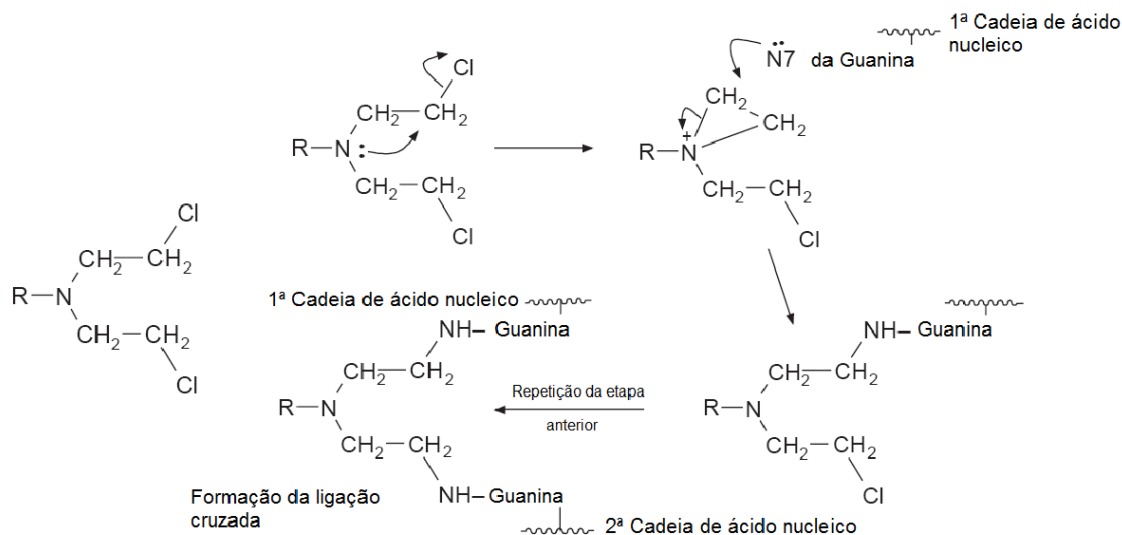


Figura 13. Proposta de mecanismo de formação de ligação cruzada entre agente alquilante e o DNA (THOMAS, 2007).

A cisplatina, um dos primeiros compostos de coordenação utilizados como quimioterápico, também é classificado como agente alquilante ou correlato em virtude de formar ligações cruzadas com o DNA. A cisplatina (Figura 14) ou cisdiaminodicloroplatina (II) marcou os anos setenta representando um dos mais potentes agentes antitumorais usado clinicamente para uma grande variedade de tumores sólidos (GONZALEZ *et al.*, 2001; SIDDIK, 2003; AVENDAÑO & MENÉNDEZ, 2008).

Ao estudar os efeitos do campo elétrico sobre o crescimento bacteriano usando eletrodos de platina, Rosenberg observou inibição do crescimento das bactérias, ou seja, paralisação da divisão celular. A descoberta acidental do composto de coordenação de platina, na Universidade de Michigan/Estados Unidos, permitiu-se propor que este composto poderia também inibir a proliferação descontrolada de células cancerosas (ROSENBERG *et al.*, 1965, 1969; ROSENBERG, 1973).

A cisplatina ou cis-DDP é um fármaco administrado ao paciente por via intravenosa que se difunde rapidamente para os tecidos. Aproximadamente 90% da cisplatina é transportada para os tecidos ligados a albumina e outras proteínas plasmáticas. Como a concentração de cloreto no meio extra celular é em torno de 100mM a cisplatina é transportada na forma inativa. A cis-DDP pode ser transportada para o meio intracelular de duas formas, por difusão ou pelo transportador de cobre CTR-I (DAINO *et al.*, 2000; NGUEWA, *et al.*, 2005; CEPEDA *et al.*, 2007). Dentro da célula a concentração de cloreto é baixa, assim, os cloretos da cis-DDP podem ser deslocados por reação com nucleófilos como a água, adquirindo carga positiva (Figura 14), responsável pela formação da espécie ativa do fármaco. A cisplatina carregada positivamente reage com um nucleófilo forte, como o N7 da guanina, de forma semelhante aos agentes alquilantes, formando adutos com o DNA que inibem a sua transcrição e replicação, resultando em quebras e erros de codificação que acabam levando a morte celular por apoptose (BAKHTIAR & OCHIAI, 1999; GOODMAN & GILMAN, 2005).

Componentes celulares que possuem sítios nucleofílicos como DNA, RNA, proteínas, fosfolipídios de membrana e citoesqueleto reagem com a cisplatina. Embora cerca de 1% da cis-DDP intracelular reaja com o DNA nuclear (Figura

combinada (dois antineoplásicos ou mais) tem sido utilizada de forma sinérgica, uma vez que o uso de fármacos com mecanismos de ação diferentes podem provocar uma taxa elevada de morte celular e evitar a resistência aos mesmos. Entretanto, a carcinogênese é um processo complexo e em sua maioria, os cânceres inicialmente clonais (originários de uma única célula transformada) desenvolvem heterogeneidade, uma vez que sofrem novas mutações e aumentam a variação genética entre as células-filhas, podendo levar a quadros de resistência (GOLAN, *et al.*, 2009).

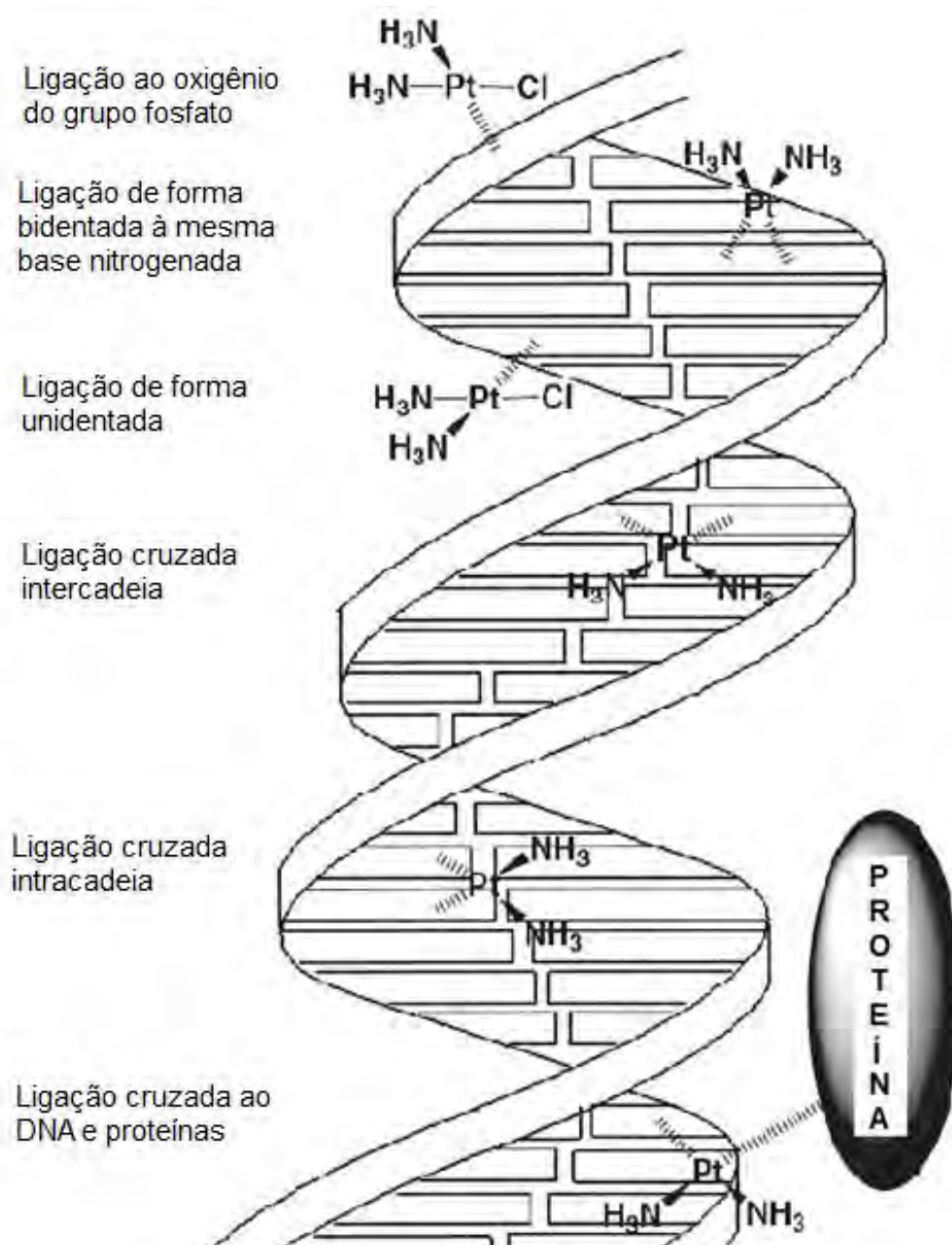


Figura 15. Interação da cisplatina com o DNA e proteínas (JONES & THORNBACK, 2007).

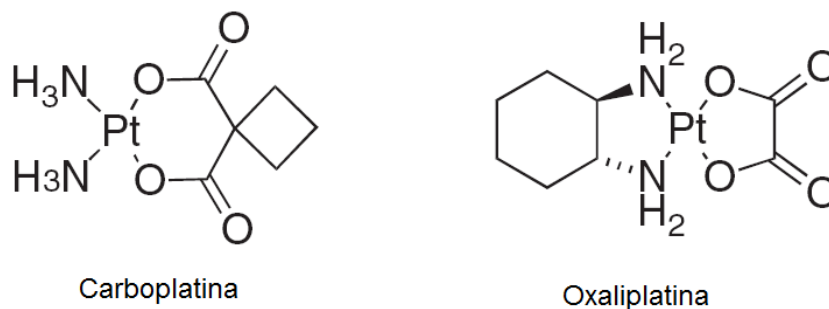


Figura 16. Estrutura da carboplatina e oxaliplatina (AVENDAÑO & MENÉNDEZ, 2008).

A resistência pode ser provocada por inativação do fármaco, diminuição da sua captação, reparo das lesões causadas pelos fármacos, reprogramação da via metabólica e insensibilidade à apoptose. Sem dúvida, a resistência é um dos principais fatores limitantes associado ao insucesso da quimioterapia (GOLAN, *et al.*, 2009). As alterações genéticas das células tumorais que ocorrem nos centros regulatórios da apoptose e de suas vias de sinalização, tem enfatizado a maquinaria apoptótica como um novo e interessante alvo para o desenvolvimento racional de novos fármacos com atividade antitumoral (LISTON *et al.*, 2003; REED, 2003; DEBATIN, 2004; JUIM *et al.*, 2004).

1.5. PLANEJAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

A química medicinal é uma ciência interdisciplinar que apresenta interfaces com várias áreas do conhecimento (química orgânica, química inorgânica, bioquímica, farmacologia, biologia molecular, genética, imunologia e toxicologia) e tem como objetivo a descoberta, desenvolvimento, preparo e identificação de compostos biologicamente ativos, buscando compreender o mecanismo de ação destas drogas para a construção de relações estrutura-atividade (WERMUTH *et al.*, 1998; IMMING, 2008). A química medicinal teve um papel importante na descoberta e desenvolvimento de drogas anticancerígenas. A mudança de um átomo de enxofre por um de nitrogênio transformou a mostarda nitrogenada (Figura 17) em um dos primeiros compostos utilizados com sucesso na indução da remissão tumoral em um paciente portador de linfoma (RAJSKI & WILLIAMS, 1998; CHAST, 2008).

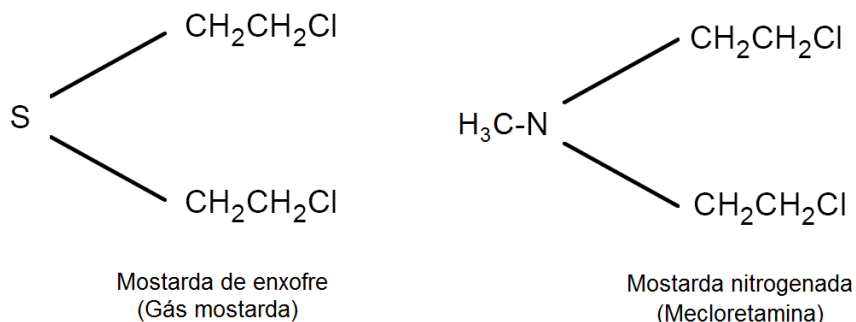


Figura 17. Estrutura da mostarda de enxofre da mecloretamina adaptado de Bennion & David-Bajar (1994).

Apesar da importância da síntese química para a indústria farmacêutica moderna, a maioria dos fármacos foram descobertos por acaso ou por meio de triagem de compostos de origem natural, por isso, muitas drogas utilizadas na medicina têm a sua origem nos produtos naturais. A grande diversidade dos recursos naturais e sintéticos proporcionou a descoberta e o desenvolvimento de potenciais substâncias biologicamente ativas (IMMING, 2008). A síntese química vem contribuindo de forma crescente para a obtenção de novas drogas, cerca de 85% dos fármacos comercialmente disponíveis são de origem sintética, considerando aqueles oriundos de processos semi-sintéticos, como os antibióticos obtidos a partir de processos fermentativos, esse percentual pode chegar a mais de 85% (BARREIRO & FRAGA, 2008).

Durante as últimas décadas do século 20 os compostos farmacêuticos contendo metais começou a desempenhar um papel muito importante na medicina diagnóstica e terapêutica. Uma grande inovação na quimioterapia do câncer foi a introdução da cisplatina (Platinil® ou Platinol®), composto aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1978 para uso no tratamento de câncer ovariano e testicular. Entretanto, como já mencionado, o uso das cisplatina é severamente limitado pelos seus efeitos tóxicos como nefrotoxicidade, o que estimulou o desenvolvimento de fármacos análogos à cisplatina como a carboplatina (Paraplatin®). Além disso, a descoberta da cisplatina intensificou as pesquisas sobre uma variedade de compostos metálicos com propriedades anticancerígenas (GOODMAN & GILMAN, 2005; JONES & THORNBAC, 2007).

O cobre é um metal que desempenha papel importante em vários organismos microbianos, plantas e seres humanos. O cobre apresenta-se como constituinte de proteínas como a citocromo C oxidase (CCO), que participa da cadeia respiratória mitocondrial e conseqüentemente da formação de ATP, e a cobre-zinco superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD), que atua na resposta de defesa antioxidante, entre outras funções (KIM *et al.*, 2008). As proteínas utilizam da natureza redox do cobre para realizarem mais facilmente reações de transferência de elétrons. Esta propriedade química deste metal é também potencialmente tóxica uma vez que estas reações redox podem gerar radicais hidroxila que podem resultar em danos a lipídios de membrana, proteínas e DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984). Apesar do teor médio de cobre no corpo humano estar em torno de 100 mg, dificilmente este metal é encontrado livre na célula (RAE *et al.*, 1999).

A química inorgânica medicinal busca explorar as propriedades únicas de íons metálicos para a concepção de novos medicamentos. No desenvolvimento de metalofármacos, as moléculas orgânicas (ligantes) apresentam papel importante, uma vez que podem limitar os efeitos tóxicos dos metais e potencializar suas propriedades terapêuticas. Ligantes sintéticos planejados para obtenção de compostos de coordenação podem permitir a obtenção de novos agentes terapêuticos (STORR *et al.*, 2006; BRUIJNINCX & SADLER, 2008).

O processo de desenvolvimento de um novo fármaco envolve uma multiplicidade de fatores como os farmacodinâmicos (interações responsáveis pela atividade biológica), farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) e toxicológicos. A modificação molecular tem sido empregada no planejamento de novas drogas com a finalidade de se obter fármacos mais potentes e com reduzidos efeitos colaterais (BARREIRO *et al.*, 2002; BARREIRO & FRAGA, 2008).

A hibridização molecular tem sido amplamente empregada pelos químicos medicinais como estratégia utilizada no planejamento e modificação molecular de ligantes e protótipos. Esta técnica permite a junção estrutural de compostos bioativos em uma única molécula, originando um novo produto que poderá apresentar atividade conjugada de ambos compostos de partida (BARREIRO &

FRAGA, 2008). Os ligantes duais podem ser planejados para agir seletivamente em alvos múltiplos, possibilitando um aumento da eficácia terapêutica, uma vez que vias metabólicas diferentes podem ser inibidas por uma única molécula (ESPINOZA-FONSECA, 2006). Os compostos duais podem agir também em diferentes sítios adjacentes de uma mesma macromolécula o que também pode levar a uma droga mais potente e/ou mais seletiva (CONTERAS & SIPPL, 2008).

Os ligantes com propriedade dual são denominados de ligantes múltiplos (LM) e podem ser classificados, segundo o mecanismo utilizado para unir as estruturas moleculares, em conjugados, pré-fundidos e fundidos. Os compostos conjugados são aqueles em que se utiliza um espaçador entre as estruturas que se deseja unir (Figura 18). Os espaçadores podem ser cadeias geralmente metilênicas, anéis não aromáticos, anéis aromáticos e heteroaromáticos. Quando este espaçador é reduzido ao ponto das estruturas se tocarem, sem que ocorra sobreposição, os compostos são denominados pré-fundidos. Os compostos fundidos são os mais comumente encontrados onde dois fármacos ou parte das suas estruturas são unidos por regiões comuns da molécula o que acarreta em pontos de sobreposição (MORPHY & RANKOVIC, 2008; CONTERAS & SIPPL, 2008).

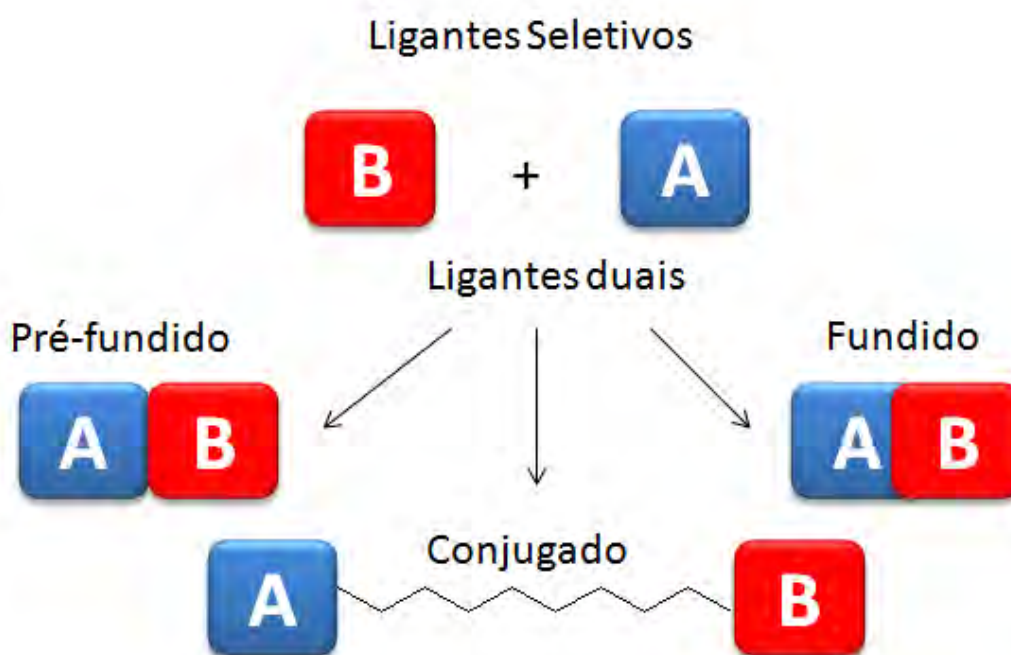


Figura 18. Classificação dos ligantes múltiplos (LM), Adaptado de MORPHY & RANKOVIC (2008) e CONTERAS & SIPPL (2008).

Para que os ligantes múltiplos apresentem potencial para candidatos a fármaco a escolha dos protótipos utilizados devem considerar o mecanismo de ação e os fatores estruturais para que a molécula planejada reconheça o alvo pretendido. Partir de drogas utilizadas na terapêutica como protótipos para o planejamento de novas drogas biologicamente ativas é uma estratégia racional uma vez que as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas destes agentes já estão bem estabelecidas (BARREIRO & FRAGA, 2008).

Apesar da ação hipotensora do propranolol como também da ação anti-coagulante do dicumarol e seu derivado sintético, a varfarina (Figura 19) (HOULT & PAYDT, 1996; GOODMAN & GILMAN, 2005), estes compostos e seus análogos estão sendo avaliados com outras finalidades, como a atividade anticancerígena. O propranolol tem apresentado atividade “*in vitro*” contra câncer de pâncreas (Al-WADEI *et al.*, 2009). A varfarina sódica mostrou redução de metástase em experimentos com animais (SMITH *et al.*, 1988) e o dicumarol induziu morte celular por apoptose em células de câncer pancreático (LEWIS, *et al.*, 2004). Pacientes com câncer renal tratados com a cumarina (1,2-benzopirona) apresentaram regressão tumoral sendo relatados baixos efeitos colaterais (MARSHALL *et al.*, 1991). A 4-hidroxicumarina tem apresentado atividade antineoplásica contra melanoma (VELASCO-VELAZQUEZ, 2003; SALINAS-JAZMÍN *et al.*, 2010), a 7-hidroxicumarina mostrou-se eficaz contra câncer de pulmão (JIMÉNEZ-OROZCO *et al.*, 2001) e a 6-metil-7-hidroxicumarina foi ativa contra câncer renal induzindo morte celular por apoptose (FINN *et al.*, 2003).

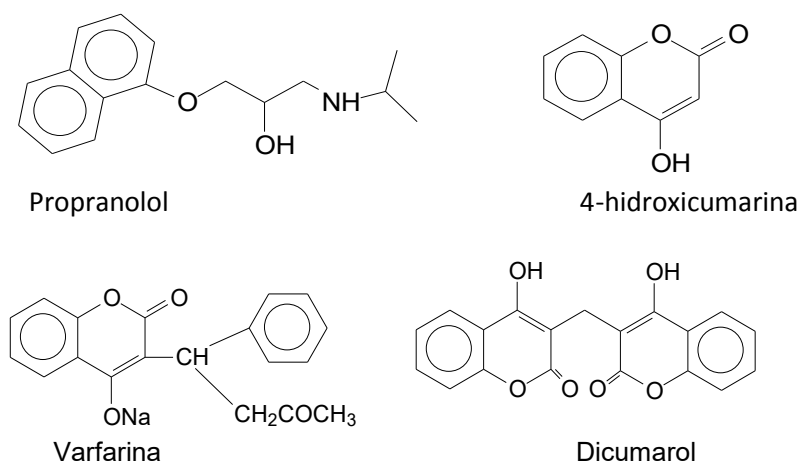


Figura 19. Estrutura do propranolol, cumarina, varfarina e dicumarol (GOODMAN & GILMAN, 2005).

Os fármacos sintéticos apresentam variados mecanismos de ação, e em sua maioria, apresentam em sua estrutura mais de um heteroátomo entre átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio predominantemente, além de cloro e flúor (BARREIRO & FRAGA, 2008). O grupo de pesquisa em Química Bioinorgânica da Universidade Estadual do Norte Fluminense investigou a atividade antineoplásica de dois compostos orgânicos, um contendo piridina em sua estrutura (BMPA) e outro apresentando uma piridina e um fenol em sua estrutura (HBPA) (Figura 20). Estes compostos citotóxicos, cujo mecanismo de ação ainda não foi elucidado, induziram morte celular por apoptose em células de origem leucêmica (BULL, 2008), característica importante para candidatos a protótipos antitumorais. É importante considerar que átomos como o nitrogênio e oxigênio possuem elétrons não ligantes capazes de realizarem ligações coordenadas com metais e assim formar os compostos de coordenação (JONES & THORNBACK, 2007). Em seu trabalho, Bull (2008) verificou que os compostos de coordenação de cobre obtidos a partir do BMPA e HBPA (Figura 20), além de apresentarem maior atividade biológica do que os seus respectivos ligantes, mantiveram a característica dos ligantes de partida induzindo morte celular por apoptose em células de origem leucêmica humana (U937 e THP-1).

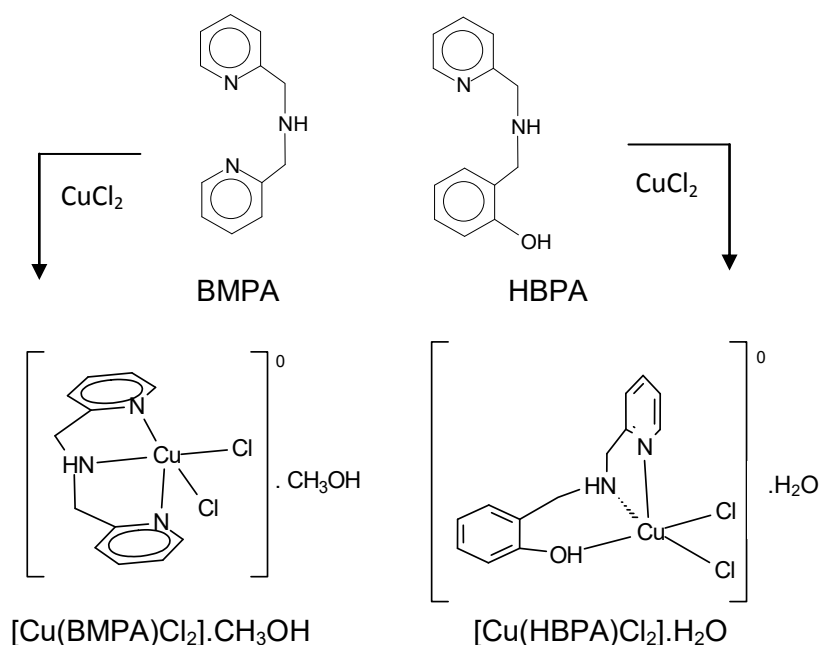


Figura 20. Compostos orgânicos e de coordenação com atividade antitumoral avaliados pelo grupo de Bioinorgânica da Universidade Estadual do Norte Fluminense, (BMPA) bis-(2-piridilmetil)amina, (HBPA) (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (BULL, 2008).

Assim, este trabalho tem como objetivo o planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de compostos orgânicos e de coordenação de cobre. Os ligantes foram propostos empregando-se a hibridação molecular, onde unidades estruturais do propranolol (Figura 21a) e da varfarina (Figura 22a) foram agregados aos ligantes HBPA e BMPA, obtendo-se novos ligantes N,O-doadores. Os ligantes foram reagidos com CuCl_2 para a obtenção de novos compostos de coordenação de cobre (Figuras 21b e 22b). Posteriormente foram avaliadas as atividades antitumorais dos mesmos frente a duas linhagens de células leucêmicas, U937 e THP-1.

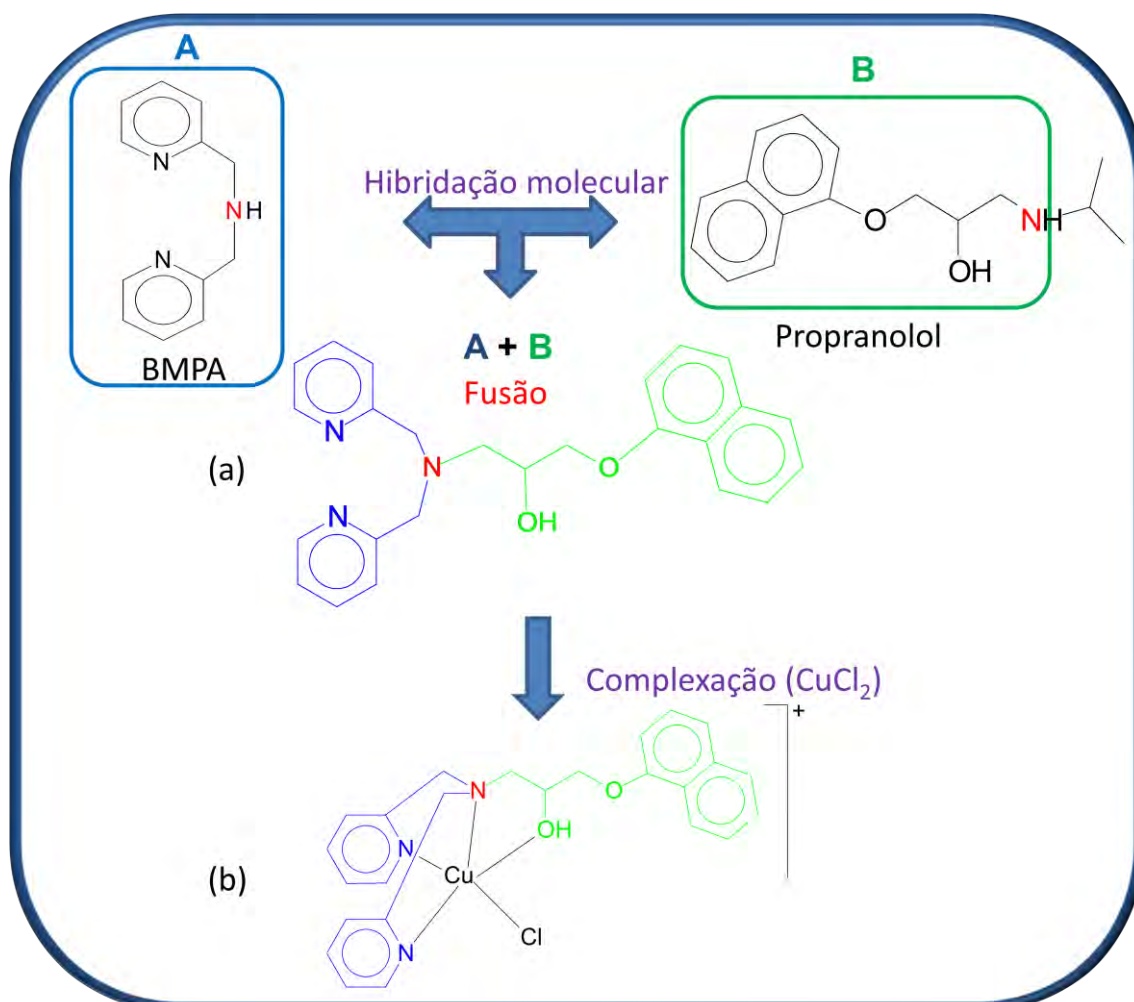


Figura 21. Composto orgânico (a) desenhado a partir do propranolol e composto de coordenação de cobre obtido a partir do ligante planejado (b).

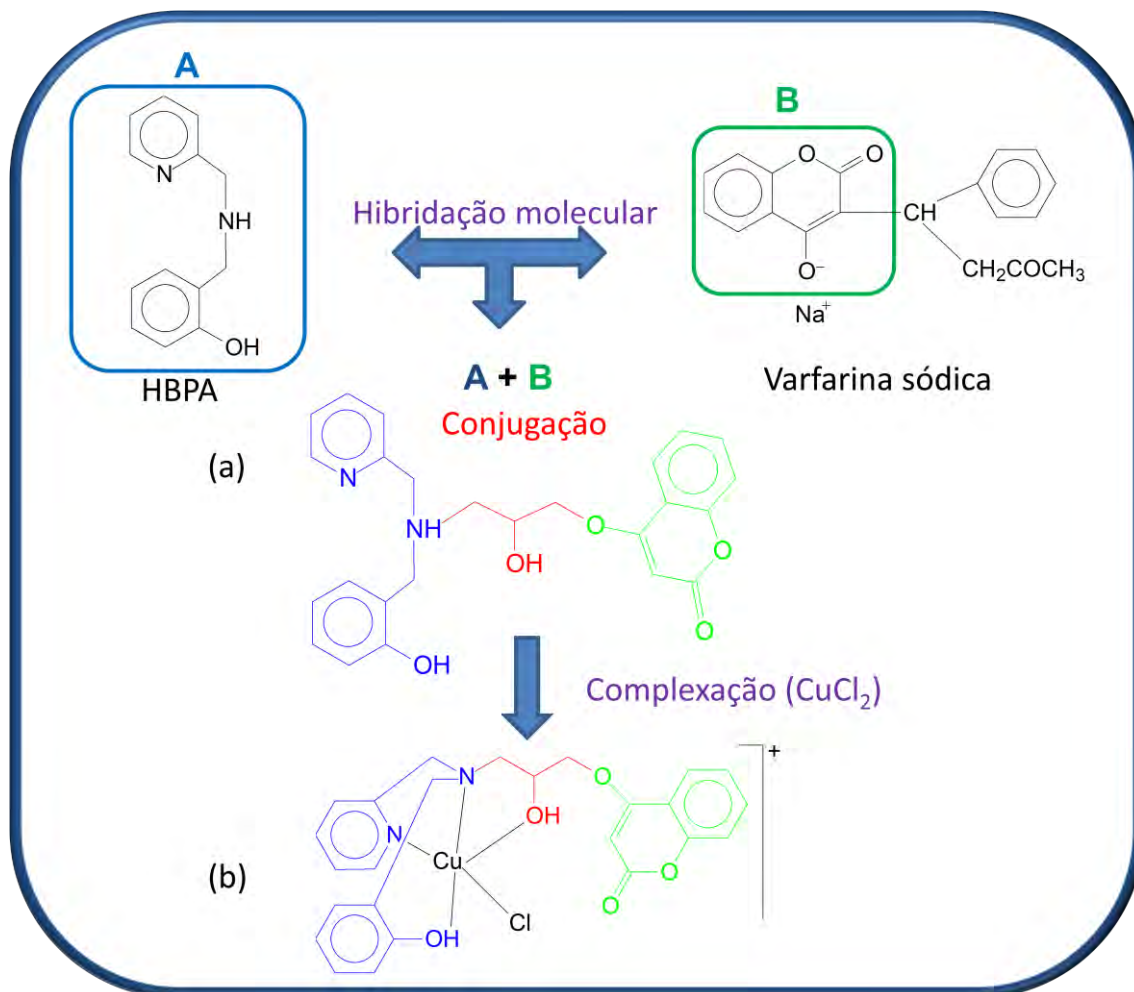


Figura 22. Composto orgânico (a) desenhado a partir da varfarina e composto de coordenação de cobre obtido a partir do ligante planejado (b).

OBJETIVOS

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antineoplásica de compostos orgânicos e de seus respectivos compostos de coordenação de cobre, contendo os grupos naftol e cumarina em suas estruturas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar por técnicas espectroscópicas (Infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C) os novos ligantes polidentados obtidos;
- Sintetizar compostos de coordenação de cobre empregando-se os ligantes propostos;
- Caracterizar os compostos de coordenação de cobre, quando possível, empregando-se as técnicas de análise elementar (C, H, e N), medidas de condutividade, determinação do ponto de fusão, espectroscopia eletrônica e de infravermelho, voltametria cíclica e espectrometria de Massas com Ionização por *electrospray* (ESI-MS e ESI-MS/MS);
- Investigar a citotoxicidade “*in vitro*” dos compostos sintetizados frente às linhagens humanas de células leucêmicas U937 e THP-1, através do método do MTT;
- Investigar o mecanismo de morte celular pelas técnicas de microscopia de fluorescência e de avaliação do ciclo celular e do potencial mitocondrial de membrana por citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito dos grupos substituintes como também da isomeria sobre a atividade biológica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As sínteses dos ligantes e dos complexos foram realizadas utilizando-se solventes de grau PA adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Acros, Vetec, Synth e Merck) sem prévia purificação. As reações orgânicas foram acompanhadas por análise cromatográfica em camada delgada (TLC) (sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck) utilizando-se solvente adequado. As reações foram realizadas sob agitação magnética e para aquelas que necessitaram de aquecimento, foram utilizadas placas de agitação com aquecimento marca Fisatom ou Fisher e termômetro para o controle da temperatura do banho. Quando necessário, as reações orgânicas foram concentradas no evaporador rotatório marca Fisatom.

3.1.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram registrados em um espectrômetro Jeol modelo eclipse+ 400 (Laboratório de Ciências Químicas - UENF), operando a 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C, utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente. Como padrão interno para ¹H empregou-se tetrametilsilano (TMS).

3.1.2. Espectroscopia de infravermelho

As análises de infravermelho dos compostos sintetizados foram realizadas utilizando-se um espectrômetro de infravermelho Shimadzu FT-IR 8300 (Laboratório de Ciências Químicas - UENF). As amostras sólidas foram analisadas em pastilha de KBr, já as amostras oleosas foram analisadas na forma de filme sobre pastilhas de KBr, utilizando diclorometano como solvente. A região do espectro analisada foi de 400 a 4000 cm⁻¹.

3.1.3. Difração de raios X

Os dados foram coletados em um difratômetro *Enraf-Nonius Kappa-CCD* a temperatura ambiente pelo Prof. Lorenzo C. Viscentin, no LRX da UFF. Para a resolução e refinamento das estruturas cristalinas foram utilizados os programas SIR97 e SHELXL97.

3.1.4. Análise elementar

As determinações das porcentagens do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas em um analisador elementar Thermo Scientific, modelo FLASH 2000 CHNS/O Analyzer, no LCQUI-UENF.

3.1.5. Condutimetria

As medidas de condutividade foram realizadas em um condutivímetro de bancada microprocessado Biocristal modelo PHN. Os compostos foram analisados a 25 °C na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$, utilizando-se metanol grau espectroscópico como solvente. O condutivímetro foi previamente calibrado com uma solução padrão de KCl ($1412 \mu\text{S.cm}^{-1}$ a 25 °C). As medidas foram realizadas no LCQUI-UENF.

3.1.6. Espectroscopia eletrônica

Os espectros eletrônicos (200-1100 nm) foram obtidos em um espectrofotômetro de UV-Vis Varian, modelo Cary 50 Bio. As leituras foram realizadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm, utilizando-se metanol grau espectroscópico. Os espectros foram obtidos no LCQUI-UENF.

3.1.7. Voltametria Cíclica

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos empregando-se um potenciostato/galvanostato da Auto Lab, modelo PGSTAT 10-Eco Chemie no LCQUI-UENF. Os experimentos foram realizados sob atmosfera de argônio, utilizando-se a seguinte configuração de eletrodos:

- Eletrodo de trabalho: carbono vítreo;
- Eletrodo auxiliar: platina;
- Eletrodo de referência: Prata/Cloreto de prata (Ag-AgCl).

3.1.8. Espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS)

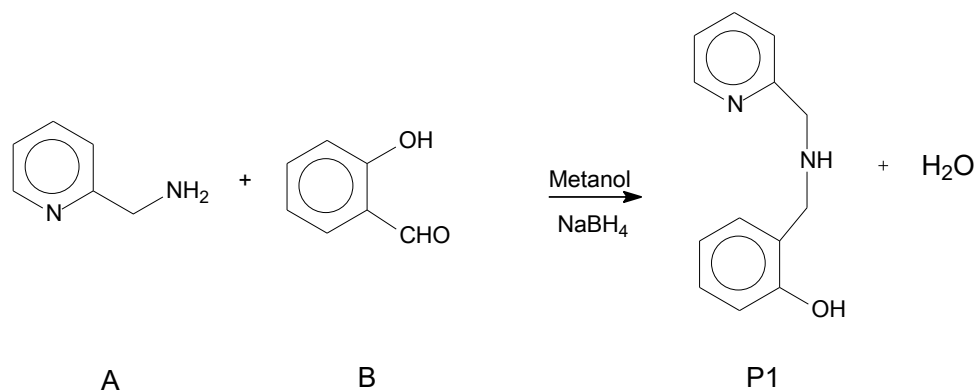
Os espectros de massas foram obtidos pela Professora Christiane Fernandes empregando-se um espectrômetro de massas Q-TOF (Micromass, Manchester, UK) do Departamento de Química da Texas A&M University (Estados Unidos). A técnica de ionização utilizada foi a de ionização por *electrospray* em modo positivo (ESI(+)-MS). Condições empregadas: temperatura da fonte: 80°C, temperatura de dessolvação: 80°C, voltagem: 40V, sendo os compostos de coordenação analisados em metanol/água (1:1).

3.2. SÍNTESES

3.2.1. Síntese dos compostos orgânicos

3.2.1.1. Síntese do (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1)

O precursor P₁ (Esquema 1) foi sintetizado a partir da reação de condensação entre 2-(aminometil)piridina (3,0 mL; 28,5 mmol; A) e salicilaldeído (3,0 mL; 28,5 mmol; B), em 40 mL de metanol, utilizando-se a rota sintética previamente descrita na literatura (NEVES *et al.*, 1993). Rendimento: 5,0 g (83%).

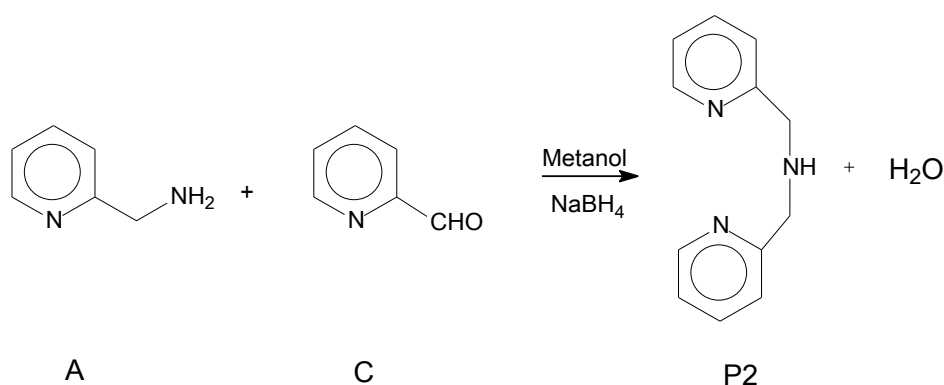


Esquema 1. Rota sintética do precursor P1 (NEVES *et al.*, 1993).

3.2.1.2. Síntese do bis-(2-piridilmetil)amina (P2)

A síntese do precursor P2 (Esquema 2) foi realizada através de modificações da rota sintética descrita por Neves *et al.*, 1995. Em um balão de fundo redondo de 250 mL foi adicionado 100 mL de metanol, 5,5 mL de 2-(aminometil)piridina (52,3 mmol; A) e 5,5 mL de 2-carboxipiridilaldeído (52,3 mmol; C). Após 1 hora de reação foi adicionado, paulatinamente, quantidade equimolar de borohidreto de sódio (2,0 g; 52,3 mmol), sob banho de gelo. Após 24 horas de reação o pH da solução foi ajustado para 2 com HCl concentrado, sob banho de gelo. A solução tornou-se alaranjada e verificou-se a formação de um precipitado branco (NaCl). A reação foi mantida sob agitação magnética por 24 horas e em seguida foi concentrada no evaporador rotatório a 50°C. O

óleo obtido foi solubilizado em água destilada e extraído sucessivamente com diclorometano, até que a fase orgânica se apresentasse incolor, sendo esta descartada. O pH da fase aquosa foi ajustado para 10 com adições lentas de Na_2CO_3 sob agitação vigorosa. A fase aquosa foi novamente submetida à extrações com diclorometano, até que a fase orgânica se apresentasse incolor. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 anidro, filtrada e concentrada no evaporador rotatório a 50°C , obtendo-se um óleo castanho-avermelhado. A análise por cromatografia de camada delgada, utilizando-se metanol como eluente, revelou a presença de um único produto. Rendimento: 8,33g (80%).

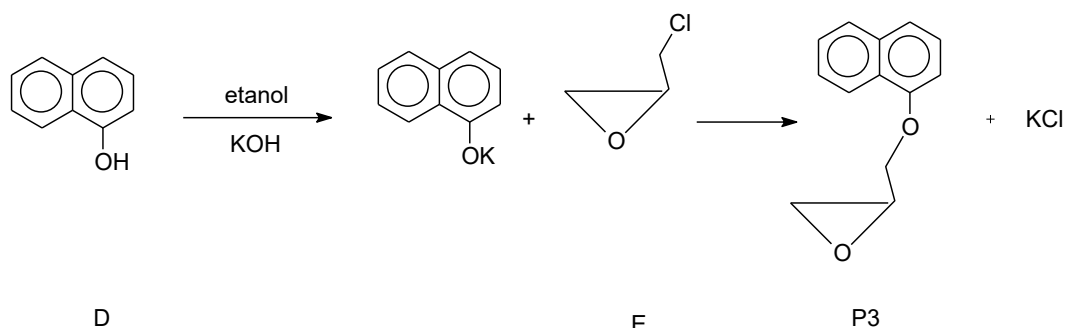


Esquema 2. Rota sintética do precursor P2 (NEVES et al., 1995).

3.2.1.3. Síntese do 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3)

O precursor P3 (Esquema 3) foi sintetizado segundo Corrêa (2006). Em um balão de fundo redondo de 500 mL foi adicionado 200 mL de álcool etílico, 10,0g de α -naftol (0,07 mol; D) e 4,0 g de KOH. Após 10 minutos sob agitação magnética à temperatura ambiente, foi adicionado lentamente 33,6 mL de 1-cloro-2,3-epóxiopropano (E). A solução foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 48h e a reação foi acompanhada por TLC, empregando hexano e acetato de etila como eluentes na proporção de 9:1. A seguir, a solução foi concentrada no evaporador rotatório à 50°C , dissolvida em 30 mL de água, transferida para um funil de separação e extraída 4 vezes com 20 mL de éter etílico gelado. Em seguida, a fase etérea foi seca com sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada. A solução foi concentrada no evaporador

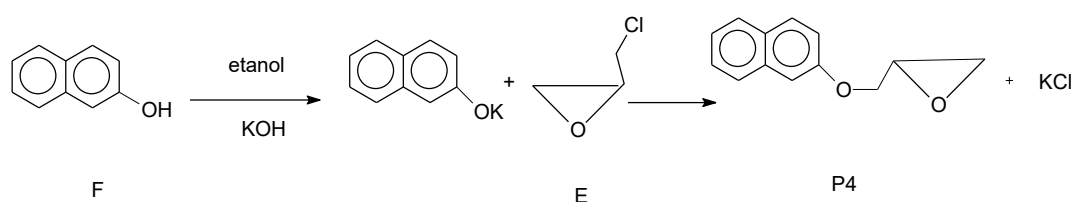
rotatório à 50°C, sendo obtido um óleo castanho-avermelhado. Rendimento: 7,0g (49,73%).



Esquema 3. Rota sintética do precursor P3.

3.2.1.4. Síntese do 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4)

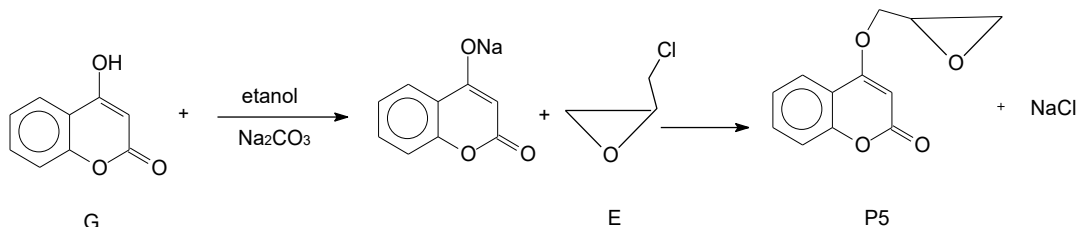
A rota sintética do precursor P4 (Esquema 4) foi realizada a partir da reação do β -naftol (F) com 1-cloro-2,3-epóxiopropano (E), em meio básico, segundo Corrêa (2006), descrito no item 3.2.1.3. A solução foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 24h e a reação foi acompanhada por TLC, empregando-se hexano e acetato de etila como eluentes na proporção de 9:1. O óleo obtido solidificou após 3 dias em repouso. O produto foi recristalizado em hexano a quente originando um sólido branco. Rendimento: 7,32g (52%).



Esquema 4. Rota sintética do precursor P4.

3.2.1.5. Síntese do 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2-ona (P5)

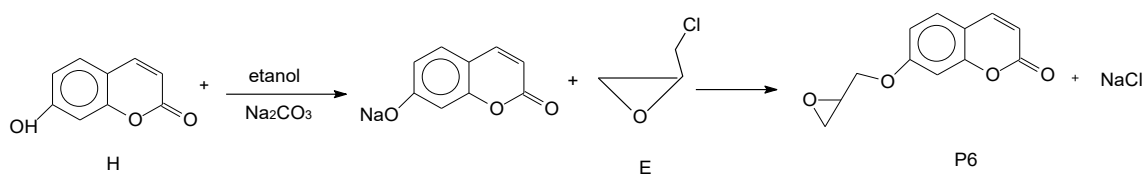
A síntese do precursor P5 (Esquema 5) foi realizada através de modificações da rota sintética descrita por Corrêa (2006). Em um balão de fundo redondo de 500 mL foram adicionados 250 mL de álcool etílico, 10,0g de 4-hidroxi-2H-cromen-2-ona (0,062 mol; G) e 6,55 g de Na_2CO_3 (0,062mol). Após 2 horas sob agitação magnética foi adicionado lentamente 33,6mL de epícloridrina (0,430mol; E). A solução foi mantida sob agitação magnética à 60°C por 4 dias e a reação foi acompanhada por TLC empregando-se hexano e acetato de etila como eluentes na proporção de 2:8. Em seguida a solução foi concentrada no evaporador rotatório à 50°C, dissolvida em 30 mL de água, transferida para um funil de separação e extraída 6 vezes com porções de 20 mL de clorofórmio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada no evaporador rotatório à 50°C. Foi obtido um óleo transparente que solidificou em 3 dias. O sólido bege claro obtido foi lavado com éter etílico gelado e mantido em dessecador. Rendimento: 7,65g (56%).



Esquema 5. Rota sintética do precursor P5.

3.2.1.6. Síntese do 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2-ona (P6)

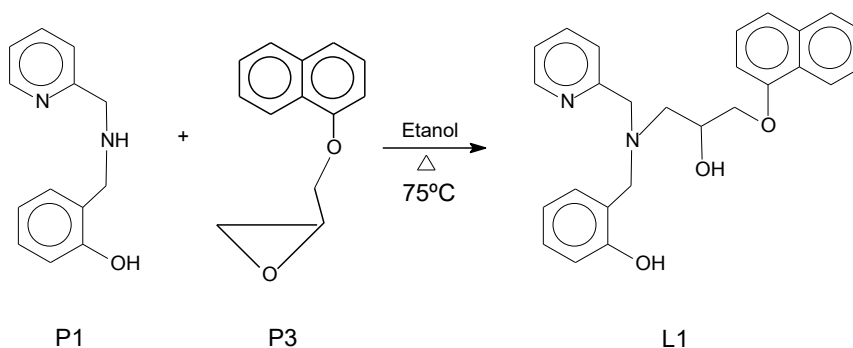
A síntese do precursor P6 (Esquema 6) foi realizada a partir da reação entre a 4-hidroxi-2H-cromen-2-ona (H) e epícloridrina (E), em meio básico, conforme modificações na rota sintética descrita por Corrêa (2006), previamente descrita no item 3.2.1.5. A reação foi acompanhada por TLC empregando-se acetato de etila e álcool metílico como eluentes na proporção de 9:1. Foi obtido um óleo transparente que após 3 dias originou um sólido bege, o qual foi lavado com éter etílico gelado e mantido em dessecador. Rendimento: 7,65g (56%).



Esquema 6. Rota sintética do precursor P6.

3.2.1.7. Síntese do 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L1)

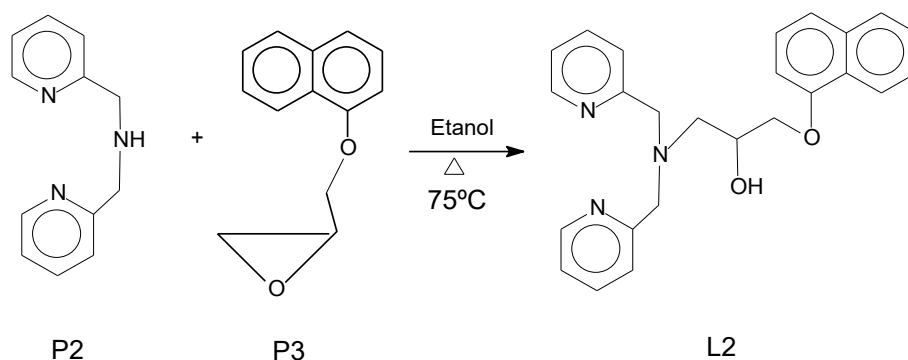
O composto L1 foi sintetizado conforme a rota sintética mostrada no Esquema 7. Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 100 mL de etanol foram adicionados 5g (0,025 mol) do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3) e 5,35g (0,025 mol) do precursor (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1). A solução foi mantida sob agitação magnética a 75°C por 5 dias e a reação foi acompanhada por TLC empregando-se hexano e acetato de etila como eluentes na proporção de 6:4. Em seguida, concentrou-se a solução no evaporador rotatório à 50° C obtendo-se um óleo castanho-escuro. Este foi dissolvido em clorofórmio e sucessivas extrações foram realizadas empregando-se solução “brine” (solução aquosa saturada de cloreto de sódio com uma pequena quantidade de bicarbonato de sódio). À fase orgânica adicionou-se MgSO₄ anidro e após 20 minutos a mesma foi filtrada e concentrada no evaporador rotatório a 50° C até a secura. Obteve-se um óleo castanho-avermelhado. Rendimento: 7,0g (67%).



Esquema 7. Rota sintética do composto L1.

3.2.1.8. Síntese do 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L2)

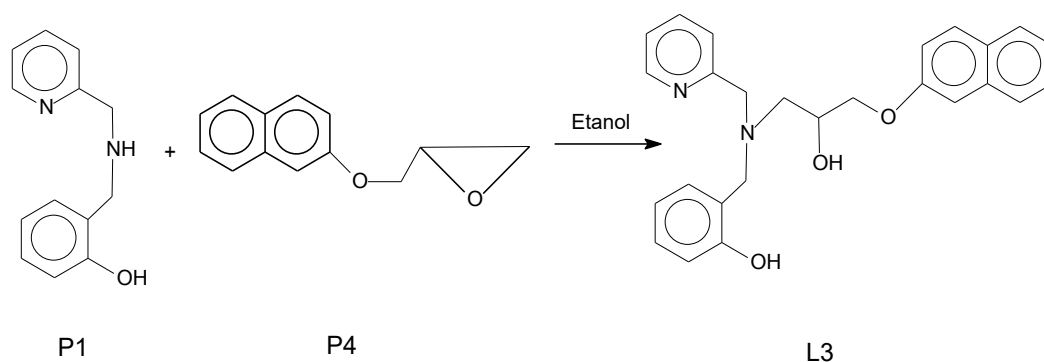
O composto L2 foi sintetizado segundo a rota sintética mostrada no Esquema 8. Em um balão de fundo redondo de 250 mL, contendo 100mL de etanol, foram adicionados 5g (0,025 mol) do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3) e 4,98g (0,025 mol) do precursor bis-(2-piridilmetil)amina (P2). A solução foi mantida sob agitação magnética a 75°C por 5 dias. A reação foi acompanhada por TLC, empregando-se acetato de etila e metanol como eluentes, na proporção de 8:2. Em seguida, concentrou-se a solução no evaporador rotatório à 50° C, obtendo-se um óleo castanho-escuro. Esse foi dissolvido em clorofórmio e sucessivas extrações foram realizadas empregando-se solução “brine” (solução aquosa saturada de cloreto de sódio com uma pequena quantidade de bicarbonato de sódio). À fase orgânica adicionou-se MgSO₄ anidro e após 20 minutos a mesma foi filtrada e concentrada no evaporador rotatório a 50° C até a secura. Obteve-se um óleo castanho escuro. Rendimento: 7,1 g (71%).



Esquema 8. Rota sintética do composto L2.

3.2.1.9. Síntese do 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3)

O composto L3 foi sintetizado conforme a rota sintética mostrada no Esquema 9. Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 130 mL de etanol foram adicionados 5,0g (0,025 mol) do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4) e 5,35g (0,025 mol) do precursor (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1). A solução foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente a (27°C) e a reação foi acompanhada por TLC, empregando-se acetato de etila e hexano como eluentes na proporção de 6:4. Após 24 horas ocorreu a precipitação de um sólido branco o qual foi filtrado a vácuo e recristalizado em etanol a quente. O composto cristalino obtido foi mantido em dessecador. Rendimento: 6,6 g (64%).

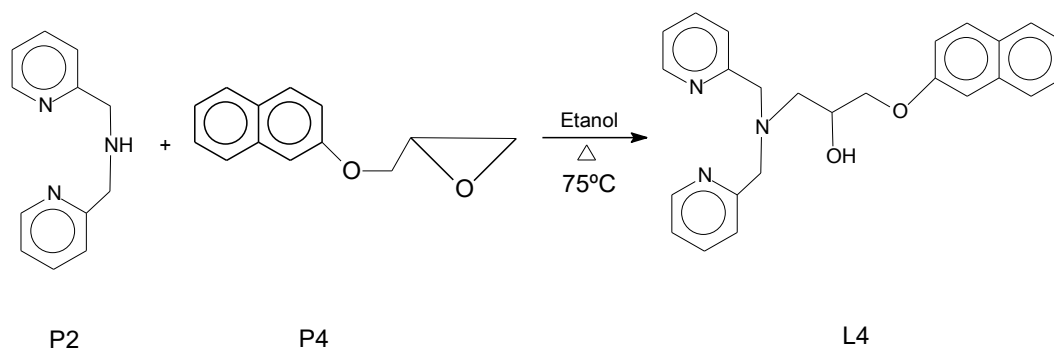


Esquema 9. Rota sintética do composto L3.

3.2.1.10. Síntese do 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4)

O composto L4 foi sintetizado conforme a rota sintética mostrada no Esquema 10. Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 130 mL de etanol foram adicionado 5g (0,025 mol) do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4) e 4,98g (0,025 mol) do precursor bis-(2-piridilmetil)amina (P2). A solução foi mantida sob agitação magnética a 75°C por 5 dias e a reação foi acompanhada por TLC, empregando etanol como eluente. Em seguida, concentrou-se a solução no evaporador rotatório à 50°C, obtendo-se um óleo, o qual foi

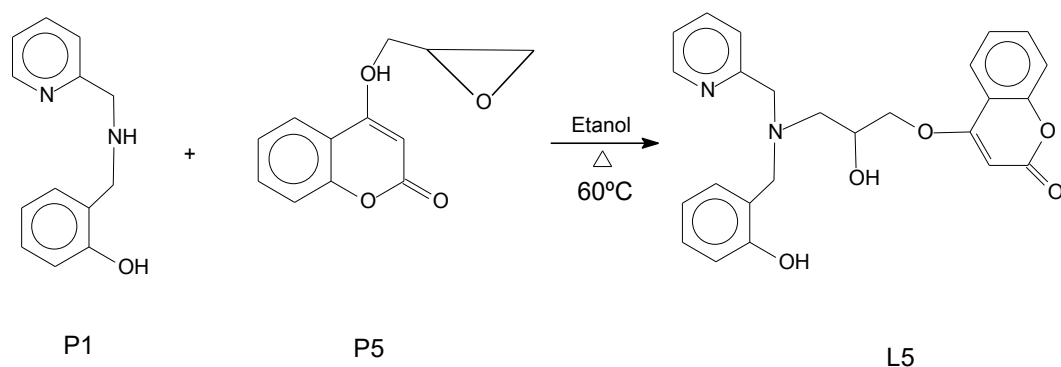
dissolvido em clorofórmio e submetido a sucessivas extrações empregando solução “brine” (solução aquosa saturada de cloreto de sódio com uma pequena quantidade de bicarbonato de sódio). À fase orgânica adicionou-se MgSO_4 anidro e após 20 minutos a mesma foi filtrada e concentrada no evaporador rotatório a 50°C . Obteve-se um óleo marrom escuro. Rendimento: 6,45g (65%).



Esquema 10. Rota sintética do composto L4.

3.2.1.11. Síntese do 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5)

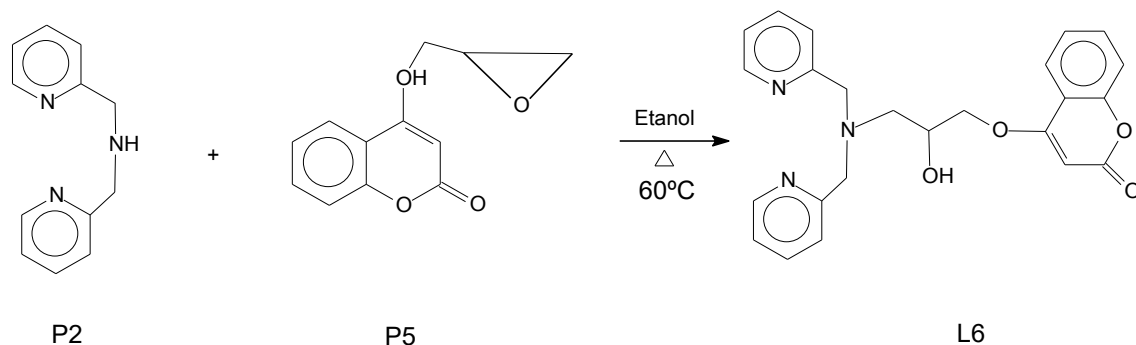
O composto L5 foi sintetizado segundo a rota sintética mostrada no Esquema 11. Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 100 mL de etanol foram adicionados 2,95 g (0,0137 mol) do precursor (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1) e 3g (0,0137 mol) do precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5). A solução foi mantida sob agitação magnética a 60°C por 5 dias e a reação foi acompanhada por TLC, empregando-se acetato de etila como eluente. Em seguida, concentrou-se a solução no evaporador rotatório à 50°C , obtendo-se um óleo, o qual foi dissolvido em clorofórmio e submetido a sucessivas extrações empregando solução “brine” (solução aquosa saturada de cloreto de sódio com uma pequena quantidade de bicarbonato de sódio). À fase orgânica adicionou-se MgSO_4 anidro e após 20 minutos a mesma foi filtrada e concentrada no evaporador rotatório a 50°C . Obteve-se um óleo castanho-avermelhado. Rendimento: 3,98g (67%).



Esquema 11. Rota sintética do composto L5.

3.2.1.12. Síntese do ligante 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxiopoxi]-2H-2-croman-2-ona (L6)

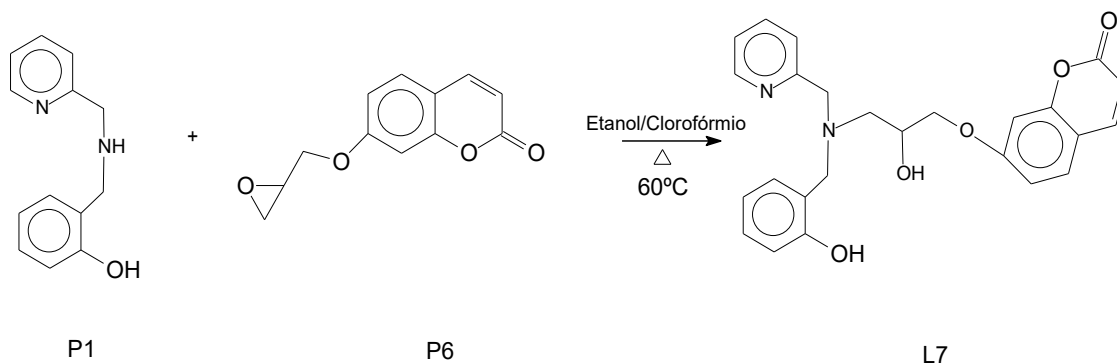
O composto L6 foi sintetizado conforme a rota sintética mostrada no Esquema 12. Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 100mL de etanol foram adicionados 2,742g (0,0137 mol) do precursor bis-(2-piridilmetil)amina (P2) e 3g (0,0137 mol) do precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5). A solução foi mantida sob agitação magnética a 60°C por 5 dias e a reação foi acompanhada por TLC, empregando acetato de etila e metanol como eluentes na proporção de 9:1. Em seguida, concentrou-se a solução no evaporador rotatório à 50° C, obtendo-se um óleo, o qual foi dissolvido em clorofórmio e submetido a sucessivas extrações empregando solução “brine” (solução aquosa saturada de cloreto de sódio com uma pequena quantidade de bicarbonato de sódio). À fase orgânica adicionou-se MgSO₄ anidro e após 20 minutos a mesma foi filtrada e concentrada no evaporador rotatório a 50°C. Obteve-se um óleo castanho escuro. Rendimento: 4,5 g (79%).



Esquema 12. Rota sintética do composto L6.

3.2.1.13. Síntese do 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7)

O composto L7 foi sintetizado conforme a rota sintética mostrada no Esquema 13. Em um balão de fundo redondo de 250 mL, contendo 100 mL de uma mistura de etanol e clorofórmio na proporção de 1:1, foram adicionados 3,76g (0,017 mol) do precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6) e 3,69 g (0,017 mol) do precursor (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1). A solução foi mantida sob agitação magnética a 60°C por 5 dias e a reação foi acompanhada por TLC, empregando-se acetato de etila e metanol como eluentes na proporção de 9:1. Em seguida, concentrou-se a solução no evaporador rotatório à 50° C, obtendo-se um óleo, o qual foi dissolvido em clorofórmio e submetido a sucessivas extrações empregando solução “brine” (solução aquosa saturada de cloreto de sódio com uma pequena quantidade de bicarbonato de sódio). À fase orgânica adicionou-se MgSO₄ anidro e após 20 minutos a mesma foi filtrada e concentrada no evaporador rotatório a 50°C obtendo-se um óleo castanho claro. Rendimento: 5,19g (88%).



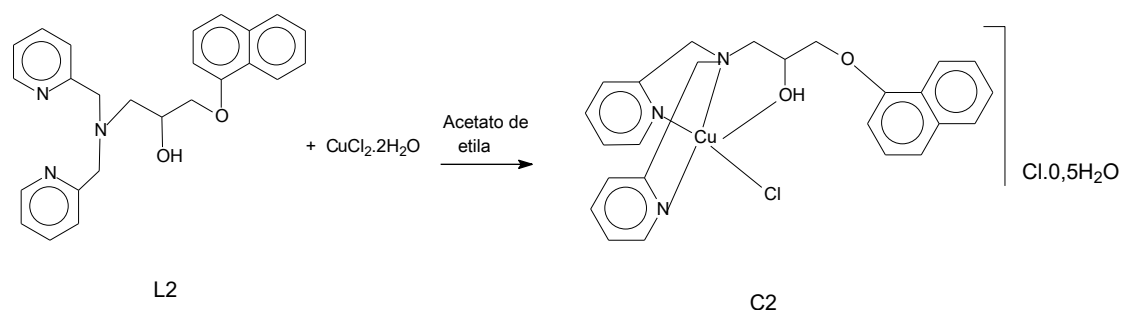
Esquema 13. Rota sintética do composto L7.

3.2.1.14. Síntese do Síntese do ligante 7-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxi-propoxi]}-2H-2-croman-2-ona (L8)

O composto L8 foi sintetizado conforme a rota sintética mostrada no Esquema 14. Em um balão de fundo redondo de 250 mL, contendo 100 mL de uma mistura de etanol e colorofórmio na proporção de 1:1, foram adicionados 3,76g (0,017 mol) do precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6) e 3,43g (0,017 mol) do precursor bis-(2-piridilmetil)amina (P2). A solução foi mantida sob agitação magnética a 60°C por 5 dias e a reação foi acompanhada por TLC empregando-se etanol como eluente. Em seguida, concentrou-se a solução no evaporador rotatório à 50°C, obtendo-se um óleo, o qual foi dissolvido em clorofórmio e submetido a sucessivas extrações empregando solução “brine” (solução aquosa saturada de cloreto de sódio com uma pequena quantidade de bicarbonato de sódio). À fase orgânica adicionou-se MgSO₄ anidro e após 20 minutos a mesma foi filtrada e concentrada no evaporador rotatório a 50°C. Obteve-se um óleo castanho. Rendimento: 4,90 g (86%).

3.2.2.2. Síntese do complexo [Cu(L2)Cl]Cl.0,5H₂O (C2)

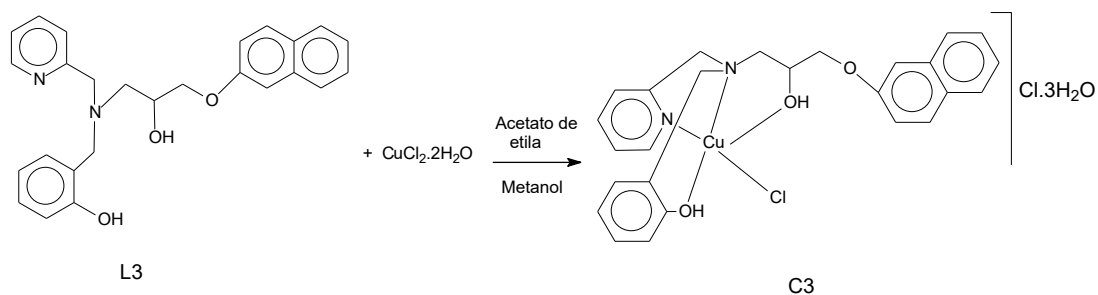
O complexo C2 foi obtido (Esquema 16) a partir da reação de uma solução de acetato de etila (10 mL) contendo 0,398g (1,0 mmol) do pró-ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L2) com uma solução de acetato de etila (1,5mL) contendo 0,1705g (1,0 mmol) de CuCl₂.2H₂O. A solução, de coloração azul, foi mantida em repouso à temperatura ambiente e após quatro dias foi obtido um sólido microcristalino azul. Rendimento: 0,339 g (62%). Ponto de fusão: 197°C.



Esquema 16. Rota sintética para obtenção do complexo C2.

3.2.2.3. Síntese do complexo [Cu(L3)Cl]Cl. 3H₂O (C3)

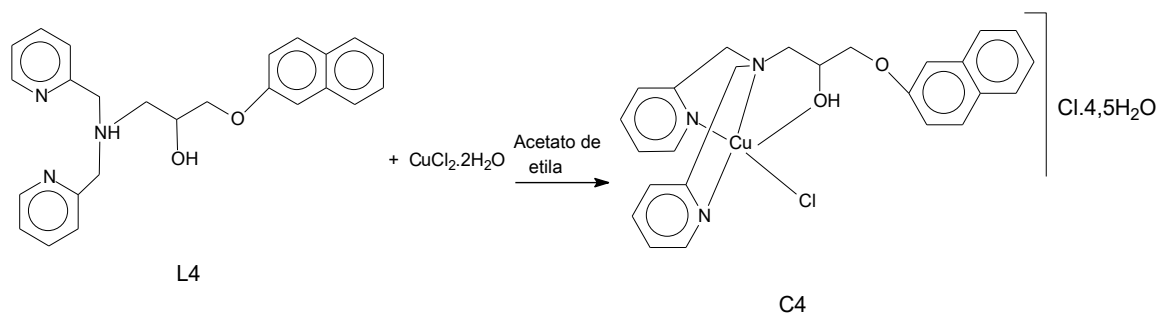
Para a obtenção do complexo C3 (Esquema 17) reagiu-se 10,0mL de uma solução de acetato de etila e metanol (3:2) contendo 0,414g (1,0 mmol) do pró-ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3) e uma solução metanólica (1,5mL) contendo 0,1705g (1,0 mmol) de CuCl₂.2H₂O. A solução de coloração verde foi mantida em repouso à temperatura ambiente e após um dia foi obtido um sólido microcristalino verde. Rendimento: 0,583 g (97%). Ponto de fusão: 105°C.



Esquema 17. Rota sintética para obtenção do complexo C3.

3.2.2.4. Síntese do complexo [Cu(L4)Cl]Cl·2H₂O (C4)

O complexo C4 foi obtido (Esquema 18) a partir da reação de uma solução de acetato de etila (10,0mL) contendo 0,398g (1,0 mmol) do pró-ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4) e 0,1705g (1,0 mmol) de CuCl₂·2H₂O. A solução, de coloração verde, foi mantida em repouso à temperatura ambiente e após quatro dias foi obtido um sólido microcristalino verde-escuro. Rendimento: 0,255 g (45%). Ponto de fusão: 136°C.

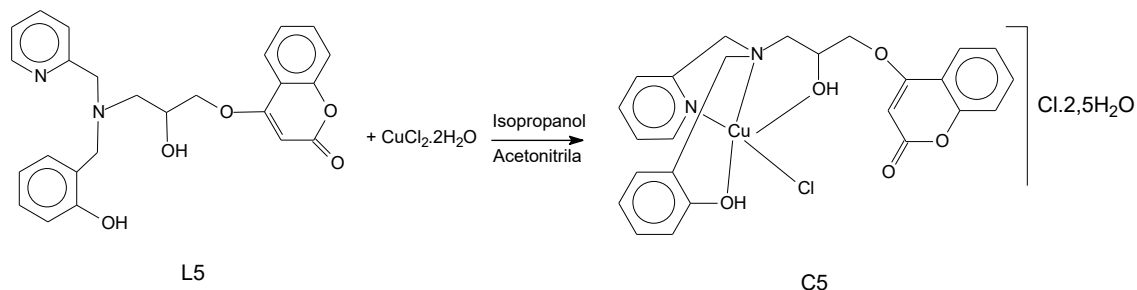


Esquema 18. Rota sintética para obtenção do complexo C4.

3.2.2.5. Síntese do complexo [Cu(L5)Cl]Cl·2,5H₂O (C5)

O complexo C5 foi obtido (Esquema 19) a partir da reação de 10 mL de uma solução de isopropanol e acetonitrila (1:1) contendo 0,432g (1,0 mmol) do pró-ligante 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5) e 0,1705g (1,0 mmol) de CuCl₂·2H₂O. A solução, de

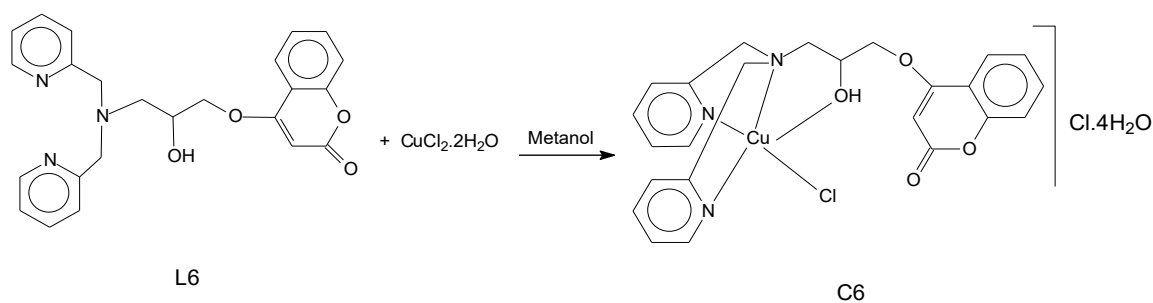
coloração verde, foi mantida em repouso à temperatura ambiente e após sete dias foi obtido um sólido microcristalino verde-escuro. Rendimento: 0,348 g (57%). Ponto de fusão: 128°C.



Esquema 19. Rota sintética para obtenção do complexo C5.

3.2.2.6. Síntese do complexo [Cu(L6)Cl]Cl·4H₂O (C6)

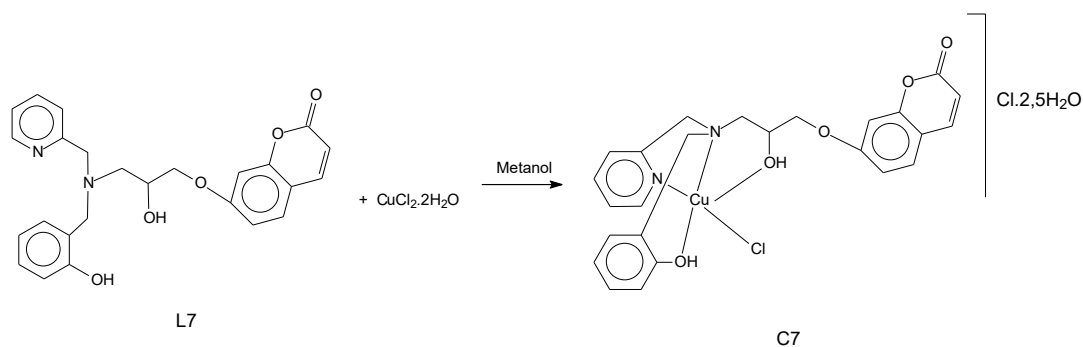
Para a obtenção do complexo C6 (Esquema 20) reagiu-se uma solução metanólica (10,0mL) contendo 0,414g (1,0 mmol) do pró-ligante 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino]-2-hidroxiopropoxi}-2H-2-croman-2-ona (L6) com uma solução metanólica (2mL) contendo 0,1705g (1,0 mmol) de CuCl₂·2H₂O. A solução, de coloração verde, foi mantida em repouso à temperatura ambiente e após quatro dias foi obtido um sólido microcristalino verde. Rendimento: 0,298 g (48%). Ponto de fusão: 219°C.



Esquema 20. Rota sintética para obtenção do complexo C6.

3.2.2.7. Síntese do complexo [Cu(L7)Cl] Cl. 2,5H₂O (C7)

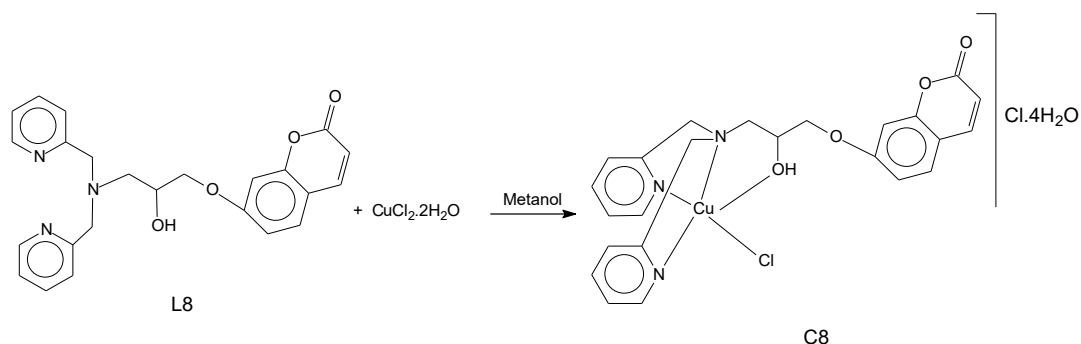
O complexo C7 foi obtido (Esquema 21) a partir da reação de uma solução metanólica (10,0mL) contendo 0,432g (1,0 mmol) do pró-ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7) com uma solução metanólica (2,0mL) contendo 0,1705g (1,0 mmol) de CuCl₂·2H₂O. A solução, de coloração verde, foi mantida em repouso à temperatura ambiente e após três dias foi obtido um sólido microcristalino verde. Rendimento: 0,357 g (56%). Ponto de fusão: 119°C.



Esquema 21. Rota sintética para obtenção do complexo C7.

3.2.2.8. Síntese do complexo [Cu(L8)Cl] Cl. 4H₂O (C8)

Para a obtenção do complexo C8 (Esquema 22) reagiu-se uma solução metanólica (10,0mL) contendo 0,414g (1,0 mmol) do pró-ligante 7-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxi]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L8) com uma solução metanólica (2,0mL) contendo 0,1705g (1,0 mmol) de CuCl₂·2H₂O. A solução, de coloração verde, foi mantida em repouso à temperatura ambiente e após quatro dias foi obtido um sólido microcristalino verde-escuro. Rendimento: 0,285 g (45%). Ponto de fusão: 211°C.



Esquema 22. Rota sintética do complexo C8.

3.3. TESTES BIOLÓGICOS

3.3.1 Diluição e armazenamento dos compostos orgânicos e de coordenação

Para a realização dos teste biológicos foram preparadas soluções estoque dos compostos sintetizados (orgânicos e inorgânicos) e do sal utilizado nas reações inorgânicas (CuCl₂) empregando-se DMSO (dimetilsulfóxido) como solvente. As soluções mantiveram-se estáveis armazenadas na geladeira a 8°C.

3.3.2. Cultura das células

3.3.2.1. Cultura das linhagens de células neoplásicas

Células de linfoma histiocítico (U937) e de leucemia monocítica aguda (THP-1), adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC), foram cultivadas em meio D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20mg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As células foram cultivadas em garrafas de cultura (40mL) e mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) com temperatura e pressão de CO₂ controlados (37°C e 5% de CO₂). O meio de cultura foi renovado a cada dois dias. As duas linhagens foram utilizadas para a realização dos testes de viabilidade celular,

microscopia de fluorescência (apoptose), avaliação do ciclo celular (SUB-G1) e do potencial de membrana mitocondrial (JC-1).

3.3.2.2. Cultura das linhagens de células normais do sangue periférico (PBMC)

As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram obtidas do sangue de voluntários saudáveis quanto a neoplasias sanguíneas. O sangue venoso foi coletado pelo sistema de tubos "Vacutainer™" (*Becton Dickinson*) contendo heparina sódica e processado pela metodologia descrita por Bennett & Breit (1994). O sangue total coletado foi lentamente adicionado sobre o Ficoll-Paque™ Plus (1,08g/mL), na proporção de 2:1 (20mL de sangue para 10mL de Ficoll), em tubos falcon de 50 mL, e centrifugado (Centrifuga Sorval, RT7) à 1500rpm por 40min, a 20°C. O plasma, que compõe a primeira camada do gradiente obtido, foi descartado e o anel de células mononucleares foi removido, lavado três vezes com meio de cultura (DMEM/F12) gelado e centrifugado a 1500rpm por 10min a 4°C. Após o processo de lavagem o "pellet" formado foi ressuspensionado em DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 20ug/mL de gentamicina e 0,25ug/mL de enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB) (Sigma, S0812). As células foram mantidas em garrafas de cultura e em estufa (37°C e 5% de CO₂) por duas horas para aderência dos monócitos. Após este período as células mononucleares do sangue periféricos humano (PBMC), presentes no sobrenadante, foram recolhidas e utilizadas para realização dos teste de viabilidade celular por metabolização do MTT.

3.3.3. Padronização da concentração da cultura celular

As células neoplásicas (U937 e THP-1) e normais (PBMC) foram coradas com azul de Tripán 0,2% (Sigma, T6146) para a realização da contagem do número de células em câmara de Neubauer e avaliação da viabilidade celular. Todos

os ensaios biológicos foram realizados com células neoplásicas e normais na concentração de 1×10^6 células/mL.

3.3.4. Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio)

O teste de viabilidade celular pelo ensaio de metabolização do MTT (Sigma, M2128) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983), que consiste na redução do MTT a formazan, composto de cor púrpura, pela succinato desidrogenase mitocondrial (Esquema 23).



Esquema 23. Representação da redução do MTT a formazan pela succinato desidrogenase mitocondrial.

A diluição dos compostos foi realizada em meio D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 20mg/mL de gentamicina (Gibco, BRL), sendo a preparação deste experimento mostrado no Esquema 24. Células leucêmicas (U937 e THP-1) e normais (PBMC) na concentração de 1×10^6 células/mL foram plaqueadas em volume de 100 μ L/poço, em placas de 96 poços. Em seguida foi adicionado 100 μ L/poço de cada composto sintetizado nas concentrações de 10 μ M a 160 μ M e as células foram incubadas por 36 horas em estufa (37°C e 5% de CO₂). Após o período de incubação foi adicionado, em cada poço, 20 μ L de solução de MTT (5,0 mg/mL dissolvido em tampão fosfato salino pH 7,2 - PBS) seguido de incubação por 4 horas em estufa (37°C e 5% de CO₂). Após este período, foram retirados 150 μ L do

sobrenadante e os cristais formados foram homogeneizados com 100µL de uma solução de isopropanol (Merck) com 0,0014% de HCl concentrado. A placa de 96 poços foi avaliada em espectrofotômetro (MULTISKAN-EX) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. A cisplatina foi utilizada nas concentrações de 10µM, 20µM, 40µM e 80µM para fins comparativos e todos os testes foram realizados em triplicata. Poços onde foram adicionados 100µL de células e 100µL de meio de cultura foram utilizados como controle positivo (branco) e como controle negativo foi utilizado Triton X-100 10% em BPS. Os resultados de absorbância obtidos foram convertidos para porcentagem de células viáveis de acordo com a equação:

$$VC = ((DOT - MDOCN) \times 100) / (BRANCO - MDOCN)$$

Onde:

VC = Viabilidade Celular

DOT = Densidades Ópticas de Cada Teste

MDOCN = Média das Densidades Ópticas do Controle Negativo

BRANCO = Média das Densidades Ópticas do Controle Positivo

	L1			C1			L2			C2		
160 µM	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
80 µM	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
40 µM	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
20 µM	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10 µM	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Branco	○	○	○									
Sal-160 µM	●	●	●									
Triton 10%	●	●	●									

Esquema 24. Preparação do ensaio de viabilidade celular (MTT) empregando-se placa de 96 poços.

3.3.5. Avaliação do mecanismo de morte celular

3.3.5.1. Microscopia de fluorescência

Os compostos em estudo foram diluídos em meio D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 20mg/mL de gentamicina (Gibco, BRL). As concentrações testadas foram de 80 μ M e 160 μ M para todos os compostos, exceto o composto C1 o qual foi avaliado nas concentrações de 40 μ M e 80 μ M. Células leucêmicas (U937 e THP-1) na concentração de 1x10⁶ células/mL foram plaqueadas em volume de 100 μ L/poço, em placas de 96 poços. Em seguida foi adicionado 100 μ L/poço de cada composto em estudo e as células foram incubadas por 12, 24 e 36 horas em estufa (37°C e 5% de CO₂). Após o período de incubação uma alíquota de 20 μ L foi retirada de cada poço, transferida para lâmina de microscopia, corada com 10 μ L de solução de laranja de acridina (5 μ g/mL, Sigma, A6529) e brometo de etídio (10 μ g/mL, Sigma E8751) e recoberta com lamínula para serem analisadas quanto a morfologia no microscópio de fluorescência (Nikon Labophot). Foram contadas 300 células por lâmina em campos aleatórios, com diferenciação entre células normais, apoptóticas e necróticas de acordo com os parâmetros de Coligan *et al.* (1996). As células controle (branco) foram cultivadas apenas em meio de cultura D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20mg/mL de gentamicina (Gibco, BRL), não sofrendo assim qualquer estímulo de morte. O experimento foi realizado em duplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de células apoptóticas.

3.3.5.2. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1)

Os compostos estudados foram diluídos em meio D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 20mg/mL de gentamicina (Gibco, BRL). A concentração testada para todos os compostos foi de 160 μ M, exceto para os compostos C1 e C3, os quais foram avaliados nas

concentrações de 40 μ M e 80 μ M, respectivamente. Células leucêmicas (U937 e THP-1) na concentração de 1x10⁶ células/mL foram plaqueadas em volume de 1mL/poço em placas de 24 poços. Após adição de 1mL/poço de cada composto em estudo, as células foram incubadas por 36 horas em estufa (37°C e 5% de CO₂) e em seguida foram processadas segundo método descrito por Gong *et al.* (1994). As células controle foram incubadas apenas com meio D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20mg/mL de gentamicina (Gibco, BRL). Após o período de incubação o conteúdo de cada poço (2mL) foi transferido para eppendorf (2mL) e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. O “pellet” obtido foi lavado duas vezes com PBS e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. Depois de lavado, ao “pellet” foi adicionado lentamente 1mL de etanol 70% gelado e as células foram submetidas a fixação por 30 minutos a 4°C. Após o período de fixação as células foram sedimentadas por centrifugação a 1500rpm por 5min e o “pellet” formado foi lavado com tampão fosfato-citrato (0,2M, pH=7,8) e centrifugado por 5 minutos a 1500rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao “pellet” formado foi adicionado 50 μ L de RNase A (100 μ g/mL Sigma, R4875) e incubado a temperatura ambiente por 15min. A seguir, foi adicionado 400 μ L de iodeto de propídio (concentração final 50 μ g/mL; Sigma, P4170). As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur) onde foram contados 10.000 eventos por amostra. Os histogramas e as porcentagens de células em sub-G1 foram obtidos através do software WinMDI versão 2.9.

3.3.5.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (JC-1)

Os compostos em estudo foram diluídos em meio D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 20mg/mL de gentamicina (Gibco, BRL). A concentração testada para todos os compostos foi de 160 μ M, exceto para os compostos C1 e C3, os quais foram avaliados nas concentrações de 40 μ M e 80 μ M, respectivamente. Células leucêmicas (U937 e THP-1) na concentração de 1x10⁶ células/mL foram plaqueadas em volume

de 500 μL /poço, em placas de 24 poços. Em seguida foi adicionado 500 μL /poço de cada composto avaliado e as células foram incubadas por 36 horas em estufa (37°C e 5% de CO_2). Após o período de incubação o conteúdo de cada poço (1mL) foi transferido para eppendorf (2mL) e centrifugado por 5 minutos a 2062 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” incubado por 15 minutos em estufa (37°C e 5% de CO_2) com 500 μL de solução de JC-1 (25 μg /mL diluído 1:1000 em meio de cultura, Sigma). As células em suspensão foram centrifugadas por 5 minutos a 2062 rpm e lavadas duas vezes com 2mL de meio de cultura D-MEMF12 (Gibco, BRL). O sobrenadante foi descartado e o “pellet” obtido foi ressuspensionado em 500 μL de meio de cultura D-MEMF12 (Gibco, BRL) e a leitura foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo (FACS Calibur). Os gráficos de *Density plot* e a porcentagem de células com mitocôndrias normais e comprometidas foram obtidos através do software WinMDI versão 2.9.

3.3.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas para os testes de viabilidade e indução de apoptose utilizando o programa Graph Pad versão 4.0. Para ambos os experimentos foi utilizado o teste estatístico ANOVA. As diferenças significativas foram consideradas como $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

4.1.1. Caracterização das moléculas orgânicas

A caracterização dos precursores (P1, P2, P3, P4, P5 e P6) e dos compostos orgânicos inéditos (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 e L8) foi realizada por espectroscopias de infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , utilizando-se CDCl_3 como solvente e TMS como padrão interno. Para os ligantes L1, L2, L3 e L4 a atribuição dos espectros 1D foi realizada com o auxílio de experimentos bidimensionais. A atribuição dos átomos de carbono e hidrogênio foi realizada por meio de experimentos 2D como HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence/Coerência Heteronuclear Múltiplo-Quântica) que correlaciona hidrogênio e carbono diretamente ligados (J_1) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence/ Coerência Heteronuclear em Ligações Múltiplas) que detecta acoplamentos carbono-hidrogênio de longa distância (J_2 e J_3). Os demais ligantes foram analisados através de espectros 1D de RMN ^1H e RMN ^{13}C , obtidos no departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.1.1.1. Caracterização do (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1)

As análises dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e infravermelho mostraram que o precursor P1, que possui uma piridina e um fenol em sua estrutura, foi sintetizado com elevado teor de pureza, estando os dados de caracterização de acordo com os apresentados na literatura (NEVES et al., 1993).

Resultados de caracterizações: **IV (cm⁻¹):** 3263 (NH), 3045-3007 (CH aromático), 2947-2930 (CH₂ alifático), 1593, 1570, 1479, 1454 e 1430 (C=C e C=N), 756 cm⁻¹ (CH anel); **RMN ¹H:** 8,58 (1H, aromático), 7,65 (1H, aromático), 7,23-7,15 (3H, aromático), 6,97(1H, aromático), 6,86(1H, aromático), 6,77 (1H, aromático), 4,00 (2H, alifáticos), 3,83 (2H, alifáticos) e 2,60 ppm (0,2H, próton do NH); **RMN ¹³C:** 157,8, 153,2, 149,4, 136,6, 128,7, 128,5, 122,6, 122,5, 122,4, 119, 116,4, 53,1, 51,9 ppm (13 átomos de C).

4.1.1.2. Síntese do bis-(2-piridilmetil)amina (P2)

As análises dos espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C e infravermelho mostraram que o precursor P2, que possui duas piridinas em sua estrutura, foi sintetizado com elevado teor de pureza, estando os dados de caracterização de acordo com os apresentados na literatura (NEVES et al., 1995).

Resultados de caracterizações: **IV (cm⁻¹):** 3311 (NH), 3063-3011(CH aromático), 2920(CH₂ alifático), 2837 (CH₂ alifático), 1593, 1570, 1475, 1435 (C=C e C=N), 758 e 668 cm⁻¹ (CH anel); **RMN ¹H:** 8,48 (2H, aromático), 7,56 (2H, aromático), 7,28 (2H, aromático), 7,07(2H, aromático), 3,90 (4H, alifático) e 2,9 ppm (1,35H, NH); **RMN ¹³C:** 159,38, 149,08, 136,28, 122,12, 121,77, 54,50 (6 átomos de C).

4.1.1.3. Caracterização do 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3)

O espectro de infravermelho e as principais bandas observadas para o precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3) são apresentados na Figura 23 e Tabela 2, respectivamente.

Observou-se no espectro de infravermelho (Figura 23) bandas características de deformação axial de C-H_{aromático} (3055 e 3003 cm⁻¹), deformação angular no plano de C-H_{aromático} (δ1101 cm⁻¹) e de deformação axial de C=C (ν 1595,

1579, 1508, 1462 e 1396 cm^{-1}) do anel aromático. A presença do grupo metileno (CH_2) é confirmada pelo aparecimento das bandas de deformação axial assimétrica (ν_{as} 2926 cm^{-1}) e simétrica (ν_{s} 2874 cm^{-1}) de C-H de alifáticos. Verificou-se a presença de bandas de deformação angular fora do plano de $\text{C-H}_{\text{aromático}}$ (γ -CH) e de deformação angular do anel (β -anel) características de hidrocarboneto aromático polinuclear em 793 e 771 cm^{-1} . As bandas de deformação axial referentes a ligação C-O-C alifática e do epóxido foram observadas em 1271 cm^{-1} (ν_{as} C-O-C_{alifático}) e 1240 cm^{-1} (ν_{s} C-O-C_{epóxido}), respectivamente (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Assim, o espectro de infravermelho indica a presença dos principais grupos funcionais do precursor P3.

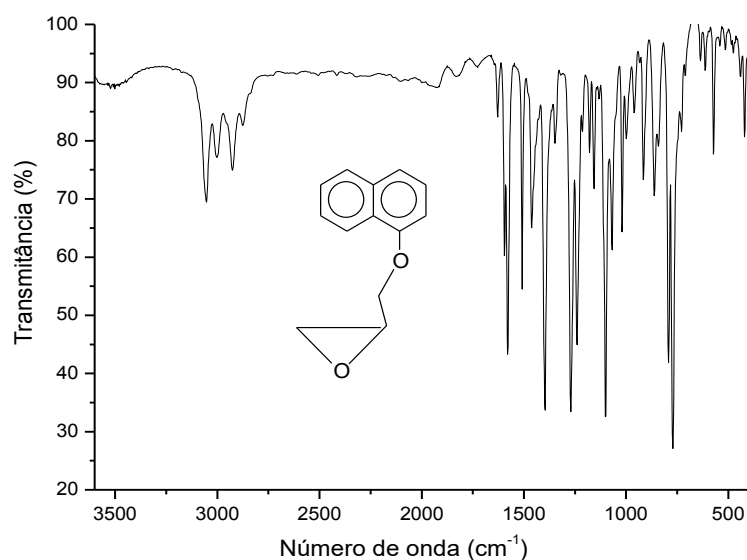


Figura 23. Espectro de infravermelho para o precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3), obtido em filme.

Tabela 2. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3055, 3003	ν $\text{CH}_{\text{aromático}}$	1271	ν_{as} C-O-C _{alifático}
2926	ν_{as} CH_2	1240	ν_{s} C-O-C _{epóxido}
2874	ν_{s} CH_2	1101	δ $\text{CH}_{\text{aromático}}$
1595, 1579, 1508, 1462, 1396	ν C=C	793, 771	γ -CH ^a ; β -anel ^b

a= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares; b= deformação do anel de aromáticos polinucleares.

O espectro de RMN ^1H está apresentado na Figura 24 e a Tabela 3 sumariza os resultados obtidos e as atribuições dos átomos de hidrogênio e carbono para o precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3). No espectro de RMN ^1H do precursor P3 são observados cinco sinais entre 2,84 e 4,39 ppm referentes aos átomos de hidrogênio alifático e do epóxido. Em 2,84 ppm ($\text{H}_{12\text{b}}$) e 2,96 ppm ($\text{H}_{12\text{a}}$) observam-se os sinais dos átomos de hidrogênio metilênicos H_{12} e em 3,47-3,51 ppm observa-se um multiplete referente ao átomo de hidrogênio H_{11} . Os sinais dos átomos de hidrogênio do grupo metilênico do éter alifático são observados em 4,14 ppm ($\text{H}_{10\text{b}}$) e 4,39 ppm ($\text{H}_{10\text{a}}$). Na região entre 6,83 ppm e 8,30 ppm verificam-se os sinais atribuídos aos átomos de hidrogênio aromáticos. O átomo de hidrogênio aromático H_2 (6,83 ppm) apresenta-se mais blindado em virtude de estar localizado na posição *orto* em relação ao substituinte do anel aromático (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

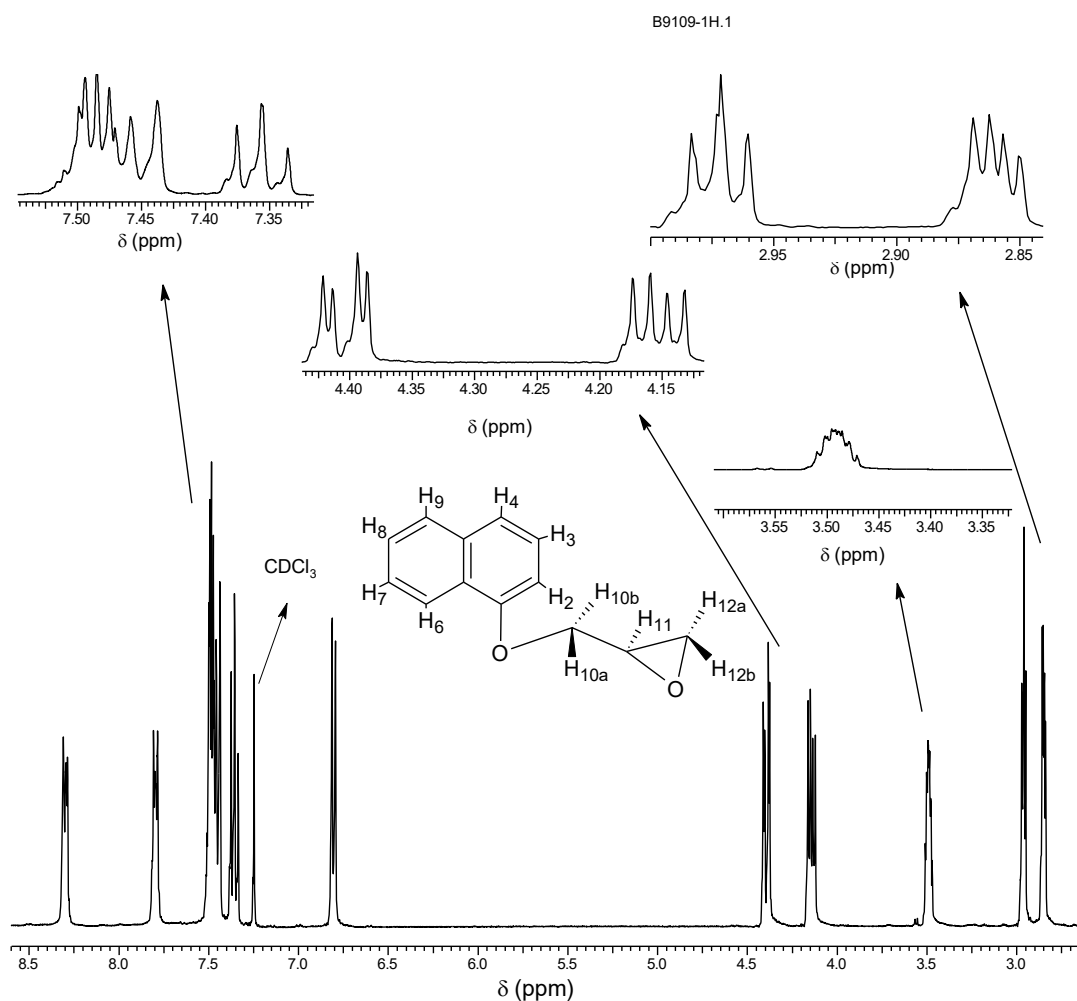


Figura 24. Espectro de RMN ^1H do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3), obtido em CDCl_3 .

O espectro de RMN ^{13}C do precursor P_3 (Figura 25) mostra treze sinais para treze átomos de carbono. Os átomos de carbono do epóxido apresentam deslocamento químico de 44,68 ppm (C_{12}) e 50,19 ppm (C_{11}) e o átomo de carbono alifático C_{10} apresenta deslocamento de 68,89 ppm. Os átomos de carbono aromáticos apresentam sinais entre 104,96 ppm e 153,17 ppm, sendo que o átomo de carbono secundário C_1 (153,17 ppm) apresenta-se mais desblindado em virtude de estar ligado ao átomo de oxigênio do éter alifático. As atribuições dos átomos de carbono, para o precursor P_3 , estão apresentadas na Tabela 3 (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

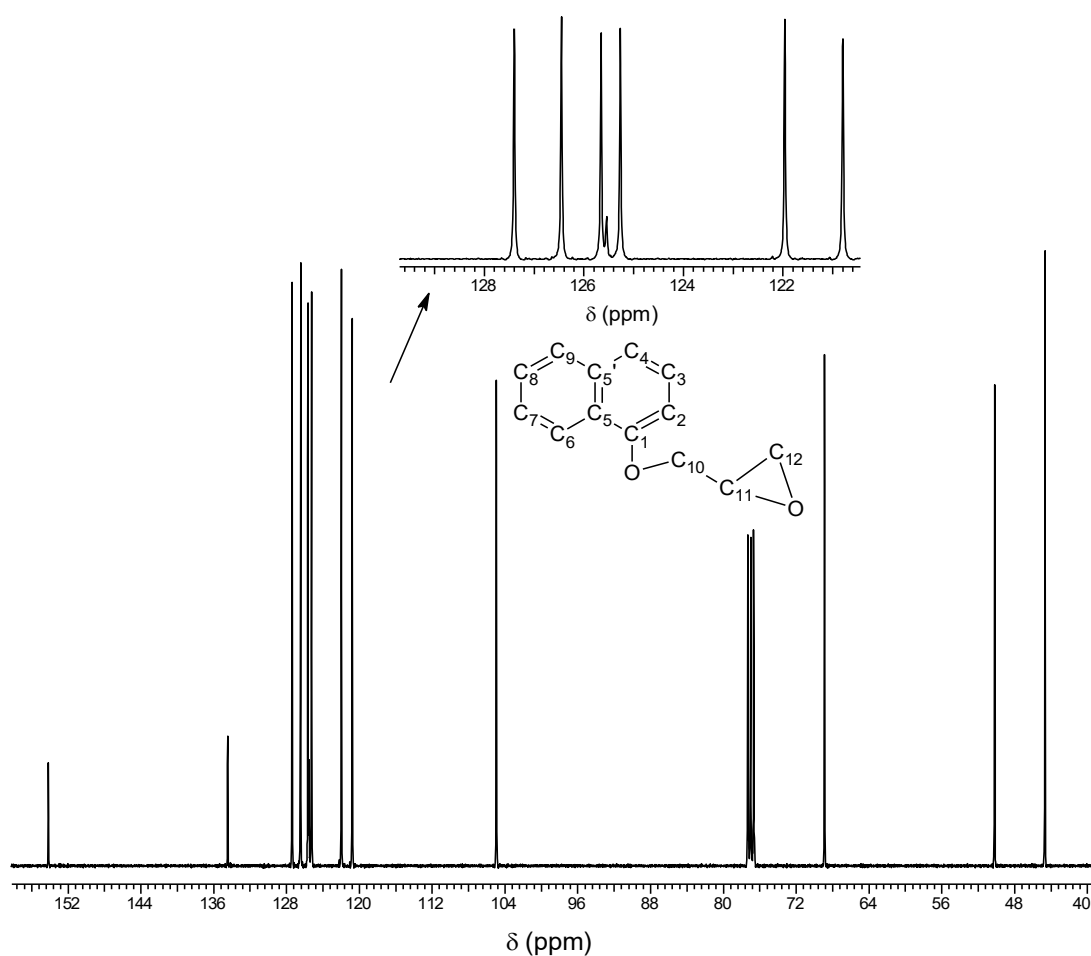


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P_3), obtido em CDCl_3 .

Tabela 3. Dados para os espectros de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e atribuições para o precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P3).

Atribuição	Carbono		Hidrogênios	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicidade; $J_{\text{observado}}$ (Hz)	Átomos de hidrogênio
C				
5'	125,54	-	-	-
5	134,48	-	-	-
1	153,17	-	-	-
CH				
11	50,19	3,47-3,51 (m)	-	1,00
2	104,96	6,83 (d)	$J_{2-3} = 7,68$	1,00
4	120,80	7,45 (d)	$J_{4-3} = 7,60$	1,00
6	121,97	8,29-8,31 (m)	-	1,00
3	125,27	7,36 (t)	$J_{3-4} = J_{3-2} = 8,00$	1,00
7	125,66	7,49 (m)	-	2,00
8	126,45	7,49 (m)	-	2,00
9	127,40	7,78-7,81 (m)	-	1,00
CH₂				
12	44,68	(a) 2,96 (t)	$J_{12a-12b} = 4,90$ $J_{12a-11} = 4,20$	1,00
		(b) 2,84 (dd)	$J_{12b-12a} = 5,12$; $J_{12b-11} = 2,56$	1,00
10	68,89	(a) 4,39 (dd)	$J_{10a-10b} = 11,00$ $J_{10a-11} = 2,92$	1,02
		(b) 4,14 (dd)	$J_{10b-10a} = 11,00$ $J_{10b-11} = 5,52$	1,00

d=dupleteo; dd=duplo dupleteo; m=multiplero; s=simpleto; t=tripleto.

4.1.1.4. Caracterização do composto 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4)

Os precursores P3 e P4 são isômeros de posição, onde estes precursores apresentam, respectivamente, o anel aromático "α" e "β" substituídos. Apesar de serem semelhantes estruturalmente, foram observadas variações nos valores de número de onda (espectroscopia de infravermelho) e de deslocamentos químicos (RMN ^1H e RMN ^{13}C), os quais confirmam a formação de um novo composto orgânico.

O espectro de infravermelho e as principais bandas observadas para o precursor P4 são apresentados na Figura 26 e Tabela 4, respectivamente. O espectro de infravermelho mostrou bandas de deformação axial de C-H_{aromático} (3057 e 3001 cm⁻¹), deformação angular no plano de C-H_{aromático} (δ 1217 e 1184 cm⁻¹) e de deformação axial de C=C (ν 1629, 1599, 1508, 1469 e 1388 cm⁻¹) características do anel aromático (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

As bandas de deformação axial assimétrica e simétrica do grupo metileno (CH₂) são observadas, respectivamente, em 2924 cm⁻¹ e 2874 cm⁻¹. Foram observadas bandas de deformação angular fora do plano de C-H_{aromático} (γ -CH) e de deformação angular do anel (β -anel), características de hidrocarboneto aromático polinuclear. O sinal em 1258 cm⁻¹ indica a presença do éter alifático e do epóxido (C-O-C_{alifático} e C-O-C_{epóxido}). A banda larga em 3482 cm⁻¹ pode ser atribuída a deformação axial de OH do grupo álcool em virtude da presença de moléculas do solvente ou de água de hidratação (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

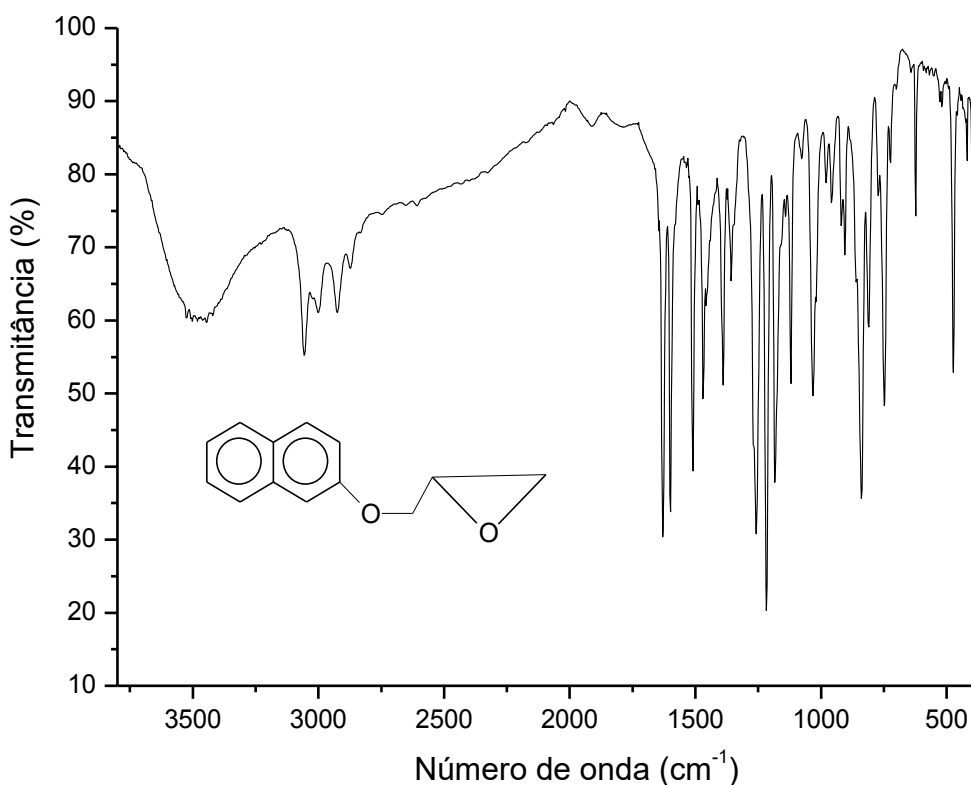


Figura 26. Espectro de infravermelho para o precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4), obtido em pastilha de KBr.

Tabela 4. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3482	v OH _{solvente}	1629, 1599, 1508, 1469, 1388	v C=C
3057, 3001	v CH _{aromático}	1258	v _s C-O-C _{epóxido} ; v _{as} C-O-C _{alifático}
2924	v _{as} CH ₂	1217, 1184	δ CH _{aromático}
2874	v _s CH ₂	839,748	γ-CH ^a ; β-anel ^b

a= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares; b= deformação do anel de aromáticos polinucleares.

Observa-se nos espectro de RMN ¹H do precursor P4 (Figura 27) deslocamentos químicos em 2,82 ppm (H_{12b}), 2,95 ppm (H_{12a}) e 3,41-3,44 ppm (H₁₁) referentes aos átomos de hidrogênio do anel do epóxido. Os átomos de hidrogênio metilênicos H₁₀ apresentam deslocamento químico em 4,08ppm (H_{10b}) e em 4,35 ppm (H_{10a}). Na região entre 7,14 a 7,78 ppm verificam-se os sinais referentes aos átomos de hidrogênio aromáticos. Os átomos de hidrogênio aromáticos H₁ (7,14 ppm) e H₃ (7,19 ppm), que estão em posição *orto* em relação ao substituinte do anel, apresentam-se mais blindados devido a maior densidade eletrônica (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). O espectro de RMN ¹³C do precursor P4 e as atribuições dos átomos de hidrogênio e carbono são mostrados, respectivamente, na Figura 28 e Tabela 5.

O espectro de RMN ¹³C do precursor P4 (Figura 28) mostra treze sinais para treze átomos de carbono. O átomo de carbono alifático C₁₀ apresenta deslocamento químico de 68,89 ppm e os átomos de carbono do epóxido apresentam deslocamento de 44,77 ppm (C₁₂) e 50,11 ppm (C₁₁). Os átomos de carbono aromáticos apresentam sinais entre 106,88 ppm e 156,42 ppm, sendo que o átomo de carbono C₂ (156,42 ppm) apresenta-se mais desblindado em virtude de estar ligado ao átomo de oxigênio do éter alifático (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

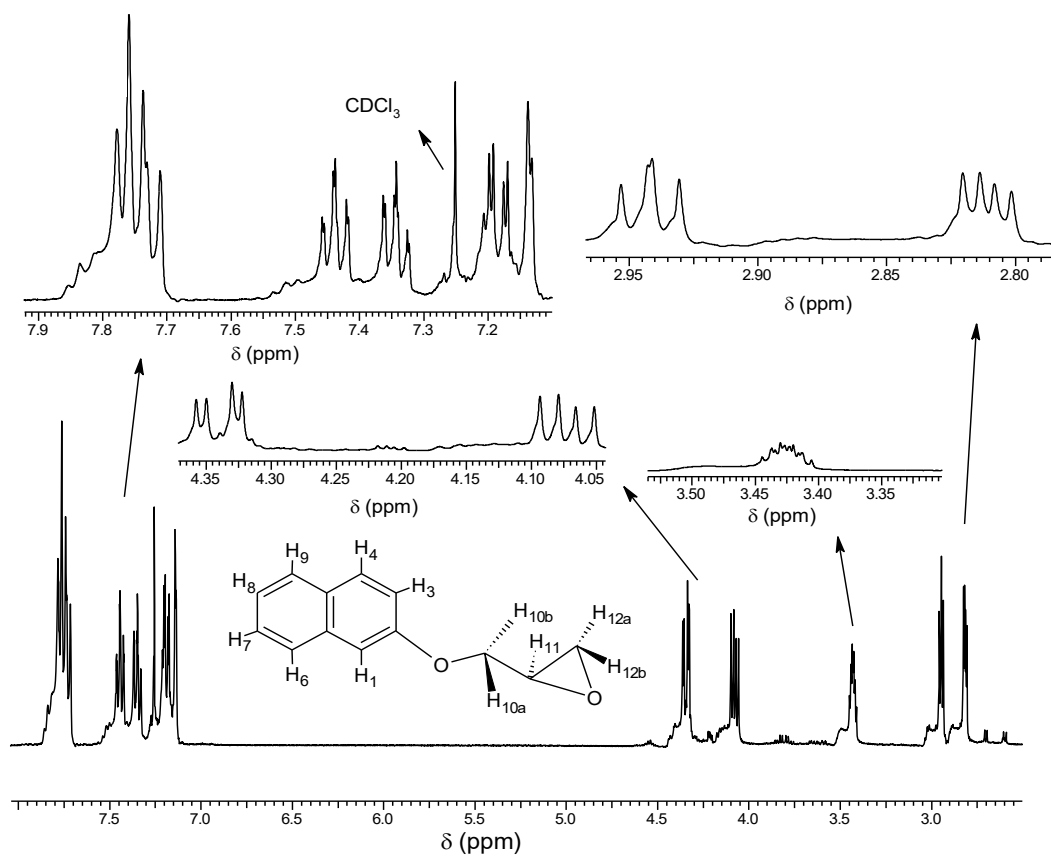


Figura 27. Espectro de RMN ^1H do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4), obtido em CDCl_3 .

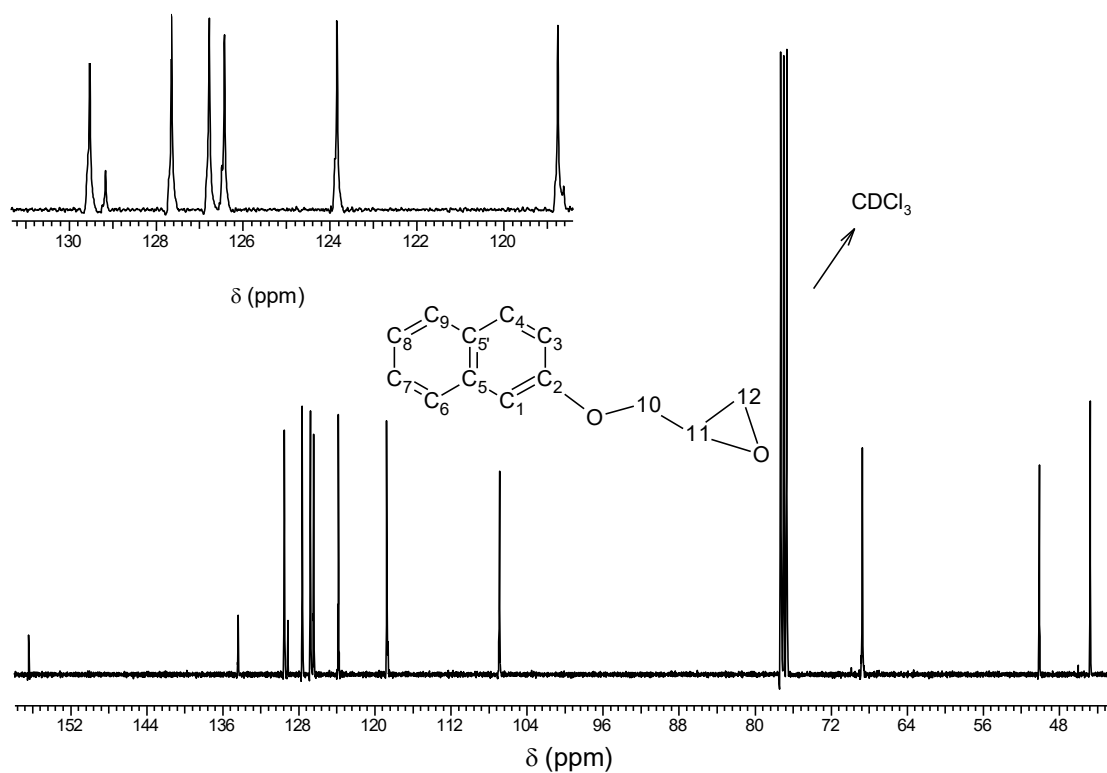


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4), obtido em CDCl_3 .

Tabela 5. Dados para os espectros de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e atribuições para o precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P4).

Atribuição	Carbono		Hidrogênios	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicidade; $J_{\text{observado}}$ (Hz)	Átomos de hidrogênio
C				
5'	129,17	-	-	-
5	134,40	-	-	-
2	156,42	-	-	-
CH				
11	50,11	3,41-3,44 (m)	-	0,97
1	106,88	7,14 (d)	$J_{1-3} = 3,4$	0,96
3	118,72	7,19 (dd)	$J_{3-4} = 8,76$ $J_{3-1} = 3,6$	0,96
8	123,83	7,32-7,36 (m)	-	1,04
7	126,43	7,42-7,46(m)	-	1,05
9	126,78	7,71-7,78 (m)	-	3,00
6	127,65	7,71-7,78 (m)	-	3,00
4	129,54	7,71-7,78 (m)	-	3,00
CH₂				
12	44,77	(a) 2,95 (t)	$J_{12a-12b} = 4,88$ $J_{12a-11} = 4,16$	1,00
		(b) 2,82 (dd)	$J_{12b-12a} = 5,56$ $J_{12b-11} = 2,65$	0,98
10	68,89	(a) 4,35 (dd)	$J_{10a-10b} = 10,97$ $J_{10a-11} = 3,40$	1,00
		(b) 4,08 (dd)	$J_{10b-10a} = 10,76$ $J_{10b-11} = 5,12$	1,00

d=duplete; dd=duplo duplete; m=multiplete; s=simpleto; t=tripleto.

4.1.1.5. Caracterização do composto 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5)

O precursor P5 é um derivado da cumarina (1,2-benzopirona) e consequentemente o espectro de infravermelho (Figura 29) desse precursor mostra vibrações de deformação axial C=O (ν 1720 cm^{-1}) e C-O (ν 1248, 1188 e 1109 cm^{-1}) de lactonas. O sinal em 1248 cm^{-1} também pode ser atribuído à deformação axial simétrica de C-O-C do epóxido. Em 1275 cm^{-1} observa-se a vibração de deformação axial assimétrica de C-O-C do éter alifático. Bandas de absorção características de deformação axial de C-H_{aromático} (3078 cm^{-1}) e deformação axial de C=C (ν 1622, 1546 e 1398 cm^{-1}) confirmam a presença do anel aromático. Também foram observadas bandas de deformação angular fora do plano de C-H_{aromático} (γ -CH) e de deformação angular do anel (β -anel) características de hidrocarboneto aromático em 937, 770 e 752 cm^{-1} . Entre 3100-3500 cm^{-1} observa-se a banda atribuída ao grupo hidroxila (OH) do solvente uma vez que a reação é realizada utilizando-se metanol (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). As atribuições das bandas observadas no espectro do precursor P5 estão apresentadas na Tabela 6.

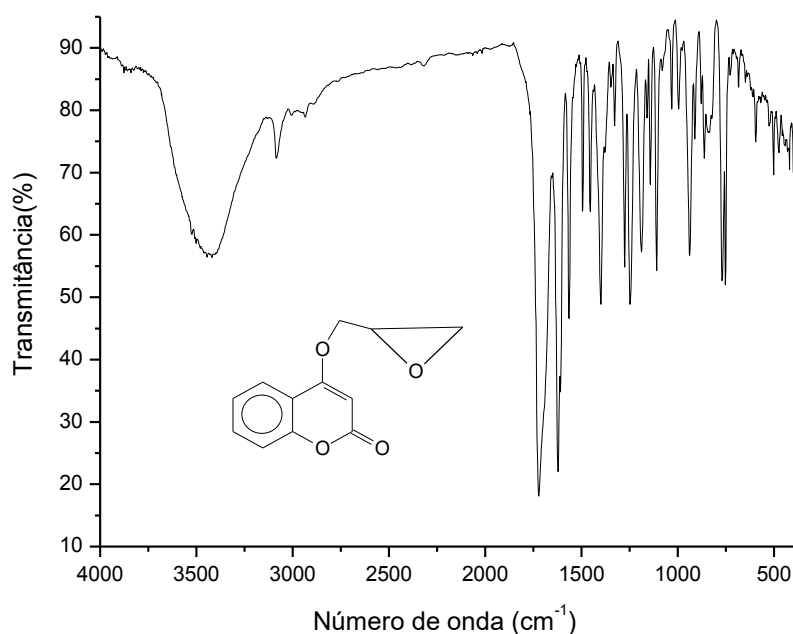


Figura 29. Espectro de infravermelho para o precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5), obtido em pastilha de KBr.

Tabela 6. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3100-3500	v OH _{solvente}	1275	v _{as} C-O-C alifático
3078	v CH _{aromático}	1248, 1188, 1109	v C-O lactona
2933	v _a CH ₂	1248	v _s C-O-C epóxido
1720	v C=O lactona	937, 770, 752	γ-CH ^a ; β-anel ^b
1622, 1564, 1398	v C=C		

a= deformação C-H fora do plano de aromáticos; b= deformação do anel de aromáticos.

A análise elementar (C, H e N), apresentada na Tabela 7, confirma a composição do precursor P5, o qual apresenta em sua constituição doze átomos de carbono, dez átomos de hidrogênio e quatro átomos de oxigênio, resultando em um peso molecular de 218,21 g.mol⁻¹.

Tabela 7. Dados de análise elementar (C, H e N) para o precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5).

P5	%C	%H	%N
Experimental	66,29	4,33	0
Calculado	66,05	4,62	0

A análise dos sinais presentes no espectro de RMN ¹H confirmam a obtenção do precursor P5 (Figura 30). Os deslocamentos químicos em 2,80 ppm (H_{12b}), 2,91 ppm (H_{12a}) e 3,45-3,49 (H₁₁) são atribuídos aos átomos de hidrogênio do anel do epóxido. Os duplos dupletos observados em 4,08 ppm (H_{10b}) e em 4,62 ppm (H_{10a}) são atribuídos aos átomos de hidrogênio H₁₀. Entre 7,31 ppm e 7,81 ppm encontram-se os sinais referentes aos átomos de hidrogênio aromáticos. Os átomos de hidrogênio do anel aromático H₆ e H₈ encontram-se na mesma faixa de deslocamento químico (7,31-7,39 ppm). O átomo de hidrogênio H₂ (alfa à carbonila) é observado em 5,90 ppm (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). O espectro de RMN ¹³C do precursor P5 e as atribuições dos átomos de hidrogênio e carbono são mostrados na Figura 31 e Tabela 8, respectivamente.

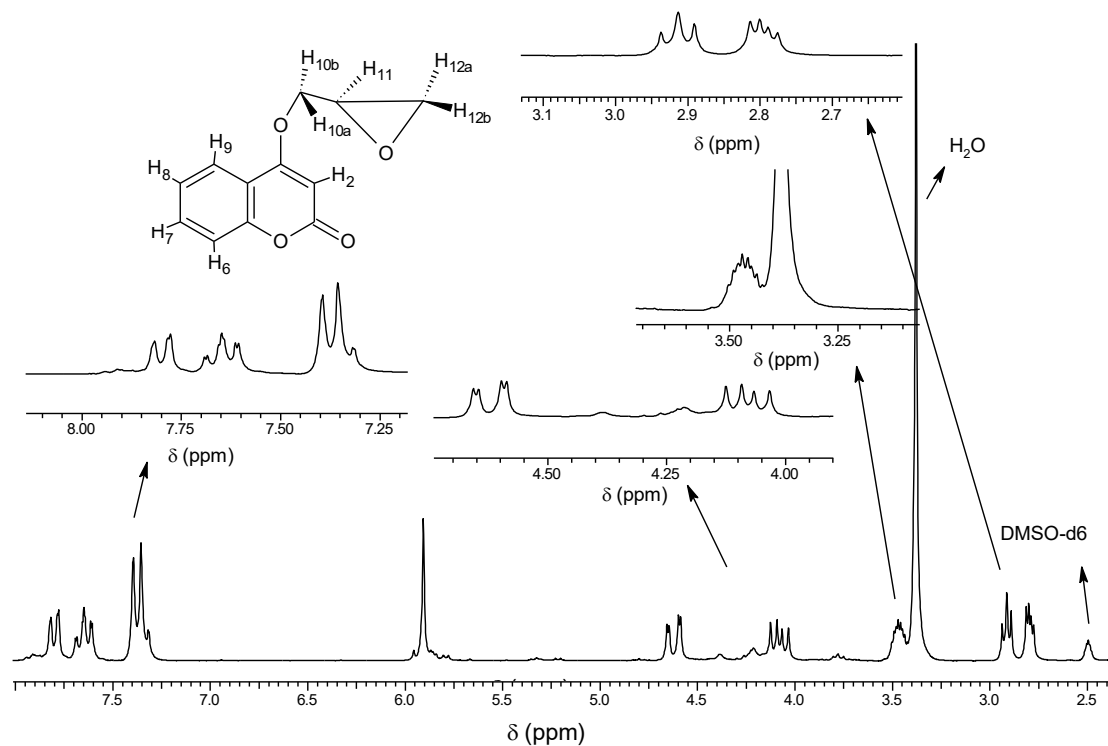


Figura 30. Espectro de RMN ^1H do precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2-ona (P5), obtido em DMSO- d_6 .

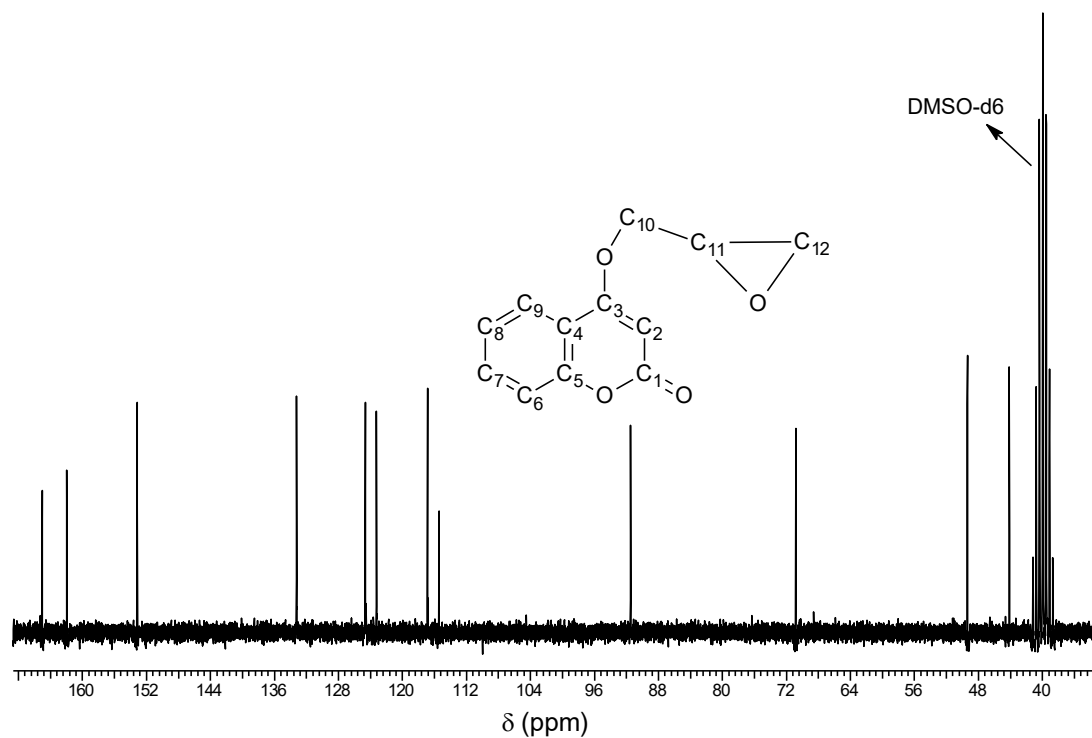


Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C do precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2-ona (P5), obtido em DMSO- d_6 .

O espectro de RMN ^{13}C do precursor P5 (Figura 31) mostra doze sinais para doze átomos de carbono, sendo que os átomos de carbono aromáticos encontram-se entre 91,47 ppm e 165,95 ppm. Em 161,95 ppm observa-se o sinal atribuído ao átomo de carbono aromático C_3 que faz ligação com o átomo de oxigênio do éter alifático. Observam-se em 165,95 ppm e em 91,47 ppm os sinais atribuídos respectivamente ao átomo de carbono da carbonila (C_1) e ao átomo de carbono alfa à carbonila (C_2). Os sinais em 44,14 ppm (C_{12}), 49,38 ppm (C_{11}) e 70,48 ppm (C_{10}) são atribuídos aos átomos de carbono do anel do epóxido e do éter alifático (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Os resultados mostram que o precursor P5 foi obtido com elevado teor de pureza.

Tabela 8. Dados para os espectros de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e atribuições para o precursor 4-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P5).

Atribuição	Carbono		Hidrogênios	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicidade; $J_{\text{observado}}$ (Hz)	Átomos de hidrogênio
C				
4	115,44	-	-	-
5	153,16	-	-	-
3	161,95	-	-	-
1	165,95	-	-	-
CH				
11	49,38	3,45-3,49 (m)	-	1,00
2	91,47	5,90 (s)	-	1,00
6	116,88	7,31-7,39 (m)	-	2,00
8	123,25	7,31-7,39 (m)	-	2,00
9	124,66	7,77-7,81 (m)	-	1,00
7	133,25	7,60-7,69 (m)	-	1,00
CH₂				
12	44,14	(a) 2,91 (t)	$J_{12\text{a}-12\text{b}} = 4,78$ $J_{12\text{a}-11} = 4,40$	0,88
		(b) 2,80 (dd)	$J_{12\text{b}-12\text{a}} = 4,78$ $J_{12\text{b}-11} = 2,74$	0,88
10	70,48	(a) 4,62 (dd)	$J_{10\text{a}-10\text{b}} = 11,94$ $J_{10\text{a}-11} = 2,38$	1,00
		(b) 4,08 (dd)	$J_{10\text{b}-10\text{a}} = 11,94$ $J_{10\text{b}-11} = 6,50$	1,00

d=dupletto; dd=duplo dupletto; m=multiplerto; s=simpleto; t=tripleto.

4.1.1.6. Caracterização do 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6)

Os precursores P5 e P6 apresentam grande semelhança estrutural uma vez que são isômeros de posição. Variações observadas nos valores de número de onda (espectroscopia de infravermelho), nos deslocamentos químicos (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e no padrão de acoplamento dos hidrogênios mostram que os precursores P5 e P6 são compostos distintos.

Semelhante ao precursor P5, o espectro de infravermelho do precursor P6 (Figura 32) apresenta vibrações de deformação axial C=O (ν 1719 cm^{-1}) e de deformação axial C-O (ν 1230, 1120 e 1109 cm^{-1}) características de lactonas. O sinal em 1230 cm^{-1} também pode ser atribuído à deformação axial simétrica de C-O-C do epóxido e o sinal em 1278 cm^{-1} corresponde a deformação axial C-O-C do éter alifático. Bandas de absorção características de deformação axial de C=C (ν 1612, 1506 e 1396 cm^{-1}), de deformação angular fora do plano de C-H_{aromático} (γ -CH) e de deformação angular do anel (β -anel) confirmam a presença do anel aromático (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

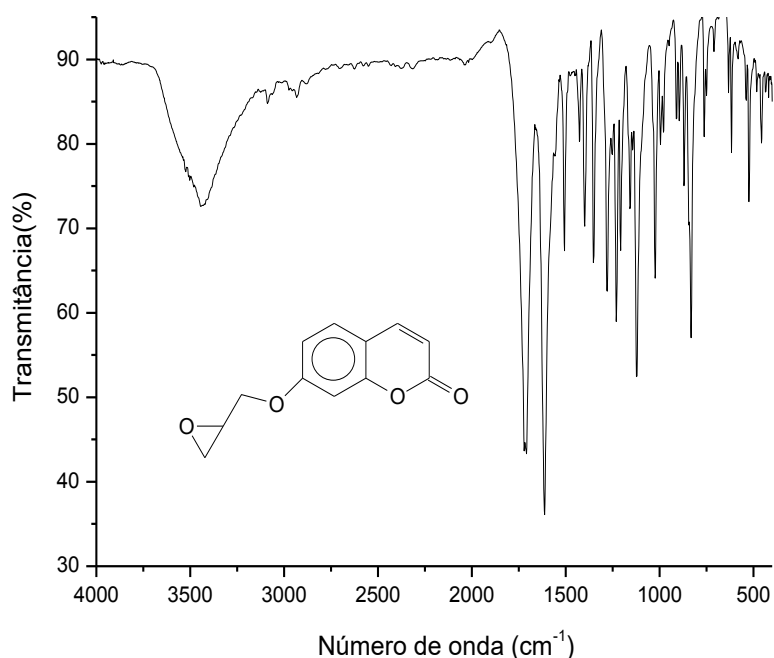


Figura 32. Espectro de infravermelho para o precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6), obtido em pastilha de KBr.

A banda alargada entre 3300-3500 cm^{-1} pode ser atribuída ao OH do metanol utilizado na reação. As atribuições detalhadas das bandas observadas no espectro do precursor P6 estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3500-3300	ν OH _{solvente}	1278	ν_{as} C-O-C _{alifático}
3088	ν CH _{aromático}	1230, 1120, 1109	ν C-O _{lactona}
2933	ν_{as} CH ₂	1230	ν_{s} C-O-C _{epóxido}
1719	ν C=O _{lactona}	831	γ -CH ^a ; β -anel ^b
1612, 1506, 1396	ν C=C		

a= deformação C-H fora do plano de aromáticos; b= deformação do anel de aromáticos.

A análise elementar (C, H e N), apresentada na Tabela 10, confirma a composição do precursor P6, o qual apresenta em sua constituição doze átomos de carbono, dez átomos de hidrogênio e quatro átomos de oxigênio resultando em um peso molecular de 218,21 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabela 10. Dados de análise elementar (C, H e N) para o precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6).

P6	%C	%H	%N
Experimental	66,35	4,42	0
Calculado	66,05	4,62	0

A análise do espectro de RMN ^1H do precursor P6 (Figura 33) mostra deslocamentos químicos em 2,78 ppm ($\text{H}_{12\text{a}}$), 2,93 ppm ($\text{H}_{12\text{b}}$) e 3,36-3,40 ppm (H_{11}) atribuídos aos átomos de hidrogênio do epóxido. Os átomos de hidrogênio alifáticos H_{10} apresentam deslocamento químico em 3,96 ppm ($\text{H}_{10\text{b}}$) e em 4,33 ppm ($\text{H}_{10\text{a}}$). Os átomos de hidrogênio aromáticos são observados na região entre 6,25 e 7,63 ppm. O precursor P6 apresenta em 6,25 ppm um duplete referente ao átomo de hidrogênio alfa à carbonila (H_2) (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). O espectro de RMN ^{13}C do precursor P6 e

as atribuições dos átomos de hidrogênio e carbono são mostrados respectivamente na Figura 34 e Tabela 11.

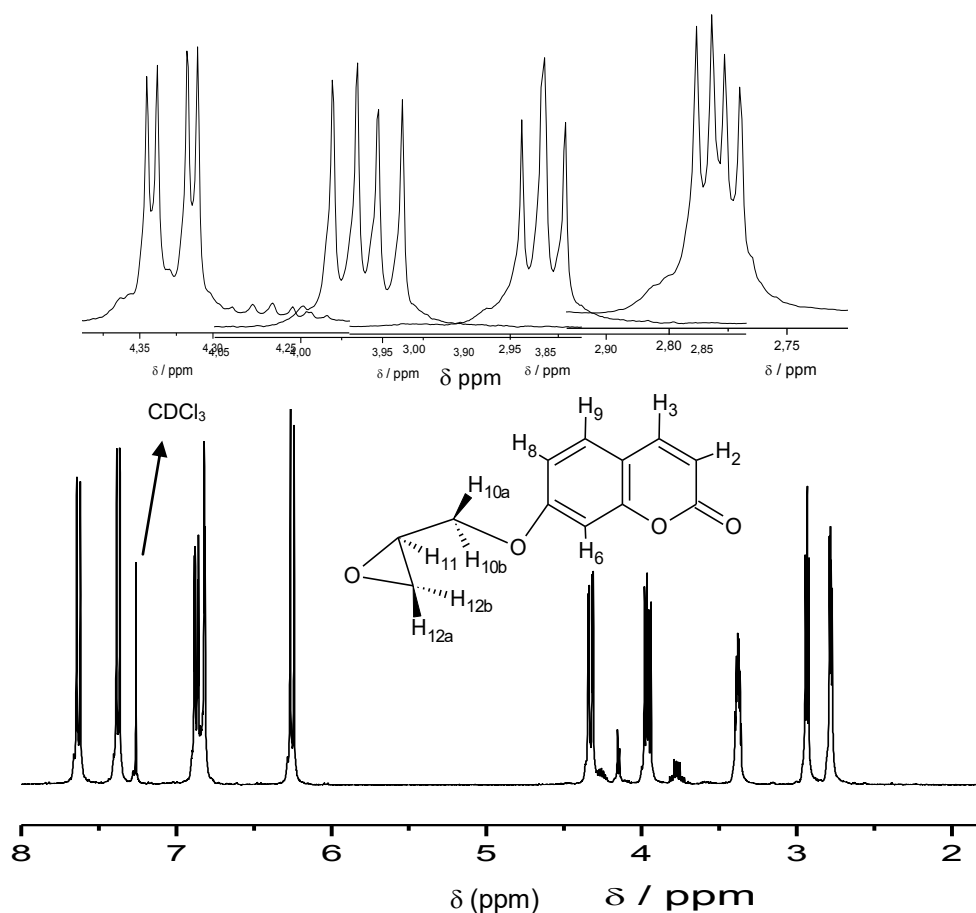


Figura 33. Espectro de RMN ^1H do precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6), obtido em CDCl_3 .

O espectro de RMN ^{13}C do precursor P6 (Figura 34) mostra doze sinais para doze átomos de carbono sendo que os átomos de carbono aromáticos estão entre 101,73 ppm e 161,65 ppm. Os sinais referentes aos átomos de carbono da carbonila e do carbono alfa à carbonila (C_2) são observados, respectivamente, em 161,65 ppm (C_1) e 113,01 ppm (C_2). Em 161,15 ppm e em 155,8 ppm encontram-se os respectivos sinais dos átomos de carbono C_7 e C_5 . Os sinais em 44,57 (C_{12}), 49,86 (C_{11}) e 69,36 (C_{10}) são atribuídos aos átomos de carbono do anel do epóxido e do éter alifático (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

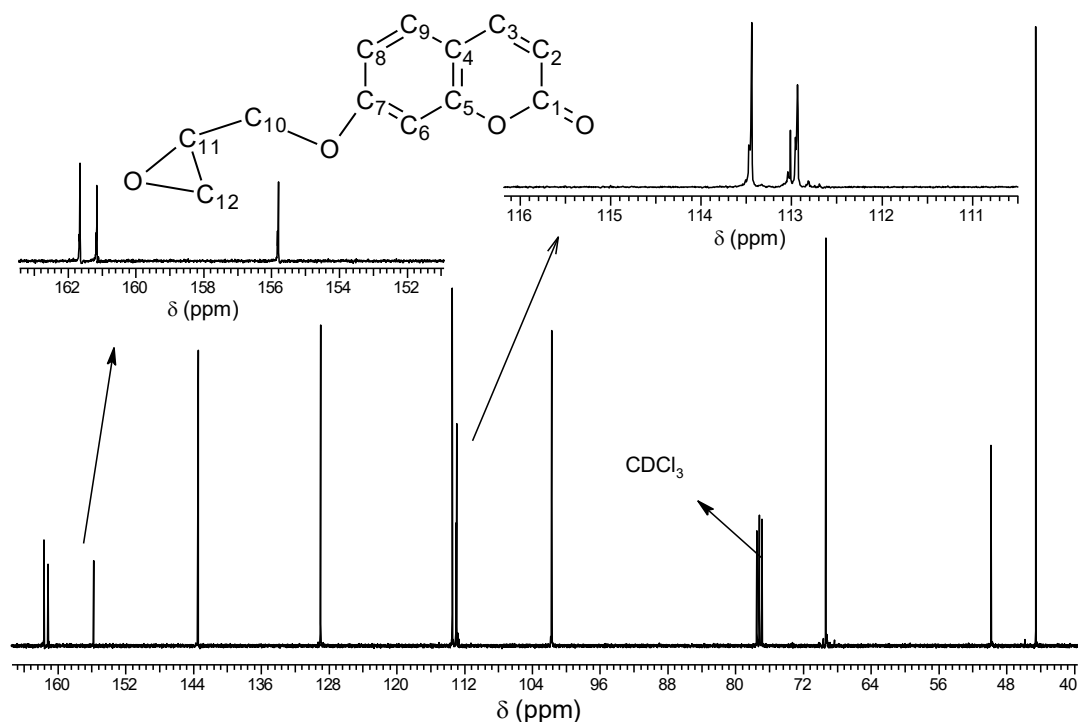


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C do precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6), obtido em CDCl_3 .

Tabela 11. Dados para os espectros de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e atribuições para o precursor 7-(2-oxiranilmetoxi)-2H-cromen-2ona (P6).

Atribuição	Carbono		Hidrogênios	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicidade; $J_{\text{observado}}$ (Hz)	Átomos de hidrogênio
C				
4	112,94	-	-	-
5	155,80	-	-	-
7	161,15	-	-	-
1	161,65			
CH				
11	49,86	3,36-3,40 (m)	-	1,00
6	101,73	6,81 (d)	$J_{6-8} = 2,56$	1,00
2	113,01	6,25 (d)	$J_{2-3} = 9,52$	1,00
8	113,44	6,87 (dd)	$J_{8-9} = 8,60$	1,00
9	128,99	7,37 (d)	$J_{9-8} = 8,44$	1,00
3	143,47	7,63 (d)	$J_{3-2} = 9,52$	1,00
CH₂				
12	44,57	(b) 2,93 (t)	$J_{12b-12a} = 5,12$; $J_{12b-11} = 4,58$	0,88
		(a) 2,78 (dd)	$J_{12a-12b} = 5,12$; $J_{12a-11} = 2,60$	0,88
10	69,36	(a) 4,33 (dd)	$J_{10a-10b} = 11,00$; $J_{10a-11} = 2,92$	1,00
		(b) 3,96 (dd)	$J_{10b-10a} = 11,36$; $J_{10b-11} = 6,24$	1,00

d=duplete; dd=duplo duplete; m=multiplato; s=simpleto; t=tripleto.

4.1.1.7. Caracterização do composto 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L1)

O ligante L1 foi obtido a partir da reação entre os precursores P1 e P3, sendo assim esses compostos apresentam semelhanças estruturais as quais podem ser observadas nos espectros de infravermelho e RMN (^1H e ^{13}C). Entretanto, observam-se variações nos valores de número de onda (espectroscopia de infravermelho) e de deslocamento químico (RMN ^1H e RMN ^{13}C) o que confirma a formação de um composto orgânico (L1) distinto dos seus precursores (P1 e P3). O espectro de infravermelho do ligante L1 e a atribuição para as principais bandas são apresentados na Figura 35 e na Tabela 12, respectivamente.

Observa-se no espectro de infravermelho para o ligante L1 bandas de deformação angular fora do plano de C-H ($\gamma\text{-CH}$) e de deformação angular do anel ($\beta\text{-anel}$) de heteroaromáticos (piridina). O padrão de absorção desses tipos de deformações angulares é determinado pelo número de átomos de hidrogênios adjacentes que se deformam em fase. As absorções de deformação angular fora do plano de C-H e do anel para piridinas 1,2-dissubstituídas encontram-se na faixa de $781\text{-}740\text{ cm}^{-1}$ e $752\text{-}746\text{ cm}^{-1}$ respectivamente. Bandas nesta região caracterizam a presença de anel benzênico 1,2-dissubstituído pois a inserção de um heteroátomo no anel aromático lhe confere um caráter de anel substituído. Observa-se que o ligante L1 apresenta um sinal em 756 cm^{-1} que é característico de anel aromático piridínico. A banda mais alargada em 756 cm^{-1} , quando comparada com o espectro de infravermelho do precursor P3, indica a ocorrência do sobreposição de bandas, assim, este sinal também demonstra a presença de anel aromático polinuclear do naftol (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Os anéis aromáticos podem ser identificados também pelas bandas de deformação axial de C-H_{aromático} (3051 cm^{-1}) e de deformação axial de C=C e C=N (ν 1581, 1489 e 1400 cm^{-1}) do anel aromático. As bandas de deformação axial assimétrica (ν_{as} 2927 cm^{-1}) e simétrica (ν_{s} 2831 cm^{-1}) de C-H alifático confirmam a presença do grupo metileno (CH_2). Em 1242 cm^{-1} e 1269 cm^{-1}

verificam-se as bandas características de deformação axial de C-O de fenol e C-O-C de éter alifático, respectivamente. A região alargada entre 2800-3300 cm^{-1} é atribuída a deformação axial do grupo hidroxila (OH) de álcool e fenol em ligação de hidrogênio intermolecular (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Algumas das bandas apresentadas pelo ligante L1 são semelhantes às observadas para o precursor P1 relatadas em trabalho realizado por Neves *et al.* (1993).

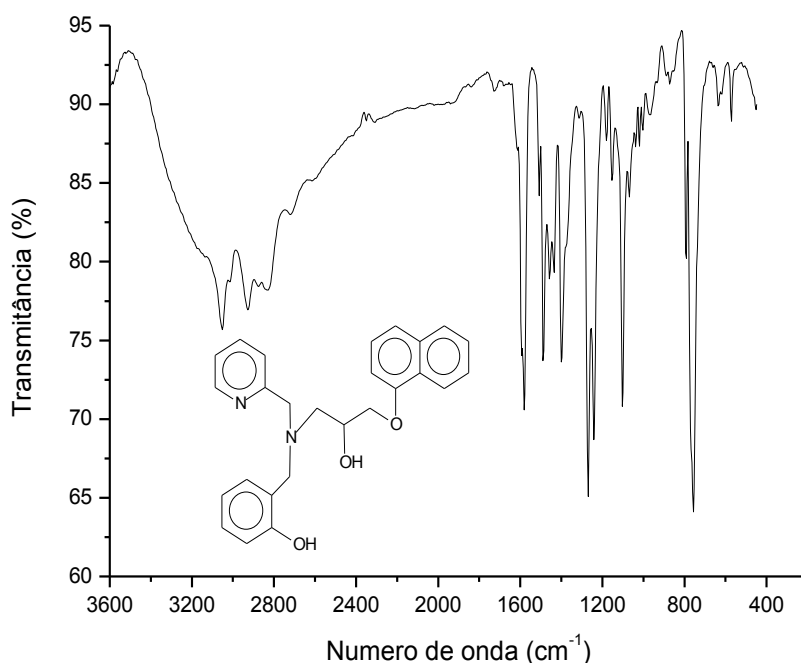


Figura 35. Espectro de infravermelho para o ligante 1-[2-hidroxi-1-(2-piridilmetil)amino]propano-2-ol (L1), obtido em filme.

Tabela 12. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 1-[2-hidroxi-1-(2-piridilmetil)amino]propano-2-ol (L1), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
2800-3300	ν OH	1269	ν_{as} C-O-C
3051	ν $\text{CH}_{\text{aromático}}$	1242	ν C-O ^a
2927	ν_{as} CH_2	1103	δ $\text{CH}_{\text{aromático}}$
2831	ν_{s} CH_2	791, 756	γ -CH ^b ; β -anel ^c
1581, 1489, 1400	ν C=C; ν C=N		

a= deformação axial de fenol; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; c= deformação do anel de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos.

O espectro de RMN ^1H do ligante L1 está apresentado na Figura 36 e as atribuições detalhadas dos sinais observados nos espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C do ligante L1 são apresentadas na Tabela 13. O espectro de RMN ^1H (Figura 36) mostra a presença de átomos de hidrogênio alifáticos (3,00 ppm a 4,39 ppm) e aromáticos (6,77 ppm a 8,63 ppm). Os sinais em 6,77 ppm (H_2), 7,41-7,44 ppm (H_4), 8,03 ppm (H_6), 7,34 ppm (H_3), 7,48 ppm (H_7 e H_8) e 7,78 ppm (H_9), são referentes aos átomos de hidrogênio do anel aromático polinuclear do α -naftol e estão de acordo com a literatura, uma vez que também são observados no espectro de RMN ^1H do propranolol (BECKER & LARIVE, 2008). Observa-se que o átomo de hidrogênio H_{19} encontra-se mais desblindado uma vez que o seu respectivo átomo de carbono (C_{19}) está ligado ao átomo de nitrogênio piridínico. O átomo de hidrogênio aromático mais blindado é o H_2 (6,77 ppm) em consequência da sua posição *orto* em relação ao substituinte do anel do α -naftol. O multiplete em 4,35-4,39 ppm é atribuído ao átomo de hidrogênio alifático H_{11} . Em 3,00 ppm (H_{12}), 3,79-3,84 ppm (H_{13}), 3,91-4,00 ppm (H_{13}), 4,03-4,08 ppm (H_{14}) e 4,15-4,19 ppm (H_{14}) observam-se os sinais atribuídos aos átomos de hidrogênio dos metilenos ligados a amina alifática. Os átomos de hidrogênio H_{10} são observado em 4,03-4,08 ppm e 4,13 ppm. Não foram observados os sinais referentes aos átomos do hidrogênio do álcool secundário e do fenol (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Assim como o observado para o espectro de RMN ^1H , a análise do espectro de RMN ^{13}C para o ligante L1 mostra sinais com deslocamento químico semelhantes aos apresentados pelos precursores P1 e P3. O espectro de RMN ^{13}C mostra vinte e seis sinais para vinte e seis átomos de carbono (Tabela 13). Os átomos de carbono alifáticos apresentam deslocamento químico de 56,90 ppm (C_{12}), 58,61 ppm (C_{14}), 58,72 ppm (C_{13}), 67,72 ppm (C_{11}) e 70,09 ppm (C_{10}). Os sinais dos átomos de carbono aromáticos foram observados entre 104,71 ppm e 157,45 ppm. Em 154,14 ppm observa-se o sinal do átomo de carbono aromático ligado ao átomo de oxigênio do éter alifático (C_1). Em 157,28 ppm e em 157,45 ppm verificam-se, respectivamente, os sinais do átomo de carbono ligado ao átomo de nitrogênio do anel piridínico (C_{15}) e do átomo de carbono ligado ao átomo de oxigênio do fenol (C_{25}) (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Em virtude da abertura do anel do epóxido e da mudança do ambiente químico, os átomos de carbono C₁₁ e C₁₂ apresentaram deslocamentos químicos diferentes daqueles observado para o precursor P3 (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). A análise conjunta dos dados obtidos pelos mapas de correlação HMQC (Figuras 37, 38 e 39) e HMBC (Figuras 40, 41 e 42) confirmaram as atribuições dos átomos de hidrogênio e carbono do ligante L1.

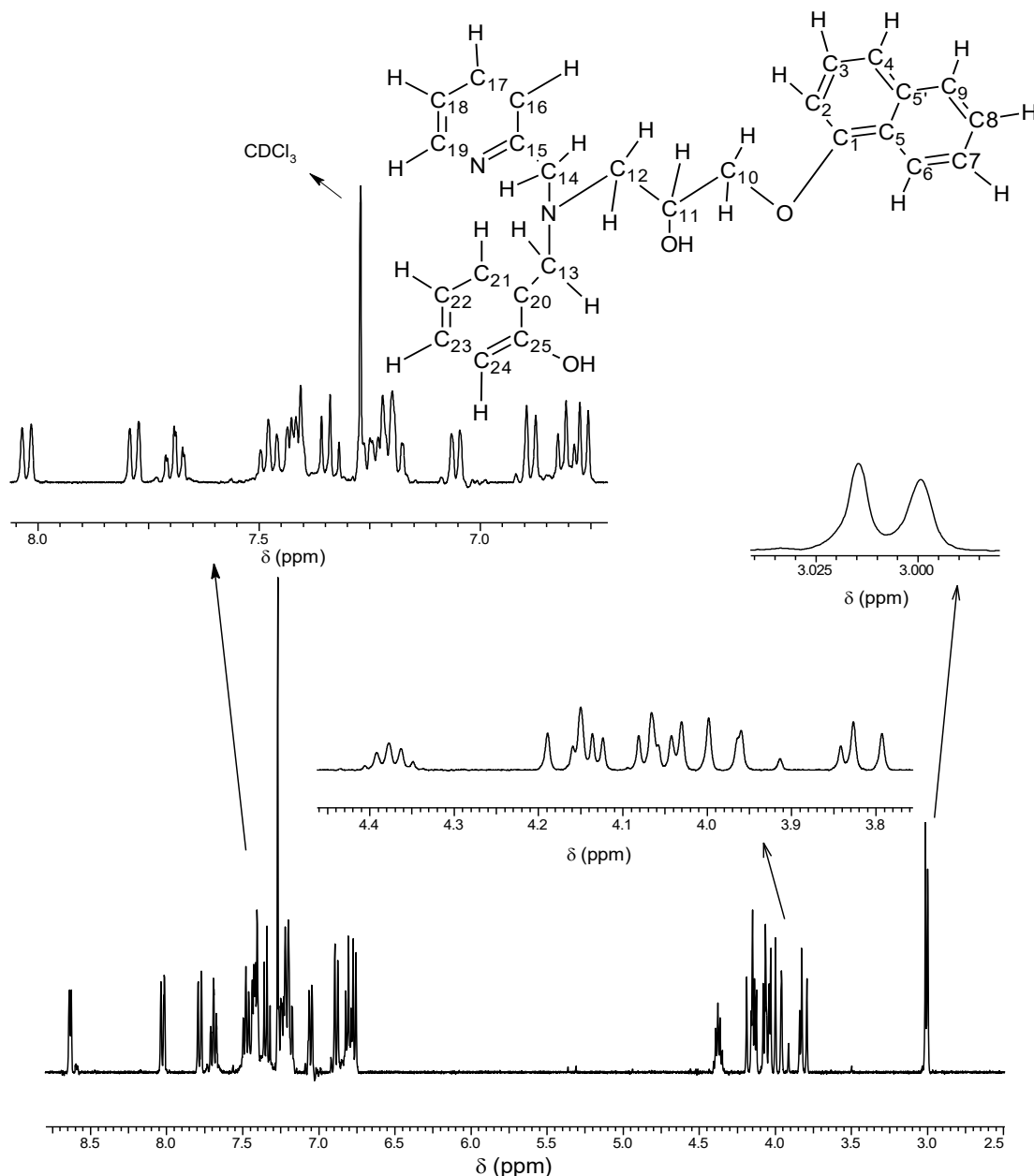


Figura 36. Espectro de RMN ¹H do ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L1), obtido em CDCl₃.

Tabela 13. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do ligante L1 e as correlações observadas no espectro de HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) e HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$).

Atribuição	HMQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
20	122,32	-	-	-
5'	125,43	-	-	-
5	134,39	-	-	-
1	154,14	-	-	-
15	157,28	-	-	-
25	157,45	-	-	-
CH				
11	67,72	4,35-4,39 (m)	-	-
2	104,71	6,77 (d)	C ₃	C ₄
24	116,67	6,89 (d)	C ₂₅	C ₂₂
22	119,14	6,81 (t)	-	C ₂₄
4	120,43	7,41-7,44 (m)	-	C ₂
6	121,80	8,03 (d)	C ₅	C ₈
18	122,54	7,17-7,25 (m)	-	C ₁₆
16	123,26	7,17-7,25 (m)	-	C ₁₈
3	125,12	7,34 (t)	-	C ₁
7	125,80	7,48 (t)	C ₆	C ₅
8	126,29	7,48 (t)	-	C ₆
9	127,39	7,78 (d)	C _{5'}	-
23	129,21	7,17-7,25 (m)	-	C ₂₁
21	129,60	7,06 (d)	-	C ₁₃ , C ₂₅
17	137,18	7,69 (t)	-	C ₁₅ , C ₁₉
19	148,81	8,63 (d)	-	-
CH₂				
12	56,90	3,00 (d)	C ₁₁	C ₁₀ , C ₁₃ , C ₁₄
14	58,61	4,03-4,08 (m)	C ₁₅	C ₁₂
		4,15-4,19 (m)	C ₁₅	C ₁₂
13	58,72	3,79-3,84 (m)	C ₂₀	C ₁₂ , C ₂₁ , C ₂₅
		3,91-4,00 (m)	C ₂₀	C ₁₂ , C ₂₁ , C ₂₅
10	70,09	4,13 (d)	-	-
		4,03-4,08 (m)	-	-

d=dupleteo; dd=duplo dupleteo; m=multiploto; s=simpleto; t=tripleto.

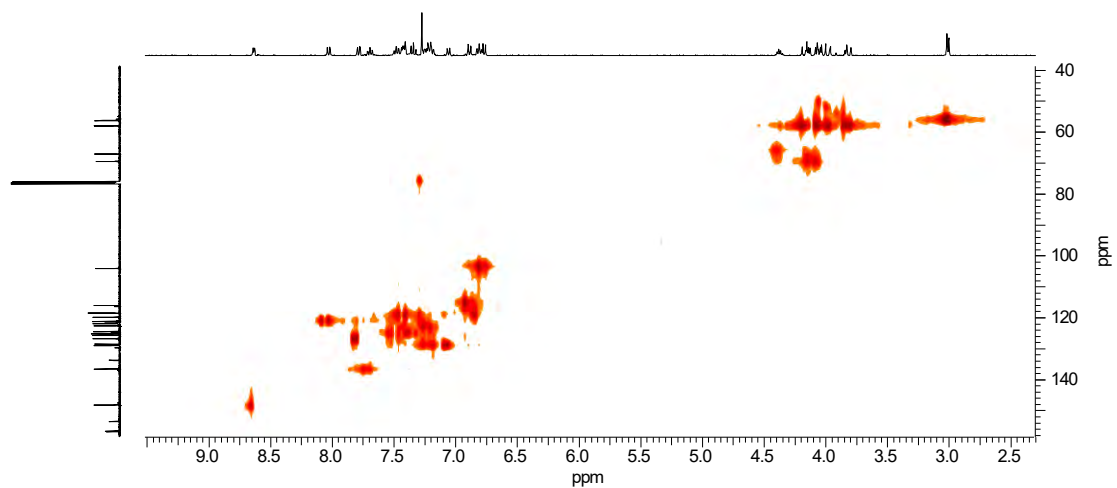


Figura 37. Mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L1.

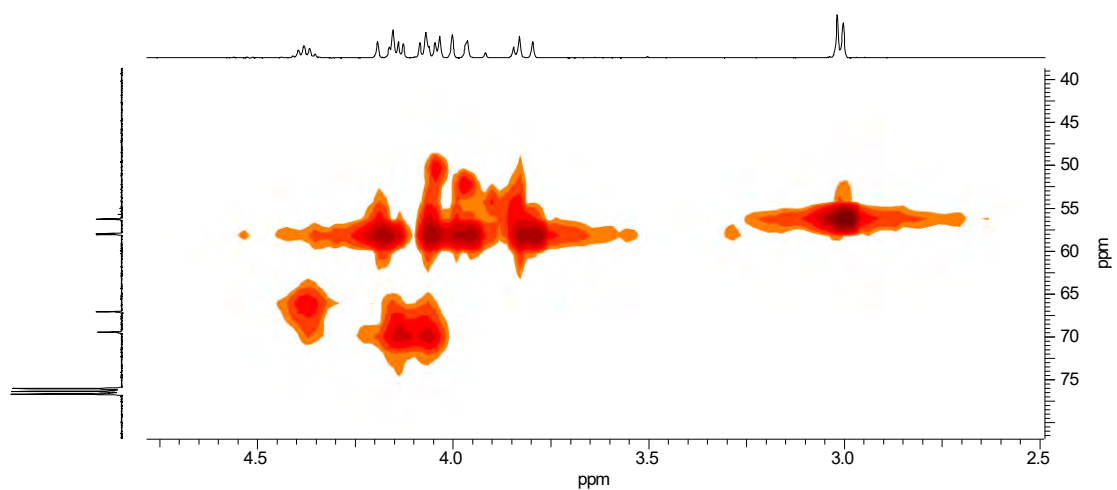


Figura 38. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L1.

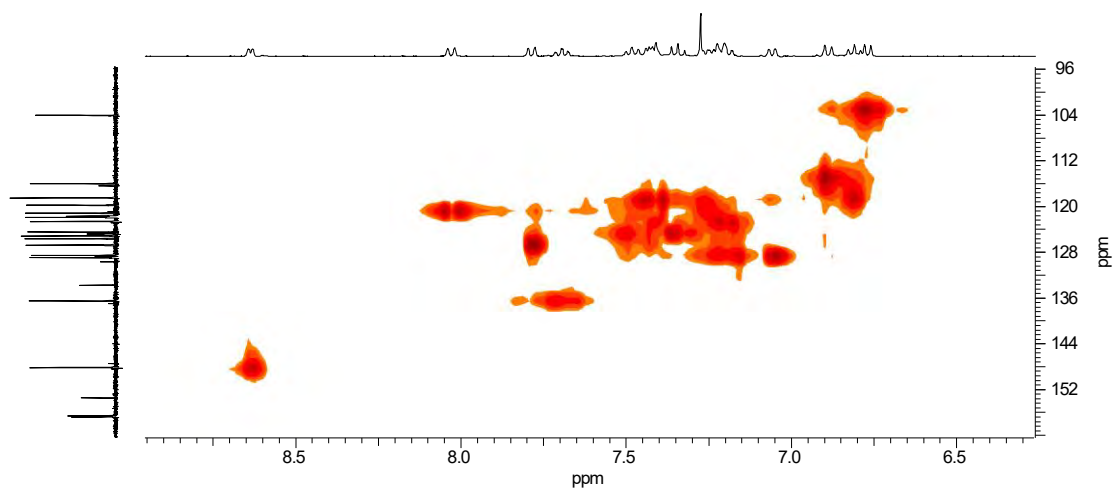


Figura 39. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L1.

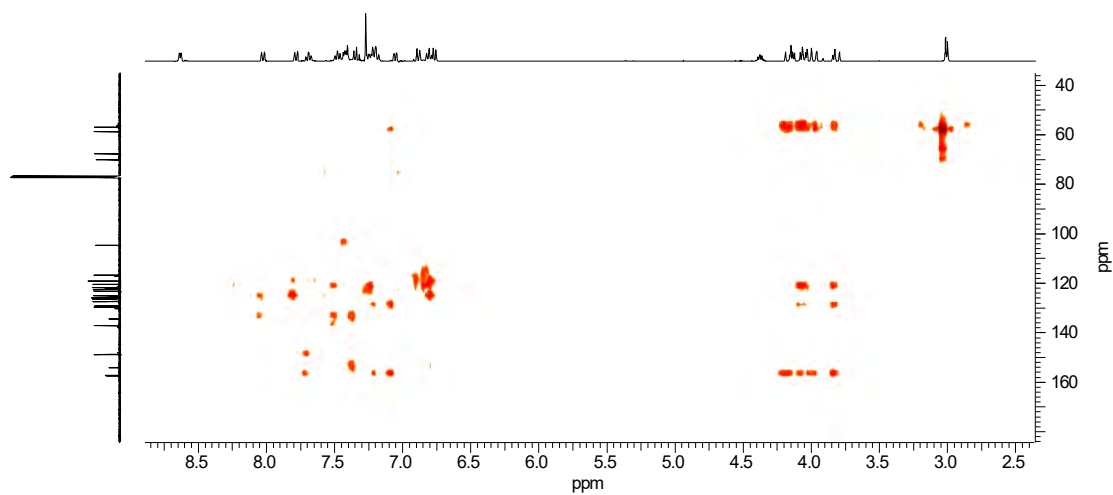


Figura 40. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L1.

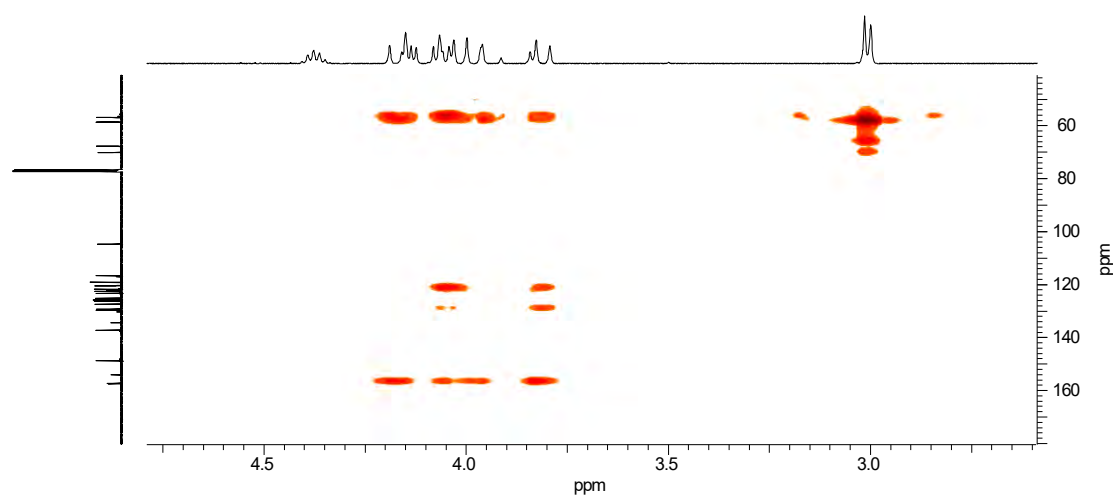


Figura 41. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L1.

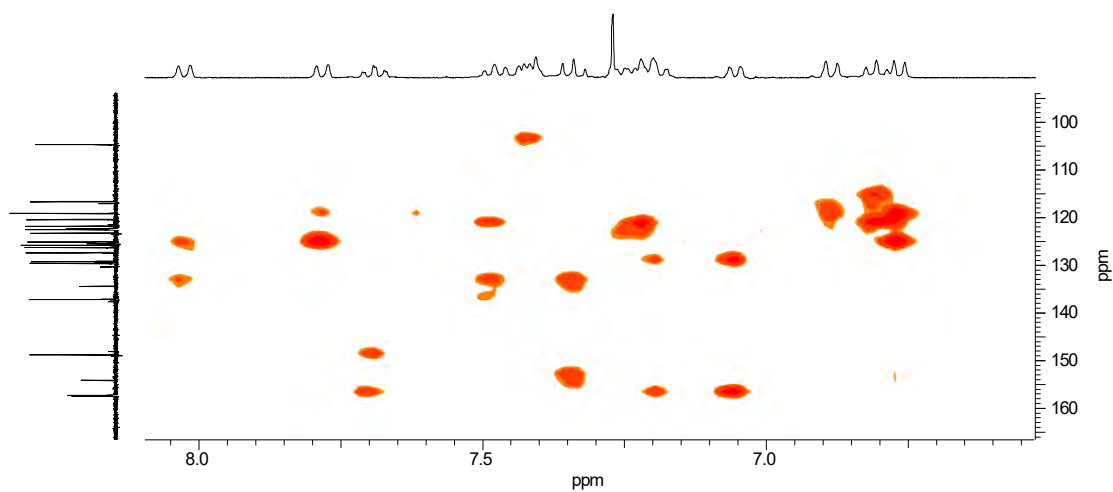


Figura 42. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L1.

4.1.1.8 Caracterização do composto 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L2)

O ligante L2 foi obtido a partir da reação entre os precursores P2 e P3 e variações observadas no número de onda das bandas de absorção (espectroscopia de IV) e nos valores de deslocamento químico (RMN ^1H e RMN ^{13}C) confirmam a formação de um novo composto orgânico. Em virtude de se utilizar o precursor P3 para a síntese dos ligantes L1 e L2, estes apresentam semelhanças estruturais observadas nos espectros de infravermelho e RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C).

O espectro de infravermelho do ligante L2 (Figura 43) apresenta as bandas características dos grupos funcionais presentes na estrutura proposta, tendo um espectro com perfil semelhante ao apresentado pelo ligante L1, diferindo principalmente pela ausência da banda característica de deformação axial de fenol (ν C-O), presente no ligante L1. A Figura 43 mostra o espectro de infravermelho e a Tabela 14 apresenta as principais bandas e atribuições para o ligante L2.

O espectro de infravermelho para o ligante L2 mostra a presença de bandas de deformação angular fora do plano de C-H (γ -CH) e de deformação angular do anel (β -anel) de heteroaromáticos (piridina) e aromáticos polinucleares. Os anéis aromáticos podem ser identificados também pelas bandas de deformação axial de C-H_{aromático} (3051 cm^{-1}) e de deformação axial de C=C e C=N (ν 1628 , 1589 , 1508 e 1435 cm^{-1}) do anel aromático. As bandas de deformação axial assimétrica e simétrica dos grupos metilenos (CH_2) são observadas em 2928 cm^{-1} e 2839 cm^{-1} , respectivamente. A banda de deformação axial assimétrica de C-O-C em 1269 cm^{-1} indica a presença de éter alifático. A região alargada entre 3100 e 3700 cm^{-1} é atribuída à deformação axial de O-H em ligação de hidrogênio intermolecular ou a água de hidratação presente no ligante, o qual é um óleo denso (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Algumas das bandas apresentadas pelo ligante L2 são semelhantes às observadas para o precursor P2 relatadas em trabalho realizado por Neves et al. (1995).

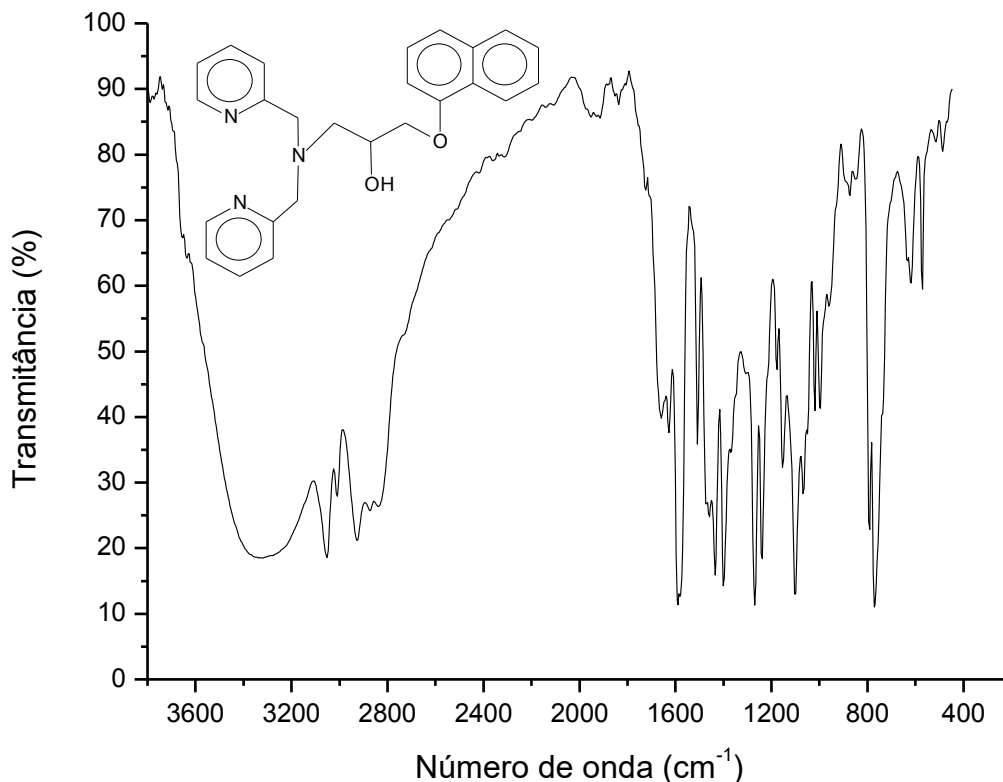


Figura 43. Espectro de infravermelho para o ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L2), obtido em filme.

Tabela 14. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L2), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3100-3700	v OH	1628, 1589, 1508, 1435	v C=C; v C=N
3051	v CH _{aromático}	1269	v _{as} C-O-C
2928	v _{as} CH ₂	1103	δ CH _{aromático}
2839	v _s CH ₂	791, 771	γ-CH ^a ; β-anel ^b

a= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; b= deformação do anel de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos.

Os espectros de RMN ¹H (Figura 44) e RMN ¹³C para o ligante L2, conforme o esperado, apresenta sinais com deslocamento químico semelhantes aos apresentados pelos precursores utilizados na sua síntese (P2 e P3), como também ao ligante L1, estruturalmente semelhante ao ligante L2. Na região mais desblindada do espectro de RMN ¹H do ligante L2 (Figura 44) observam-se os sinais atribuídos aos átomos de hidrogênio aromáticos (6,77 ppm a 8,56

ppm). Na região mais protegida do espectro de RMN ^1H observam-se os sinais dos átomos de hidrogênio alifáticos (2,96 ppm a 4,35 ppm). Os sinais em 3,97 ppm e 4,05-4,09 ppm são atribuídos aos átomos de hidrogênio metilênicos H_{13} e H_{14} , os quais possuem ambiente químico semelhante. Os átomos de hidrogênio H_{10} são observados em 4,05-4,09 ppm e 4,19 ppm. Observa-se ainda, na região alifática, dois duplos dupletos em 2,96 ppm e em 3,12 ppm atribuídos aos átomos de hidrogênio H_{12} . O átomo de hidrogênio alifático mais desprotegido é o H_{11} (4,34,28-4,35 ppm) em virtude de estar ligado ao átomo de carbono do álcool secundário (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Os sinais referentes aos átomos de hidrogênio aromáticos do α -naftol (H_2 , H_3 , H_4 , H_6 , H_7 , H_8 e H_9) estão de acordo com a literatura uma vez que são observados no espectro de RMN ^1H do propranolol (BECKER & LARIVE, 2008). O multipletto em 8,56 ppm é atribuído ao átomo de hidrogênio piridínico H_{19} . Em 6,77 ppm verifica-se o sinal referente ao átomo de hidrogênio aromático mais protegido (H_2). Não foi observado o sinal referente ao átomo de hidrogênio do álcool secundário (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A análise do espectro de RMN ^{13}C do ligante L2 mostra dezenove sinais para vinte e cinco átomos de carbono o que indica a ocorrência de equivalências magnéticas (Tabela 15). Observa-se duas equivalências magnéticas para os deslocamentos de 60,78 ppm (C_{13} e C_{14}), 122,42 ppm (C_{18}), 123,43 ppm (C_{16}), 136,88 ppm (C_{17}), 149,21 ppm (C_{19}) e 157,28 ppm (C_{15}). Os átomos de carbono aromáticos apresentam deslocamento químico entre 104,87 ppm e 157,28 ppm e os alifáticos entre 58,20 ppm e 70,27 ppm. O sinal em 157,28 ppm é atribuído ao átomo de carbono C_{15} que faz ligação com o átomo de nitrogênio do anel piridínico. O átomo de carbono aromático C_1 , ligado ao átomo de oxigênio do éter alifático, apresenta deslocamento químico em 154,65 ppm (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). As atribuições detalhadas dos sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e de RMN ^{13}C do ligante L2, apresentados na Tabela 15, foram realizadas a partir da análise conjunta dos dados obtidos pelos mapas de correlação HMQC (Figuras 45, 46 e 47) e HMBC (Figuras 48, 49 e 50).

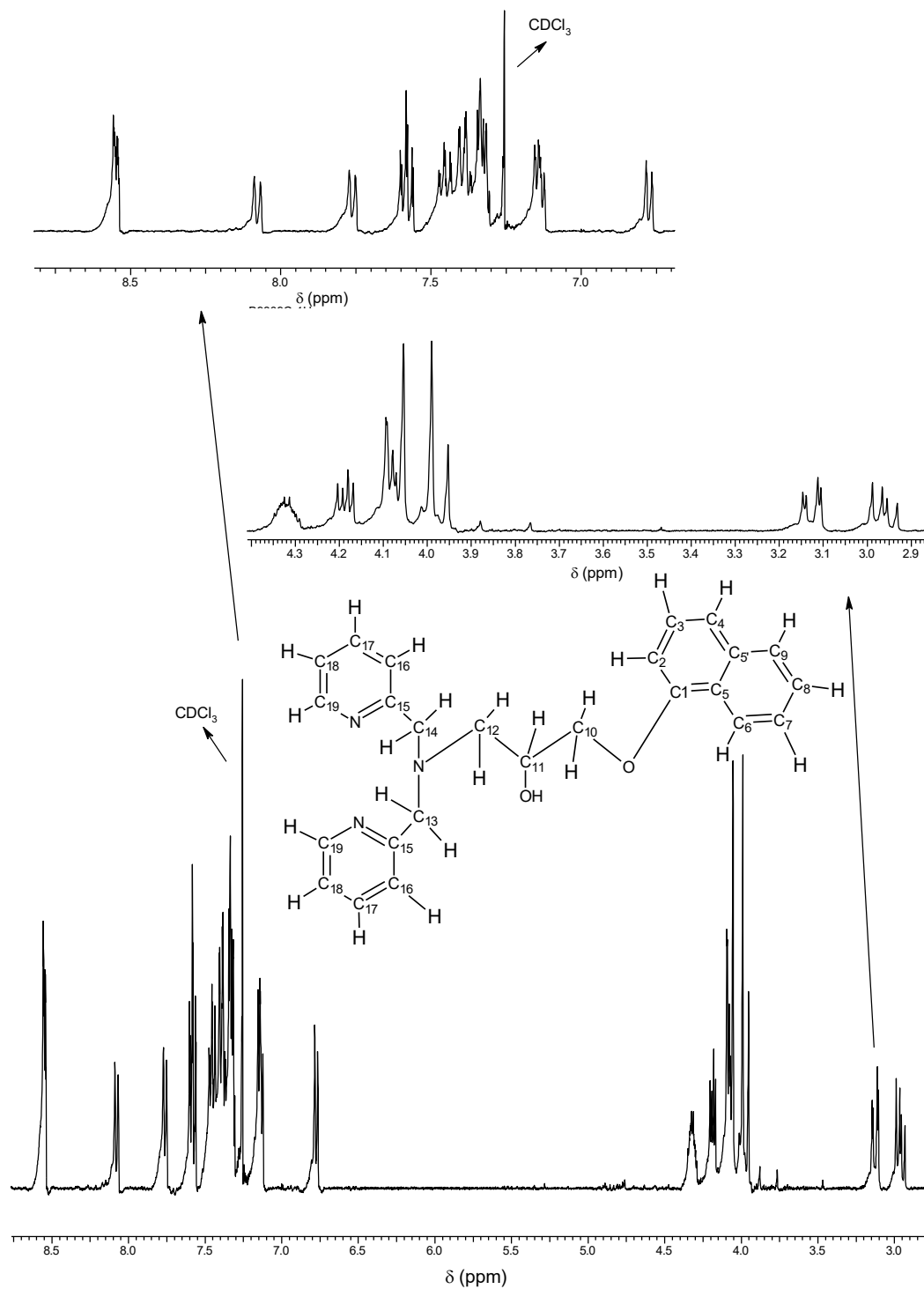


Figura 44. Espectro de RMN ^1H do ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L2), obtido em CDCl_3 .

Tabela 15. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do ligante L2 e as correlações observadas no espectro de HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) e HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$).

Atribuição	HMQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
5'	125,78	-	-	-
5	134,64	-	-	-
1	154,65	-	-	-
15	157,28	-	-	-
CH				
11	67,99	4,28-4,35	-	-
2	104,87	6,77 (d)	C ₁ , C ₃	C ₄
4	120,50	7,39 (dd)	-	C ₂
6	122,26	8,09 (d)	C ₅	C ₈
18	122,42	7,12-7,16 (m)	-	C ₁₆
16	123,43	7,12-7,16 (m)	-	C ₁₈
3	125,26	7,32-7,36 (m)	-	C ₁
7	126,07	7,46 (t)	C ₆	C ₅
8	126,29	7,46 (t)	-	C ₆
9	127,59	7,76 (d)	C _{5'}	C ₄
17	136,88	7,58 (t)	-	C ₁₅ , C ₁₉
19	149,21	8,56 (m)	-	C ₁₇
CH₂				
12	58,20	2,96 (dd)	-	C ₁₀ , C ₁₃ , C ₁₄
		3,12 (dd)	-	-
13	60,78	3,97 (d)	C ₁₅	C ₁₂ , C ₁₄ , C ₁₆
		4,05-4,09 (m)	C ₁₅	C ₁₂ , C ₁₄ , C ₁₆
14	60,78	3,97 (d)	C ₁₅	C ₁₂ , C ₁₃ , C ₁₆
		4,05-4,09 (m)	C ₁₅	C ₁₂ , C ₁₃ , C ₁₆
10	70,27	4,05-4,09 (m)	-	-
		4,19 (dd)	-	-

d=dupletto; dd=duplo dupletto; m=multiplato; s=simpleto; t=tripleto.

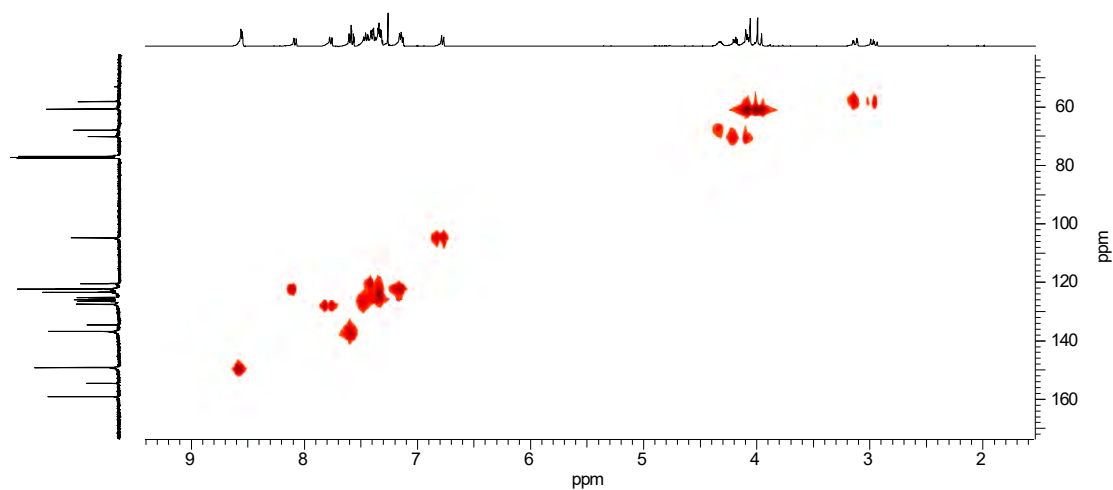


Figura 45. Mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L2.

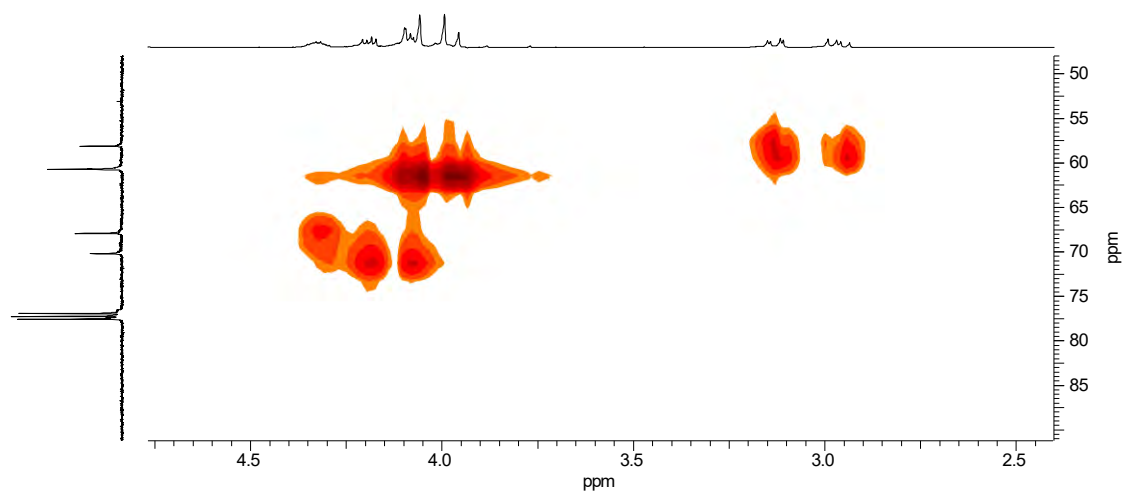


Figura 46. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L2.

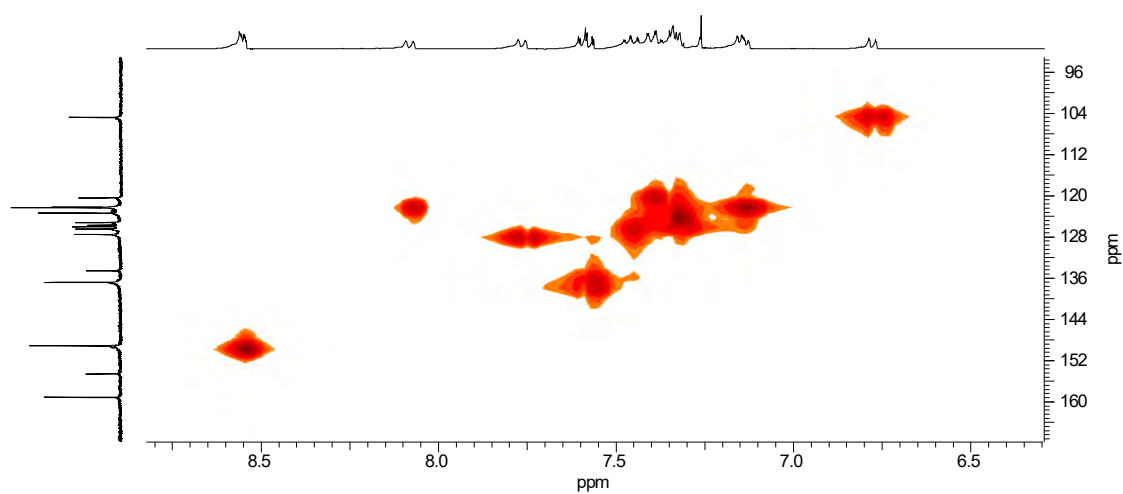


Figura 47. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L2.

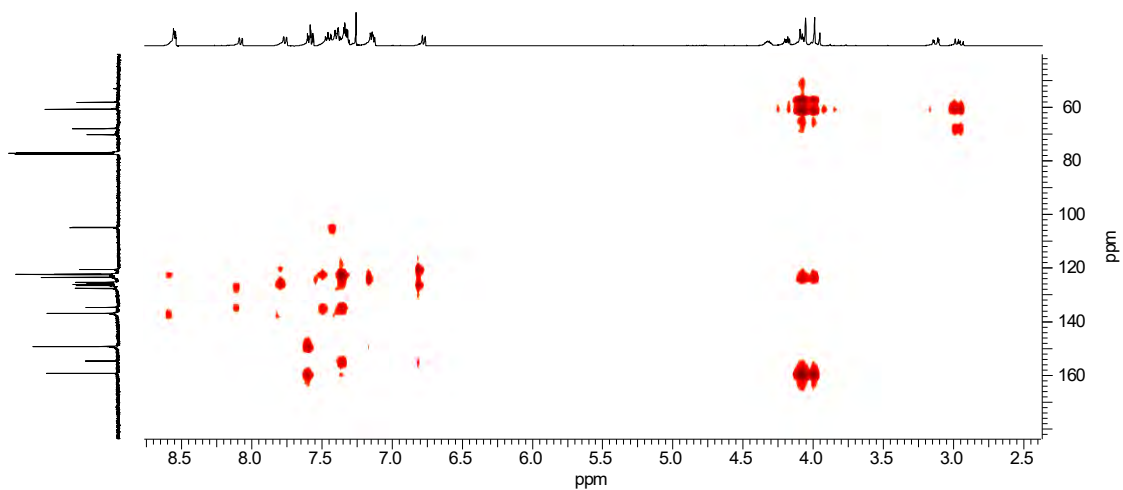


Figura 48. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L2.

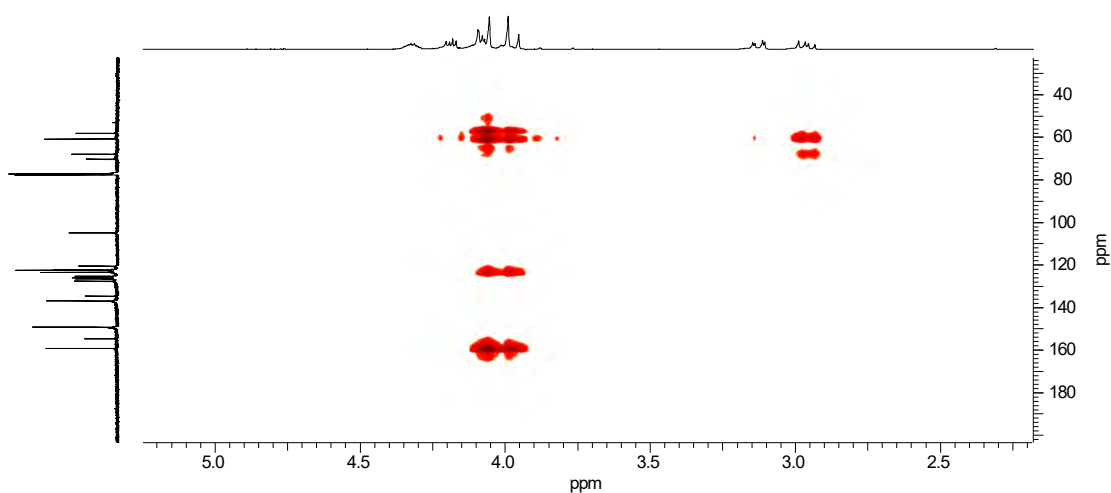


Figura 49. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L2.

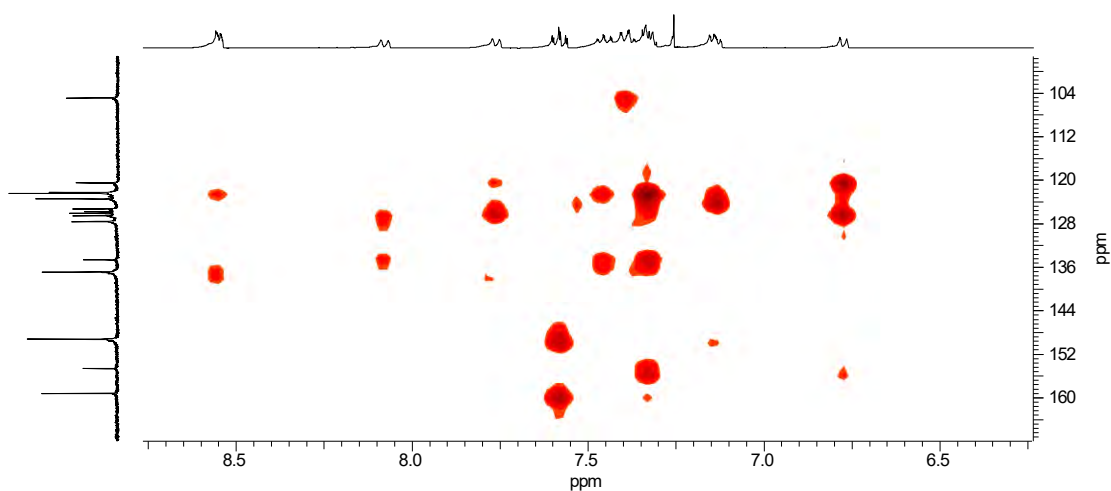


Figura 50. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L2.

4.1.1.9. Caracterização do composto 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3)

O ligante L3, isômero de posição do ligante L1, foi sintetizado a partir da reação entre os precursores P1 e P4. Observam-se semelhanças espectrais entre o ligante L3 e seus precursores como também com o ligante L1. Entretanto verifica-se para o ligante L3 variações nos valores de número de onda (espectroscopia de infravermelho) e de deslocamento químico (RMN ^1H e RMN ^{13}C), os quais confirmam a formação de um novo composto orgânico. Embora isômeros, L1 é um óleo denso enquanto L3 é um sólido cristalino. O espectro de infravermelho do ligante L3 e as principais bandas são apresentados respectivamente na Figura 51 e Tabela 16.

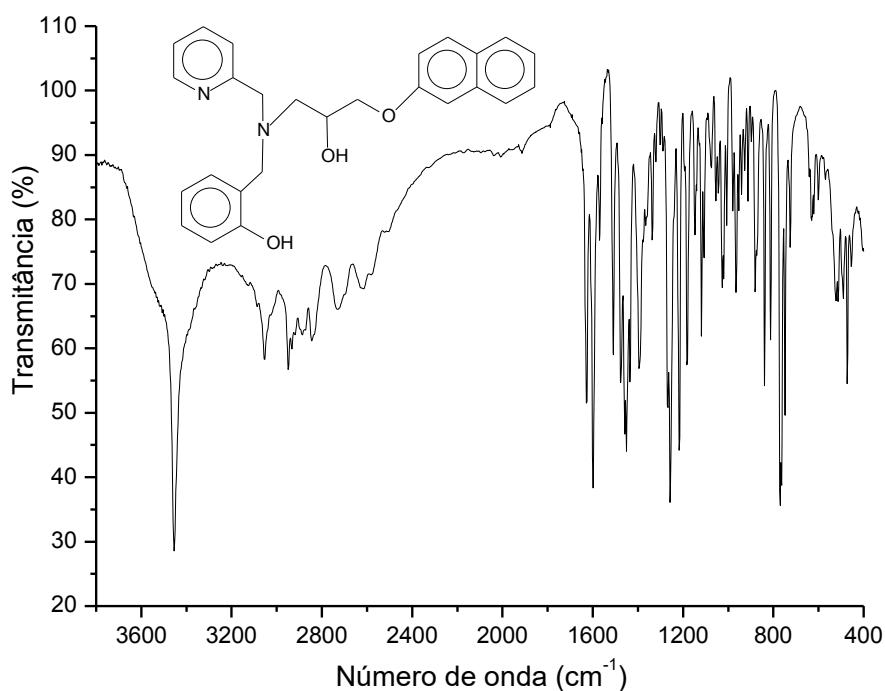


Figura 51. Espectro de infravermelho para o ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3), obtido em pastilha de KBr.

O espectro de infravermelho para o ligante L3 (Figura 51) mostra bandas em 839 cm^{-1} , 763 cm^{-1} e 748 cm^{-1} , características de anel aromático polinuclear e de heteroaromáticos 1,2-dissubstituídos (piridina). Verificam-se também bandas de deformação axial de $\text{C-H}_{\text{aromático}}$ (3053 cm^{-1}), de deformação axial de $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}=\text{N}$ (ν 1628 , 1599 , 1508 , 1477 e 1395 cm^{-1}) e de deformação angular de $\text{C-H}_{\text{aromático}}$ (δ 1182 e 1217 cm^{-1}) características de anéis aromáticos (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). As bandas de deformação axial assimétrica (ν_{as} 2949 cm^{-1}) e simétrica (ν_{s} 2845 cm^{-1}) de C-H alifático confirmam a presença do grupo metileno (CH_2). Em 1258 cm^{-1} e 1267 cm^{-1} observam-se respectivamente os sinais referentes a deformação axial de C-O de fenol e C-O-C de éter alifático. O sinal de deformação axial do grupo hidroxila (OH) de álcool e fenol é observado em 3455 cm^{-1} (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Tabela 16. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3455	ν OH	1267	ν_{as} C-O-C
3053	ν $\text{CH}_{\text{aromático}}$	1258	ν C-O^{a}
2949	ν_{as} CH_2	1217, 1182	δ $\text{CH}_{\text{aromático}}$
2845	ν_{s} CH_2	839, 763, 748	γ - CH^{b} ; β -anel ^c
1628, 1599, 1508, 1477, 1395	ν $\text{C}=\text{C}$; ν $\text{C}=\text{N}$		

a= deformação axial de C-O de fenol; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; c= deformação de aromáticos polinucleares e do anel heteroaromático.

A Tabela 17 mostra o resultado de análise elementar (C, H e N) a qual confirma a composição do ligante L3, que apresenta em sua constituição vinte e seis átomos de carbono, vinte e seis átomos de hidrogênio, três átomos de oxigênio e dois átomos de nitrogênio, resultando em um peso molecular de $414,50\text{ g.mol}^{-1}$.

Tabela 17. Dados de análise elementar (C, H e N) para o ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3).

P6	%C	%H	%N
Experimental	75,49	6,01	6,39
Calculado	75,34	6,32	6,75

A estrutura de raios X apresentada na Figura 52 mostra que o ligante L3 possui em sua estrutura o naftol (C₁₇ a C₂₆), proveniente do precursor P4. Observa-se que as ligações do éter alifático C(17)-O(1)-C(16) apresenta ângulo de 118,1(2)°. As ligações C(15)-O(3)-H(3O) do álcool secundário apresenta ângulo de 107(2)°. Observa-se também na estrutura do ligante L3 os átomos de nitrogênio amínico (N₁) e piridínico (N₂) e a hidroxila do fenol (O₂), originários do precursor P1. Análise dos dados cristalográficos e de CHN mostram concordância e confirmam a estrutura do ligante L3. Os parâmetros cristalográficos e os principais comprimentos e ângulos de ligações do ligante L3 são apresentados, respectivamente, nas Tabelas 18 e 19.

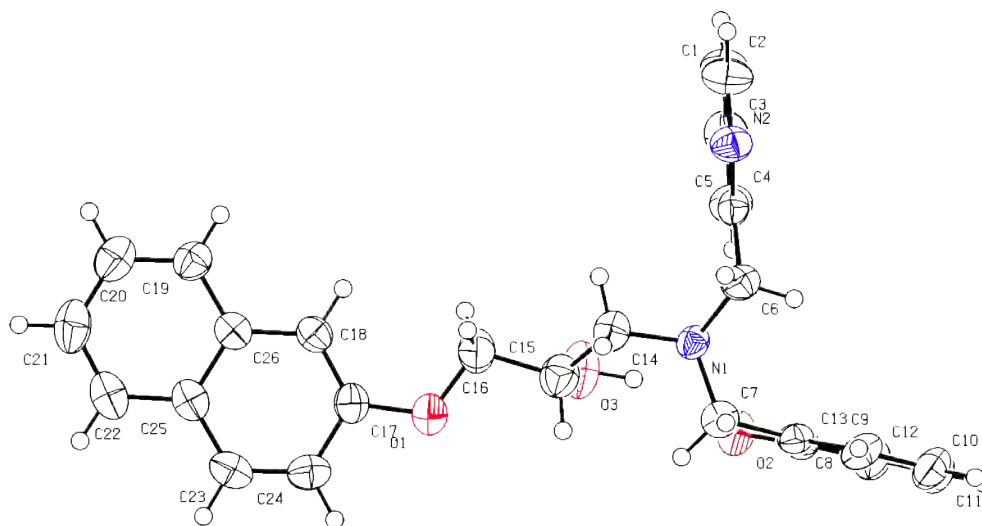


Figura 52. Estrutura de raios X do ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3).

Tabela 18. Parâmetros cristalográficos para o ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3).

Parâmetros	Dados
Fórmula empírica	C ₂₆ H ₂₆ N ₂ O ₃
Peso molecular	414,49
Temperatura	295(2) K
Comprimento de onda	0.71073 Å
Sistema Cristalino, grupo especial	Triclínico, P-1
Parâmetros da cela	a = 7.9720(16) Å α = 78.96(3) b = 8.5344(17) Å β = 79.30(3) c = 16.974(3) Å γ = 69.18(3)
Volume da cela	1050,7(4) Å ³
Z, Densidade calculada	1,310 Mg/m ³
Coefficiente de absorção	0,086 mm ⁻¹
F(000)	440
Dimensões do crustak	0.49 x 0.27 x 0.16 mm
Intervalo de θ na coleta	2,87 a 25°
Intervalo hkl na coleta	-9 ≤ h ≤ 9, -10 ≤ k ≤ 10, -20 ≤ l ≤ 20
Reflexões coletadas	16769
Reflexões independentes	3686 [R(int) = 0.0917]
Teta = 25.00°	99,5%
Fatores de transmissão máx. e mín.	0,9864 e 0,9591
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Dados/parâmetros	3686/0/288
GOF	1,005
Índices finais R [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0556, wR2 = 0.1128
Índices R (todos os dados)	R1 = 0.1261, wR2 = 0.1310
Picos máx. e mín.	0.333 e -0.248 e.Å ⁻³

Tabela 19. Principais comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) para o ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3).

Comprimento de ligações (Å)		ângulos de ligações (°)	
O(2)-C(13)	1,363(3)	C(13)-O(2)-H(2O)	113(2)
O(2)-H(2O)	0,88(3)	C(15)-O(3)-H(3O)	107(2)
O(3)-C(15)	1,406(3)	C(17)-O(1)-C(16)	118,1(2)
O(3)-H(3O)	0,94(4)	C(6)-N(1)-C(7)	112,04(18)
O(1)-C(17)	1,365(3)	C(6)-N(1)-C(14)	111,21(18)
O(1)-C(16)	1,378(3)	C(7)-N(1)-C(14)	112,45(19)
N(1)-C(6)	1,448(3)	C(5)-N(2)-C(1)	117,4(2)
N(1)-C(7)	1,452(3)	O(1)-C(17)-C(24)	113,4(2)
N(1)-C(14)	1,452(3)	N(2)-C(5)-C(4)	121,4(2)
C(14)-C(15)	1,479(3)		
C(14)-H(14A)	0,9700		
C(14)-H(14B)	0,9700		
C(15)-C(16)	1,502(4)		
C(15)-H(15)	0,9800		

O espectro de RMN ^1H do ligante L3 (Figura 53) mostra a presença de átomos de hidrogênio alifáticos (2,91 ppm a 4,28 ppm) e aromáticos (6,79 ppm a 8,61 ppm). Os átomos de hidrogênio aromáticos H_1 e H_3 , os quais encontram-se em posição *orto* em relação ao substituinte do anel aromático do β -naftol, apresentam-se na mesma região de deslocamento químico (7,07-7,10 ppm). Em 8,61 ppm verifica-se o sinal do átomo de hidrogênio piridínico H_{19} . O multiplete em 4,25-4,28 ppm é atribuído ao átomo de hidrogênio H_{11} . Em 2,91 ppm observa-se um multiplete referente aos átomos de hidrogênio H_{12} . Os átomos de hidrogênio metilênicos H_{13} , H_{14} e H_{10} são observados na região entre 3,78 ppm e 4,11 ppm. Não foram observados os sinais referentes aos átomos de hidrogênio do álcool secundário e do fenol (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

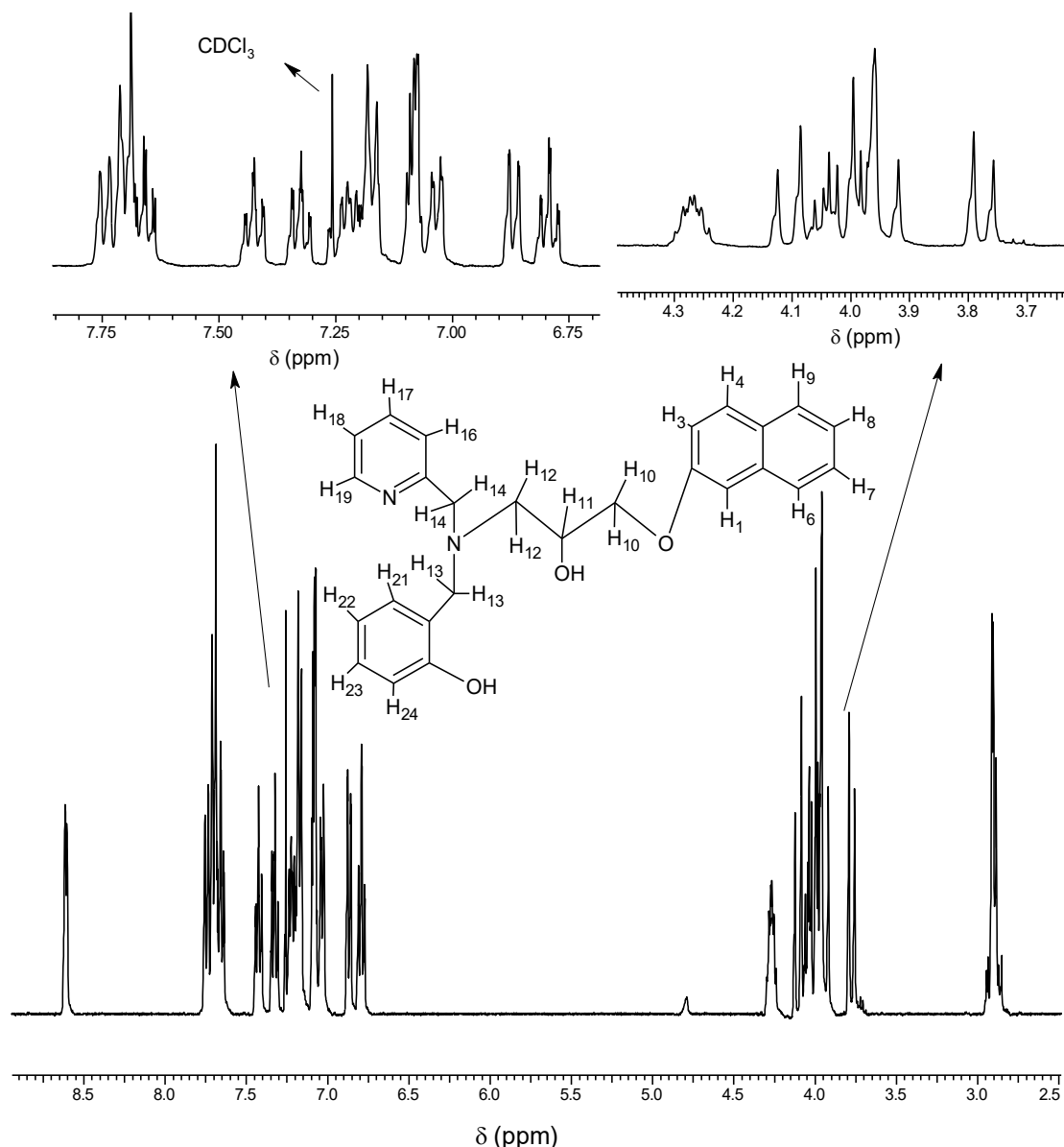


Figura 53. Espectro de RMN ^1H do ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3), obtido em CDCl_3 .

Observa-se no espectro de RMN ^{13}C do ligante L3 (Figura 54) vinte e seis sinais para vinte e seis átomos de carbono. Os átomos de carbono alifáticos apresentam deslocamento químico entre 57,09 ppm e 70,34 ppm. Os sinais referentes aos átomos de carbono aromáticos foram observados entre 106,97 ppm e 157,57 ppm. Os átomos de carbono que fazem ligação com o átomo de nitrogênio piridínido são observados em 148,92 ppm (C_{19}) e 157,40 ppm (C_{15}). O átomo de carbono ligado ao átomo de oxigênio do fenol apresenta deslocamento químico de 157,57 ppm (C_{25}). Em 156,58 ppm observa-se o sinal atribuído ao átomo de carbono C_2 . (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). A

elucidação estrutural do ligante L3 também foi realizada a partir da análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMQC (Figuras 55, 56 e 57) e HMBC (Figuras 58, 59 e 60). As atribuições referentes aos átomos de carbono e hidrogênio são mostradas na Tabela 20. A análise dos resultados de infravermelho, de ressonância magnética nuclear, CHN e de difração de raios X mostram que o ligante L3 foi obtido com elevado teor de pureza.

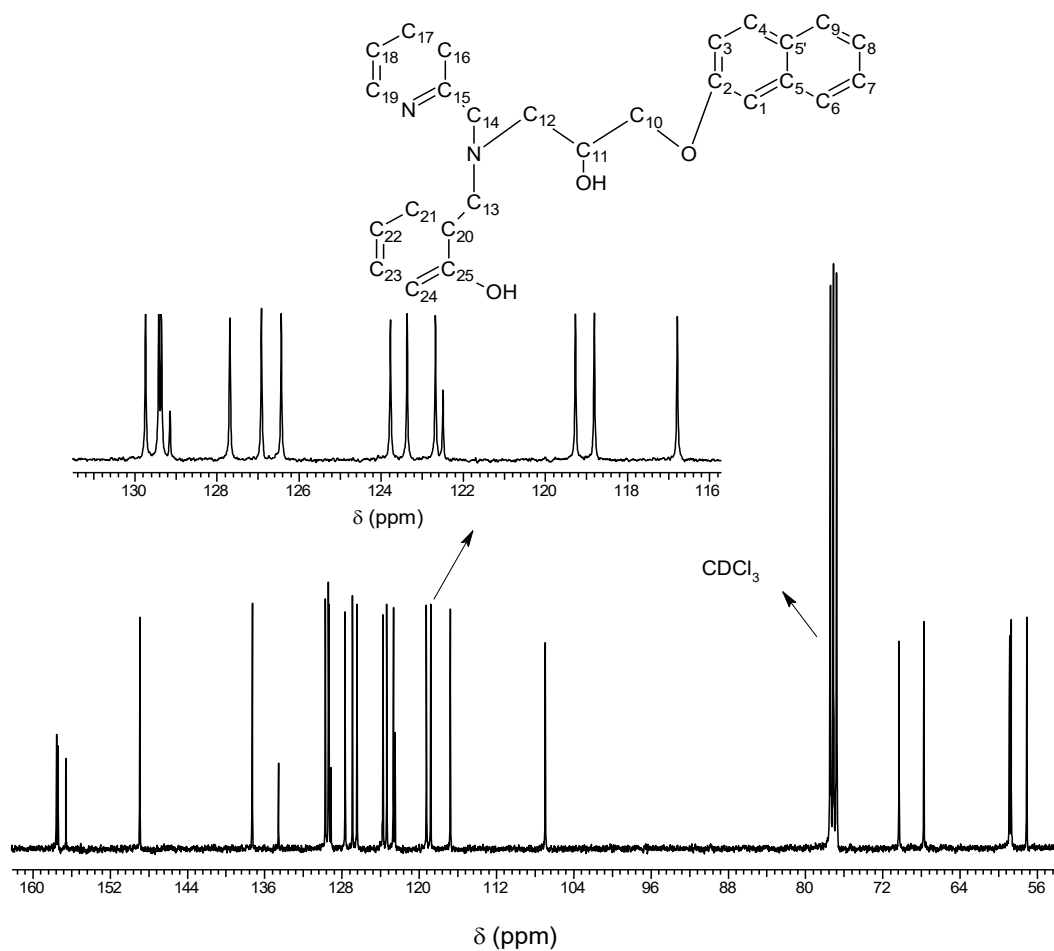


Figura 54. Espectro de RMN ^{13}C do ligante 1-[2-hidroxi-benzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L3), obtido em CDCl_3 .

Tabela 20. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do ligante L3 e as correlações observadas no espectro de HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) e HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$).

Atribuição	HMQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
20	122,50	-	-	-
5'	129,19	-	-	-
5	134,37	-	-	-
2	156,58	-	-	-
15	157,40	-	-	-
25	157,57	-	-	-
CH				
11	67,75	4,25-4,28 (m)	-	-
1	106,97	7,07-7,10 (m)	-	C ₃ , C ₆
24	116,67	6,87 (dd)	-	-
3	118,81	7,07-7,10 (m)	-	-
22	119,27	6,79 (t)	-	C ₂₀ , C ₂₄
18	122,68	7,20-7,24 (t)	-	C ₁₆
8	123,37	7,32 (t)	C ₇	C _{5'}
16	123,77	7,17 (d)	C ₁₅	C ₁₈
7	126,42	7,42 (t)	C ₆	C ₅
9	126,92	7,74 (d)	-	C ₅
6	127,69	7,68-7,71 (m)	C ₅	C ₁ , C ₈
23	129,36	7,02-7,04 (m)	-	C ₂₁
21	129,42	7,02-7,04 (m)	-	C ₂₅ , C ₂₃
4	129,74	7,17(d)	C _{5'}	-
17	137,29	7,65 (dd)	-	C ₁₉
19	148,92	8,61(m)	-	C ₁₇
CH₂				
12	57,09	2,91 (m)	-	C ₁₃ , C ₁₄
14	58,71	3,92-4,00 (m)	-	C ₁₂
		4,11 (d)	C ₁₅	C ₁₂
13	58,88	3,78 (d)	C ₂₀	C ₁₂ , C ₂₁ , C ₂₅
		3,92-4,00 (m)	C ₂₀	C ₁₂ , C ₂₁ , C ₂₅
10	70,34	3,92-4,00 (m)	-	C ₁₂
		4,02-4,06 (m)	C ₁₁	C ₁₂

d=duplete; dd=duplo duplete; m=multiplato; s=simpleto; t=tripleto.

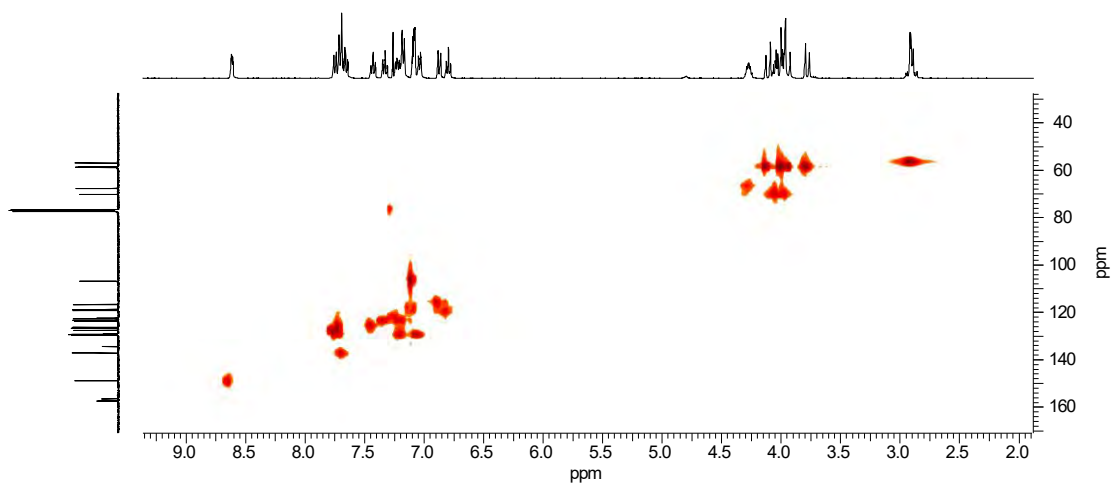


Figura 55. Mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L3.

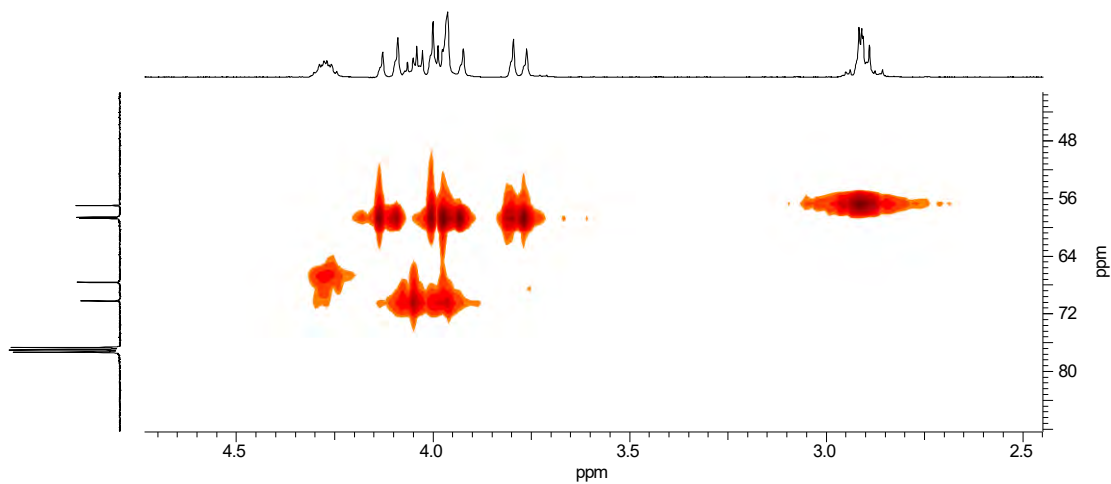


Figura 56. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L3.

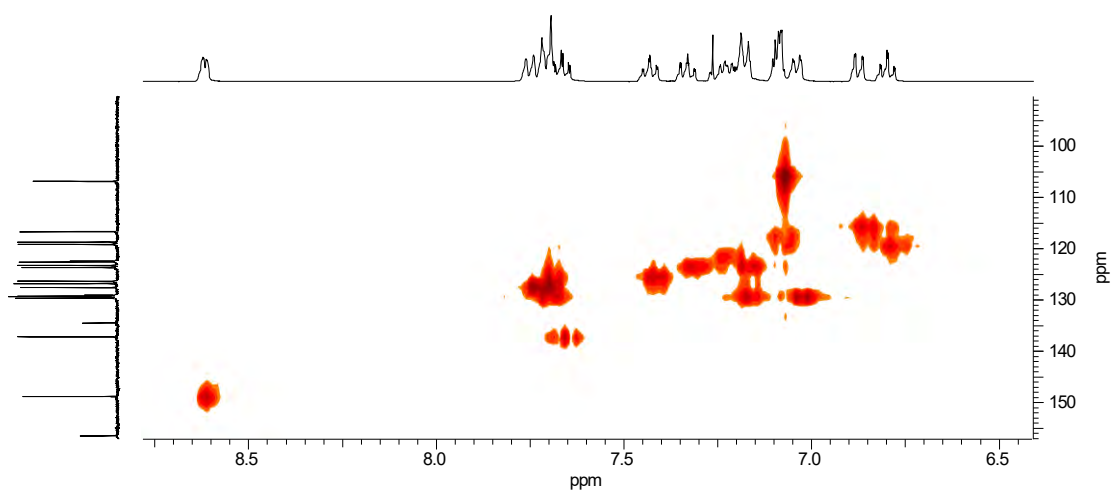


Figura 57. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L3.

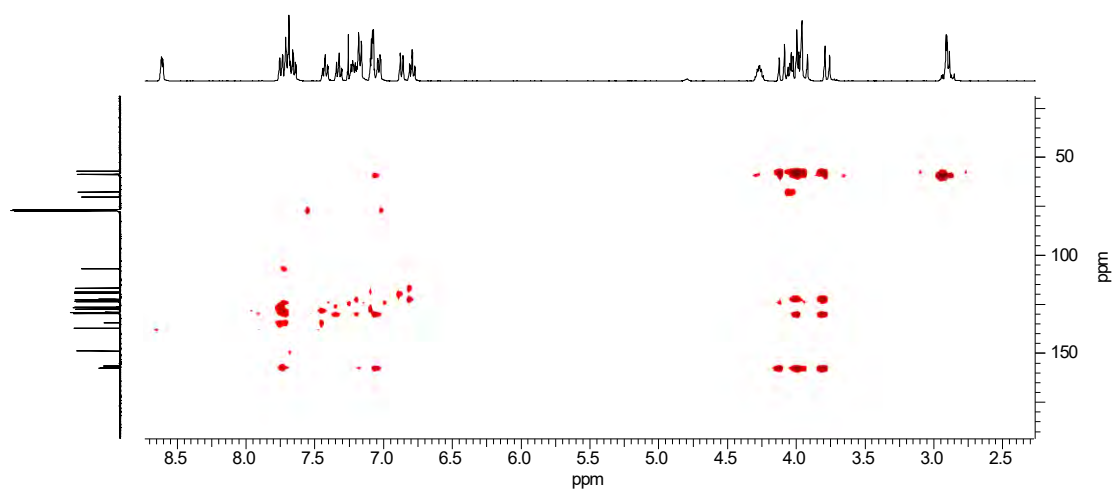


Figura 58. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L3.

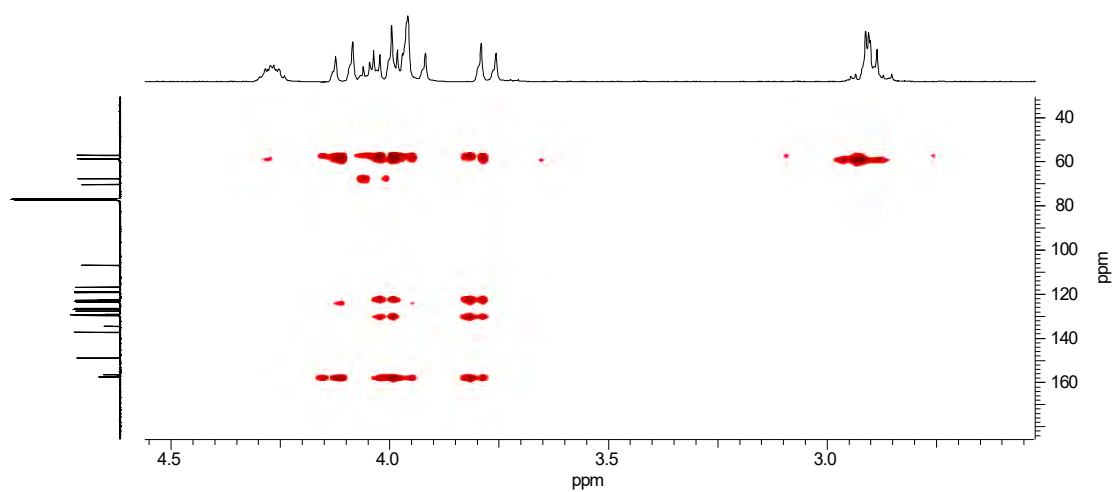


Figura 59. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L3.

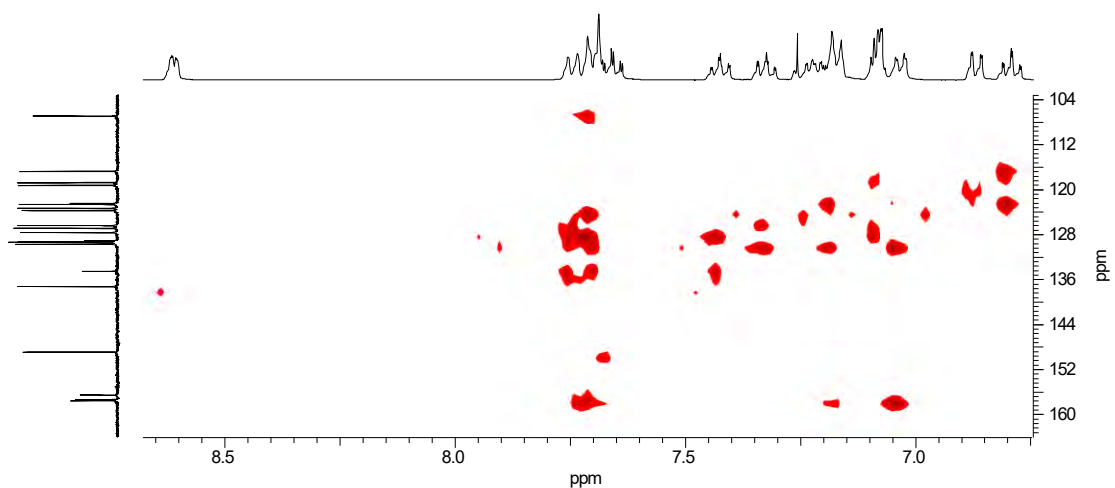


Figura 60. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L3.

4.1.1.10. Caracterização do composto 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4)

O ligante L4 foi obtido a partir da reação entre o precursor P2 e P4. O ligante L4 é estruturalmente semelhante ao ligante L2, diferindo apenas na posição do substituinte do anel aromático do naftol. Observam-se semelhanças espectrais entre o ligante L4 e seus precursores como também com o ligante L2 (isomero α). Entretanto as análises de Infravermelho e de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C) mostraram variações nos valores de número de onda (cm^{-1}) e de deslocamento químico (ppm), os quais confirmam a formação de um novo composto orgânico. A Figura 61 mostra o espectro de infravermelho e a Tabela 21 apresenta as principais bandas e atribuições para o ligante L4.

Observam-se no espectro de infravermelho do ligante L4 a presença de bandas características de anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico e de aromáticos polinucleares (Tabela 21). As bandas de deformação axial assimétrica e simétrica do grupo metileno (CH_2) são observadas em 2928 cm^{-1} e 2835 cm^{-1} , respectivamente. O sinal de deformação axial assimétrica de C-O-C em 1258 cm^{-1} indica a presença de éter alifático. A região alargada entre $2800\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ é atribuída à deformação axial de O-H em ligação de hidrogênio intermolecular ou a água de hidratação presente no ligante, o qual é um óleo denso (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Bandas referentes ao anel piridínico também foram relatadas para o precursor P2 em trabalho realizado por Neves *et al.* (1995).

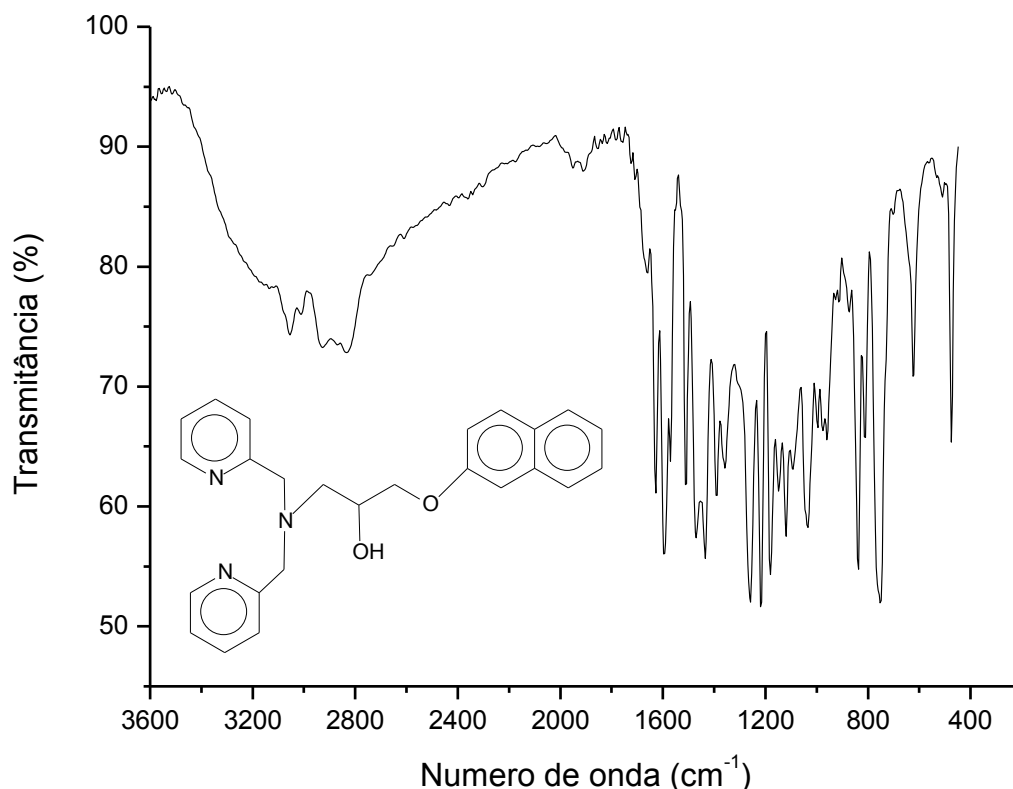


Figura 61. Espectro de infravermelho para o ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4), obtido em filme.

Tabela 21. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
2800-3300	v OH	1628, 1597, 1512, 1469	v C=C; v C=N
3055	v CH _{aromático}	1258	v _{as} C-O-C
2928	v _{as} CH ₂	1180, 1219	δ CH _{aromático}
2835	v _s CH ₂	837, 752	γ-CH ^a ; β-anel ^b

a= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; b= deformação de aromáticos polinucleares e do anel heteroaromático.

O espectro de RMN ¹H do ligante L4 (Figura 62) mostra sinais referentes aos átomos de hidrogênio aromáticos entre 7,11 ppm e 8,54 ppm e alifáticos entre 2,89 ppm e 4,26 ppm. Os sinais em 2,89 ppm e 3,04 ppm são atribuídos aos átomos de hidrogênio metilênicos H₁₂. Em 3,92-3,96 ppm e 4,01-4,05 ppm observam-se os sinais referentes aos átomos de hidrogênio metilênicos H₁₃ e H₁₄, os quais possuem ambiente químico semelhante. Os átomos de hidrogênio

H₁₀ são observados em 4,01-4,05 ppm e 4,08-4,12 ppm na forma de multipletos. O átomo de hidrogênio alifático mais desprotegido é o H₁₁ (4,21-4,26 ppm) em virtude de estar ligado ao átomo de carbono do álcool secundário. Observa-se um duplete em 8,54 ppm atribuído ao átomo de hidrogênio piridínio H₁₉. Os átomos de hidrogênio aromáticos H₁ e H₃, os quais encontram-se em posição *orto* em relação ao substituinte do anel aromático do β-naftol, apresentam-se na mesma região de deslocamento químico (7,11 ppm). Não foi observado o sinal referente ao átomo de hidrogênio do álcool secundário (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

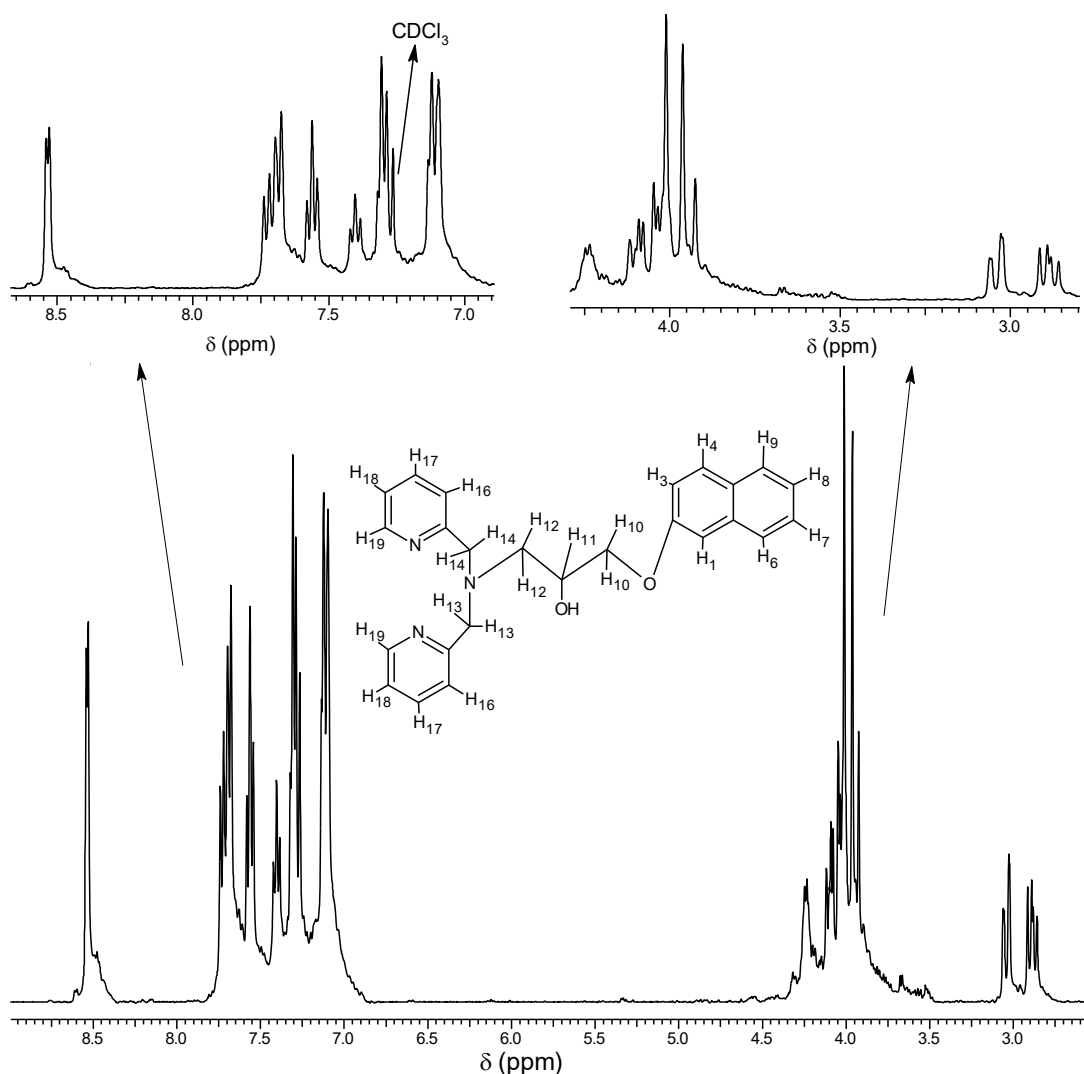


Figura 62. Espectro de RMN ¹H do ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4), obtido em CDCl₃.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 63) do ligante L4 mostra dezenove sinais para vinte e cinco átomos de carbono o que indica a ocorrência de equivalências magnéticas. Observam-se duas equivalências magnéticas para os deslocamentos químicos de 60,73 ppm (C_{13} e C_{14}), 122,42 ppm (C_{18}), 123,82 ppm (C_{16}), 136,88 ppm (C_{17}), 149,18 ppm (C_{19}) e 159,25 ppm (C_{15}). Os átomos de carbono aromáticos apresentam deslocamento químico entre 106,88 ppm e 159,25 ppm e os alifáticos entre 58,41 ppm e 70,42 ppm. Os sinais referentes aos átomos de carbono que fazem ligação com o átomo de nitrogênio piridínico são observados em 159,25 ppm (C_{15}) e 148,18 ppm (C_{19}). O sinal em 156,99 ppm é atribuído ao átomo de carbono aromático C_2 que faz ligação com o átomo de oxigênio do éter. A estrutura do ligante L4 foi elucidada a partir das análises dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e pelos mapas de correlação HMQC (Figuras 64, 65 e 66) e HMBC (Figuras 67, 68 e 69). As atribuições referentes aos átomos de carbono e hidrogênio do ligante L4 são apresentadas na Tabela 22.

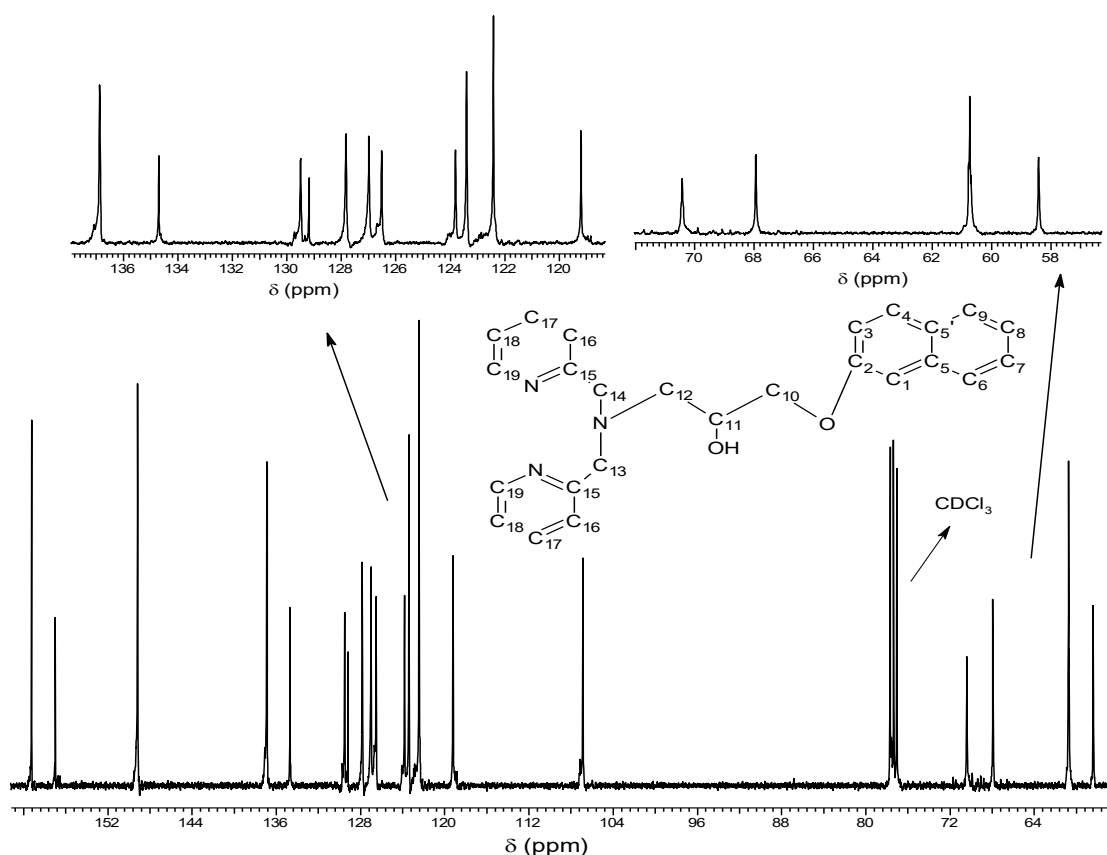


Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C do ligante 1-bis(2-piridilmetil)amino-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (L4), em CDCl_3 .

Tabela 22. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do ligante L4 e as correlações observadas no espectro de HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) e HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$).

Atribuição	HMQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
5'	129,19	-	-	-
5	134,71	-	-	-
2	156,99	-	-	-
15	159,25	-	-	-
CH				
11	67,94	4,21-4,26 (m)	-	-
1	106,88	7,11 (d)	C ₂	C ₃
3	119,21	7,11 (d)	C ₂ , C ₄	-
18	122,42	7,11 (d)	C ₁₉	C ₁₆
8	123,41	7,26-7,31(m)	-	C _{5'}
16	123,82	7,26-7,31(m)	C ₁₅ , C ₁₇	C ₁₈
7	126,52	7,40 (t)	-	C ₅ , C ₉
9	127,00	7,40 (t)	-	-
6	127,83	7,68-7,74 (m)	C ₅	C ₁ , C ₈
4	129,50	7,68-7,74 (m)	-	C ₂ , C ₉
17	136,88	7,56 (t)	-	C ₁₅ , C ₁₉
19	149,18	8,54 (d)	C ₁₈	C ₁₇
CH₂				
12	58,41	2,89 (m)	-	C ₁₀ , C ₁₁ , C ₁₃ , C ₁₄
		3,04 (dd)	-	C ₁₃ , C ₁₄ ,
14	60,73	3,92-3,946 (m)	C ₁₅	C ₁₂ , C ₁₃ , C ₁₆
		4,01-4,05 (m)	C ₁₅	C ₁₂ , C ₁₃ , C ₁₆
13	60,73	3,92-3,946 (m)	C ₁₅	C ₁₂ , C ₁₄ , C ₁₆
		4,01-4,05 (m)	C ₁₅	C ₁₂ , C ₁₄ , C ₁₆
10	70,42	4,01-4,05 (m)	-	-
		4,08-4,12 (m)	C ₁₁	-

d=duplete; dd=duplo duplete; m=multiplato; s=simpleto; t=tripleto.

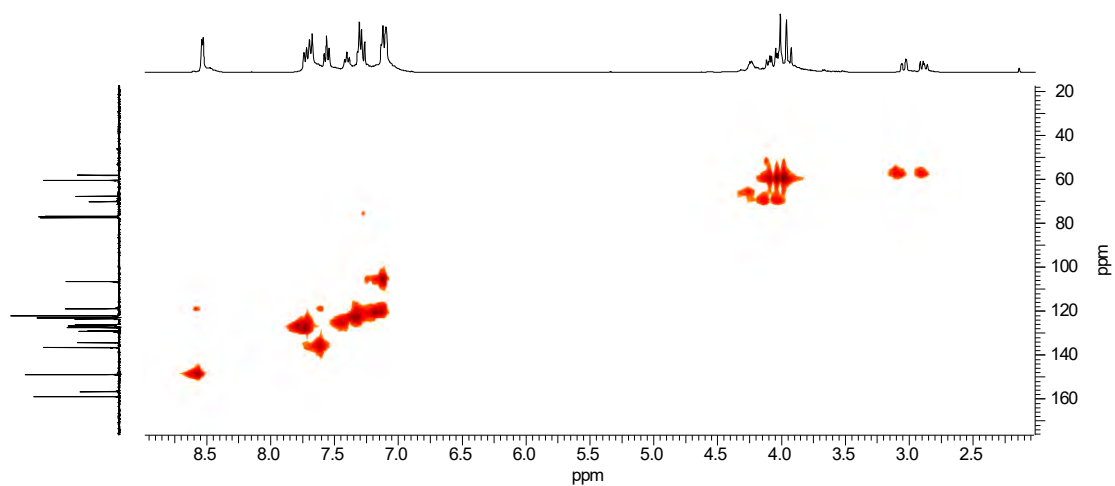


Figura 64. Mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L4.

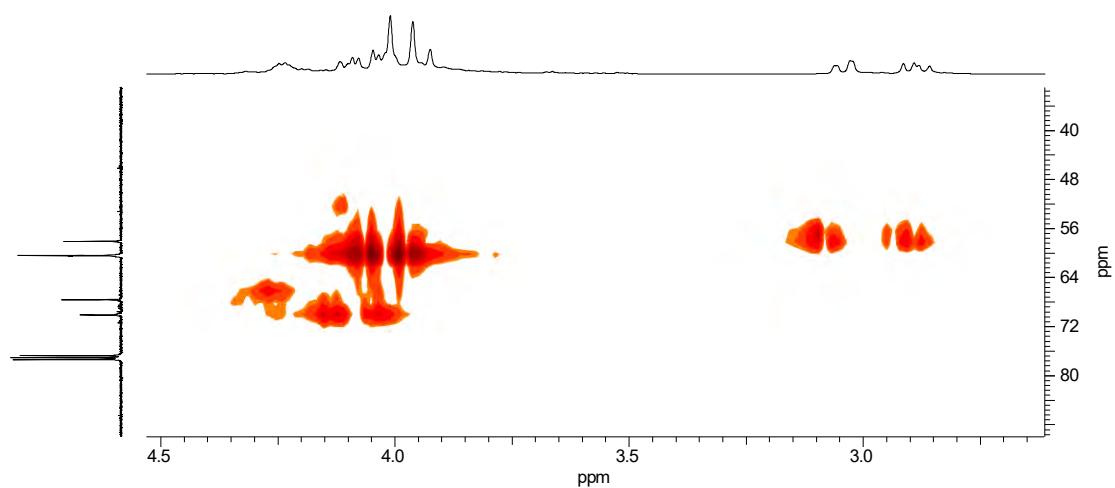


Figura 65. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L4.

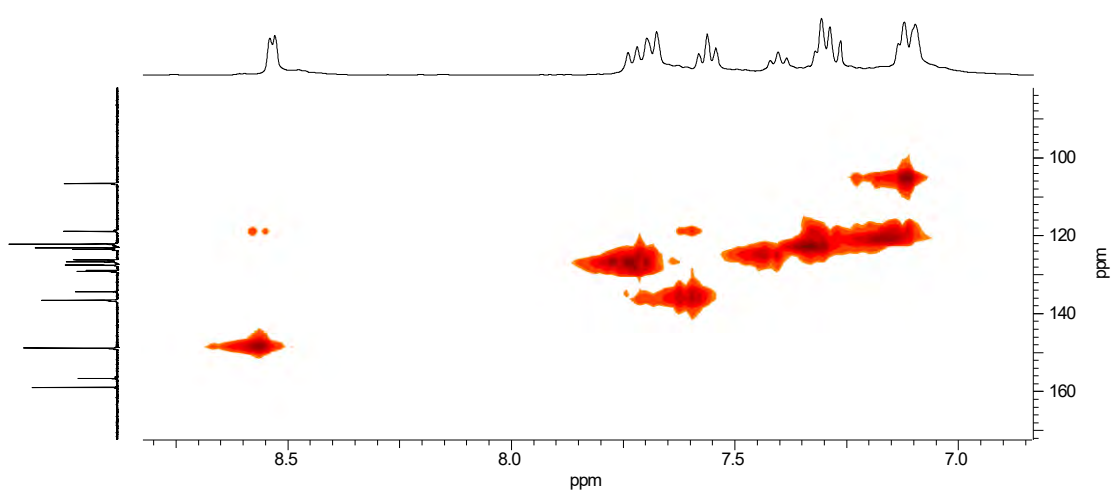


Figura 66. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMQC do composto L4.

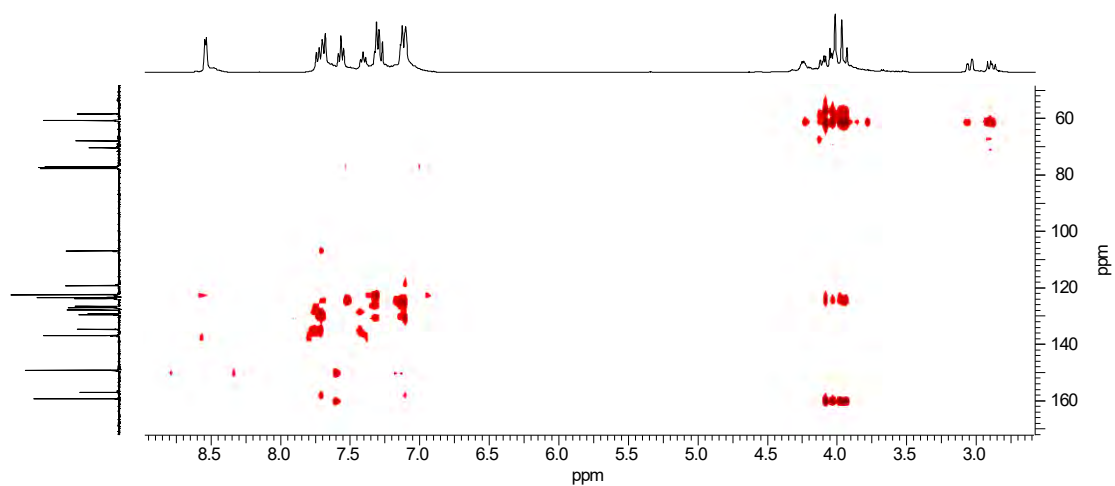


Figura 67. Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L4.

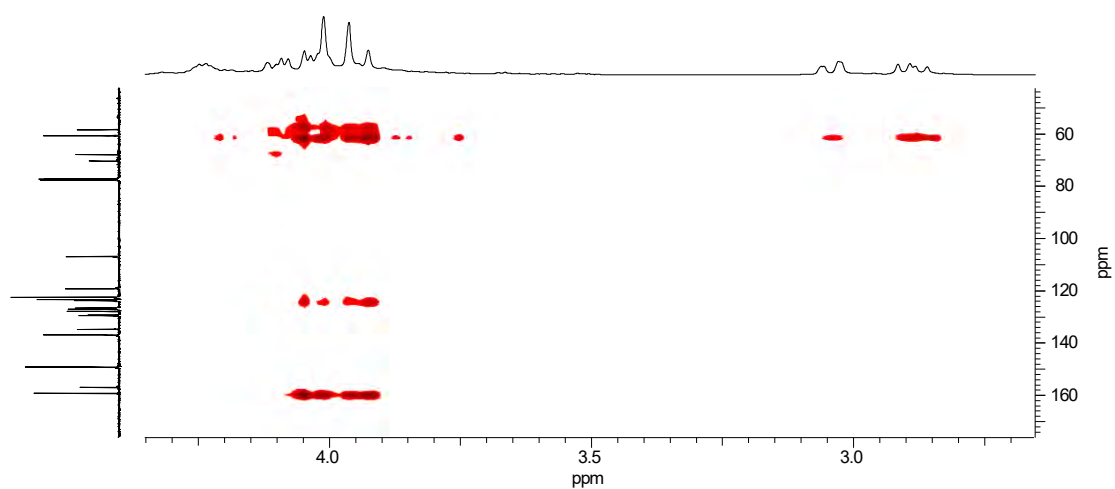


Figura 68. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L4.

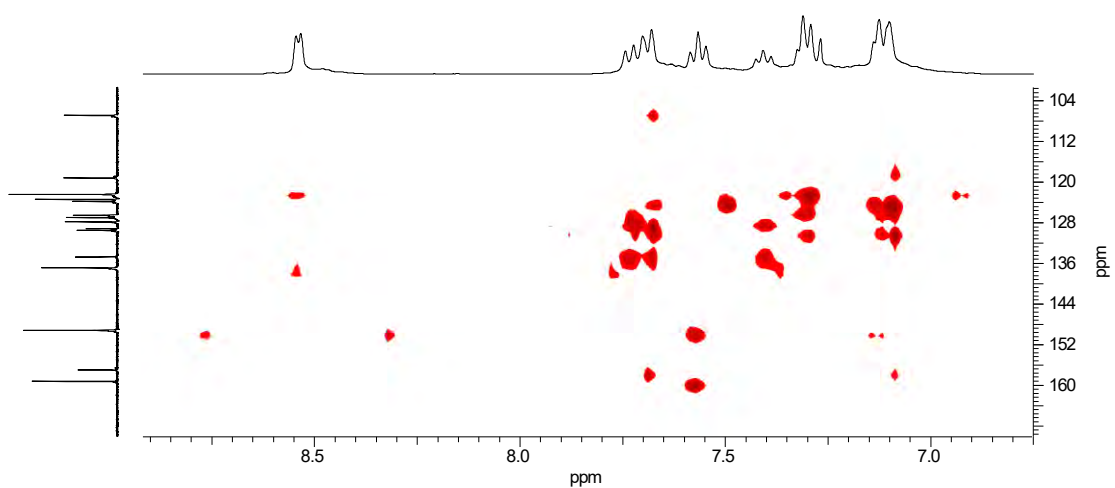


Figura 69. Ampliação da região aromática do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto L4.

4.1.1.11. Caracterização do composto 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5)

O Ligante L5 foi obtido a partir da reação entre o precursor P1 e P5. O precursor P1 foi utilizado para a síntese dos ligantes L1, L3, e L5, conferindo aos mesmos semelhanças estruturais. A diferença entre eles se dá pela substituição do naftol, presentes nos ligantes L1 e L3, pela cumarina com substituição na posição “4”, presente no ligante L5. As variações observadas no número de onda nas bandas de absorção (espectroscopia de IV) e nos valores de deslocamentos químicos (RMN ^1H e RMN ^{13}C) para o ligante L5, quando comparado com seus análogos (P1, P5, L1 e L3), confirmam a obtenção de um composto orgânico distinto. O espectro de infravermelho e a atribuição das principais bandas para o ligante L5 estão apresentadas na Figura 70 e Tabela 23, respectivamente.

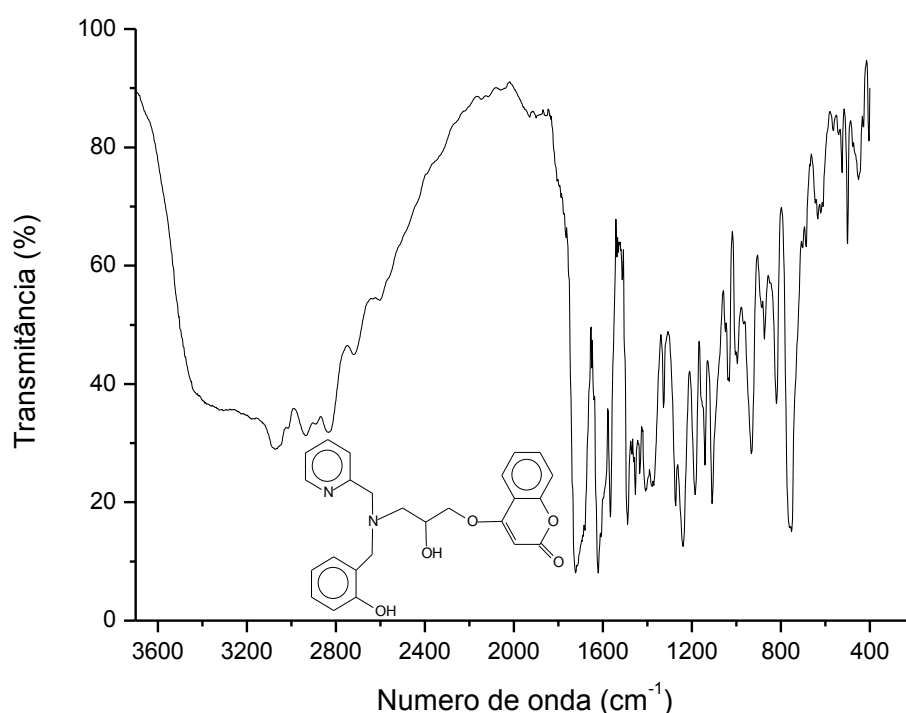


Figura 70. Espectro de infravermelho para o ligante 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5), obtido em filme.

Além de apresentar bandas de absorção referentes aos grupos piridina e fenol (Tabela 23), já discutidas para os ligante L1 e L3, o ligante L5 apresenta bandas de deformação axiais de C=O_{lactona} (ν 1722 cm^{-1}) e C-O_{lactona} (ν 1242, 1186 e 1109 cm^{-1}) características de 1,2-benzopirona, o que indica a presença do grupo cumarínico na estrutura deste ligante.

Tabela 23. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3450-3300	ν OH	1620, 1566, 1489, 1408	ν C=C; ν C=N
3073	ν CH _{aromático}	1273	ν_{as} C-O-C _{alifático}
2934	ν_{as} CH ₂	1242, 1186, 1109	ν C-O _{lactona}
2835	ν_{s} CH ₂	1242	ν C-O ^a
1722	ν C=O _{lactona}	821, 756	γ -CH ^b ; β -anel ^c

a= deformação axial de fenol; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos e heteroaromáticos; c= deformação do anel de aromáticos e heteroaromáticos.

O espectro de RMN ¹H do ligante L5 (Figura 71) mostra a presença de átomos de hidrogênio alifáticos entre 2,83 ppm e 4,38 ppm. Os átomos de hidrogênio aromáticos são observados entre 5,58 ppm e 8,67 ppm. O átomo de hidrogênio alfa à carbonila (H₂) apresenta deslocamento químico de 5,58-5,76 ppm. Em 8,55-8,67 ppm verifica-se o sinal do átomo de hidrogênio piridínico H₁₉. Observam-se entre 3,45 ppm e 4,12 ppm os sinais dos átomos de hidrogênio metilênicos H₁₀, H₁₃ e H₁₄. O multiplete em 4,24-4,38 ppm é atribuído ao átomo de hidrogênio H₁₁. Os átomos de hidrogênio H₁₂ são observados em 2,83-3,03 ppm na forma de multiplete. Não foram observados os sinais referentes aos átomos de hidrogênio do álcool secundário e do fenol (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A análise do espectro de RMN ¹³C do ligante L5 mostra vinte e cinco sinais para vinte e cinco átomos de carbono (Tabela 24). Os átomos de carbono aromáticos apresentam deslocamento químico entre 90,71 ppm e 165,49 ppm. Os átomos de carbono alifáticos apresentam-se entre 56,51 ppm e 70,99 ppm. Em 90,71 e 165,49 ppm observam-se os sinais atribuídos respectivamente aos

átomos de carbono C₂ (alfa à carbonila) e C₁ (carbonila) característicos do grupo cumarínico. O átomo de carbono C₃, que faz ligação com o átomo de oxigênio do éter alifático, apresenta deslocamento químico de 163,00 ppm (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Os resultados mostram a presença dos principais grupos funcionais da cumarina na estrutura do ligante L5, sinais também observados para o seu precursor (P5). As atribuições detalhadas dos sinais observados nos espectros de RMN ¹H e de RMN ¹³C do ligante L5 estão apresentadas na Tabela 24.

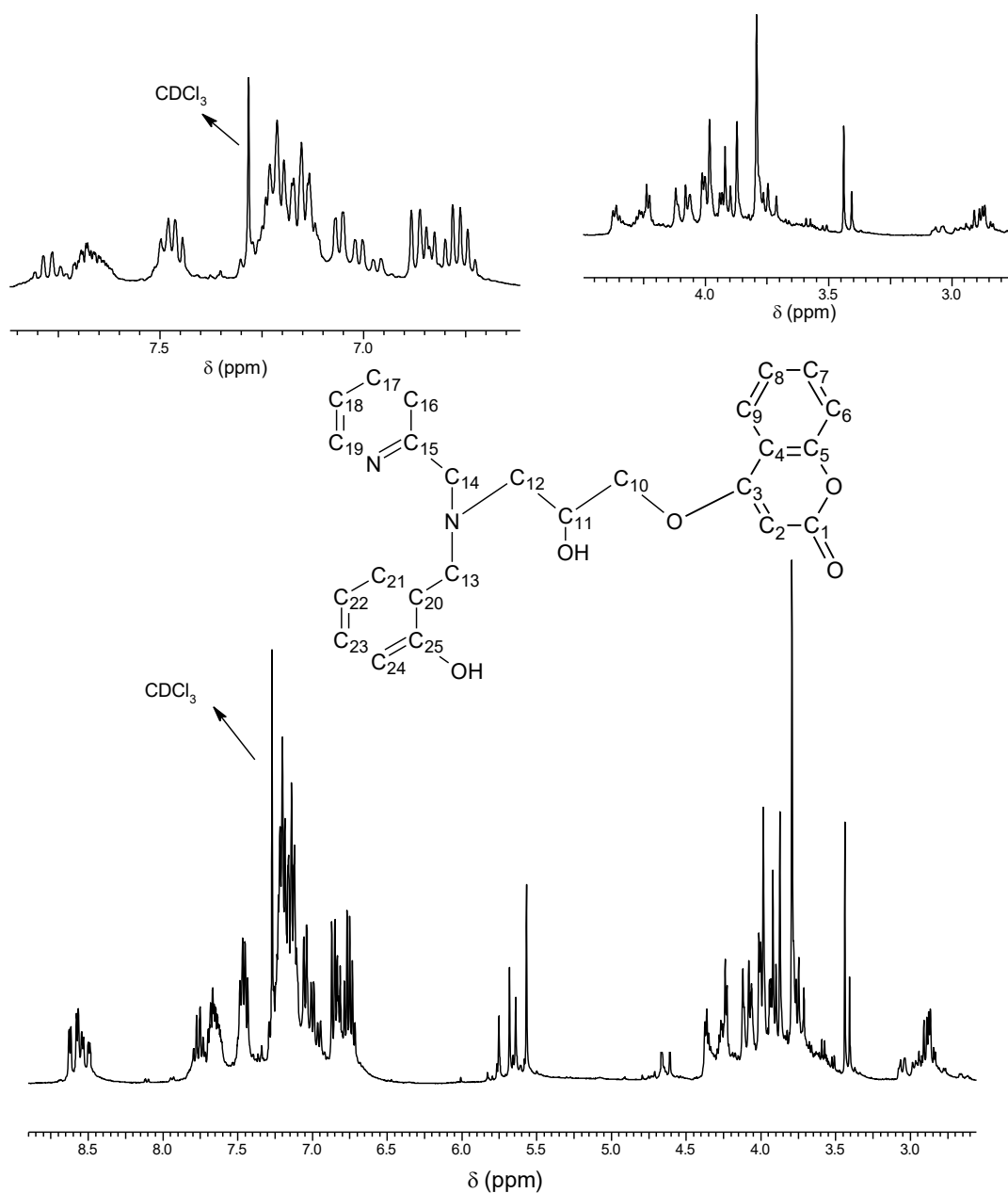


Figura 71. Espectro de RMN ¹H do ligante 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5), obtido em CDCl₃.

Tabela 24. Dados dos espectros de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e atribuições para o ligante 4-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L5).

Atribuição	Carbono		Hidrogênios	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicidade; $J_{\text{observado}}$ (Hz)	Átomos de hidrogênio
C				
4	115,59	-	-	-
20	122,40	-	-	-
5	153,27	-	-	-
15	156,12	-	-	-
25	157,37	-	-	-
3	163,00	-	-	-
1	165,49	-	-	-
CH				
11	67,61	4,24-4,38 (m)	-	1,00
2	90,71	5,58-5,76 (m)	-	1,15
6	116,85	7,20 (t)	$J_{6-7} = 8,00$	2,00
24	117,11	6,95-7,06 (m)	-	2,00
22	119,32	6,73-6,87 (m)	-	2,00
18	121,71	6,73-6,87 (m)	-	2,00
8	123,18	7,20 (t)	$J_{8-7} = J_{8-9} = 8,00$	2,00
16	123,41	7,11-7,15 (m)	-	2,10
9	123,96	7,69-7,77 (m)	-	1,10
23	129,54	7,11-7,15 (m)	-	2,10
21	130,49	6,95-7,06 (m)	-	2,00
7	132,69	7,43-7,47(m)	-	2,00
17	137,18	7,43-7,47 (m)	-	2,00
19	148,93	8,55-8,67 (m)	-	1,00
CH₂				
12	56,51	2,83-3,03 (m)	-	2,00
14	58,72	3,71-4,12 (m)	-	5,00
13	58,83	3,45 (d)	$J_{13-13} = 8,00$	1,00
		3,71-4,12 (m)	-	5,00
10	70,99	3,71-4,12 (m)	-	5,00

d=dupleteo; dd=duplo dupleteo; m=multiplero; s=simpleto; t=tripleto.

4.1.1.12. Caracterização do composto 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxiopoxi]-2H-2-croman-2-ona (L6)

O ligante L6 foi obtido a partir da reação entre os precursores P2 e P5. O precursor P2 foi utilizado para a síntese dos ligantes L2, L4, e L6, conferindo aos mesmos semelhanças estruturais, as quais podem ser observadas nos espectros de infravermelho e de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C). A diferença entre estes compostos consiste na substituição do naftol, presente nos ligantes L2 e L4, pela cumarina, presente no ligante L6. As variações observadas no número de onda nas bandas de absorção (espectroscopia de IV) e nos valores de deslocamento químico (RMN ^1H e RMN ^{13}C) para o ligante L6, quando comparado com seus análogos (P2, P5, L2 e L4), demonstram a obtenção de um composto orgânico distinto.

O espectro de infravermelho e a atribuição das principais bandas observadas para o ligante L6 estão apresentados na Figura 72 e Tabela 25, respectivamente.

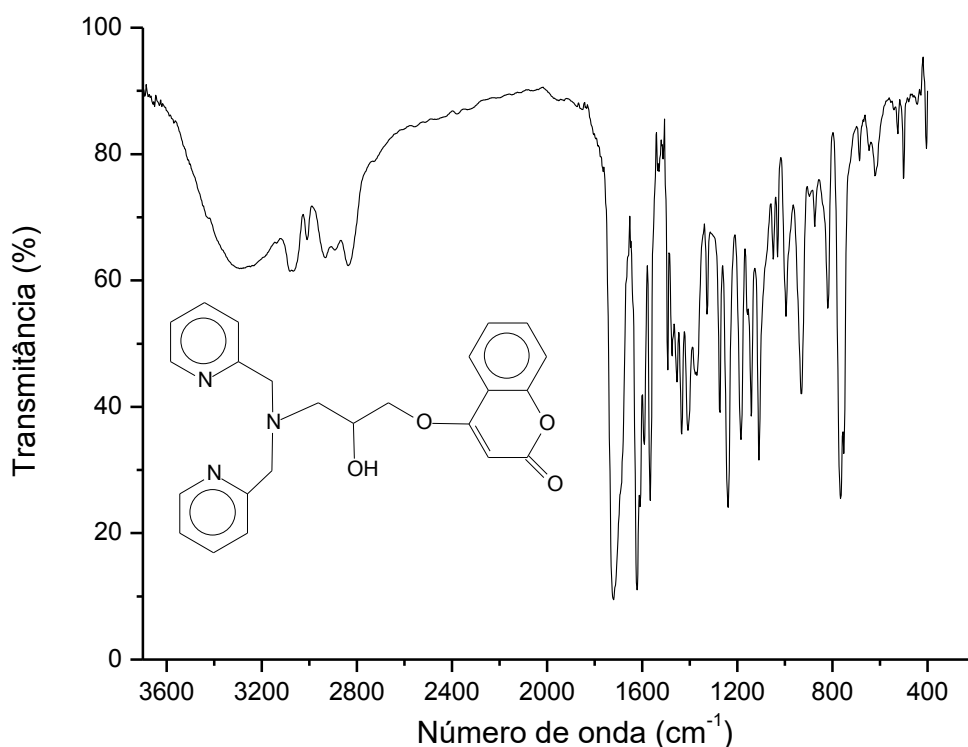


Figura 72. Espectro de infravermelho para o ligante 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxiopoxi]-2H-2-croman-2-ona (L6), obtido em filme.

O ligante L6 apresenta bandas características do anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico (Tabela 25), como já discutido para os compostos análogos (L2 e L4). Verifica-se no espectro de infravermelho do ligante L6 a presença de bandas de absorção de deformação axial de C=O_{lactona} (ν 1721 cm^{-1}) e C-O_{lactona} (ν 1240, 1184 e 1109 cm^{-1}), característico de 1,2-benzopirona, o que demonstra a presença do grupo cumarínico na estrutura deste ligante.

Tabela 25. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxiopropoxi]-2H-2-croman-2-ona (L6), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3450-3150	ν OH	1622, 1566, 1492, 1408	ν C=C; ν C=N
3080, 3009	ν CH _{aromático}	1273	ν_{as} C-O-C _{alifático}
2933	ν_{as} CH ₂	1240, 1184, 1109	ν C-O _{lactona}
2837	ν_{s} CH ₂	819, 756	γ -CH ^a ; β -anel ^b
1721	ν C=O _{lactona}		

a= deformação C-H fora do plano de heteroaromáticos; b= deformação do anel de heteroaromáticos.

Observa-se no espectro de RMN ¹H do ligante L6 (Figura 73) a presença de átomos de hidrogênio alifáticos entre 2,83 ppm e 4,33 ppm e átomos de hidrogênio aromáticos entre 5,59 ppm e 8,48 ppm. O átomo de hidrogênio alfa à carbonila (H₂), característico de 1,2-benzopirona, apresenta deslocamento químico de 5,59-5,71 ppm. Em 8,48 ppm verifica-se o sinal do átomo de hidrogênio piridínico H₁₉. Observam-se dois multipletos em 2,83-2,89 ppm e 2,95-3,00 ppm referentes aos átomos de hidrogênio H₁₂. Os átomos de hidrogênio metilênicos H₁₀, H₁₃ e H₁₄ são observados em 3,88-4,03 ppm na forma de multipletos (Tabela 26). Não foi observado o sinal referentes ao átomo de hidrogênio do álcool secundário (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A análise do espectro de RMN ¹³C do ligante L6 mostra dezoito sinais para vinte e quatro átomos de carbono (Tabela 26), o que indica a ocorrência de equivalências magnéticas. Observam-se duas equivalências para os deslocamentos de 60,77 ppm (C₁₃ e C₁₄), 122,42 ppm (C₁₈), 123,48 ppm (C₁₆),

137,02 ppm (C₁₇), 149,13 ppm (C₁₉) e 158,92 ppm (C₁₅). Os átomos de carbono aromáticos apresentam deslocamento químico entre 90,71 ppm e 165,78 ppm. Os átomos de carbono alifáticos apresentam valores de deslocamento químico entre 57,51 e 71,28 ppm. Os átomos de carbono que fazem ligação com o átomo de nitrogênio piridínico são observados em 149,13 ppm (C₁₉) e 158,92 ppm (C₁₅). Em 163,19 ppm observa-se o sinal referente ao átomo de carbono C₃ que faz ligação com o átomo de oxigênio do éter alifático. O sinal em 90,71 é atribuído ao átomo de carbono C₂ que encontra-se ligado ao átomo de carbono da carbonila C₁ (165,78 ppm). As atribuições detalhadas dos sinais observados nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C do ligante L6 estão apresentadas na Tabela 26.

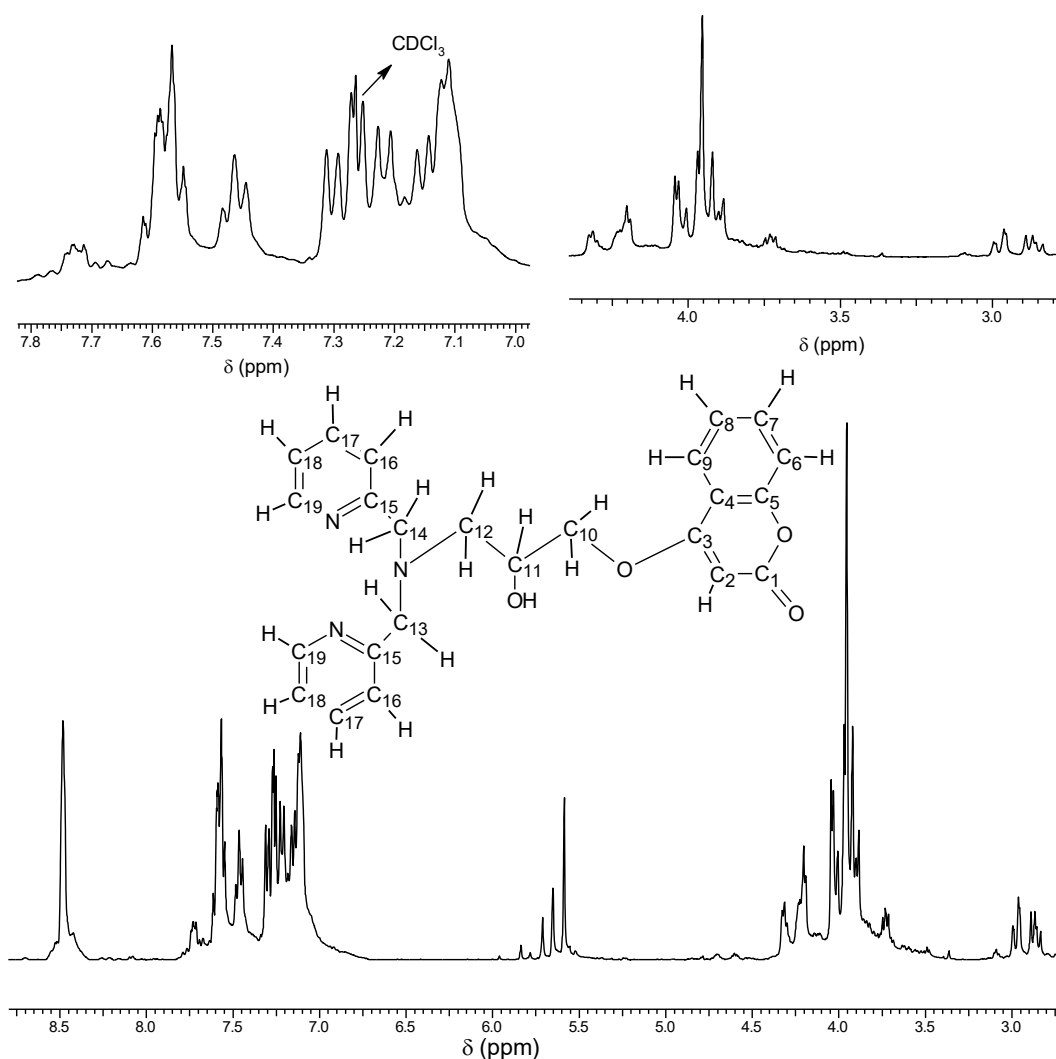


Figura 73. Espectro de RMN ¹H do ligante 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxiopropoxi]-2H-2-croman-2-ona (L6), obtido em CDCl₃.

Tabela 26. Dados para os espectros de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e atribuições para o ligante 4-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxiopropoxi]-2H-2-croman-2-ona (L6).

Atribuição	Carbono		Hidrogênios	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicidade; $J_{\text{observado}}$ (Hz)	Átomos de hidrogênio
C				
4	115,75	-	-	-
5	153,36	-	-	-
15	158,92	-	-	-
3	163,19	-	-	-
1	165,78	-	-	-
CH				
11	67,35	4,20-4,33 (m)	-	1,00
2	90,71	5,59-5,71(m)	-	1,00
6	116,81	7,25-7,31(m)	-	2,00
18	122,42	7,11-7,23(m)	-	4,00
8	122,55	7,25-7,31(m)	-	2,00
16	123,48	7,11-7,23(m)	-	4,00
9	124,02	7,75-7,72 (m)	-	1,00
7	132,58	7,46 (t)	$J_{7-6} = J_{7-8} = 8,00$	1,00
17	137,02	7,55-7,60 (m)	-	2,00
19	149,13	8,48 (s)	-	2,00
CH₂				
12	57,51	2,83-2,89 (m)	-	1,00
		2,95-3,00 (m)	-	0,84
14	60,74	3,88-4,03 (m)	-	6,00
13	60,74	3,88-4,03 (m)	-	6,00
10	71,28	3,88-4,03 (m)	-	6,00

d=dupleto; dd=duplo dupleto; m=multiplato; s=simpleto; t=tripleto.

4.1.1.13. Caracterização do composto 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7)

O ligante L7 apresenta analogia com os ligantes obtidos a partir dos precursores P1, P5 e P6, o que é confirmado através das semelhanças nos espectros de infravermelho e RMN. As variações observadas no número de onda nas bandas de absorção (espectroscopia de IV) e nos valores de deslocamento químico (RMN ^1H e RMN ^{13}C) para o ligante L7, quando comparado com seus análogos (P1, P5, P6, L1, L3, L5 e L6) confirmam a formação de um composto orgânico distinto. O espectro de infravermelho do ligante L7 está apresentado na Figura 74 e as atribuições das principais bandas observadas estão descritas descrita na Tabela 27.

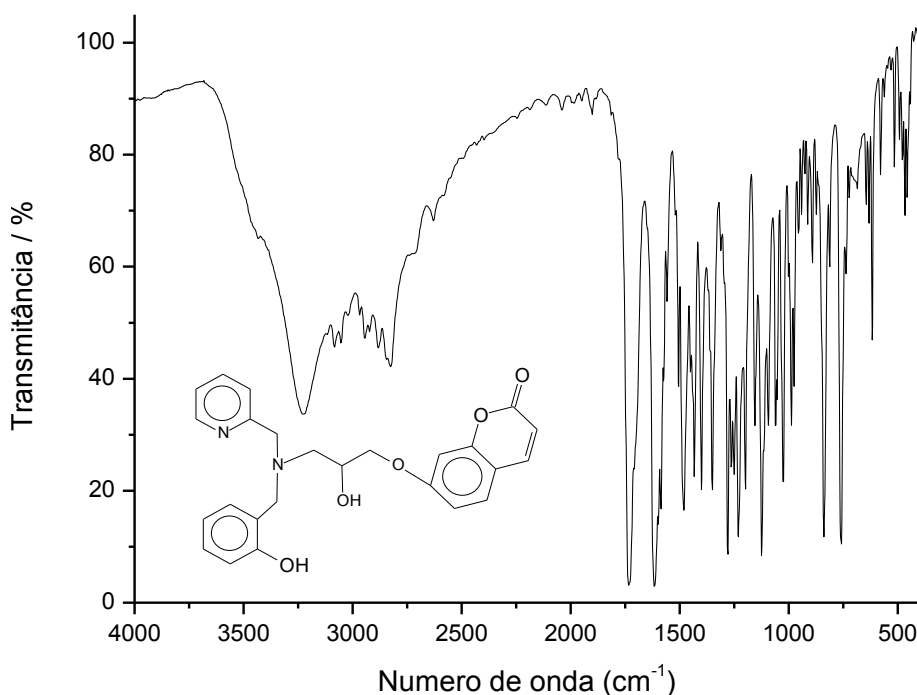


Figura 74. Espectro de infravermelho para o ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7), obtido em filme.

Como já discutido, o ligante L7 apresenta sinais característicos do anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico. Assim como observado para os ligantes que apresentam a cumarina em sua estrutura (L5 e L6), observa-se no espectro de

infravermelho do ligante L7 (Figura 74) bandas de deformações axiais de C=O lactona (ν 732 cm^{-1}) e C-O lactona (ν 1232, 1198 e 1124 cm^{-1}) características de 1,2-benzopirona. O sinal em 1232 cm^{-1} também pode ser atribuído a deformação axial C-O do fenol. O espectro de infravermelho mostra os principais grupos funcionais presentes no ligante L7 (Tabela 27).

Tabela 27. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3235	ν OH	1616, 1481, 1433, 1400, 1350	ν C=C; ν C=N
3082, 3053	ν CH aromático	1278	ν_{as} C-O-C alifático
2945	ν_{as} CH ₂	1232, 1198, 1124	ν C-O lactona
2821	ν_{s} CH ₂	1232	ν C-O ^a
1732	ν C=O lactona	839, 758	γ -CH ^b ; β -anel ^c

a= deformação axial de fenol; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos e heteroaromáticos; c= deformação do anel de aromáticos e heteroaromáticos.

O espectro de RMN ¹H do ligante L7 (Figura 75) mostra a presença de átomos de hidrogênio alifáticos entre 2,93 ppm e 4,30 ppm e hidrogênio aromáticos entre 6,24 ppm e 8,61 ppm. O sinal em 6,24 ppm é atribuído ao átomo de hidrogênio alfa à carbonila (H₂). Em 8,61 ppm verifica-se o sinal do átomo de hidrogênio piridínico H₁₉. Entre 3,85 ppm e 4,16 ppm observam-se os átomos de hidrogênio metilênicos H₁₀, H₁₃ e H₁₄. O multiplete em 2,93-2,95 ppm é atribuído aos átomos de hidrogênio H₁₂. O átomo de hidrogênio H₁₁ é observado em 4,24-4,30 ppm na forma de multiplete. Não foram observados os sinais referentes aos átomos de hidrogênio do álcool secundário e do fenol (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

7-hchbpa final.esp

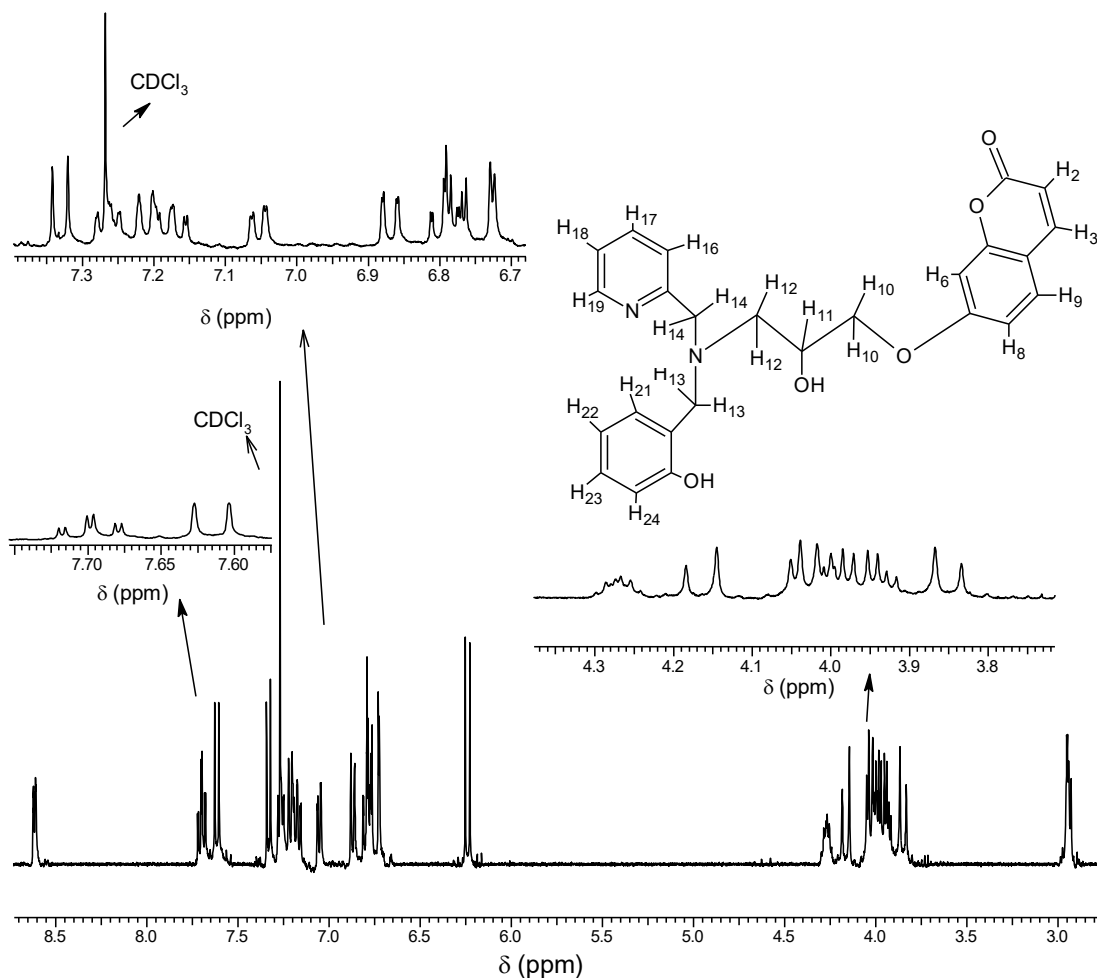


Figura 75. Espectro de RMN ^1H do ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7), obtido em CDCl_3 .

A análise do espectro de RMN ^{13}C do ligante L7 (Figura 76) mostra vinte e cinco sinais para vinte e cinco átomos de carbono. Os átomos de carbono aromáticos apresentam deslocamento químico entre 101,89 ppm e 161,91 ppm. Em 101,89 ppm e 113,30 ppm observam-se respectivamente os sinais dos átomos de carbono aromáticos mais desprotegidos C₆ e C₈. O átomo de carbono C₇ apresenta deslocamento químico em 161,31 ppm e o átomo de carbono da carbonila (C₁) é observado em 161,91 ppm. O sinal em 157,49 ppm é atribuído ao átomo de carbono ligado a hidroxila do fenol (C₂₅). Os átomos de carbono alifáticos são observados entre 56,51 ppm e 70,99 ppm (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). As atribuições detalhadas dos sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do ligante L7 estão apresentadas na Tabela 28.

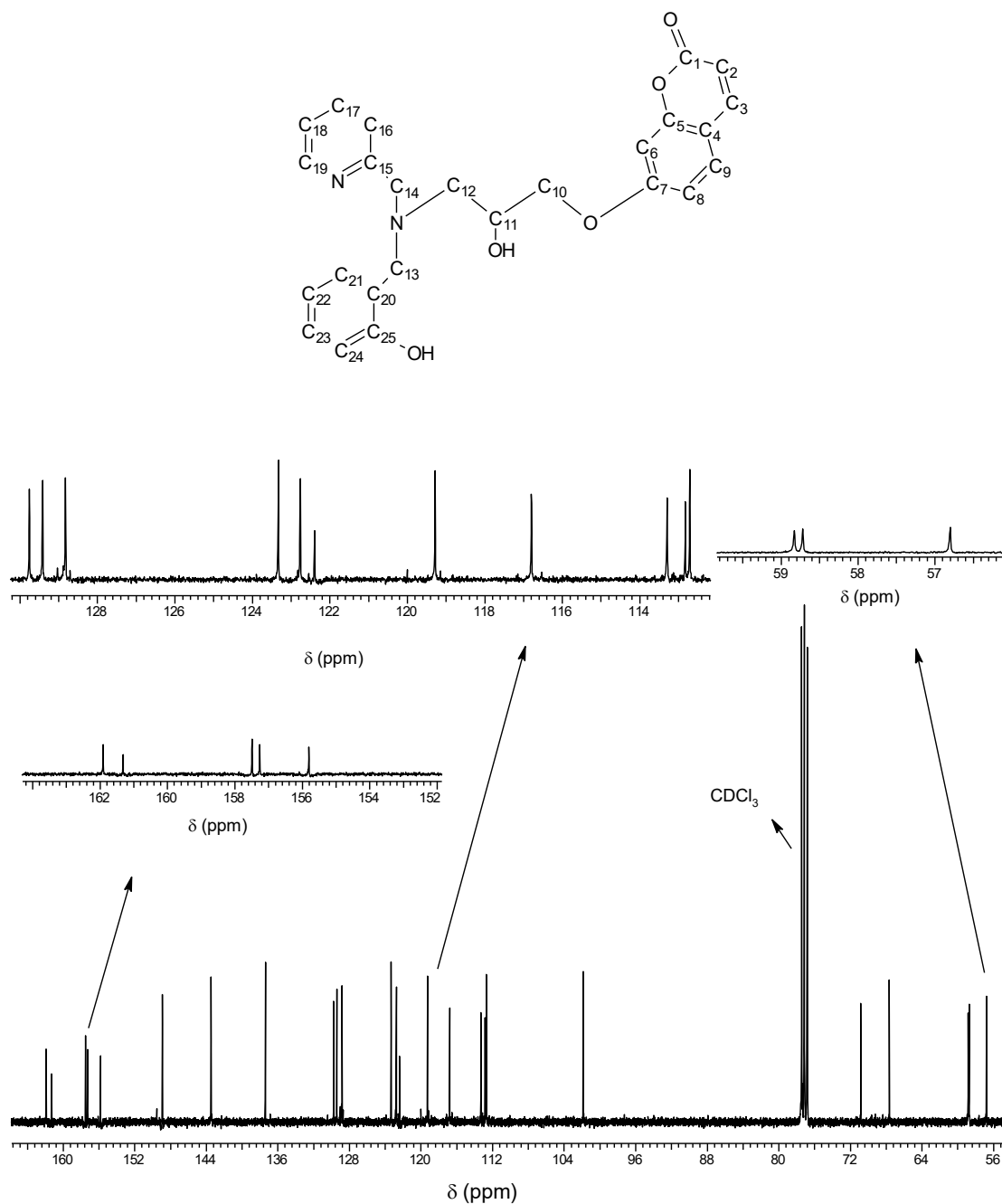


Figura 76. Espectro de RMN ^{13}C do ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxi-benzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7), obtido em CDCl_3 .

Tabela 28. Dados de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e atribuições para o ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L7).

Atribuição	Carbano		Hidrogênios	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicidade; $J_{\text{observado}}$ (Hz)	Átomos de hidrogênio
C				
4	112,71	-	-	-
20	122,76	-	-	-
5	155,81	-	-	-
15	157,28	-	-	-
25	157,49	-	-	-
7	161,31	-	-	-
1	161,91	-	-	-
CH				
11	67,64	4,24-4,30 (m)	-	1,00
6	101,89	6,73 (d)	$J_{6-8} = 2,10$	0,98
2	112,82	6,24 (d)	$J_{2-3} = 9,48$	1,00
8	113,30	6,81-6,76 (m)	-	2,00
24	116,80	6,87 (dd)	$J_{24-22} = 1,00$ $J_{24-23} = 7,96$	0,93
22	119,28	6,81-6,76 (m)	-	2,00
18	122,40	7,15-7,22 (m)	-	2,00
16	123,33	7,15-7,22 (m)	-	2,00
9	128,83	7,33 (d)	$J_{9-8} = 8,56$	1,00
23	129,42	7,15-7,22 (m)	-	1,00
21	129,76	7,05 (dd)	$J_{21-23} = 1,44$ $J_{21-22} = 7,52$	1,00
17	137,40	7,70 (td)	$J_{17-19} = 2,00$ $J_{17-18} = 7,60$ $J_{17-16} = 8,84$	1,00
3	143,49	7,62 (d)	$J_{3-2} = 9,64$;	1,00
19	148,91	8,61 (dd)	$J_{19-16} = 0,76$; $J_{19-17} = 1,64$; $J_{19-18} = 4,92$	1,00
CH₂				
12	56,51	2,93-2,95 (m)	-	2,00
14	58,72	3,92-4,05 (m)	-	4,00
		4,16 (d)	$J_{14-14} = 15,56$	1,00
13	58,83	3,85 (d)	$J_{13-13} = 13,44$	1,00
		3,92-4,05 (m)	-	4,00
10	70,99	3,92-4,05 (m)	-	4,00

d=dupletto; dd=duplo dupletto; m=multiplerto; s=simpleto; t=tripleto; td=triplo dupletto.

4.1.1.14. Síntese do ligante 7-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxi]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L8)

O ligante L8 foi obtido a partir da reação entre os precursores P2 e P6. As análises de Infravermelho e de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C) mostraram variações nos valores de número de onda (cm^{-1}) e de deslocamentos químicos (ppm) para o ligante L8, quando comparado com seus análogos (P2, P5, P6, L2, L4, L5, L6 e L7), confirmando a formação de um novo composto orgânico. O espectro de infravermelho e a atribuição das principais bandas do ligante L8 estão apresentadas respectivamente na Figura 77 e Tabela 29.

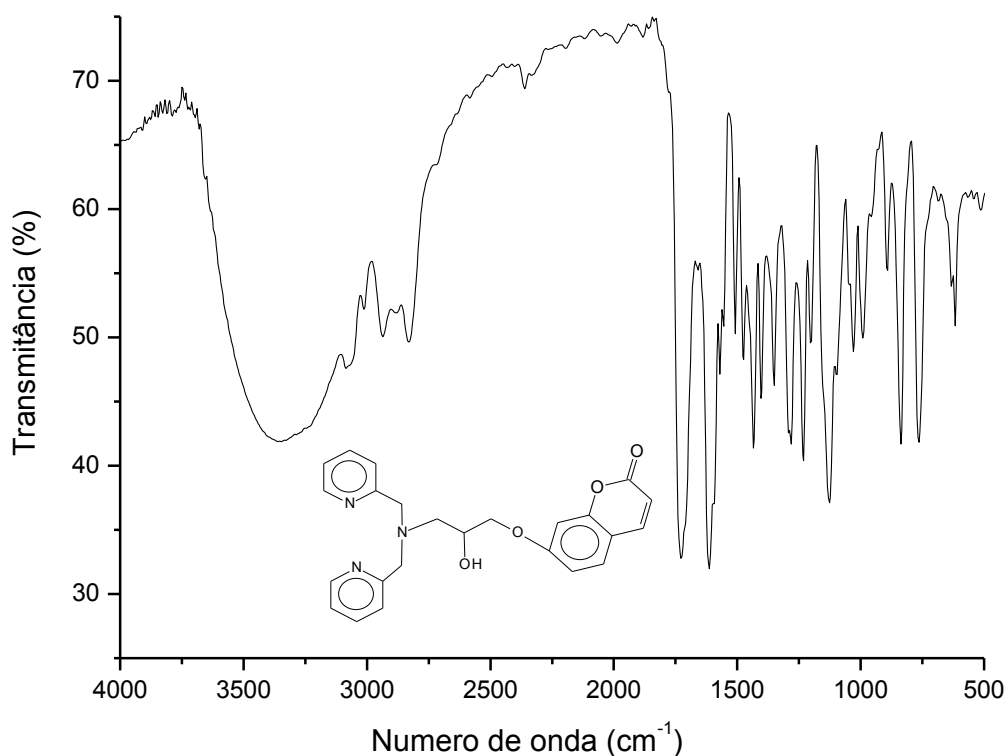


Figura 77. Espectro de infravermelho para o ligante 7-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxi]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L8), obtido em filme.

O ligante L8 apresenta bandas características do anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico como já discutido para os compostos análogos. O ligante L8 difere do ligante L6 pela substituição na posição “7” da 1,2-benzopirona. Assim como observado para os ligantes que apresentam a cumarina em sua estrutura

(L5, L6 e L7), o espectro de infravermelho do ligante L8 mostra a presença de bandas de absorção de deformação axial de C=O (ν 1728 cm^{-1}) e C-O (ν 1230, 1126, 1124 cm^{-1}) de lactona, o que confirma a presença do grupo cumarínico na estrutura deste ligante.

Tabela 29. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 7-{3-[bis(2-piridilmetil)amino-2-hidroxiopropoxi]-2H-2-croman-2-ona (L8), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3500-3150	ν OH	1612, 1508, 1435, 1404, 1350	ν C=C; ν C=N
3071	ν CH aromático	1280	ν_{as} C-O-C _{alifático}
2936	ν_{as} CH ₂	1230, 1126, 1124	ν C-O _{lactona}
2828	ν_{s} CH ₂	837, 763	γ -CH ^b ; β -anel ^c
1728	ν C=O _{lactona}		

a= deformação axial de fenol; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos e heteroaromáticos; c= deformação do anel de aromáticos e heteroaromáticos.

O espectro de RMN ¹H do ligante L8 (Figura 78) mostra a presença de átomos de hidrogênio alifáticos entre 2,86 ppm e 4,20 ppm e aromáticos entre 6,22 ppm e 8,53 ppm. Em 6,22 ppm observa-se o sinal do átomo de hidrogênio alfa à carbonila (H₂). Os átomos de hidrogênio H₆ e H₈ apresentam-se na mesma região de deslocamento químico (6,76-6,82 ppm). Em 8,53 ppm verifica-se o sinal do átomo de hidrogênio H₁₉ cujo átomo de carbono está ligado ao átomo de nitrogênio piridínico. Os átomos de hidrogênio metilênicos H₁₀, H₁₃ e H₁₄ são observados na mesma região do espectro (3,92-4,03 ppm) na forma de multiplete. Os sinais em 2,86 ppm e 3,01 ppm são atribuídos aos átomos de hidrogênio H₁₂. Não foi observado o sinal referente ao átomo de hidrogênio do álcool secundário (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

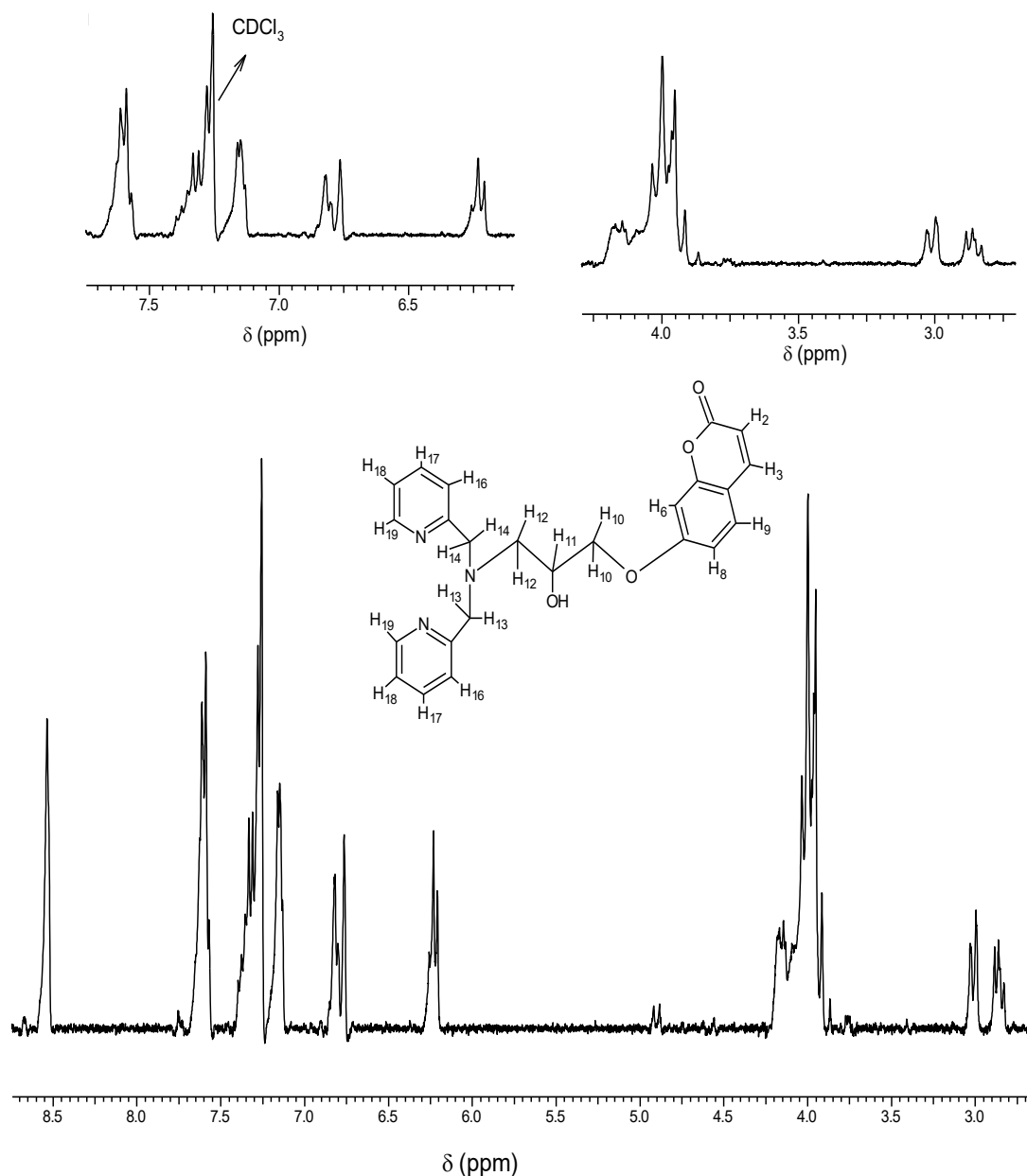


Figura 78. Espectro de RMN ^1H do ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L8), obtido em CDCl_3 .

A análise do espectro de RMN ^{13}C do ligante L8 mostra dezoito sinais para vinte e quatro átomos de carbono o que indica a ocorrência de equivalências magnéticas. Observa-se duas equivalências para os deslocamento de 60,62 ppm (C_{13} e C_{14}), 122,39 ppm (C_{18}), 123,30 ppm (C_{16}), 136,82 ppm (C_{17}), 149,10 ppm (C_{19}) e 159,06 ppm (C_{15}). Os átomos de carbono aromáticos apresentam deslocamento químico entre 101,75 ppm e 162,24 ppm. Os átomos de carbono alifáticos apresentam valores de deslocamento químico entre 58,10 ppm e 70,95 ppm. O sinal referente ao átomo de carbono C_{15} , o qual faz ligação com

o átomo de nitrogênio piridínico, é observado em 159,06 ppm. Em 161,36 ppm e 162,24 ppm observam-se respectivamente os sinais atribuídos aos átomos de carbono C₇ e C₁. O sinal em 113,19 ppm é atribuído ao átomo de carbono alfa à carbonila (C₂). As atribuições detalhadas dos sinais observados nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C do ligante L8 estão apresentadas na Tabela 30.

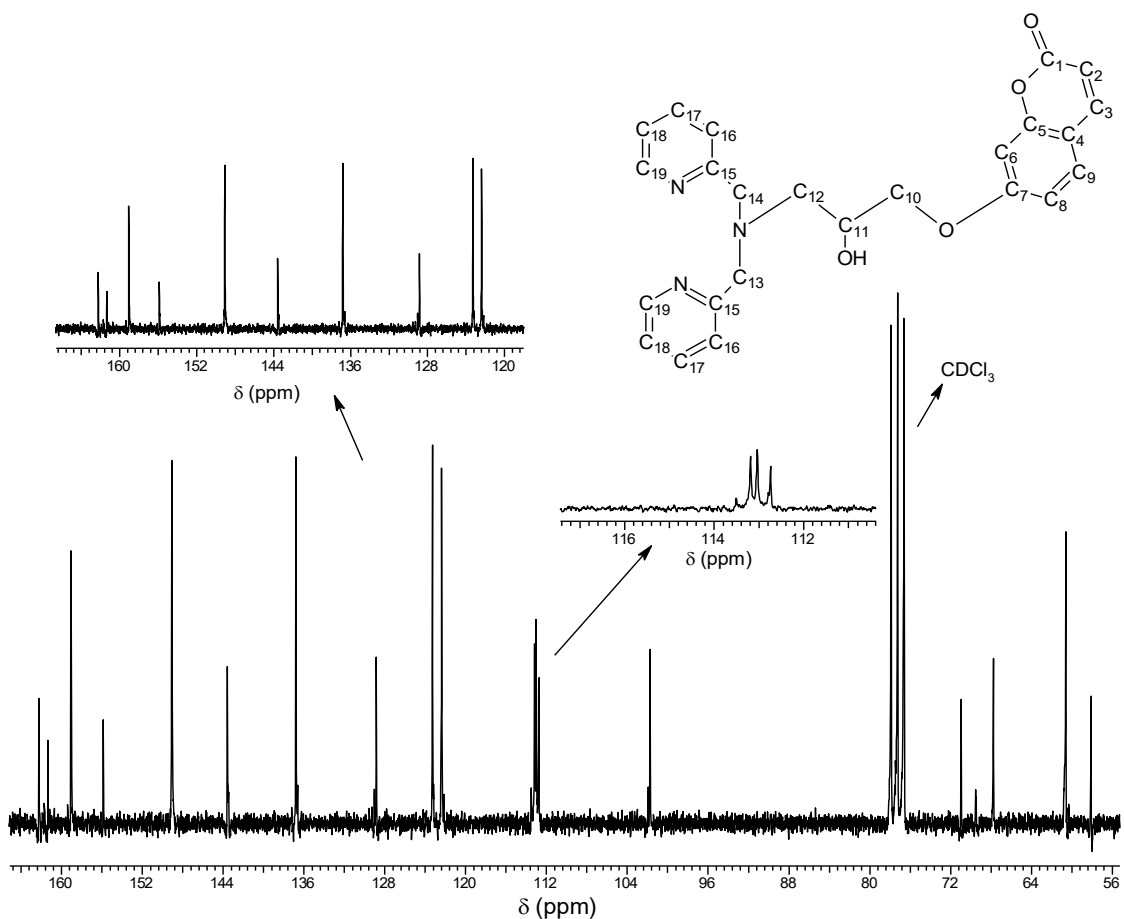


Figura 79. Espectro de RMN ¹³C do ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L8), obtido em CDCl₃.

Tabela 30. Dados de RMN (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e atribuições do ligante 7-{2-hidroxi-3-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amino]propoxi}-2H-2-croman-2-ona (L8), em CDCl_3 .

Atribuição	Carbono		Hidrogênios	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Multiplicidade; $J_{\text{observado}}$ (Hz)	Átomos de hidrogênio
C				
4	112,74	-	-	-
5	155,89	-	-	-
15	159,06	-	-	-
7	161,36	-	-	-
1	162,24	-	-	-
CH				
11	67,75	4,20 (m)	-	1,00
6	101,75	6,76-6,82 (m)	-	2,00
2	113,04	6,22 (m)	$J_{2-3} = 9,44$	1,00
8	113,19	6,76-6,82 (m)	-	2,00
18	122,39	7,26-7,33 (m)	-	3,00
16	123,30	7,16 (d)	$J_{16-17} = 4,00$	2,00
9	128,85	7,26-7,33 (m)	-	3,00
17	136,82	7,60 (d)	$J_{17-18} = 8,00$	3,00
3	143,58	7,60 (d)	$J_{3-2} = 8,00$	3,00
19	149,10	8,53 (s)	-	2,00
CH₂				
12	58,10	3,01 (d)	$J_{12-12} = 12,00$	1,00
		2,86 (m)	-	1,00
14	60,62	3,92-4,03 (m)	-	6,00
13	60,62	3,92-4,03 (m)	-	6,00
10	70,95	3,92-4,03 (m)	-	6,00

d=duplete; dd=duplo duplete; m=multiplato; s=simpleto; t=tripleto.

4.1.2. Caracterização dos compostos de coordenação

Os compostos de coordenação cobre, inéditos na literatura, foram caracterizados por análise elementar (C, H e N), espectroscopias de infravermelho e eletrônica, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS, voltametria cíclica, condutivimetria e tiveram os seus pontos de fusão determinados.

4.1.2.1. Caracterização dos isômeros [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (C1) e [Cu(L3)Cl]Cl. 3H₂O (C3)

Os complexos [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (C1) e [Cu(L3)Cl]Cl. 3H₂O (C3) foram obtidos a partir da reação dos respectivos ligantes L1 e L3 com sal de cobre CuCl₂. Tanto o ligante L1 quanto o ligante L3 apresentam as funções piridina e fenol, provenientes do precursor P1. A diferença entre estes dois compostos se encontra na substituição do anel do naftol, o ligante L1 apresenta um substituinte na posição “α” e o L3 na posição “β”. A análise dos resultados mostraram grande semelhança entre os complexos C1 e C3, sendo assim, a discussão da caracterização destes complexos será realizada em conjunto. Os espectros de infravermelhos dos complexos C1 e C3 são apresentados na Figura 80.

Bandas de absorção referentes aos ligantes L1 e L3 são encontradas nos espectros de infravermelho dos respectivos complexos C1 (Figura 80a) e C3 (Figura 80b). Entretanto, os espectros dos complexos apresentam variações no número de onda em relação aos seus ligantes o que demonstra modificações na geometria dos compostos orgânicos após a reação de complexação com o metal. As atribuições detalhadas das bandas observadas nos espectros de infravermelho dos complexos C1 e C3 estão descritas na Tabela 31.

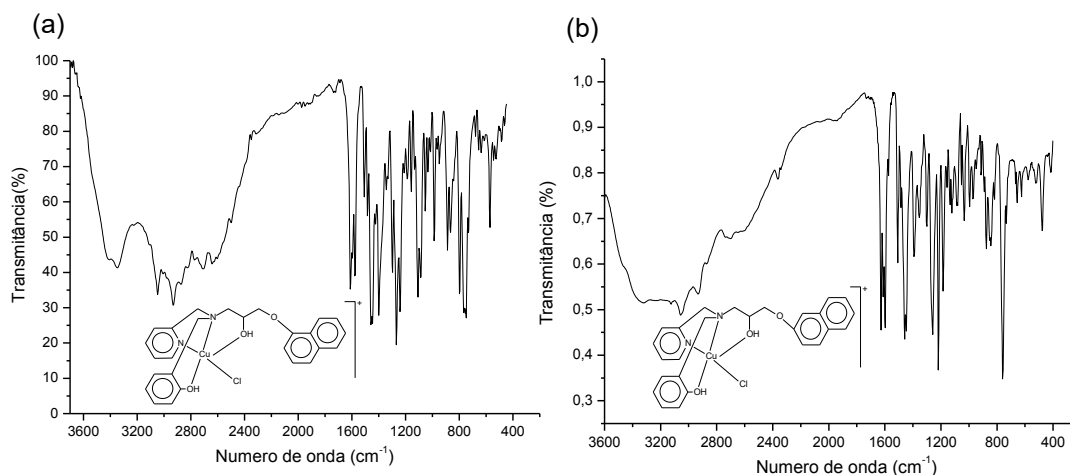


Figura 80. Espectros de infravermelho dos complexos (a) $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (C1) e (b) $[\text{Cu}(\text{L3})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (C3), obtidos em pastilha de KBr.

Tabela 31. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos complexos $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (C1) e $[\text{Cu}(\text{L3})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (C3), com suas respectivas atribuições.

C1		C3		Atribuição
Número de onda (cm^{-1})	Número de onda (cm^{-1})	Número de onda (cm^{-1})	Número de onda (cm^{-1})	
3348		3000-3350		ν OH
3047		3059		ν CH _{aromático}
2931		2931		ν_{as} CH ₂
2712		2873		ν_{s} CH ₂
1613, 1578, 1447, 1400		1628, 1597, 1508, 1458, 1399		ν C=C; ν C=N
1269		1257		ν_{as} C-O-C _{alifático}
1242		1257		ν C-O ^a
1107		1218, 1184		δ CH _{aromático}
798, 748		844, 760		γ -CH ^b ; β -anel ^c

a= deformação axial de C-O de fenol; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; c= deformação de aromáticos polinucleares e do anel heteroaromático.

Observam-se nos espectros de infravermelho dos complexos C1 (Figura 80a) e C3 (Figura 80b) sinais correspondentes a deformação axial C=C e C=N, deformação axial de C-H_{aromático} e deformação angular no plano de C-H_{aromático}

(δ CH_{aromático}) os quais demonstram a presença do anel aromático. Entre 844 e 748 cm⁻¹ verificam-se a presença de bandas características de anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico e de aromáticos polinucleares para ambos os complexos. Bandas de absorção semelhantes foram relatadas por Bull (2008) para complexo de cobre optido a partir do precursor P1.

Os sinais de deformação axial de C-O-C e C-O indicam a presença do éter alifático e do fenol respectivamente e as bandas de deformação axial assimétrica e simétrica de CH₂ confirmam a presença dos grupos metileno em ambos os complexos. As regiões alargadas entre 3000-3350 cm⁻¹, observadas para os complexos C1 e C3, são atribuídas à deformação axial de O-H de álcool em ligação de hidrogênio intermolecular ou a água de hidratação presentes nas estruturas dos complexos, sendo as mesmas confirmadas por análise elementar (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Os resultados da análise elementar (C, H e N) e da medida de condutividade para os complexos C1 e C3 são apresentados na Tabela 32. A análise elementar revela que o complexo [Cu(L1)Cl]Cl.2H₂O (C1) apresenta em sua constituição um átomo de cobre, uma molécula do ligante L1, um íon cloreto coordenado, um íon cloreto como contra-íon e duas moléculas de água de hidratação, resultando em um composto com peso molecular de 584,98 g.mol⁻¹. O complexo [Cu(L3)Cl]Cl. 3H₂O (C3) apresenta em sua estrutura o ligante L3 e uma esfera de coordenação semelhante ao complexo C1. A diferença entre estes dois compostos, além dos ligantes, é a presença de duas moléculas de água de hidratação para o complexo C1 e três moléculas de água de hidratação para o complexo C3, o qual possui peso molecular de 603,00 g.mol⁻¹.

As medidas de condutividade (Tabela 32) mostram que em solução metanólica os complexos C1 e C3 se comportam como eletrólitos 1:1 uma vez que apresentaram valores entre 80 e 115 μS/cm. De acordo com a literatura, em metanol, a condutividade varia entre 80 e 115 μS/cm para eletrólitos 1:1. A faixa de variação para eletrólitos 2:1 é de 160 a 220 μS/cm e valores entre 290 e 350 μS/cm correspondem a eletrólitos 3:1. Para os não eletrólitos a condutividade encontrada deve estar abaixo de 80 μS/cm (GEARY, 1971). Os

resultados de condutividade estão de acordo com os dados de análise elementar (C, H e N) os quais sugerem a presença de um íon cloreto como contra-íon nos complexos C1 e C3.

Tabela 32. Dados de análise elementar (C, H e N) e de condutivimetria, realizada na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ M em metanol, para os complexos $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (C1) e $[\text{Cu}(\text{L3})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (C3).

	Análise elementar						Condutivimetria	
	%C		%H		%N		Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Espécie de eletrólito ^a
	Exper.	Calc.	Exper.	Calc.	Exper.	Calc.		
C1	53,22	53,38	5,52	5,17	4,77	4,79	110,7	1:1
C3	51,79	51,96	5,35	5,66	4,70	4,65	108,4	1:1

Os espectros de ESI(+)-MS para os complexos C1 (Figura 81a) e C3 (Figura 81b) apresentam sinal de m/z 415 o qual corresponde ao cátion dos ligantes L1 (Figura 81a) e L3 (Figura 81b) após protonação do nitrogênio amínico, resultando em $[\text{H}_1(\text{L1})]^+$ (Figura 81a) e $[\text{H}_1(\text{L3})]^+$ (Figura 81b). O sinal de m/z 512 corresponde ao cátion mononuclear onde o centro metálico de cobre encontra-se coordenado a uma molécula do ligante e um íon cloreto resultando em $[\text{Cu}(\text{L1})(\text{Cl})]^+$ (Figura 81a) e $[\text{Cu}(\text{L3})(\text{Cl})]^+$ (Figura 81b). O sinal de m/z 476 corresponde aos complexos C1 (Figura 81a) e C3 (Figura 81b) após a perda de uma molécula de HCl (Figura 81). O complexo C1 ainda apresenta o sinal de m/z 290 (Figura 82a) atribuído ao cátion com uma amina, uma piridina e um grupo fenol coordenado a um centro metálico de cobre. Os espectros de ESI(+)-MS/MS para os complexos C1 (Figura 82a) e C3 (Figura 82b) mostram que os cátions de m/z 476 e m/z 290 são provenientes da espécie de m/z 512. Todos os fragmentos presentes nos espectros de massa foram atribuídos baseando-se nos seus perfis isotópicos.

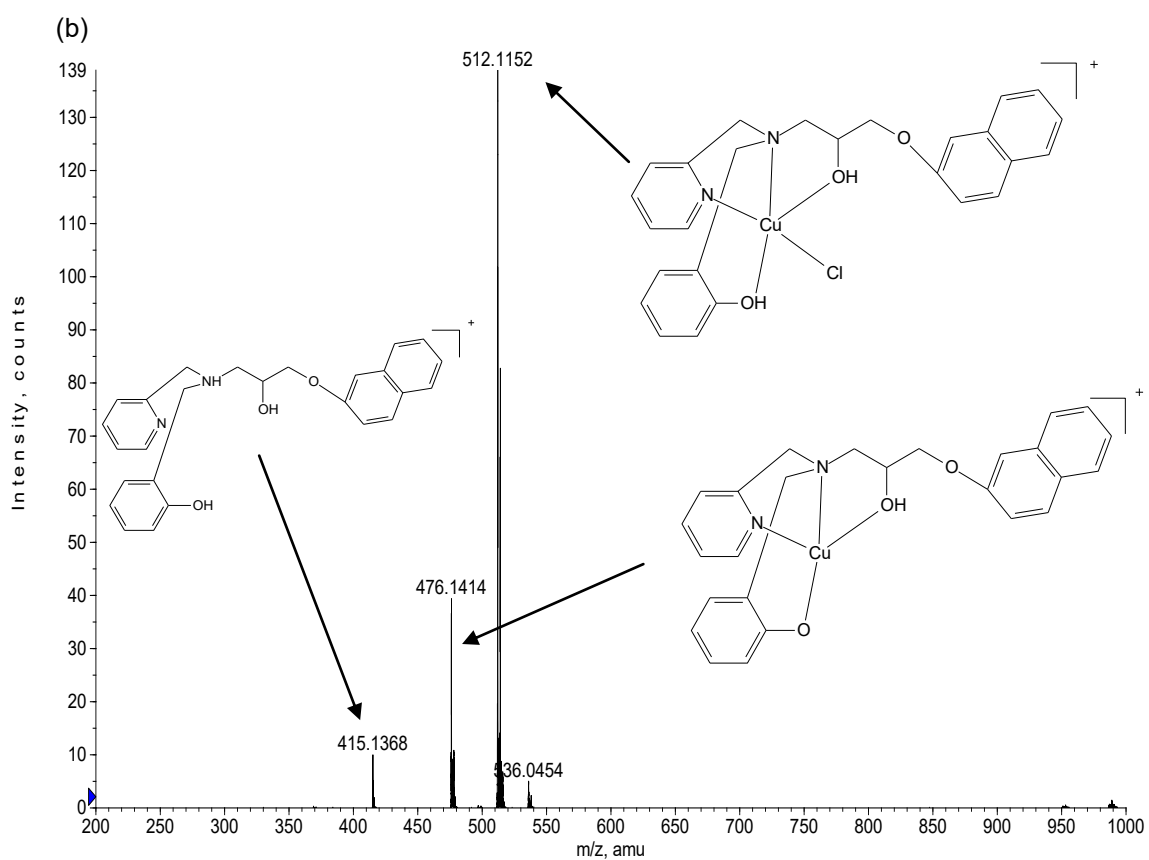
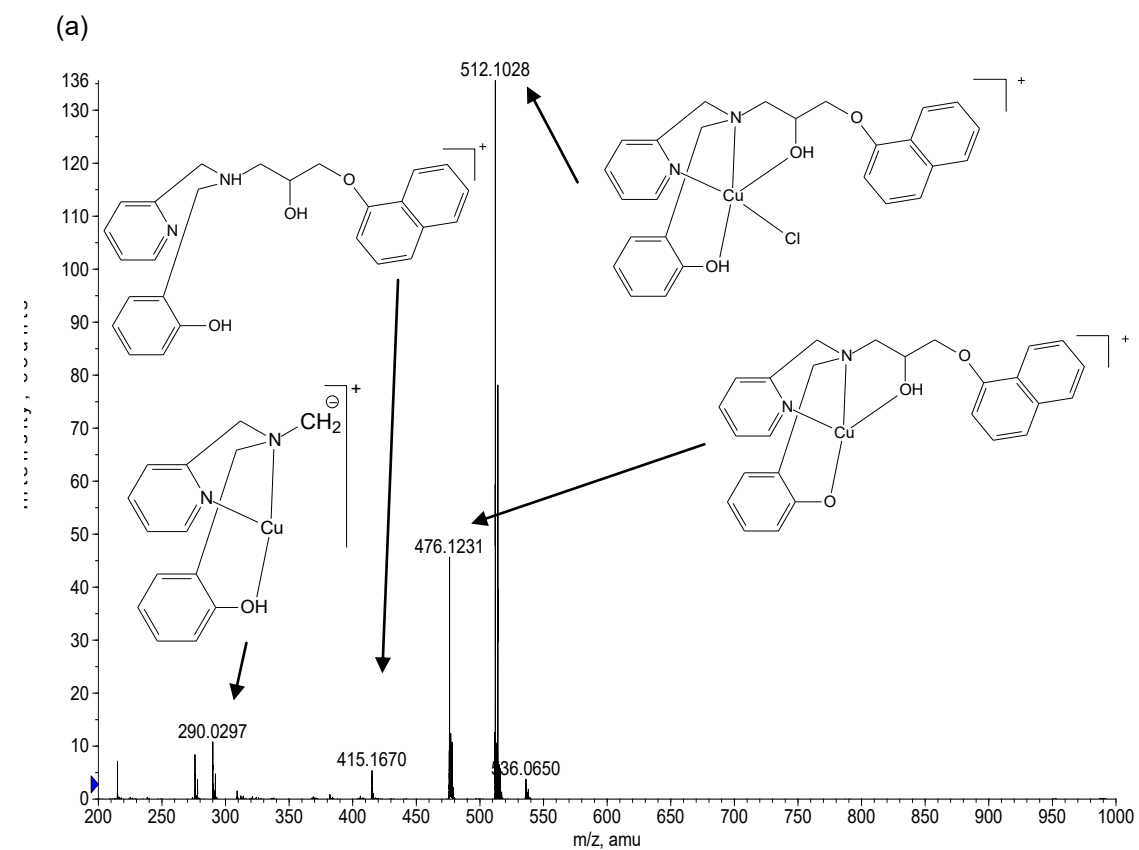


Figura 81. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para complexos C1 (a) e C3 (b).

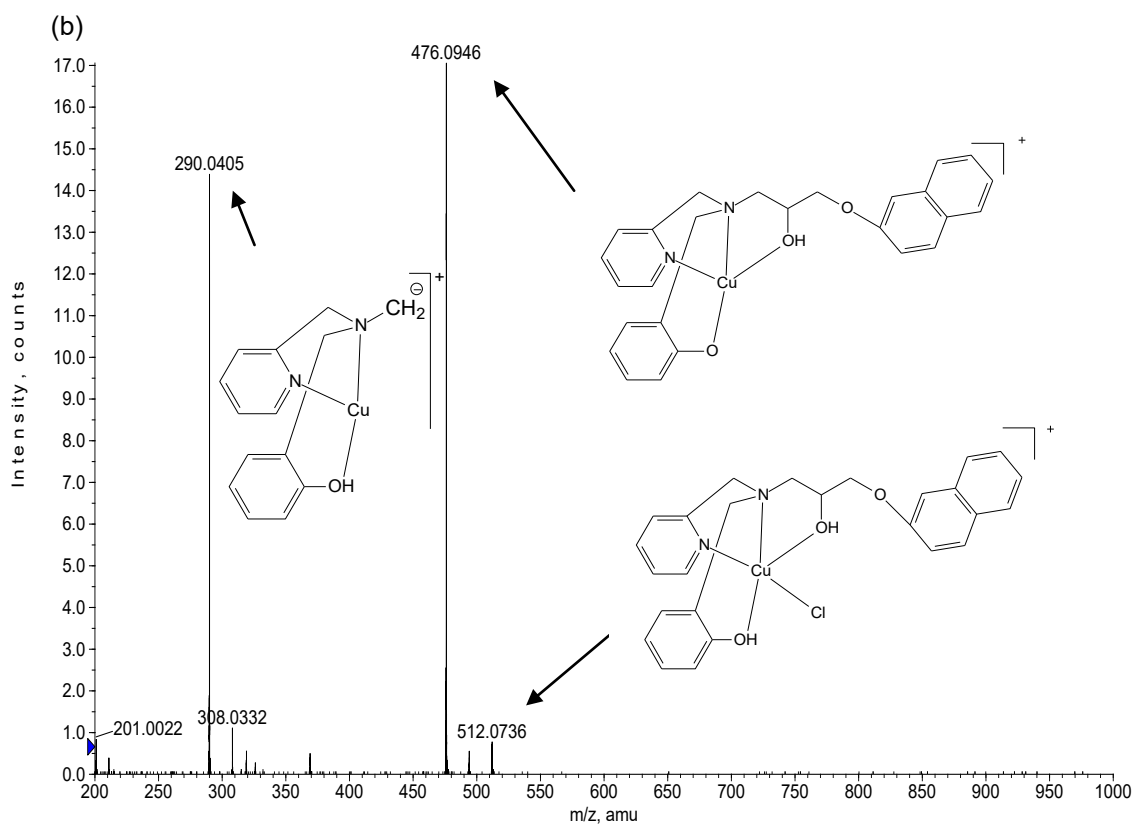
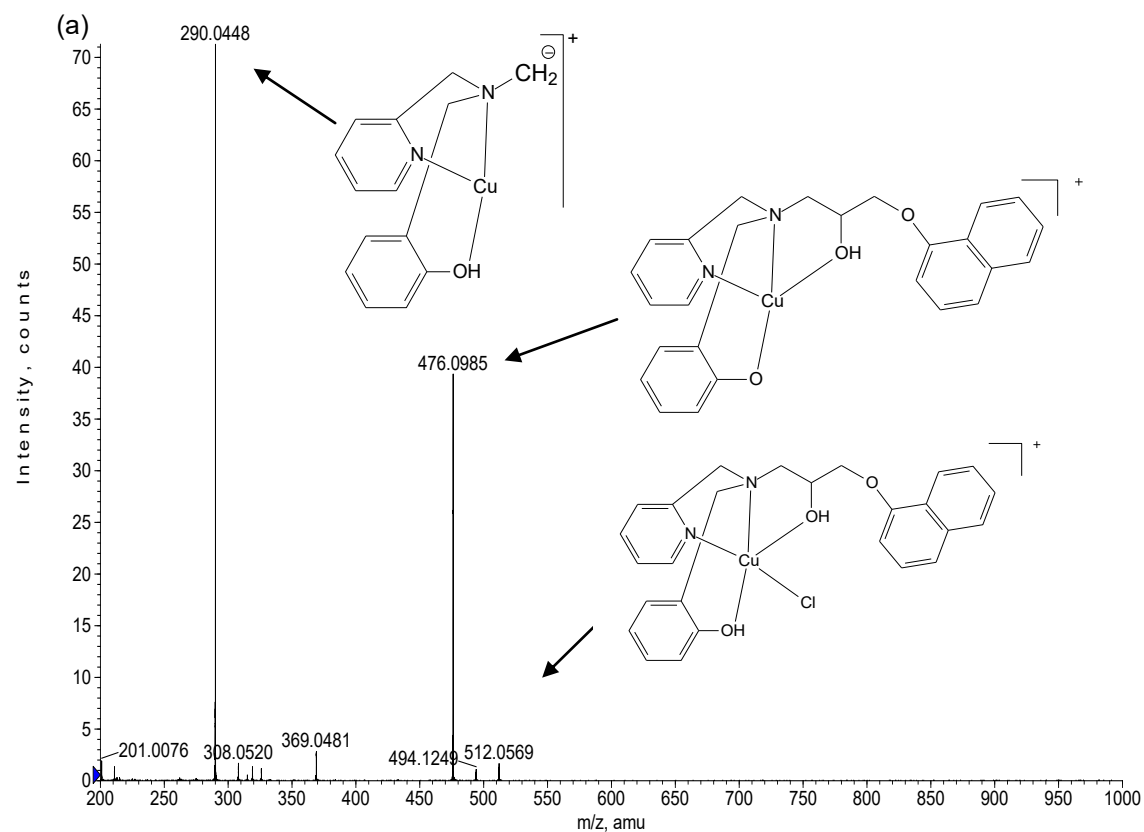


Figura 82. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexos C1 (a) e C3 (b) para o íon de m/z 512.

A Figura 83 mostra os voltamogramas cíclicos dos complexos C1 (Figura 83a) e C3 (Figura 83b). Os complexos C1 e C3 apresentam comportamentos eletroquímicos semelhantes sendo observados um processo anódico em 0,151 V para C1 e em 0,100 V para C3 e um processo catódico em -0,602 V para C1 e -0,548 V para C3, os quais são considerados irreversíveis. A presença de dois processos irreversíveis indica que os compostos analisados apresentam uma reação química acoplada ao processo redox Cu(II)/Cu(I). Assim é possível propor que ao sofrer redução, o centro metálico perca um dos seus ligantes, provavelmente o íon cloreto. Isto justifica o porquê do processo de oxidação ocorrer em potencial positivo, tendo em vista que a acidez de Lewis do metal aumenta significativamente com a saída do cloreto do ambiente de coordenação do metal. A semelhança estrutural entre os compostos C1 e C3 também podem ser observada por meio da semelhança encontrada para os valores de E_p apresentados na Tabela 33.

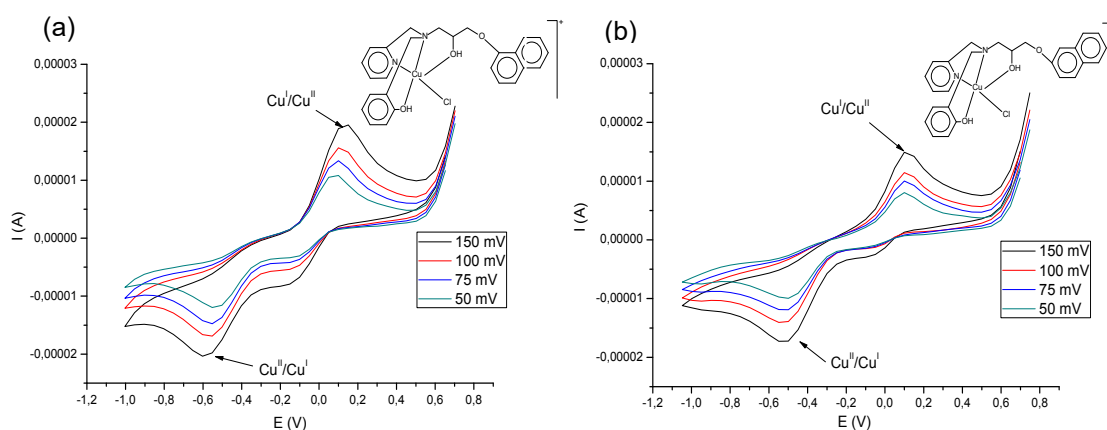


Figura 83. Voltamograma cíclico para os complexos C1 (a) e C3 (b). Eletrodo de trabalho: Carbono Vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: platina; eletrólito suporte: Perclorato de lítio 0,1 mol.L⁻¹. Os dados para o ferroceno, padrão interno, foram obtidos em separado devido a sobreposição do sinal deste com os exibidos pelos complexos C1 e C3.

Tabela 33. Valores de E_p referentes aos processos anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) observados para os complexos C1 e C3.

Compostos de coordenação	E_{pa} (V vs ENH)	E_{pc} (V vs ENH)
C1	0,164	-0,588
C3	0,114	-0,538

A Figura 84 mostra os espectros eletrônicos dos complexos C1 (Figura 84a) e C3 (Figura 84b) e a Tabela 34 sumariza os dados de espectroscopia eletrônica para os ligantes L1 e L3 e os seus respectivos complexos (C1 e C3). Observa-se na Tabela 34 que os ligantes L1 e L3 apresentam entre 208 nm e 320 nm transições $\pi \rightarrow \pi^*$, características de compostos aromáticos e heteroaromáticos (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Bandas semelhante são observadas para os respectivos complexos C1 e C3, entretanto, com pequenas variações nos valores do ϵ , o que confirma a reação de complexação destes ligantes com o sal de cobre.

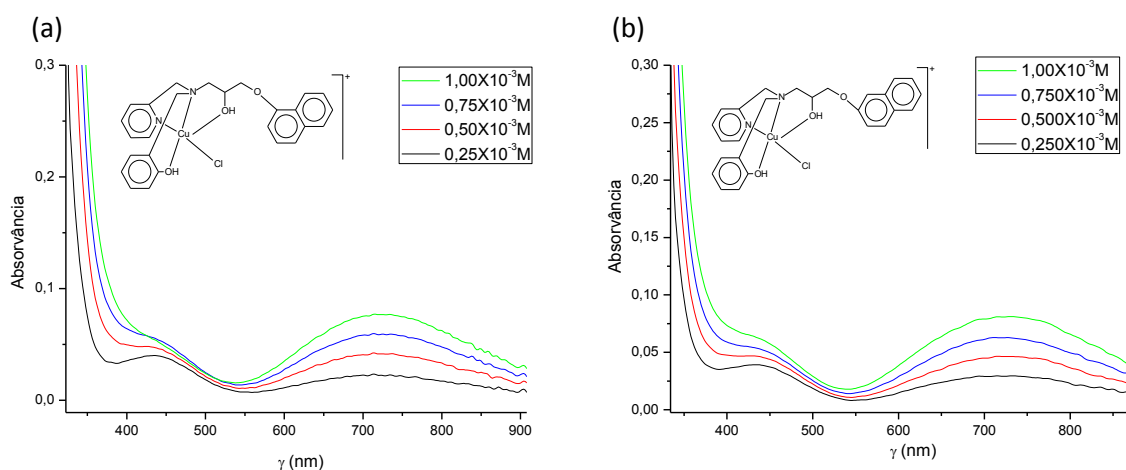


Figura 84. Espectros eletrônicos dos complexos C1 (a) e C3 (b), obtidos em metanol.

É característico para os complexos de cobre a presença de uma banda de absorção larga na região de baixa energia referente à transição $d-d$. Os compostos de coordenação de cobre Cu^{2+} são geralmente coloridos em função destas transições. Em virtude do efeito Jahn-Teller, podem ser observadas sobreposição de bandas resultando em uma banda $d-d$ assimétrica (LEE, 1999). O espectro eletrônico para os complexo C1 (Figura 84a) e C3 (Figura 84b) mostram, respectivamente, uma banda em 721,96 nm ($\epsilon=72,07\text{dm}^3.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e 731,93 ($\epsilon=68,34\text{dm}^3.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) as quais são atribuídas a transição $d-d$ em função do baixo valor do ϵ . Observa-se também um ombro em 444,02 nm ($18,21\text{dm}^3.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) para o complexo C1 e em 440,32 nm ($29,58\text{dm}^3.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) para o complexo C3, o que indica que estes complexos, em solução metanólica, apresentam geometria bipiramidal trigonal.

Segundo Rajendran *et al.* (1994), complexos com geometria piramidal de base quadrada apresentam banda de absorção na região de alta energia e um ombro na região de baixa energia, em contraste, complexos com geometria bipiramidal trigonal apresentam uma banda de absorção na região de baixa energia e um ombro na região de alta energia. Entretanto, a regra acima não pode ser aplicada para compostos multinucleares, pois estes podem possuir centros metálicos com geometrias distintas.

Tabela 34. Dados de espectroscopia eletrônica dos ligantes L1 e L3 e dos complexos C1 e C3 e suas respectivas atribuições.

Atribuição	Compostos							
	L1		C1		L3		C3	
	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ
$\pi \rightarrow \pi^*$	209,96	$1,21 \times 10^5$	208,04	$6,09 \times 10^4$	225,93	$1,02 \times 10^5$	225,94	$9,68 \times 10^3$
$\pi \rightarrow \pi^*$	231,00	$7,47 \times 10^4$	230,01	$3,73 \times 10^4$	-	-	-	-
$\pi \rightarrow \pi^*$	268,99	$1,89 \times 10^4$	268,00	$9,37 \times 10^4$	262,02	$1,10 \times 10^4$	262,22	$1,40 \times 10^3$
$\pi \rightarrow \pi^*$	280,93	$1,99 \times 10^4$	287,93	$1,11 \times 10^4$	270,04	$1,07 \times 10^4$	270,04	$1,34 \times 10^3$
$\pi \rightarrow \pi^*$	293,01	$1,64 \times 10^4$	-	-	281,97	$6,46 \times 10^3$	281,97	$1,07 \times 10^3$
$\pi \rightarrow \pi^*$	306,01	$1,11 \times 10^4$	305,94	$6,29 \times 10^3$	-	-	-	-
$\pi \rightarrow \pi^*$	319,93	$6,80 \times 10^3$	320,02	$3,19 \times 10^3$	-	-	-	-
Transição $d \rightarrow d$	-	-	444,02	18,21	-	-	440,32	29,58
Transição $d \rightarrow d$	-	-	721,96	72,07	-	-	731,93	68,34

$$\lambda_{\text{máx}} = (\text{nm}); \epsilon = (\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}).$$

4.1.2.2. Caracterização dos isômeros $[\text{Cu}(\text{L}2)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (C2), e $[\text{Cu}(\text{L}4)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (C4)

Para a obtenção dos complexos C2 ($[\text{Cu}(\text{L}2)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$) e C4 ($[\text{Cu}(\text{L}4)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) os seus respectivos ligantes L2 e L4 foram reagidos com sal de cobre CuCl_2 . Tanto o ligante L2 quanto o ligante L4 apresentam duas piridinas em suas estruturas provenientes do precursor P2. A diferença entre esses dois compostos se encontra na substituição do anel do naftol, o ligante L2 apresenta um substituinte na posição “ α ” e o L4 na posição “ β ”. A análise dos resultados mostraram grande semelhança entre os complexos C2 e C4 que, por esta razão, serão discutidos em conjunto.

Os espectros de infravermelho dos complexos C2 (Figura 85a) e C4 (Figura 85b) mostram bandas referentes aos seus respectivos ligantes L2 e L4. Variações no número de onda das absorções nos espectros dos complexos foram observadas e comparadas com as absorções dos ligantes indicando modificações na geometria destes compostos orgânicos após a reação de complexação com o metal. As atribuições das bandas observadas nos espectros dos complexos C2 e C4 estão descritas na Tabela 35.

A presença dos anéis aromáticos são confirmadas, para os complexos C2 (Figura 85a) e C4 (Figura 85b), pelos sinais referentes a deformação axial $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}=\text{N}$, deformação axial de $\text{C}-\text{H}_{\text{aromático}}$ e deformação angular no plano de $\text{C}-\text{H}_{\text{aromático}}$ ($\delta \text{CH}_{\text{aromático}}$). Entre 760 cm^{-1} e 834 cm^{-1} verificam-se a presença de bandas características de anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico e de aromáticos polinucleares para ambos os complexos (C2 e C4). Bandas de absorção semelhantes foram relatadas por Bull (2008) para o complexo de cobre obtido a partir do precursor P2.

Em 1269 cm^{-1} e 1259 cm^{-1} observam-se as bandas de deformação axial de $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ do éter alifático dos complexos C2 e C4 respectivamente. Bandas de deformação axial assimétrica e simétrica de CH_2 confirmam a presença dos grupos metileno para ambos os complexos. As regiões alargadas entre $3400-3600 \text{ cm}^{-1}$ observadas para os complexos C2 e C4 são atribuídas à deformação axial de $\text{O}-\text{H}$ de álcool em ligação de hidrogênio intermolecular ou

a moléculas de água de hidratação presentes nas estruturas dos complexos, o que é confirmado pela análise de CHN (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

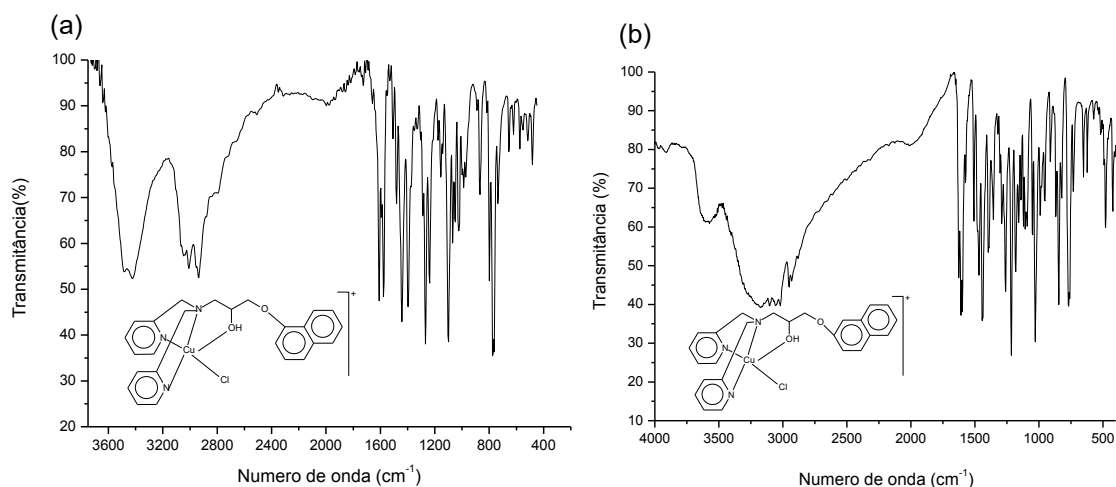


Figura 85. Espectros de infravermelho dos complexos (a) $[\text{Cu}(\text{L}2)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (C2) e (b) $[\text{Cu}(\text{L}4)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (C4), obtidos em pastilha de KBr.

Tabela 35. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos complexos $[\text{Cu}(\text{L}2)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (C2) e $[\text{Cu}(\text{L}4)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (C4), com suas respectivas atribuições.

C2		C4		Atribuição
Número de onda (cm^{-1})		Número de onda (cm^{-1})		
3425-3483		2750-3605		ν OH
3047, 3008		3103, 3057, 3021		ν CH _{aromático}
2936		2951, 2932		ν_{as} CH ₂
2881		2878		ν_{s} CH ₂
1609, 1578, 1443, 1396		1627, 1609, 1508, 1468, 1442		ν C=C; ν C=N
1269		1259		ν_{as} C-O-C alifático
1099		1215, 1182		δ CH _{aromático}
798; 775		834, 760		γ -CH ^a ; β -anel ^b

a= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; b= deformação de aromáticos polinucleares e do anel heteroaromático.

A Tabela 36 mostra os resultados de análise elementar (C, H e N) e da medida de condutividade para os complexos C2 e C4. A análise elementar revela que o complexo C2 apresenta em sua constituição um átomo de cobre, uma molécula do ligante L2, um íon cloreto coordenado, um íon cloreto como contra-íon e meia molécula de água de hidratação, resultando em um composto com peso molecular de 543,00 g.mol⁻¹. O complexo C4 apresenta esfera de coordenação semelhante ao complexo C2, contendo um átomo de cobre, uma molécula do ligante L4, um íon cloreto coordenado, um íon cloreto como contra-íon e duas moléculas de água de hidratação, resultando em um peso molecular de 570,00 g.mol⁻¹.

Os resultados da análise de condutividade (Tabela 36) mostram que os complexos C2 e C4, em solução metanólica, comportam-se como eletrólitos 1:1 uma vez que apresentaram valores entre 80 e 115 μS/cm. Os resultados de condutividade estão de acordo com os dados de análise elementar (C, H e N) que mostram que os complexos C2 e C4 apresentam um íon cloreto como contra-íon.

Tabela 36. Dados de análise elementar (C, H e N) e de condutivimetria, realizada na concentração de 1,0x10⁻³ M em metanol, para os complexos C2 e C4.

	Análise elementar						Condutivimetria	
	%C		%H		%N		Condutividade (μS/cm)	Espécie de eletrólito ^a
	Exper.	Calc.	Exper.	Calc.	Exper.	Calc.		
C2	55,49	55,30	4,64	4,83	7,85	7,74	82,9	1:1
C4	52,51	52,68	5,58	5,13	7,54	7,37	81,6	1:1

Os espectros de ESI-(+)-MS para os complexos C2 (Figura 86) e C4 (Figura 87) apresentam sinais de *m/z* 497 e *m/z* 275 comuns para ambos os complexos. O cátion de *m/z* 497 corresponde a espécie mononuclear na qual o centro metálico de cobre encontra-se coordenado a uma molécula do ligante e a um íon cloreto resultando em [Cu(L2)(Cl)]⁺ (Figura 86) e [Cu(L4)(Cl)]⁺ (Figura 87). O sinal de *m/z* 275 (Figura 88) é atribuído ao cátion com uma amina e duas piridinas coordenadas ao centro metálico de cobre.

+TOF MS: 0.233 to 0.500 min from B1309azulpositivoB.wiff
a=3.55578526467228000e-004, t0=4.31952097661342120e+001

Max. 610.6 counts.

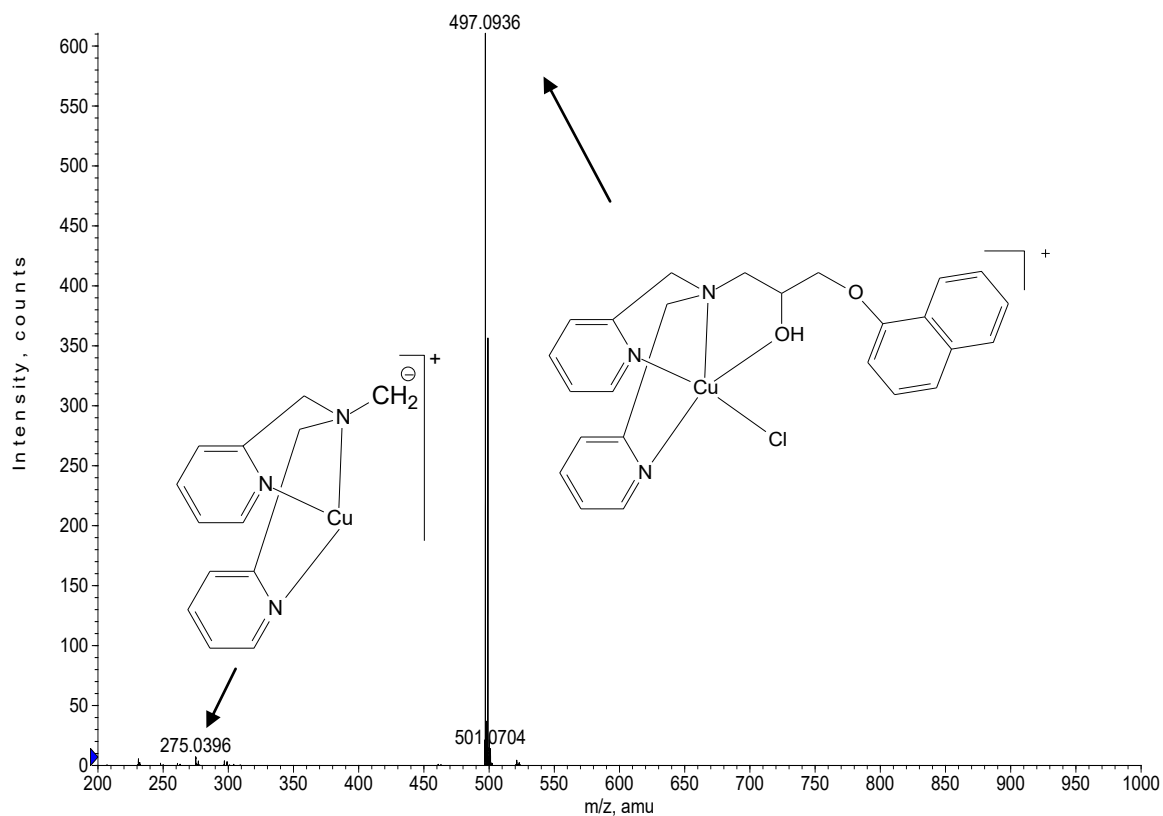


Figura 86. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para o complexo C2.

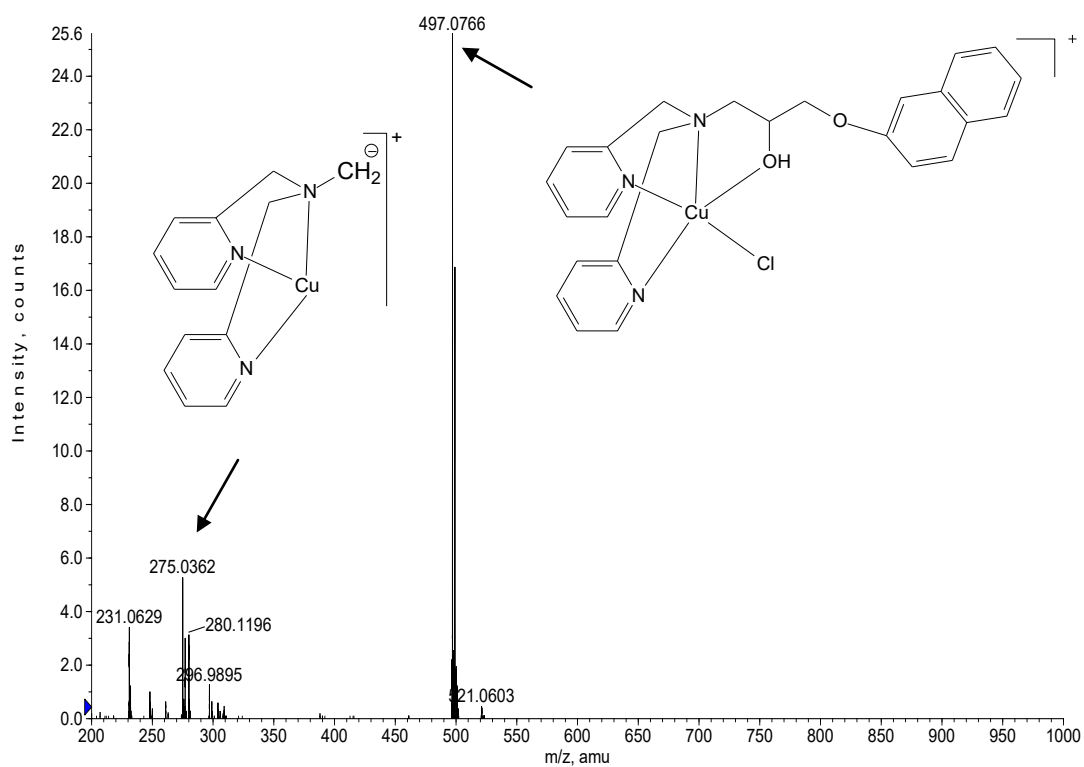


Figura 87. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para o complexo C4.

O espectro de ESI(+)-MS/MS, para o complexo C4 (Figura 88), mostra que a espécie de m/z 275 é proveniente da fragmentação do m/z 497. Todos os fragmentos presentes nos espectros de massa foram atribuídos baseando-se nos seus perfis isotópicos.

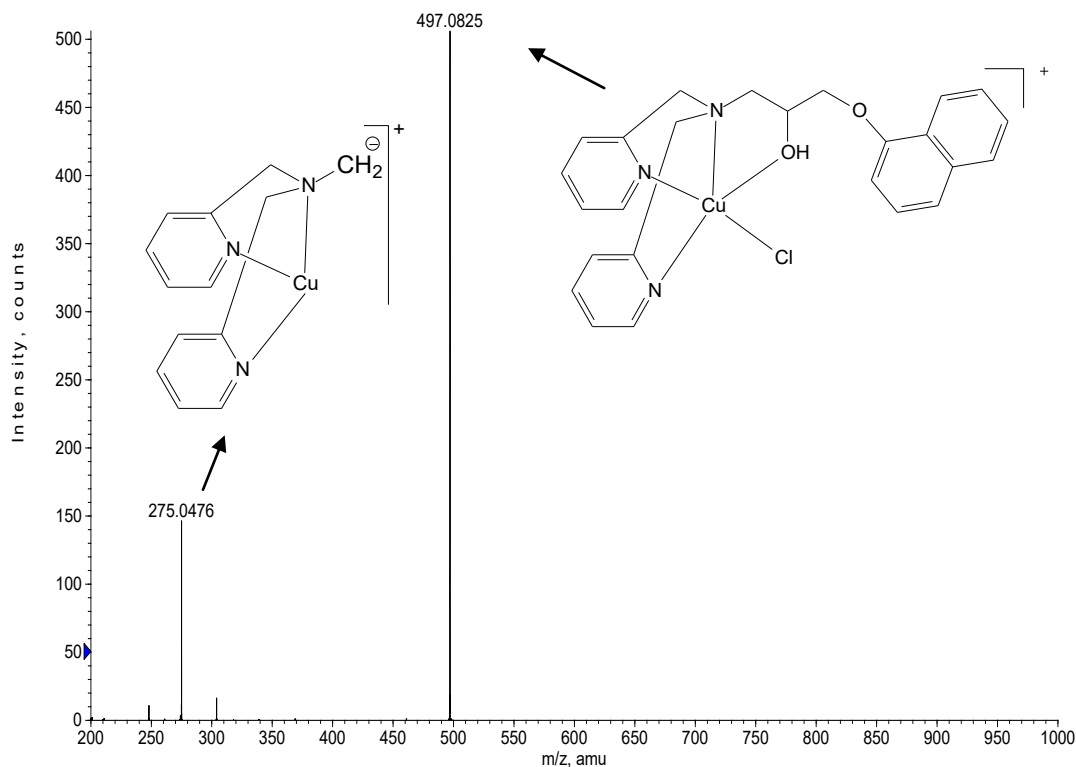


Figura 88. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) do cátion de m/z 497, relativo ao complexo C2.

Os complexos C2 (Figura 89a) e C4 (Figura 89b), que são isômeros, apresentaram o mesmo perfil eletroquímico. Os voltamogramas cíclicos revelaram a presença de um processo redox reversível atribuído ao par redox Cu(II)/Cu(I), com $E_{1/2}$ de -0,324 e de -0,348V vs ENH para os complexos C2 e C4, respectivamente. A presença de apenas um processo redox é condizente com a obtenção de complexos mononucleares de cobre. Os valores próximos de ΔE_p para os compostos C2 e C4, apresentados na Tabela 37, reforçam a semelhança estrutural entre eles.

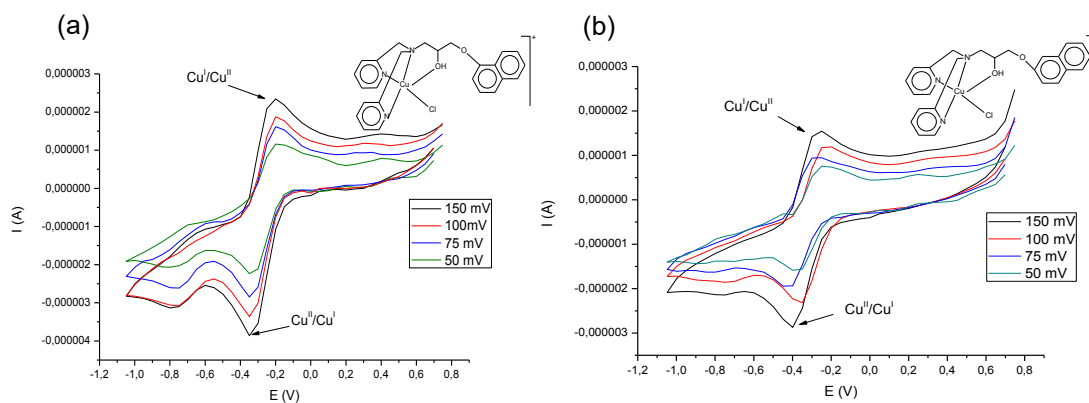


Figura 89. Voltamograma cíclico para os complexos (a) C2 e (b) C4. Eletrodo de trabalho: Carbono Vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: platina; eletrólito suporte: Perclorato de lítio 0,1 mol.L⁻¹. Os dados para o ferroceno, padrão interno, foram obtidos em separado devido a sobreposição do sinal deste com os exibidos pelos complexos C2 e C4.

Tabela 37. Valores de ΔE_p e $E_{1/2}$ referentes aos pares redox observados para os complexos C2 e C4.

Compostos de coordenação	ΔE_p V	$E_{1/2}$ (V vs ENH)
C2	0,149	-0,324
C4	0,149	-0,348

A Figura 90 mostra os espectros eletrônicos dos complexos C2 (Figura 90a) e C4 (Figura 9b) para a região de baixa energia. O dados de espectroscopia eletrônica para os ligantes L2 e L4 e para os complexos C2 e C4 estão sumarizados na Tabela 38.

Analisando os dados de espectroscopia eletrônica apresentados nas Tabelas 34 e 38, observam-se bandas semelhantes na região das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ para os compostos orgânicos e de coordenação obtidos a partir do α -naftol (L1, L2, C1, C2) assim como para os compostos obtidos a partir do β -naftol (L3, L4, C3 e C4).

Os ligantes L2 e L4 apresentam entre 209 nm e 320 nm transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ (Tabela 38), características de compostos aromáticos e heteroaromáticos (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Bandas na mesma região são observadas para os respectivos complexos C2 e C4, entretanto, com variações nos valores de ϵ , o que confirma a reação de complexação dos ligantes com o metal. Os espectros eletrônicos dos complexo C2 (Figura 90a) e

C4 (Figura 90b) mostram respectivamente uma única banda em 707,94 nm ($\epsilon = 77,91 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e em 702,06 nm ($\epsilon = 68,89 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), as quais são atribuídas a transição $d-d$ em função do baixo valor do ϵ .

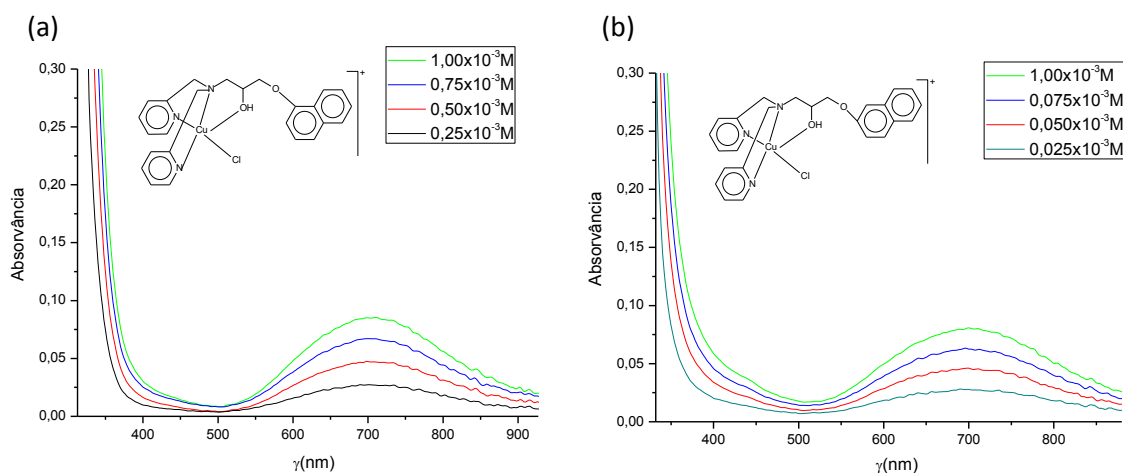


Figura 90. Espectros eletrônicos dos complexos C2 (a) e C4 (b), obtidos em metanol.

Tabela 38. Dados de espectroscopia eletrônica dos ligantes L2 e L4 e dos complexos C2 e C4 e suas respectivas atribuições.

Atribuição	Compostos							
	L2		C2		L4		C4	
	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ
$\pi \rightarrow \pi^*$	210,06	$7,39 \times 10^4$	209,93	$15,43 \times 10^4$	225,93	$9,06 \times 10^4$	225,94	$9,74 \times 10^4$
$\pi \rightarrow \pi^*$	230,94	$4,79 \times 10^4$	230,01	$1,01 \times 10^4$	-	-	-	-
$\pi \rightarrow \pi^*$	262,01	$1,29 \times 10^4$	262,02	$9,49 \times 10^4$	262,03	$1,50 \times 10^4$	259,98	$1,72 \times 10^4$
$\pi \rightarrow \pi^*$	267,99	$1,24 \times 10^4$	267,99	$5,99 \times 10^4$	270,04	$1,26 \times 10^4$	270,04	$1,23 \times 10^4$
$\pi \rightarrow \pi^*$	292,95	$9,64 \times 10^3$	292,01	$1,92 \times 10^4$	281,97	$6,12 \times 10^3$	281,97	$7,16 \times 10^3$
$\pi \rightarrow \pi^*$	305,95	$6,35 \times 10^3$	305,94	$1,69 \times 10^4$	-	-	-	-
$\pi \rightarrow \pi^*$	320,03	$3,70 \times 10^3$	320,02	$5,66 \times 10^3$	-	-	-	-
Transição $d \rightarrow d$	-	-	707,94	77,91	-	-	702,06	68,69

$$\lambda_{\text{máx}} = (\text{nm}); \epsilon = (\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}).$$

4.1.2.3. Caracterização dos isômeros $[\text{Cu}(\text{L5})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (C5) e $[\text{Cu}(\text{L7})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (C7)

Os complexos C5 e C7 foram obtidos a partir da reação dos respectivos ligantes L5 e L7 com o sal de cobre CuCl_2 . Os ligantes L5 e L7 apresentam em suas estruturas uma piridina e um fenol provenientes do precursor P1. Esses dois complexos diferem na posição do substituinte da 1,2-benzopirona (cumarina). Para o ligante L6 a substituição ocorre na posição "4" e para o ligante L8 na posição "7". Em virtude da grande analogia entre os complexos C5 e C7 a discussão da caracterização dos mesmos será realizada em conjunto. Os espectros de infravermelho e as atribuições detalhadas das principais bandas observadas para os complexos C5 e C7 estão apresentados respectivamente na Figura 91 e Tabela 39.

Observam-se nos espectros de infravermelho dos complexos C5 (Figura 91a) e C7 (Figura 91b) sinais atribuídos ao anel piridínico 1,2-dissubstituído e ao fenol, previamente discutidos para os ligantes L1, L3, L5 e L7 e para os complexos C1 e C3. Assim como observado para os complexos C1 e C3, bandas de absorção presentes nos espectros de infravermelho dos complexos C5 e C7 também foram relatadas por Bull (2008) para complexo de cobre obtido a partir do precursor P1. As vibrações mais características presentes nos espectros de infravermelho dos complexos C5 e C7 correspondem a deformações axiais de $\text{C}=\text{O}_{\text{lactona}}$ e $\text{C}-\text{O}_{\text{lactona}}$ dos grupos cumarínicos, também presentes nos espectros de infravermelho dos seus respectivos ligantes.

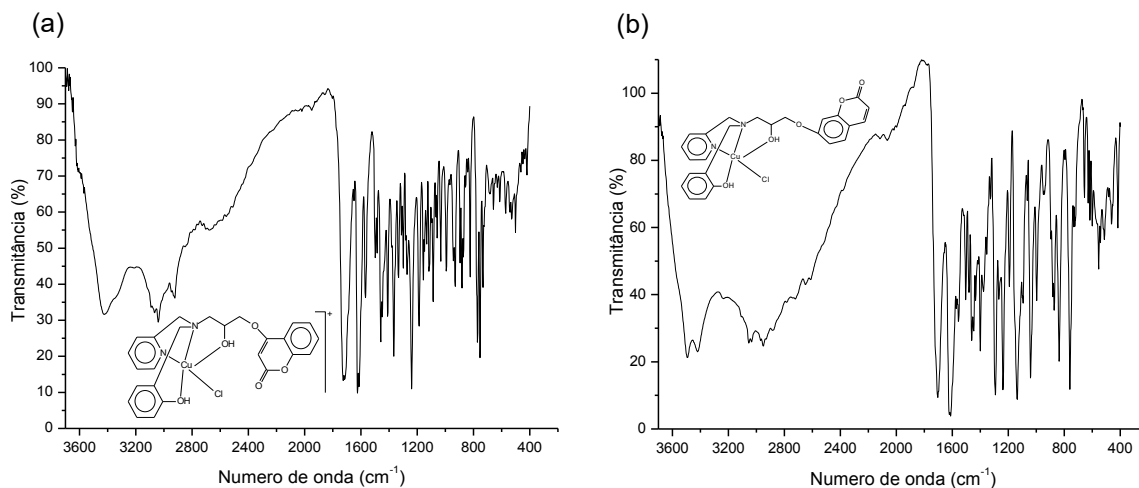
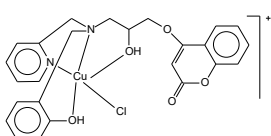
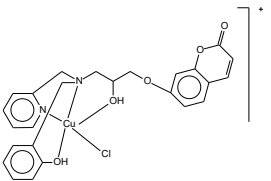


Figura 91. Espectros de infravermelho dos complexos (a) $[\text{Cu}(\text{L5})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (C5) e (b) $[\text{Cu}(\text{L7})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (C7), obtidos em filme.

Tabela 39. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos complexos $[\text{Cu}(\text{L5})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (C5) e $[\text{Cu}(\text{L7})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (C7), com suas respectivas atribuições.

C5		C7		Atribuição
				
Número de onda (cm^{-1})	Número de onda (cm^{-1})	Número de onda (cm^{-1})	Número de onda (cm^{-1})	
3300-3450		3400-3500-		ν OH
3066		3038		ν CH aromático
2922		2949		ν_{as} CH ₂
1720		1703		ν C=O lactona
1624, 1566, 1458, 1410,		1620, 1462, 1400,		ν C=C; ν C=N
1273		1294		ν_{as} C-O-C alifático
1240, 1186, 1185		1236, 1136, 1041		ν C-O lactona
1240		1236		ν C-O ^a
824, 771, 756		837, 759		γ -CH ^b ; β -anel ^c

a= deformação axial de C-O de fenol; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; c= deformação de aromáticos polinucleares e do anel heteroaromático.

A análise elementar (C, H e N) e a medida de condutividade para os complexos C5 e C7 são apresentadas na Tabela 40. A análise elementar (C, H e N) mostra que tanto o complexo C5 quanto o C7 são constituídos de uma molécula do respectivo ligante, um íon cloreto coordenado, um íon cloreto

como contra-íon e duas e meia moléculas de água de hidratação, resultando em complexos com peso molecular de $612,00 \text{ g.mol}^{-1}$.

As análises de condutividade (Tabela 40) indicam que os complexos C5 e C7 se comportam em solução metanólica como eletrólitos 1:1. Os resultados de condutividade estão de acordo com os dados de análise elementar (C, H e N) os quais sugerem a presença de um íon cloreto como contra-íon nos complexos C5 e C7.

Tabela 40. Dados de análise elementar (C, H e N) e de condutivimetria, realizada na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ em metanol, para os complexos C5 e C7.

	Análise elementar						Condutivimetria	
	%C		%H		%N		Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	Espécie de eletrólito ^a
	Exper.	Calc.	Exper.	Calc.	Exper.	Calc.		
C5	49,04	49,07	5,17	4,78	4,49	4,58	83,1	1:1
C7	49,20	49,07	5,16	4,78	4,32	4,58	87,1	1:1

Os espectros de ESI-(+)-MS dos complexos C5 (Figura 92a) e C7 (Figura 92b) mostram que as espécies catiônicas de m/z 530, 494 e 290 são comuns para ambos os complexos. O sinal de m/z 530 corresponde ao cátion mononuclear onde o centro metálico de cobre encontra-se coordenado aos seus respectivos ligantes e ao íon cloreto, o que está de acordo com o proposto pela análise elementar e condutivimetria, para ambos os complexos. O sinal de m/z 494 corresponde aos complexos C5 e C7 após a perda de uma molécula de HCl, resultando em $[\text{Cu}(\text{L5})]^+$ (Figura 92a) e $[\text{Cu}(\text{L7})]^+$ (Figura 92b). O sinal de m/z 290 corresponde a espécie mononuclear na qual o centro metálico de cobre encontra-se coordenado a uma amina, uma piridina e um fenol, conforme apresentado na Figura 92. O complexo C7 apresenta também o sinal de m/z 989 referente a uma espécie binuclear como mostra a Figura 92b. Todos os fragmentos presentes nos espectros de massa foram atribuídos baseando-se nos seus perfis isotópicos.

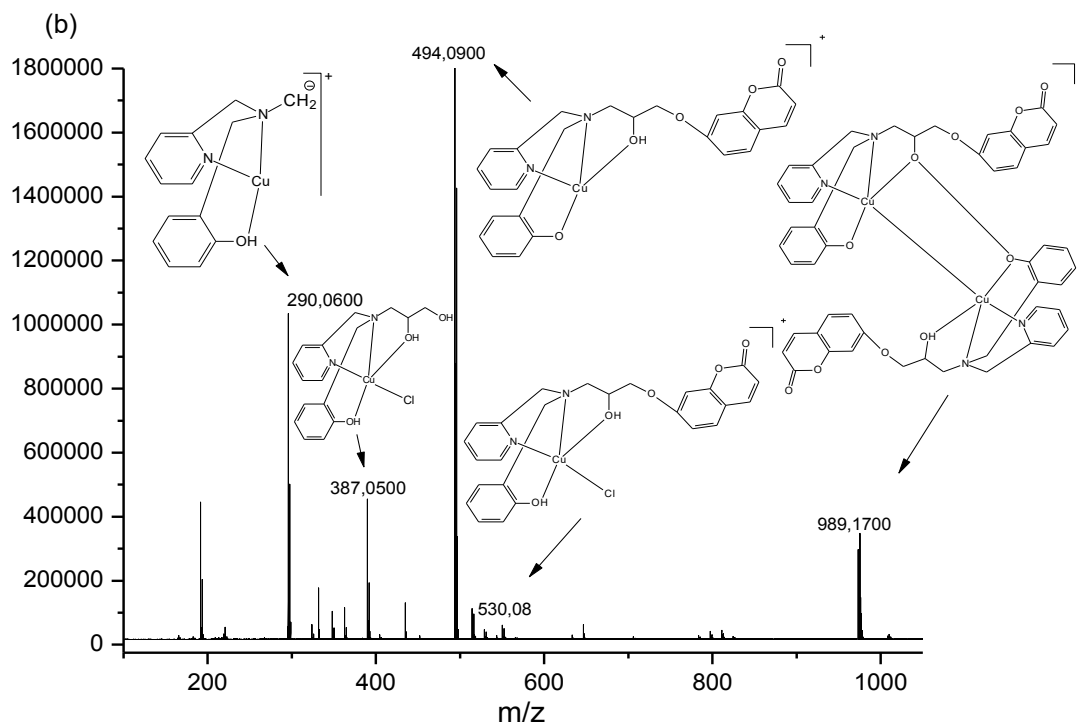
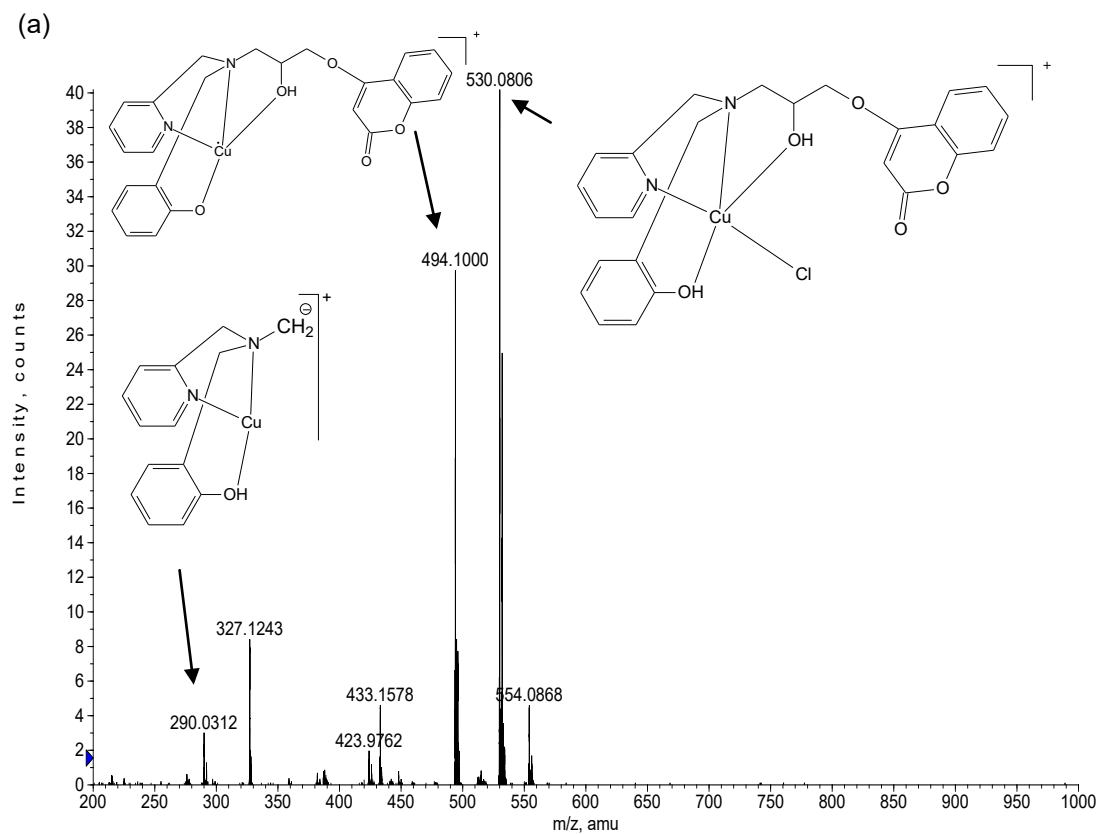


Figura 92. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para os complexos C5 (a) e C7 (b).

A análise do espectro ESI(+)-MS/MS do complexo C5 (Figura 93) mostra que os sinais de m/z 290, 387 e 494 são provenientes da fragmentação do íon de m/z 530. Os resultados de espectroscopia de massas estão de acordo com a análise elemental (C,H e N) que sugere que os complexos C5 e C7 são cátions mononucleares monovalentes.

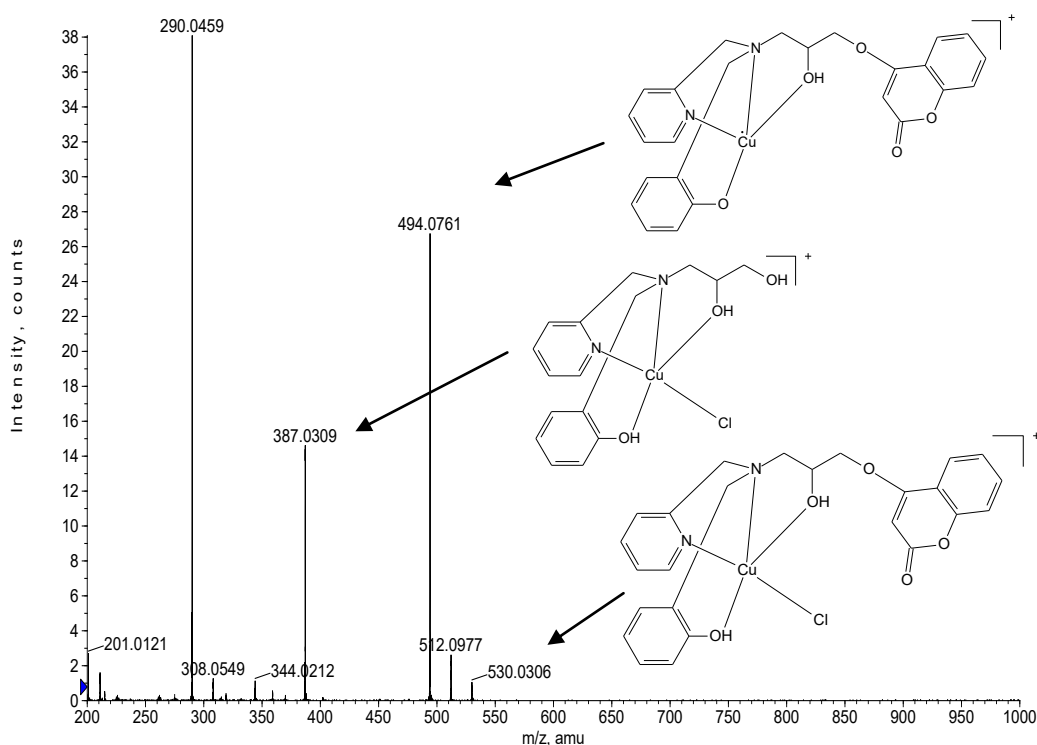


Figura 93. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) do cátion de m/z 530, relativo ao complexo C5.

Os complexos C5 (Figura 94a) e C7 (Figura 94b) apresentam comportamento eletroquímico semelhante aos observados para os complexos C1 e C3, como consequência da analogia estrutural, uma vez que todos estes complexos apresentam em sua estrutura o precursor P1. Os voltamogramas cíclicos mostram um processo anódico em 0,141 V para C5 e em 0,149 V para C7 e um processo catódico em -0,453 V para C5 e em -0,449 V para C7, os quais são considerados irreversíveis.

A presença de dois processos irreversíveis indica que os compostos analisados apresentam uma reação química acoplada ao processo redox Cu(II)/Cu(I), semelhante ao discutido para os complexos C1 e C3. A analogia estrutural

entre os complexos C5 e C7 também podem ser verificada por meio da proximidade dos valores de valores de E_p obtidos para ambos os complexos (Tabela 41).

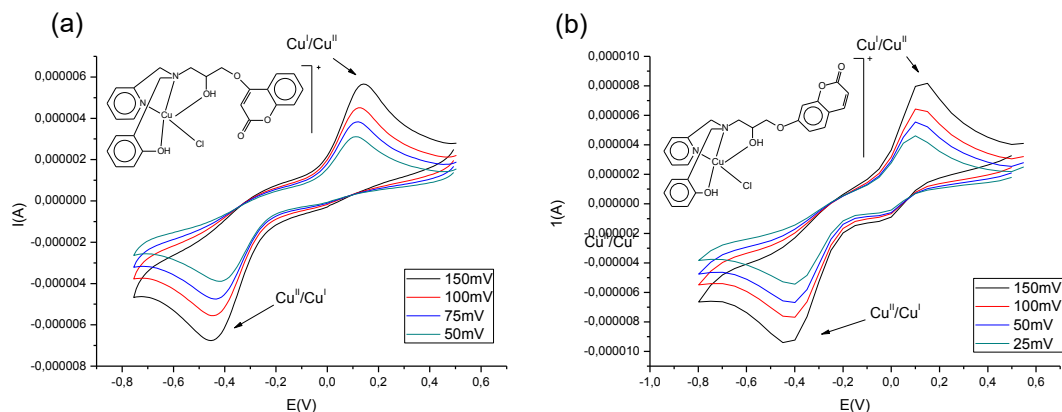


Figura 94. Voltamograma cíclico para os complexos (a) C5 e (b) C7. Eletrodo de trabalho: Carbono Vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: platina; eletrólito suporte: Perclorato de lítio 0,1 mol.L⁻¹. Os dados para o ferroceno, padrão interno, foram obtidos em separado devido a sobreposição do sinal deste com os exibidos pelos complexos C5 e C7.

Tabela 41. Valores de ΔE_p referentes aos processos anódico e catódico observados para os complexos C5 e C7.

Compostos de coordenação	E_{pa} (V vs ENH)	E_{pc} (V vs ENH)
C5	0,036	-0,558
C7	0,045	-0,554

Os espectros eletrônicos dos complexos C5 (Figura 95a) e C7 (Figura 95b) estão apresentados na Figura 95. A sumarização dos dados de espectroscopia eletrônica para os ligantes L5 e L7 e para os seus respectivos complexos estão apresentados na Tabela 42. Observa-se que os ligantes L5 e L7 apresentam entre 214 nm e 323 nm transições $\pi \rightarrow \pi^*$, características de compostos aromáticos e heteroaromáticos (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Transições eletrônicas semelhante são observadas para os respectivos complexos, entretanto, com variações nos valores do ϵ , o que confirma a reação de complexação destes ligantes com o metal. O espectro eletrônico do complexo C5 (Figura 95a) mostra uma transição $d \rightarrow d$ em 727,95 nm ($\epsilon = 69,01 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e um ombro em 448,00 nm ($\epsilon = 37,84 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) o que indica que este complexo apresenta geometria bipiramidal trigonal em solução metanólica.

Similarmente ao complexo C5, o complexo C7 (Figura 95b) apresenta um ombro em 435,94 ($\epsilon = 115,12 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e uma banda em 719,95 ($\epsilon = 84,26 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) sendo ambas atribuídas a transições $d-d$ em função do baixo valor de ϵ .

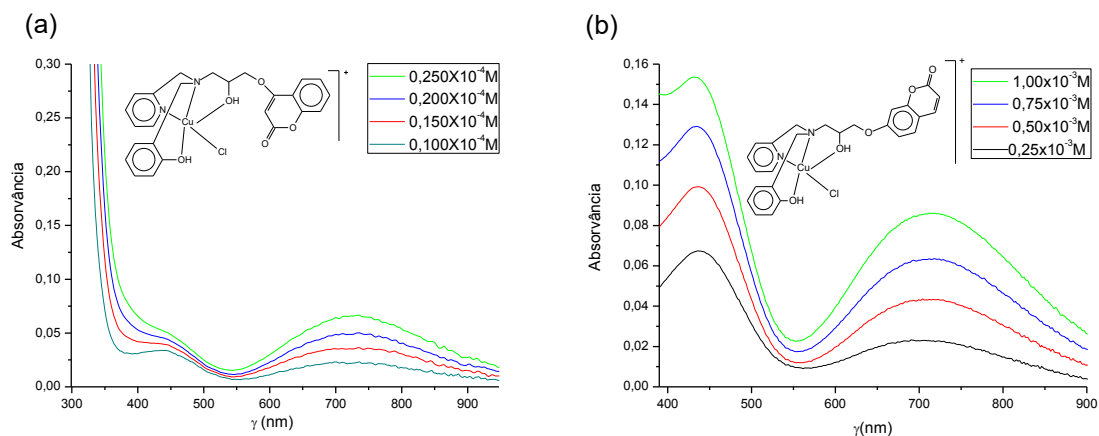


Figura 95. Espectros eletrônicos dos complexos C5 (a) e C7 (b), obtidos em metanol.

Tabela 42. Dados de espectroscopia eletrônica dos ligantes L5 e L7 e dos complexos C5 e C7 e suas respectivas atribuições.

Atribuição	Compostos							
	L5		C5		L7		C7	
	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ
$\pi \rightarrow \pi^*$	214,01	$3,05 \times 10^4$	214,01	$8,56 \times 10^3$	218,07	$1,66 \times 10^4$	235,95	$1,31 \times 10^4$
$\pi \rightarrow \pi^*$	-	-	-	-	253,99	$3,93 \times 10^3$	251,00	$9,49 \times 10^3$
$\pi \rightarrow \pi^*$	264,06	$2,95 \times 10^4$	264,06	$5,01 \times 10^3$	262,96	$4,46 \times 10^3$	264,06	$1,01 \times 10^4$
$\pi \rightarrow \pi^*$	276,01	$1,12 \times 10^4$	276,00	$3,40 \times 10^4$	268,93	$5,22 \times 10^3$	270,97	$1,08 \times 10^4$
$\pi \rightarrow \pi^*$	302,03	$6,03 \times 10^3$	302,03	$1,61 \times 10^4$	283,07	$6,24 \times 10^3$	292,95	$1,49 \times 10^4$
$\pi \rightarrow \pi^*$	315,95	$3,68 \times 10^3$	315,05	$1,38 \times 10^4$	322,99	$1,27 \times 10^4$	318,93	$1,76 \times 10^4$
Transição $d \rightarrow d$	-	-	448,00	37,84	-	-	435,94	115,12
Transição $d \rightarrow d$	-	-	727,95	69,01	-	-	719,95	84,26

$$\lambda_{\text{máx}} = (\text{nm}); \epsilon = (\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}).$$

4.1.2.4. Caracterização dos isômeros $[\text{Cu}(\text{L6})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (C6) e $[\text{Cu}(\text{L8})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (C8)

Para a obtenção dos complexos C6 e C8 os seus respectivos ligantes L6 e L8 foram reagidos com o sal de cobre CuCl_2 . Os ligantes L6 e L8 apresentam duas piridinas em sua estrutura, proveniente do precursor P2. Este dois complexos diferem na posição do substituinte da 1,2-benzopirona (cumarina), para o ligante L6 a substituição ocorre na posição “4” e para o ligante L8 na posição “7”. Em virtude da grande analogia entre os complexos C6 e C8 a discussão da caracterização dos mesmos será realizada em conjunto. A Figura 96 mostra os espectros de infravermelho e a Tabela 43 mostra as atribuições das principais bandas de absorção observadas para os complexos C6 e C8.

Os espectros de infravermelho dos complexos C6 (Figura 96a) e C8 (Figura 96b) mostram bandas referentes aos ligantes L6 e L8, previamente discutidos, que confirmam a presença do anel piridínico 1,2-dissubstituído. Bandas de absorção presentes nos espectros de infravermelho dos complexos C6 e C8 também foram relatadas previamente por Bull (2008) para um complexo de cobre obtido a partir do precursor P2.

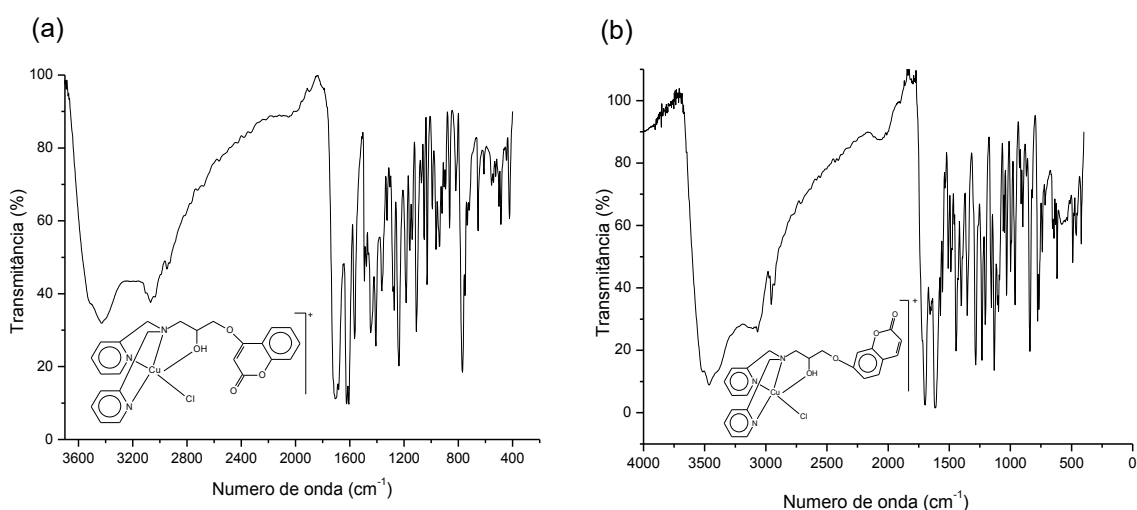
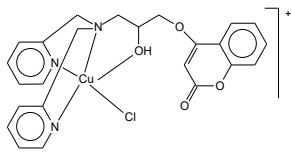
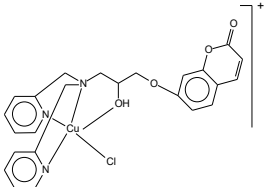


Figura 96. Espectros de infravermelho dos complexos (a) $[\text{Cu}(\text{L6})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (C6) e (b) $[\text{Cu}(\text{L8})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (C8), obtidos em pastilha de KBr.

A presença do grupo cumarínico nos complexos C6 e C8 são confirmadas pelas bandas de deformações axiais de C=O_{lactona} e C-O_{lactona} de 1,2-benzopirona, também presentes nos espectros de infravermelho dos seus respectivos ligantes (L6 e L8).

Tabela 43. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos complexos [Cu(L6)Cl]Cl.4H₂O (C6) e [Cu(L8)Cl]Cl.4H₂O (C8), com suas respectivas atribuições.

C6		C8		Atribuição
				
Número de onda (cm ⁻¹)		Número de onda (cm ⁻¹)		
3300-3500		3300-3500		v OH
3065		3067		v CH _{aromático}
2945		2955		v _{as} CH ₂
1709		1699		v C=O _{lactona}
1624, 1564, 1446, 1408,		1613, 1508, 1444, 1402, 1352		v C=C; v C=N
1273		1282		v _{as} C-O-C
1240, 1184, 1109		1232, 1097		v C-O _{lactona}
819, 769		841, 777		γ-CH ^a ; β-anel ^b

a= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; b= deformação de aromáticos polinucleares e do anel heteroaromático.

A Tabela 44 mostra os resultados de análise elementar (C, H e N) e das medidas de condutivimetria para os complexos C6 e C8. De acordo com a análise elementar (C, H e N) tanto o complexo C6 quanto o complexo C8 são constituídos por um centro de cobre, uma molécula do respectivo ligante, um íon cloreto coordenado, um íon cloreto como contra-íon e quatro moléculas de água de hidratação, resultando em complexos com peso molecular de 624,00 g.mol⁻¹.

A análise de condutivimetria (Tabela 44) mostra que os complexos C6 e C8 se comportam como eletrólitos 1:1 em solução metanólica. Os resultados de condutivimetria e de análise elementar (C, H e N) indicam que os complexos C6 e C7 possuem um íon cloreto como contra-íon.

Tabela 44. Dados de análise elementar (C, H e N) e de condutivimetria realizada na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ M em metanol, para os complexos C6 e C8.

	Análise elementar						Condutivimetria	
	%C		%H		%N		Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	Espécie de eletrólito ^a
	Exper.	Calc.	Exper.	Calc.	Exper.	Calc.		
C6	46,26	46,20	4,65	5,01	6,63	6,73	89,2	1:1
C8	46,45	46,20	5,30	5,01	6,58	6,73	88,5	1:1

Observa-se nos espectros de ESI(+)-MS dos complexos C6 (Figura 97a) e C8 (Figura 97b) que a espécie de m/z 515 é comum para ambos os complexos e corresponde a espécie mononuclear na qual o centro metálico de cobre encontra-se coordenado a uma molécula do ligante e a um íon cloreto resultando em $[\text{Cu}(\text{L6})\text{Cl}]^+$ (Figura 97a) e $[\text{Cu}(\text{L8})\text{Cl}]^+$ (Figura 97b), respectivamente. Nos espectros de ESI(+)-MS dos complexos C6 e C8 é observado respectivamente o sinal de m/z 297 (Figura 97a) e de m/z 275 (Figura 97b) cujas atribuições estão apresentadas na Figura 97. O complexo C8 apresenta o cátion de m/z 480 (Figura 97b) no qual o centro metálico de cobre encontra-se coordenado a uma molécula do ligante com o álcool desprotonado. A análise do espectro ESI(+)-MS/MS do complexo C6 (Figura 98) mostra que o sinal de m/z 275 é proveniente da fragmentação do íon de m/z 515. Todos os fragmentos presentes nos espectros de massa foram atribuídos baseando-se nos seus perfis isotópicos.

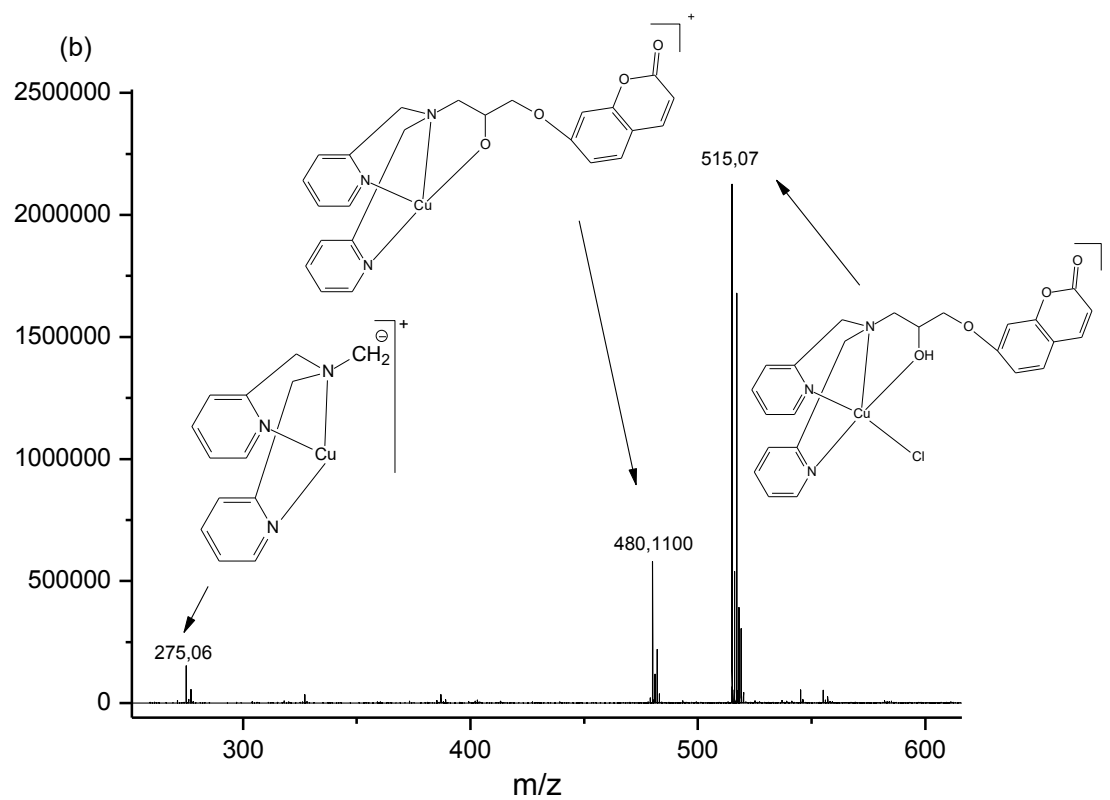
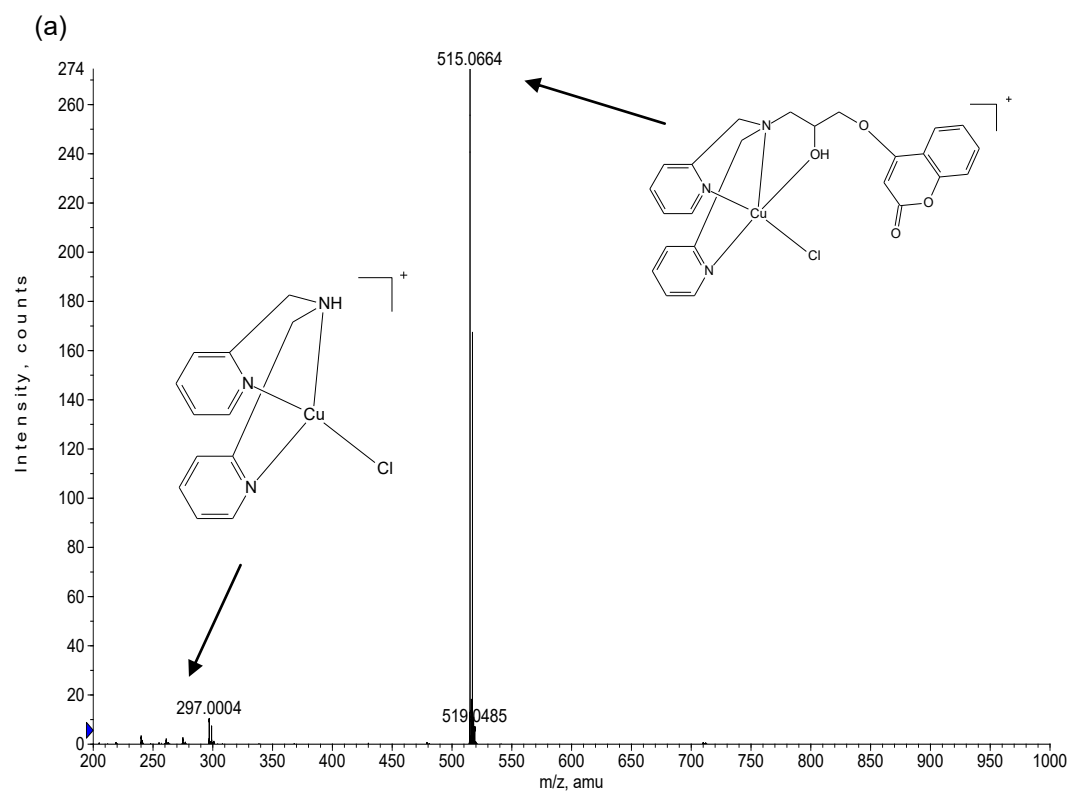


Figura 97. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para os complexos C6 (a) e C8 (b).

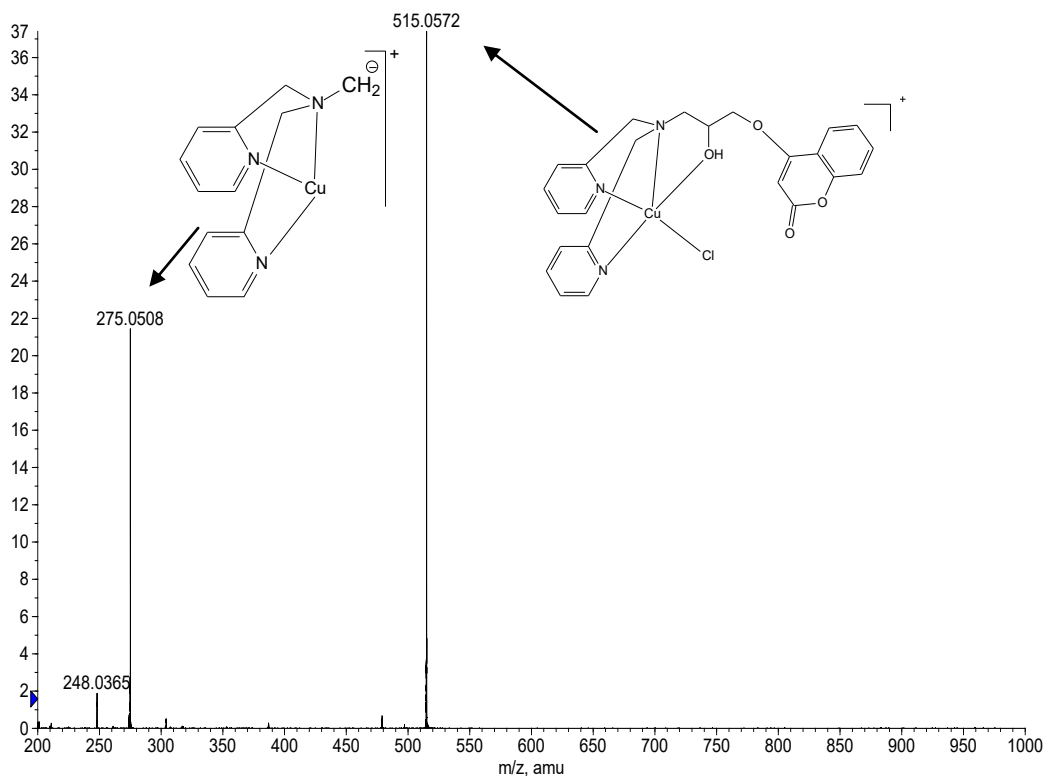


Figura 98. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) do cátion m/z 515 do complexo C6.

Os complexos C6 (Figura 99a) e C8 (Figura 99b) apresentam um perfil eletroquímico semelhante onde são observados nos voltamogramas cíclicos um processo redox reversível atribuído ao par redox Cu(II)/Cu(I), com $E_{1/2}$ - 0,368 e -0,396V vs ENH para os complexos C6 e C8, respectivamente. Observa-se ainda um processo de oxidação em 0,075 v e 0,073 v respectivamente para os complexos C6 e C8, que pode ser atribuído a uma espécie sem o cloreto coordenado (reação acoplada envolvendo o íon cloreto). Tal fato se justifica devido a maior acidez de Lewis do centro metálico sem a presença do ligante cloreto.

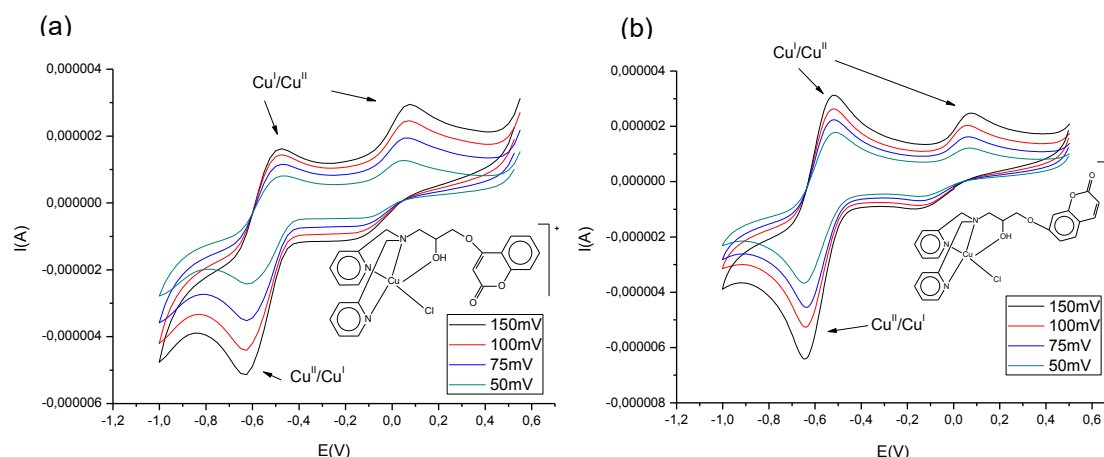


Figura 99. Voltamograma cíclico para os complexos C6 (a) e C8 (b). Eletrodo de trabalho: Carbono Vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrodo auxiliar: platina; eletrólito suporte: Perclorato de lítio 0,1 mol.L⁻¹. Os dados para o ferroceno, padrão interno, foram obtidos em separado devido a sobreposição do sinal deste com os exibidos pelos complexos C5 e C7.

Tabela 45. Valores de ΔE_p e $E_{1/2}$ referentes aos processos redox mais intensos para os complexos C6 e C8.

Compostos de coordenação	ΔE_p V	$E_{1/2}$ V
C6	0,150	-0,368
C8	0,132	-0,396

Os espectros eletrônicos dos complexos C6 (Figura 100a) e C8 (Figura 100b) são apresentados na Figura 100. A sumarização dos dados de espectroscopia eletrônica para os ligantes L6 e L8 e para os seus respectivos complexos são apresentados Tabela 46.

Observam-se que os ligantes L6 e L8 (Tabela 46) apresentam entre 211 nm e 322 nm transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$, características de compostos aromáticos e heteroaromáticos (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Bandas semelhantes são observadas para os respectivos complexos C6 e C8 com variações nos valores do ϵ , o que confirma a reação de complexação dos ligantes com sal de cobre.

Os espectros eletrônicos para os complexos C6 (Figura 100a) e C8 (Figura 100b) mostram respectivamente apenas uma transição em 715,96 nm ($\epsilon = 79,71 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e em 709,95 nm ($\epsilon = 72,56 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) as quais são atribuídas a transição $d-d$ em função do baixo valor do ϵ .

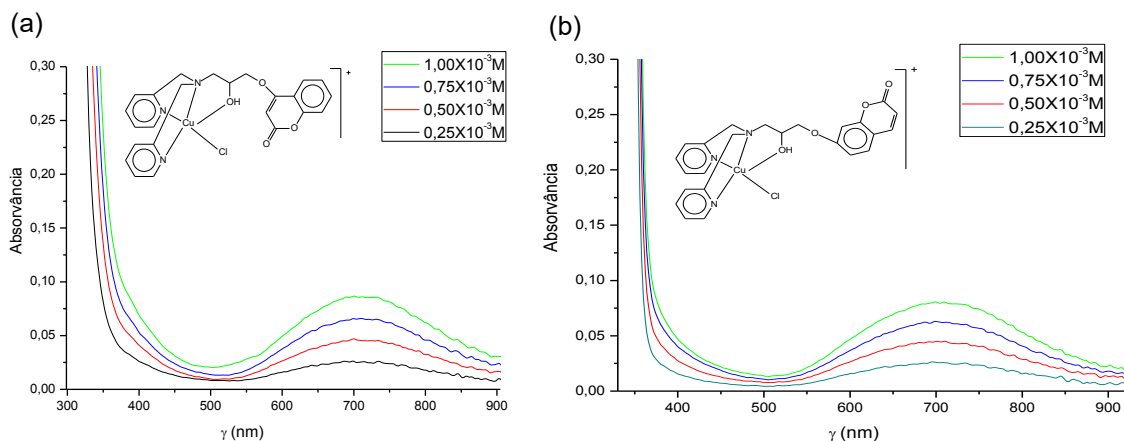


Figura 100. Espectros eletrônicos dos complexos C6 (a) e C8 (b), obtidos em metanol.

Tabela 46. Dados de espectroscopia eletrônica dos ligantes L6 e L8 e dos complexos C6 e C8 e suas respectivas atribuições.

Atribuição	Compostos							
	L6		C6		L8		C8	
	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ
$\pi \rightarrow \pi^*$	211,97	$1,81 \times 10^4$	214,01	$8,56 \times 10^3$	217,97	$1,40 \times 10^4$	217,93	$1,17 \times 10^4$
$\pi \rightarrow \pi^*$	-	-	-	-	254,00	$6,66 \times 10^3$	254,00	$1,00 \times 10^4$
$\pi \rightarrow \pi^*$	262,02	$3,87 \times 10^4$	262,02	$5,01 \times 10^3$	262,02	$7,33 \times 10^3$	262,02	$1,69 \times 10^4$
$\pi \rightarrow \pi^*$	276,01	$6,27 \times 10^3$	276,01	$3,40 \times 10^4$	268,00	$7,04 \times 10^3$	267,99	$1,97 \times 10^4$
$\pi \rightarrow \pi^*$	302,03	$3,83 \times 10^3$	302,03	$1,61 \times 10^4$	292,01	$7,30 \times 10^3$	294,04	$1,24 \times 10^4$
$\pi \rightarrow \pi^*$	315,95	$2,328 \times 10^3$	315,95	$1,38 \times 10^4$	322,05	$1,24 \times 10^4$	320,06	$1,17 \times 10^4$
Transição $d \rightarrow d$	-	-	715,96	79,71	-	-	709,95	72,56

$\lambda_{\text{máx}}$ = (nm); ϵ = ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4.2. RESULTADOS BIOLÓGICOS

Os ensaios “*in vitro*”, empregando-se células neoplásicas desempenham cada vez mais importância na descoberta de novos compostos com atividade anticancerígena. De maneira geral, uma patologia é caracterizada por uma ou várias alterações no metabolismo e em vias de sinalização essenciais à homeostasia celular. Ensaios com células podem oferecer uma representação destas alterações e fornecer relevantes modelos funcionais para avaliar a ação de uma determinada droga em potencial (ALBRECHT *et al.*, 2004). Neste trabalho, os teste biológicos foram realizados utilizando-se células humanas de linfoma histiocítico (U937) e de leucemia monocítica aguda (THP-1).

4.2.1. Avaliação da viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular mais comumente empregado é o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico), o qual tem se mostrado promissor para a predição “*in vitro*” de atividade biológica de novos compostos frente a linhagens de células cancerígenas humanas. Neste ensaio, o sal tetrazólico (MTT) é reduzido pela succinato desidrogenase, presente na mitocôndria, formando um precipitado de cor púrpura, chamado formazam, quantificado por espectrofotometria. O resultado deste ensaio é dependente da população de células metabolicamente ativas capazes de reduzir o MTT, o que reflete o estado geral da mitocôndria (ALBRECHT *et al.*, 2004).

O teste de viabilidade celular por metabolização do MTT foi realizado para avaliação do efeito citotóxico dos compostos sintetizados. Os resultados mostram que todos os compostos foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular das linhagens U937 (Figura 101) e THP-1 (Figura 102) após 36 horas de incubação, exceto o ligante L6. O sal de cobre utilizado para a reação de complexação com os ligantes como também o DMSO (dimetilsulfóxido), veículo utilizado para a dissolução dos compostos, não afetaram a viabilidade celular das linhagens testadas. Para efeito de uma melhor comparação da atividade entre os compostos foi calculado o índice de

citotoxicidade 50% (IC_{50}), ou seja, concentração que lesa ou provoca morte de 50% da população celular. A IC_{50} foi determinada a partir da curva dose resposta (Figuras 101 e 102) utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

Os valores de IC_{50} dos compostos sintetizados e da cisplatina (composto referência) para as linhagens U937 e THP-1 são mostrados na Tabela 47. A cisplatina foi utilizada como composto referência a título de comparação. Os resultados mostram que a linhagem U937 foi mais sensível aos compostos orgânicos do que a linhagem THP-1, o que pode ser observado pelos valores de IC_{50} apresentados na Tabela 47. Em contra partida, a linhagem THP-1 foi mais susceptível aos compostos de coordenação de cobre do que a linhagem U937.

A redução da viabilidade celular provocada pelos ligantes L3, L7 e L8 foram pouco expressivas, tanto para a linhagem U937 quanto para a THP-1, o que não permitiu o cálculo da IC_{50} , como pode ser observado na Tabela 47. Os resultados mostram que os ligantes sintetizados a partir do α -naftol (L1 e L2) foram mais ativos do que os sintetizados a partir do β -naftol (L3 e L4), para todas as linhagens testadas. O composto mais ativo foi o complexo C1 (possui uma piridina e um fenol em sua estrutura), o qual apresentou IC_{50} estatisticamente igual a da cisplatina (Tabela 47) para a linhagem U937 e inferior à mesma para a linhagem THP-1. Observa-se que, tanto para o ligante L1, obtido a partir do α -naftol, quanto para o ligante L3, obtido a partir do β -naftol, que possuem uma piridina e um fenol em suas estruturas, a reação de complexação com cobre foi eficiente na potencialização da atividade biológica. O complexo C1 foi 1,91 e 3,31 vezes mais ativo do que o ligante L1 para as linhagens U937 e THP-1 respectivamente e o complexo C3 apresentou IC_{50} significativamente menor do que o ligante L3 para ambas as linhagens avaliadas. O complexo C3 apresentou menor atividade em relação ao complexo C1, porém foi tão ativo quanto a cisplatina para a linhagem THP-1. Estes resultados sugerem que, para os ligantes sintetizados a partir do α -naftol (L1) e β -naftol (L3), os quais possuem em sua estrutura uma piridina e um fenol (L1 e L3), quanto maior a atividade dos ligantes maior será também a atividade dos seus respectivos complexos de cobre.

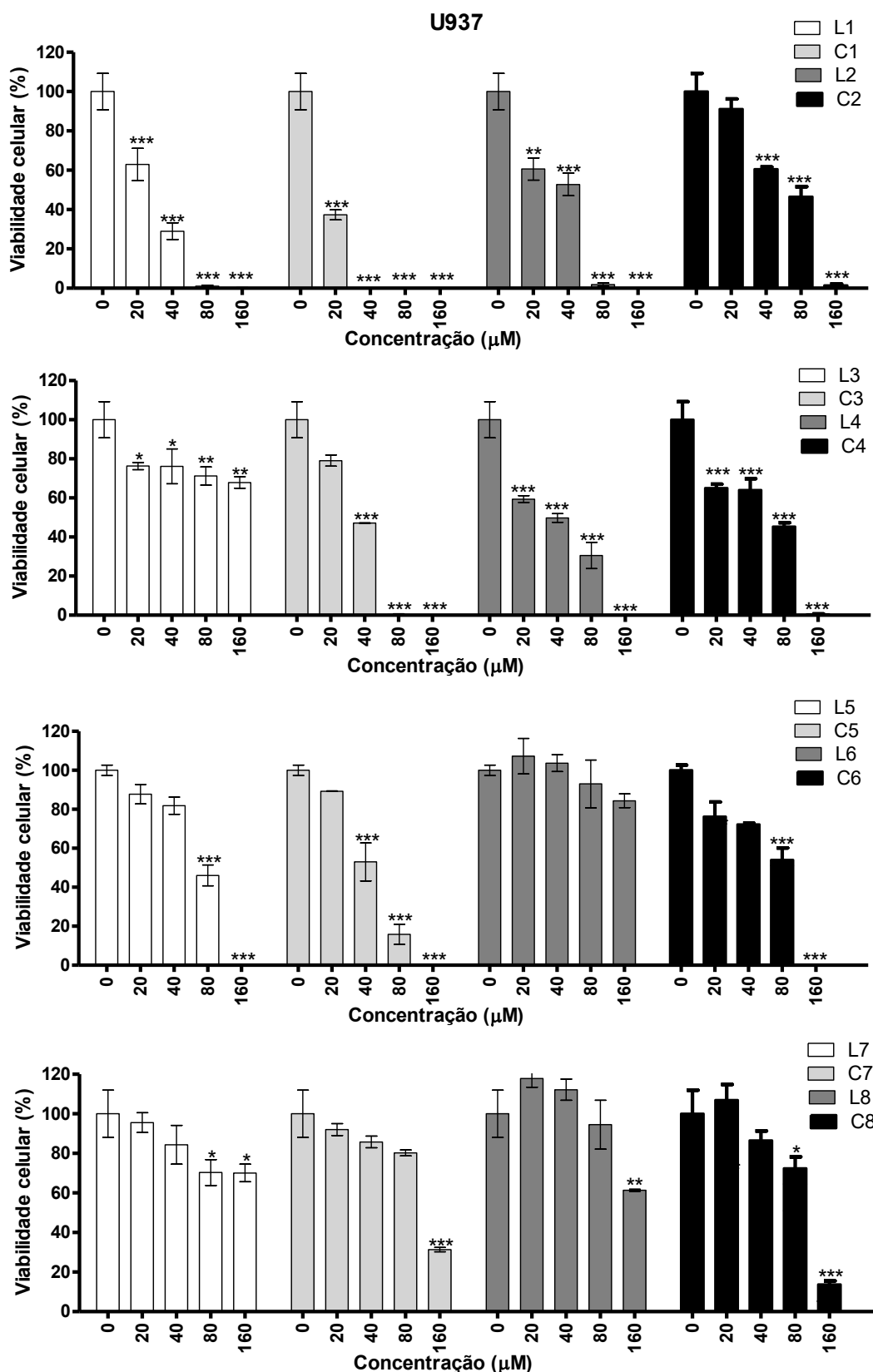


Figura 101. Avaliação da viabilidade celular da linhagem U937, pelo ensaio do MTT (n=3), após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 e L8) e de coordenação (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8). O sal de cobre (CuCl_2) e o DMSO (<0,2%) não afetaram significativamente a viabilidade celular. O símbolo (*) representa os valores estatisticamente significantes em relação às células controle pelo teste de Tukey (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

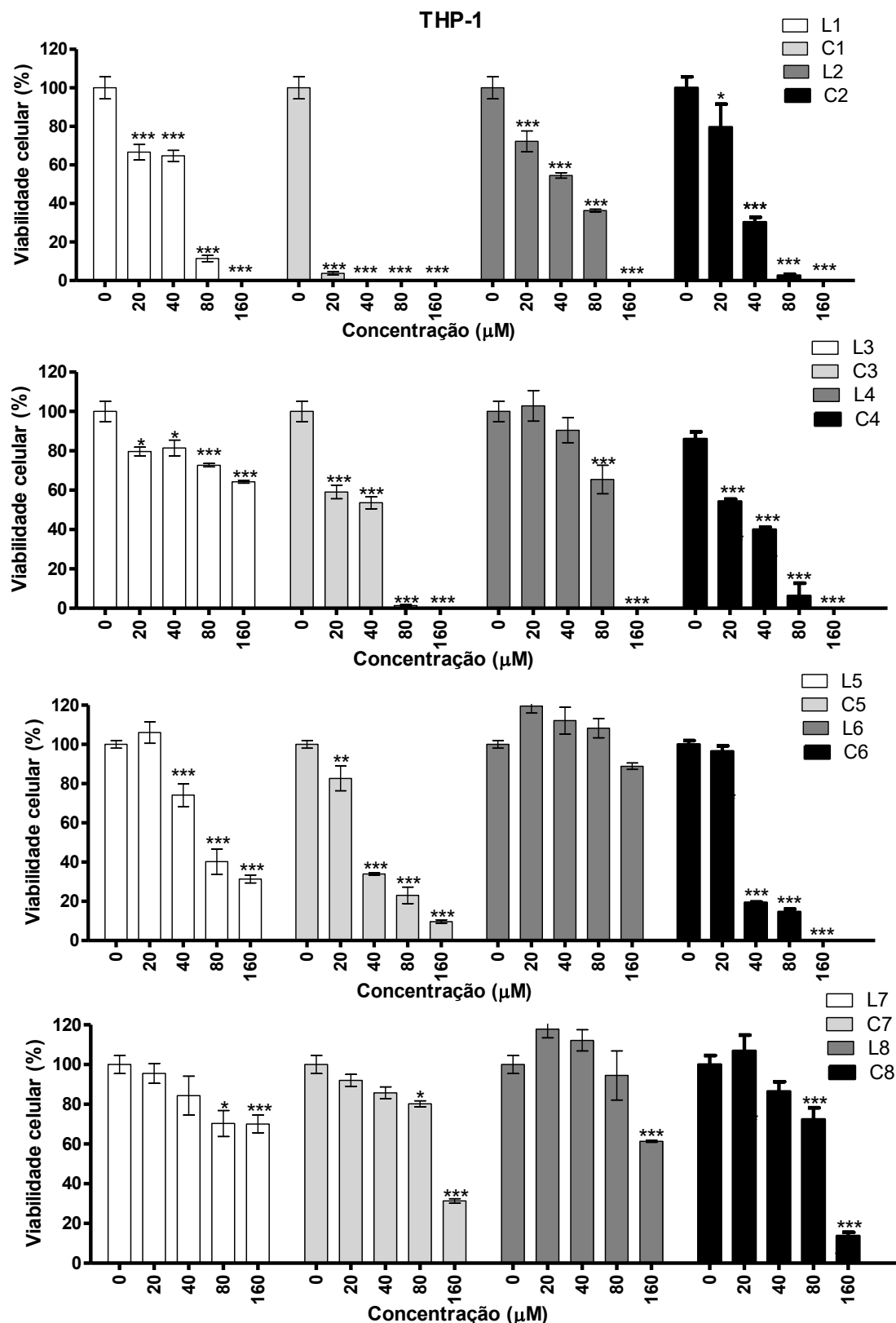
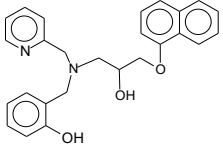
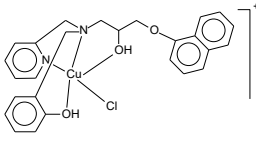
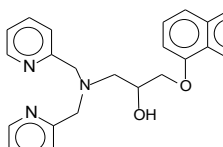
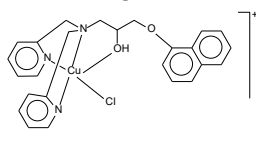
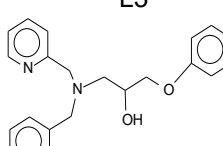
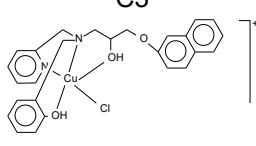
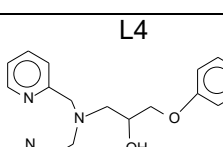
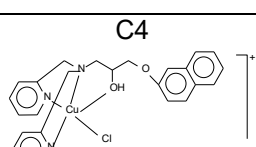
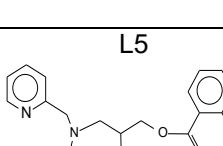
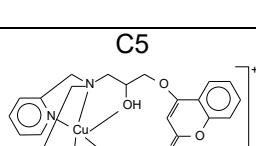
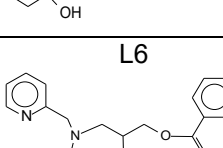
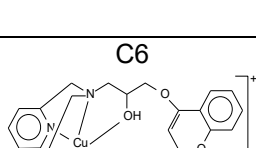
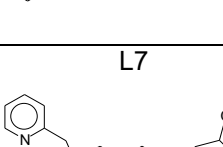
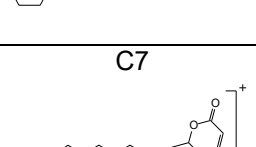
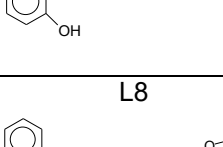
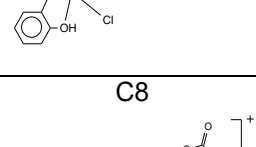


Figura 102. Avaliação da viabilidade celular da linhagem THP-1, pelo ensaio do MTT (n=3), após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 e L8) e de coordenação (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8). O sal de cobre (CuCl_2) e o DMSO (<0,2%) não afetaram significativamente a viabilidade celular. O símbolo (*) representa os valores estatisticamente significantes em relação às células controle pelo teste de Tukey (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Para os ligantes sintetizados a partir do α -naftol (L2) e β -naftol (L4), os quais possuem duas piridinas em suas estruturas, a complexação não foi tão efetiva, uma vez que a IC_{50} dos complexos C2 e C4 foi maior do que a dos seus respectivos ligantes L2 e L4 (Tabela 47) para a linhagem U937. A IC_{50} dos complexos C2 e C4 foi menor do que a apresentada pelos seus respectivos ligantes (L2 e L4) apenas para a linhagem THP-1. Estes resultados mostram a importância dos ligantes para a atividade antineoplásica observada. O ligante L1 foi o composto orgânico que apresentou maior atividade biológica sendo que o seu respectivo complexo (C1) foi o composto que apresentou maior atividade dentre todos os compostos estudados. É importante considerar que os ligantes L1, L2 e L4 apresentaram IC_{50} semelhante à uma grande parte dos compostos de coordenação obtidos, o que mostra que o naftol é um grupo importante para a atividade biológica dos ligantes e complexos sintetizados. Esta observação é confirmada pelos maiores valores de IC_{50} observados para os ligantes L5, L6, L7 e L8, onde o α e β -naftol foram substituído por grupos cumarínicos.

Considerando o grupo dos compostos cumarínicos, o ligante L5 (possui os grupos fenol, piridina e 4-hidroxicumarina) foi o único composto orgânico que apresentou IC_{50} inferior a $160\mu\text{M}$. O ligante L6, que também foi obtido a partir da 4 hidroxicumarina e possui duas piridinas em sua estrutura, não apresentou atividade biológica considerável frente as linhagens testadas. Entretanto, foi verificado potencialização da atividade biológica para os compostos de coordenação de cobre C5 e C6, uma vez que estes foram significativamente mais ativos do que os seus respectivos ligantes L5 e L6.

Tabela 47. Valores de IC₅₀ dos compostos sintetizados frente as linhagens U937 e THP-1.

Cisplatina	U937 - IC₅₀ (μM) 15,75 ± 1,02		THP-1 - IC₅₀ (μM) 28,65 ± 1,1064
L1 	U937 - IC₅₀ (μM) 26,43 ± 1,06	C1 	U937 - IC₅₀ (μM) 13,85 ± 1,05
	THP-1 - IC₅₀ (μM) 36,59 ± 1,12		THP-1 - IC₅₀ (μM) 11,06 ± 1,01
L2 	U937 - IC₅₀ (μM) 32,22 ± 1,11	C2 	U937 - IC₅₀ (μM) 58,51 ± 1,09
	THP-1 - IC₅₀ (μM) 43,67 ± 1,09		THP-1 - IC₅₀ (μM) 30,72 ± 1,09
L3 	U937 - IC₅₀ (μM) > 160	C3 	U937 - IC₅₀ (μM) 35,43 ± 1,04
	THP-1 - IC₅₀ (μM) > 160		THP-1 - IC₅₀ (μM) 27,13 ± 1,13
L4 	U937 - IC₅₀ (μM) 38,56 ± 1,17	C4 	U937 - IC₅₀ (μM) 54,75 ± 1,19
	THP-1 - IC₅₀ (μM) 87,79 ± 1,09		THP-1 - IC₅₀ (μM) 25,44 ± 1,07
L5 	U937 - IC₅₀ (μM) 70,21 ± 1,07	C5 	U937 - IC₅₀ (μM) 42,34 ± 1,14
	THP-1 - IC₅₀ (μM) 77,77 ± 1,16		THP-1 - IC₅₀ (μM) 35,51 ± 1,08
L6 	U937 - IC₅₀ (μM) > 160	C6 	U937 - IC₅₀ (μM) 64,17 ± 1,13
	THP-1 - IC₅₀ (μM) > 160		THP-1 - IC₅₀ (μM) 32,80 ± 1,70
L7 	U937 - IC₅₀ (μM) > 160	C7 	U937 - IC₅₀ (μM) 111,40 ± 1,07
	THP-1 - IC₅₀ (μM) > 160		THP-1 - IC₅₀ (μM) 108,0 ± 1,40
L8 	U937 - IC₅₀ (μM) > 160	C8 	U937 - IC₅₀ (μM) 85,65 ± 38,22
	THP-1 - IC₅₀ (μM) > 160		THP-1 - IC₅₀ (μM) 54,75 ± 1,07

Os ligantes sintetizados a partir da 7-hidroxicumarina, tanto aquele com uma piridina e um fenol em sua estrutura (L7) quanto o que possui duas piridinas (L8), apresentaram baixas atividades. Entretanto, os complexos C7 e C8 se mostraram significativamente mais ativos, o que demonstra a importância do centro metálico de cobre para a atividade biológica. Observou-se que os complexos obtidos a partir da 4-hidroxicumarina (C5 e C6) foram mais ativos do que os complexos obtidos a partir da 7-hidroxicumarina (C7 e C8).

Os resultados mostram que, de forma geral, os compostos obtidos a partir do α e β -naftol foram mais ativos do que os compostos obtidos a partir da 4-hidroxicumarina e 7-hidroxicumarina, o que pode ser verificado pelos baixos valores de IC_{50} dos primeiros. O ligante L3 apresentou pouca atividade provavelmente em virtude da sua baixa solubilidade, característica importante para um fármaco em potencial. Dentre todos os compostos testados, o ligante L3 foi o que apresentou maior dificuldade de dissolução principalmente por ter sido realizada com o meio de cultura DMEM-F12, o qual é predominantemente aquoso. Provavelmente a reação de complexação com cobre elevou o caráter hidrofílico do complexo o qual passou a ser solúvel e apresentar IC_{50} consideravelmente baixa. A potencialização da atividade biológica foi bastante significativa para os complexos C1, C3, C5, C6, C7 e C8 o que evidencia a importância do centro metálico de cobre para a atividade antitumoral.

Os precursores HBPA (P1) e o BMPA (P2), utilizados neste trabalho para a obtenção dos novos compostos orgânicos, foram avaliados primariamente por Bull (2008), que verificou em seu trabalho que o HBPA foi ativo frente as linhagem U937 e THP-1, na concentração de $400\mu M$, e o BMPA foi ativo apenas para a linhagem U937, na mesma concentração.

O planejamento dos ligantes a partir do propranolol e da varfarina foram bem sucedidos uma vez que os compostos orgânicos obtidos neste trabalho, exceto o ligante L6, comprometeram a viabilidade celular de ambas as linhagens testadas (U937 e THP-1) em concentrações iguais ou inferiores a $160\mu M$ (Figuras 101 e 102). A síntese dos ligantes tanto forneceram compostos orgânicos com atividade biológica significativa quanto também possibilitaram a obtenção de compostos de coordenação mais ativos que os seus respectivos ligantes. Os resultados mostram que o planejamento dos ligantes é de

fundamental importância para a obtenção de complexos metálicos biologicamente ativos.

A literatura mostra que o propranolol, naftol, varfarina, cumarina e análogos apresentam atividade frente a uma grande variedade de células neoplásicas (COHEN *et al.*, 1983; WILSON *et al.*, 1985; SMITH *et al.*, 1988; MARSHALL *et al.*, 1991; VELASCO-VELAZQUEZ, 2003; FINN *et al.*, 2003; LEWIS, *et al.*, 2004; DONNELLYM *et al.*, 2008; AL-WADEI *et al.*, 2009; SALINAS-JAZMÍN *et al.*, 2010).

Osowole *et al.* (2011) verificaram que o ligante HL, mostrado na Figura 103, apresentou IC₅₀ de 79,33 µM para células de melanoma. Já o seu complexo CuL₂, obtido a partir deste ligante, apresentou IC₅₀ de 11,20 µM. Osowole *et al.*, (2011) verificaram que reação de complexação com cobre foi responsável pela maior atividade do complexo CuL₂ em relação ao seu ligante HL. Resultados semelhantes também foram encontrados neste trabalho para os complexos de cobre obtidos com os ligante sintetizados a partir do naftol e da hidroxycumarina.

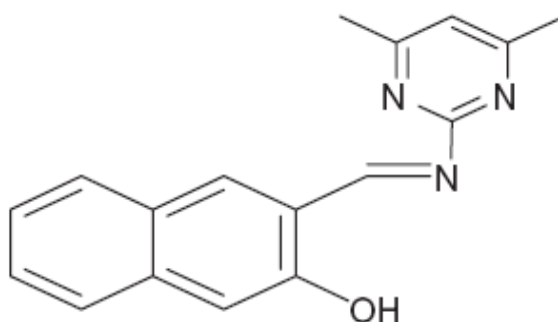


Figura 103. Estrutura do ligante HL (3-(1-(4,6-dimetil-2-pirimidinilimino)etil)-2-naftol) utilizado para obtenção de composto de coordenação de cobre ativo frente a células de melanoma (OSOWOLE *et al.*, 2011).

Neste trabalho foram investigados compostos de coordenação de cobre pelo fato de ser um metal naturalmente encontrado no organismo, o que possibilita explorar as suas propriedades biológicas, buscando a redução da sua toxicidade. Segundo Storr *et al.* (2006), ligantes adaptados para reagirem com metais podem desempenhar um papel importante na redução da toxicidade dos metais e potencialização das suas propriedades terapêuticas. Observa-se na

literatura uma grande variedade de compostos de coordenação de cobre com atividades anticancerígenas (ADSULE *et al.*, 2006; THOMADAKI *et al.*, 2008).

Com a finalidade de verificar a seletividade dos compostos para as células tumorais, foi avaliado a viabilidade das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) nas mesmas condições e concentrações utilizadas para as células neoplásicas. Este teste foi realizado com os compostos orgânicos e de coordenação que apresentaram IC_{50} inferior a $160\mu M$, para ambas as linhagens neoplásicas. Os resultados de viabilidade do PBMC estão apresentados na Figura 104. Os resultados mostram que os compostos L4, L5, C1, C2, C4, C5, C6, C7 e C8 reduziram a viabilidade do PBMC. Para melhor relacionar os resultados de viabilidade de células cancerígenas e normais foi calculado a IC_{50} para as células mononucleares do sangue periférico (Tabela 48).

Observa-se na Figura 104 que os compostos L1, L2 e C3 não comprometeram a viabilidade das células humanas normais (PBMC). Apesar dos compostos C1 e L4 terem reduzido a viabilidade das células normais na concentração de $160\mu M$, esta foi pouco expressivas o que não permitiu calcular da IC_{50} . Os compostos L1, L2, L4, C1 e C3 apresentaram IC_{50} superior a $160\mu M$ para as células humanas normais (PBMC) o que demonstra a seletividade destes compostos para as células cancerígenas em estudo (U937 e THP-1). Considerando que o complexo C1 apresentou valores de IC_{50} inferiores a $15\mu M$ para as linhagens U937 e THP-1, este composto demonstrou elevada seletividade para as células cancerígenas avaliadas.

Apesar dos compostos C2 e C4 terem apresentado citotoxicidade para as células normais (PBMC) o valor da IC_{50} para estas células foi superior aos valores de IC_{50} observados para as linhagens U937 e THP-1, mostrando também uma certa seletividade destes compostos para as células neoplásicas estudadas.

Em um tratamento com quimioterápico espera-se que a concentração terapêutica seja mais efetiva para as células cancerígenas do que para as células normais. Os compostos contendo grupos cumarínicos (L5, C5, C6, C7 e C8) foram tão ou mais citotóxicos para as células normais do que para as

células cancerígenas. Estes resultados mostram que os compostos que possuem naftol em sua estrutura (L1, L2, L4, C1, C2, C3 e C4), além de apresentarem elevada atividade biológica, foram mais seletivos para as linhagens neoplásicas U937 e THP1.

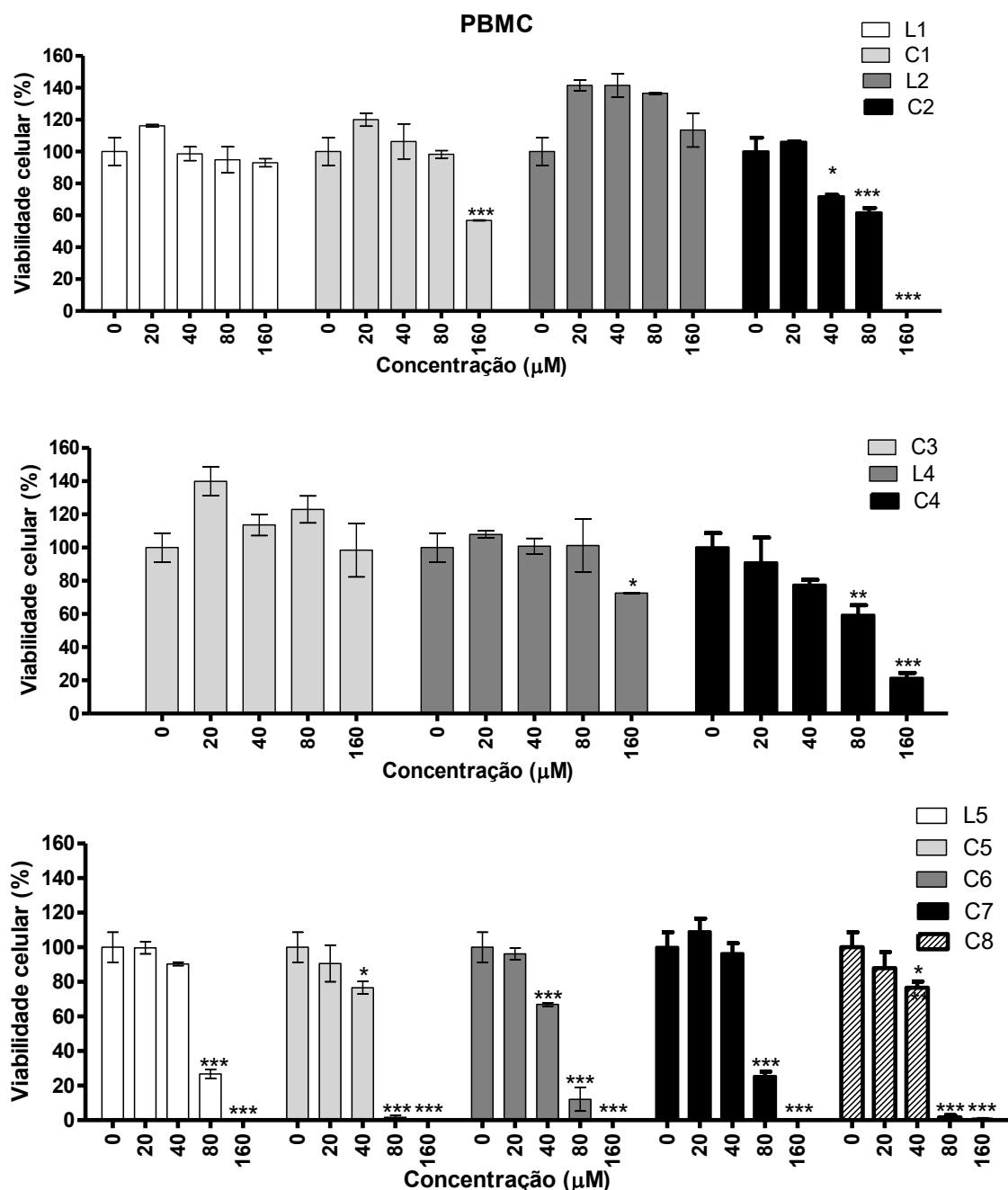
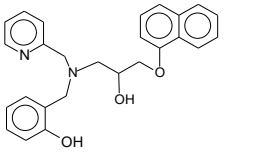
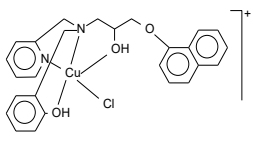
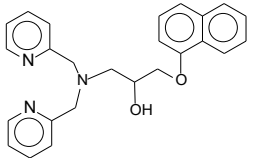
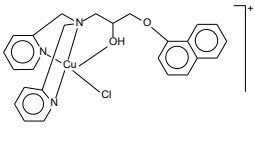
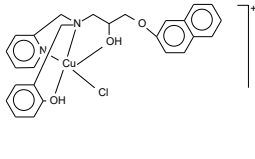
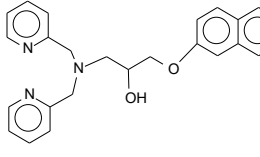
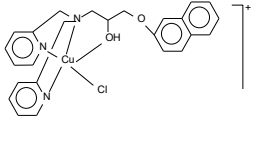
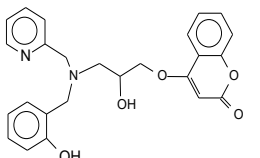
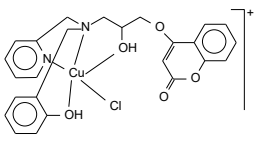
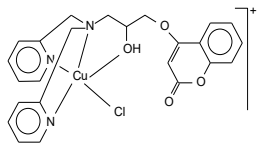
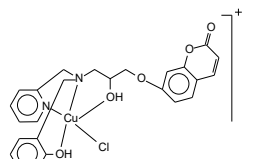
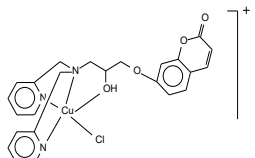


Figura 104. Avaliação da viabilidade celular das células humanas normais do sangue periférico (PBMC), pelo ensaio do MTT (n=3), após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos (L1, L2, L4 e L5) e de coordenação (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8). O sal de cobre (CuCl_2) e o DMSO (<0,2%) não afetaram significativamente a viabilidade celular. O símbolo (*) representa os valores estatisticamente significantes em relação às células controle pelo teste de Tukey (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Tabela 48. Valores de IC₅₀ obtidos para os compostos em estudo frente as células normais do sangue periférico (PBMC).

<p>L1</p> 	<p>PBMC - IC₅₀ (μM)</p> <p>> 160</p>	<p>C1</p> 	<p>PBMC - IC₅₀ (μM)</p> <p>> 160</p>
<p>L2</p> 	<p>PBMC - IC₅₀ (μM)</p> <p>> 160</p>	<p>C2</p> 	<p>PBMC - IC₅₀ (μM)</p> <p>79,64 ± 1,1</p>
<p>C3</p> 			<p>PBMC - IC₅₀ (μM)</p> <p>> 160</p>
<p>L4</p> 	<p>PBMC - IC₅₀ (μM)</p> <p>> 160</p>	<p>C4</p> 	<p>PBMC - IC₅₀ (μM)</p> <p>86,99 ± 1,13</p>
<p>L5</p> 	<p>PBMC - IC₅₀ (μM)</p> <p>64,11 ± 1,02</p>	<p>C5</p> 	<p>PBMC - IC₅₀ (μM)</p> <p>47,11 ± 1,09</p>
<p>C6</p> 	<p>PBMC - IC₅₀ (μM)</p> <p>47,68 ± 1,04</p>	<p>C7</p> 	<p>PBMC - IC₅₀ (μM)</p> <p>67,17 ± 1,07</p>
<p>C8</p> 			<p>PBMC - IC₅₀ (μM)</p> <p>47,27 ± 1,09</p>

O ensaio de viabilidade celular (MTT), realizado com as células neoplásicas e normais, permitiu uma triagem inicial para a identificação dos compostos mais promissores e seletivos para as células cancerígenas, entretanto não fornece informações sobre mecanismo de morte celular induzido pelos compostos avaliados. Para compreensão do mecanismo de morte celular induzido pelos compostos foram realizados estudos empregando-se as técnicas de microscopia de fluorescência e de avaliação do ciclo celular e do potencial mitocondrial de membrana por citometria de fluxo.

4.2.2. Avaliação do mecanismo de morte celular

4.2.2.1. Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência utiliza fluorocromos que se intercalam ao DNA (laranja de acridina e brometo de etídio). É um método simples e preciso para se avaliar o índice de indução de apoptose de um determinado composto (REMOIZE *et al.*, 1998; NAFISI *et al.*, 2007). O corante laranja de acridina é um marcador que permeia as células cuja integridade da membrana celular está preservada. Neste método as células vivas apresentam núcleo verde e íntegro, já as células em apoptose primária apresentam o núcleo verde condensado ou fragmentado. Como o brometo de etídio é permeável apenas nas células que perderam a integridade da membrana celular, células em necrose secundária apresentam núcleo condensado ou fragmentado, corado de laranja e células em necrose apresentam o núcleo alaranjado, íntegro e volumoso (REMOIZE *et al.*, 1998).

Esta avaliação foi realizada com a finalidade de se determinar o mecanismo de morte celular induzido pelos compostos orgânicos e de coordenação de cobre, que se mostraram mais seletivos para as células neoplásicas do que para células normais. As características morfológicas das linhagens U937 e THP-1 foram observadas por microscopia de fluorescência nos tempos de 12, 24 e 36 horas. Os resultados de indução de morte celular por apoptose para a linhagem U937 são apresentados na Figura 105 e para a linhagem THP são

apresentados nas Figura 106. Avaliando-se as diferentes concentrações nos tempos estudados, observou-se que, de forma geral, a indução de apoptose é um processo tempo e dose dependentes, e que todos os compostos avaliados induziram aproximadamente 100% de apoptose na maior concentração testada após 36 horas de incubação, em ambas as linhagens estudadas (Figuras 105 e 106).

De forma semelhante ao observado para o ensaio de MTT, o teste de apoptose também mostrou potencialização da atividade biológica para o complexo C1, uma vez que este composto provocou 100% de morte celular para ambas as linhagens testadas após 36 horas de incubação na concentração de 40 μ M, sendo que o mesmo foi observado para o ligante L1 na concentração de 80 μ M (Figuras 105 e 106). O ligante L3 também foi avaliado quanto ao mecanismo de morte por apoptose e foi verificado que todas as linhagens estudadas se apresentaram morfológicamente normais quando incubadas por 36 horas com este composto, na concentração máxima testada (160 μ M). Estes resultados mostram que a reação de complexação com cobre também foi muito eficiente para o complexo C3. De maneira geral, os compostos orgânicos obtidos a partir do naftol e que apresentam em sua estrutura uma piridina e um fenol, após complexação com CuCl₂, originaram compostos de coordenação muito ativos.

A análise da porcentagem de indução de apoptose ao longo dos tempos de incubação de 12, 24 e 36 horas mostra que o ligante L2 (Figura 105) induziu mais rapidamente apoptose na linhagem U937 do que o complexo C2. De forma semelhante, o ligante L2 foi mais citotóxico do que o complexo C2 pelo teste de viabilidade (MTT). Para a linhagem THP-1 (Figura 106), a apoptose induzida pelo complexo C2 na concentração de 80 μ M foi superior à promovida pelo ligante L2, o que está de acordo com o teste de viabilidade (MTT) no qual o complexo C2 foi mais citotóxico do que o ligante L2.

Considerando a indução de apoptose provocada pelo ligante L4 durante os tempos avaliados (12, 24 e 36 horas), observou-se que este ligante provocou uma porcentagem maior de morte celular do que o complexo C4 na concentração de 80 μ M para a linhagem U937 (Figura 105). De forma contrária, o complexo C4 induziu uma porcentagem maior de apoptose do que o ligante

L4 na concentração de 80 μ M, para a linhagem THP-1 (Figura 106). Resultados análogos foram encontrados para o teste de viabilidade celular (MTT) para ambas as linhagens testadas.

O cloreto de cobre e o DMSO não induziram apoptose nas linhagens avaliadas. Estes resultados estão de acordo com o teste de viabilidade (MTT) onde foi verificado que tanto o sal de cobre quanto o DMSO não apresentaram citotoxicidade para as linhagens leucêmicas estudadas. A porcentagem de necrose provocada pelos compostos estudados, para ambas as linhagens (U937 e THP-1), foi igual ou inferior a 2%. Resultado semelhante de morte por necrose foram encontradas nas células das linhagens U937 e THP-1 sem tratamento (branco).

A morte celular programada (apoptose) é considerada o principal mecanismo pelo qual a maioria dos fármacos antineoplásicos utilizados na terapêutica desempenham o seu efeito citotóxico (HICKMAN, 1992). Desta forma, a indução de apoptose em células cancerígenas podem representar uma abordagem eficaz para o desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos (HICKMAN, 1992; KERR *et al.*, 1994; VASHISHTHA *et al.*, 1998).

Os resultados deste trabalho mostram que todos os compostos orgânicos e de coordenação obtidos a partir do naftol são promissores uma vez que induziram morte por apoptose nas linhagens U937 e THP-1, o que também foi observado para o composto referência, a cisplatina. Resultados semelhantes foram relatados por Zang *et al.* (2009) e Liao *et al.* (2010) os quais verificaram que o propranolol induziu apoptose em células de carcinoma gástrico e câncer pancreático, respectivamente. Uma grande variedade de compostos de coordenação também tem se mostrado indutor de apoptose em células de câncer de colo de útero, laringe, colorretal, ovário, mama e pulmão (GOSWAMI *et al.*, 2011; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2011; BOULSOURANI *et al.*, 2011).

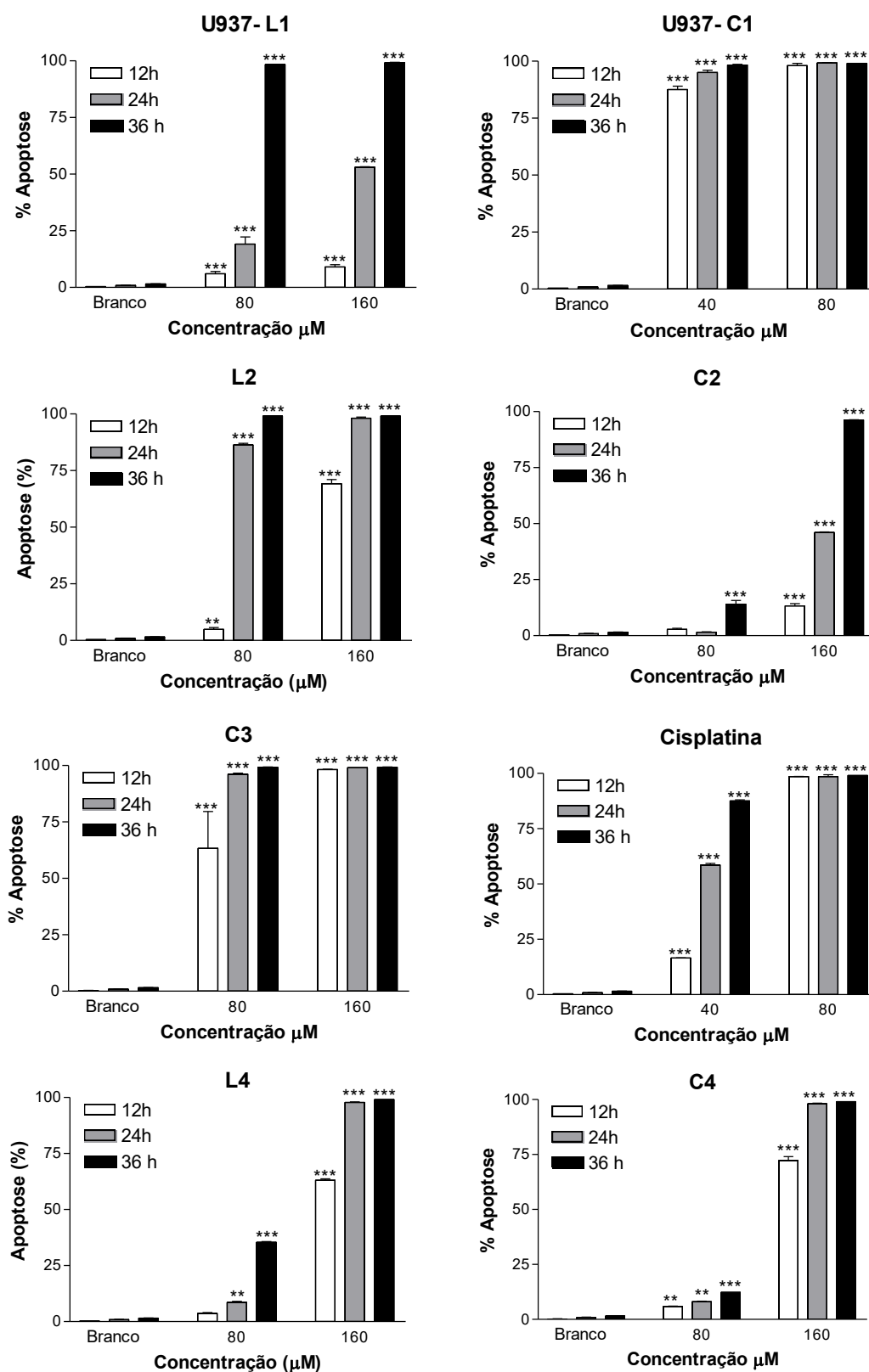


Figura 105. Porcentagem de apoptose induzida pelos compostos orgânicos (L1, L2 e L4,) e de coordenação (C1, C2, C3, C4 e Cisplatina) em células leucêmicas da linhagem U937 (n=2). O sal de cobre (CuCl_2) e o DMSO (<0,2%) não induziram morte celular nas células neoplásicas. Em todos os teste a porcentagem de necrose foi inferior a 3%. O símbolo (*) representa os valores estatisticamente significantes em relação às células controle pelo teste de Tukey (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

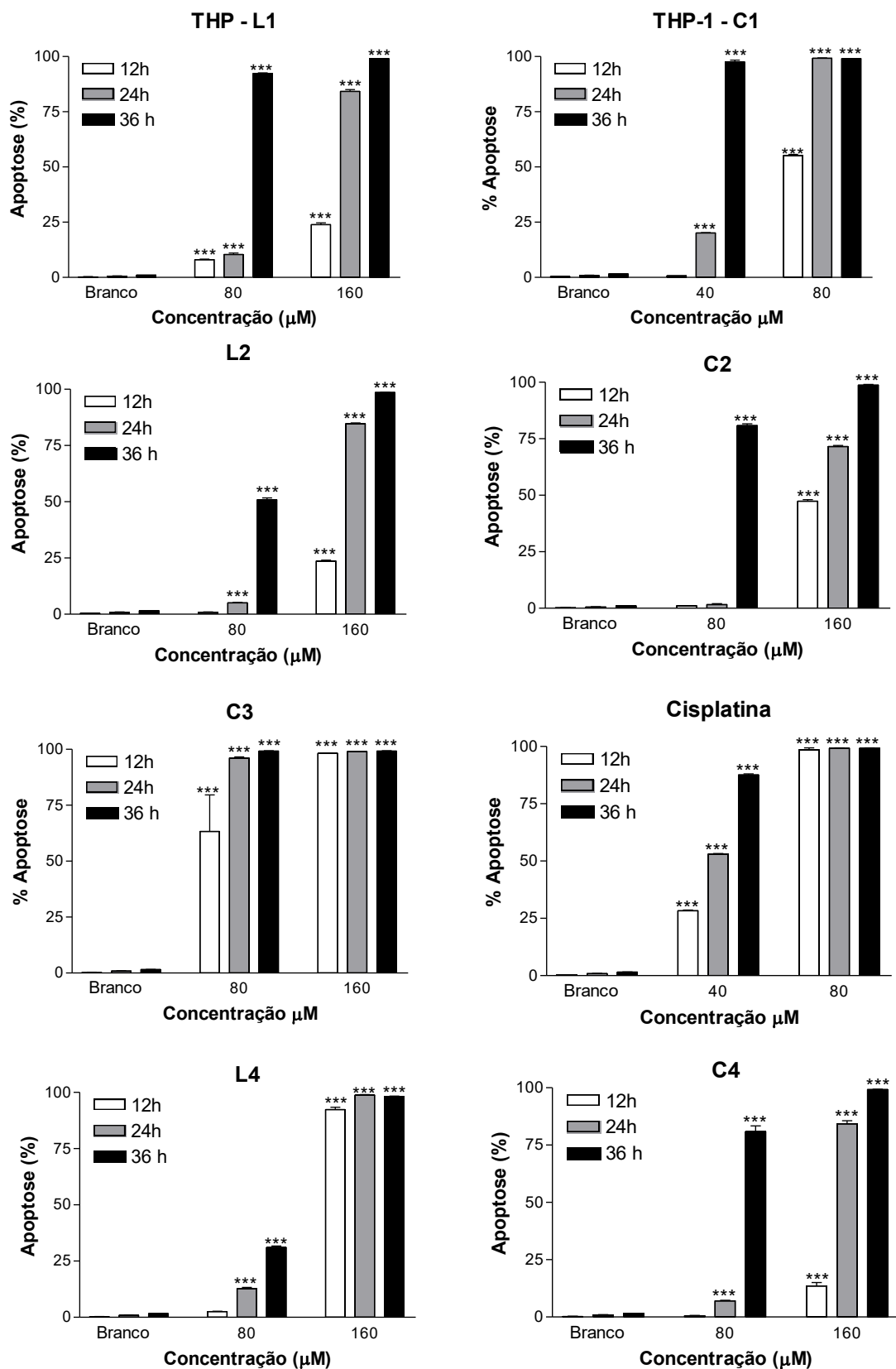


Figura 106. Porcentagem de apoptose induzida pelos compostos orgânicos (L1, L2 e L4,) e de coordenação (C1, C2, C3 e C4) em células leucêmicas da linhagem THP-1 (n=2). O sal de cobre (CuCl_2) e o DMSO (<0,2%) não induziram morte celular nas células neoplásicas. Em todos os teste a porcentagem de necrose foi inferior a 3%. O símbolo (*) representa os valores estatisticamente significantes em relação às células controle pelo teste de Tukey (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Como já mencionado, a apoptose é um dos mais complexos processos celulares cujas características morfológicas mais evidentes compreendem a condensação da cromatina, a fragmentação nuclear e formação dos corpos apoptóticos. A apoptose é um processo ativo, bioquimicamente controlado, responsável pelo equilíbrio entre proliferação celular e morte celular, importante para a homeostasia do organismo (KROEMER *et al.*, 2008). Em contraste, a necrose é um processo passivo caracterizado por um ganho de volume celular, colapso da membrana plasmática e organelas com consequente perda do conteúdo intracelular. Este tipo de morte ocorre quando a célula é submetida a uma injúria como calor, frio, estresse mecânico, choque osmótico entre outros (MAINO & JPRIS, 1995; GOLSTEIN & KROEMER, 2006; BERGHE *et al.*, 2007). A fim de confirmar os dados obtidos por microscopia de fluorescência foi realizado o testes de avaliação do ciclo celular e do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo.

4.2.2.2. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

A avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo tem-se mostrado uma técnica seletiva para investigação do mecanismo de morte celular. O iodeto de propídio (PI) é um intercalante do DNA muito utilizado como marcador fluorescente por ser estável e de baixo custo (RIEGER *et al.*, 2011). A citometria de fluxo permite identificar a distribuição das células durante as fases do ciclo celular. As fases são distinguidas, a partir do conteúdo do DNA, em fase G₁, S (síntese) e G₂/M. As fases G₂ e M (mitose) do ciclo celular aparecem na mesma região do histograma por possuírem conteúdo de DNA semelhante (NUNEZ, 2001).

Nos estágios tardios da apoptose o DNA é clivado por endonucleases em fragmentos de 200 pb ou múltiplos. Durante o processamento das amostras para análise do ciclo celular foi realizada a fixação das células em etanol 70% gelado, seguida da lavagem com tampão de extração (tampão fosfato-citrato, 0,2M, pH=7,8). Este processo remove o DNA fragmentado e as células com

baixo conteúdo de DNA aparecem na região Sub-G1 do histograma (GONG *et al.*, 1994).

Os compostos sintetizados foram avaliados na concentração que apresentou a maioria das células em apoptose pelo teste de fluorescência. Nas Figuras 107 e 108 estão apresentados, respectivamente, os histogramas com porcentagem de distribuição das células U937 e THP-1 de acordo com a fase do ciclo celular. Células U937 que não foram submetidas ao tratamento (controle) (Figura 107) apresentaram 67,00% de células na fase G₁, 19,37% na fase S (síntese) e 14,23% na fase G₂/M. As células controle da linhagem THP-1 (Figura 108) apresentaram 60,33% de células na fase G₁, 19,49% na fase S (síntese) e 20,31% na fase G₂/M. A porcentagem de células em sub-G1 foi 0,26% e 0,55% para as linhagens U937 e THP-1 respectivamente.

Os resultados mostram que células que não foram submetidas a tratamento com os compostos sintetizados apresentaram menos de 0,6% de células na fase sub-G1. Observa-se que todos os compostos estudados promoveram um deslocamento acentuado da população de células neoplásicas (U937 e THP-1) para a fase sub-G1 do ciclo celular.

A apoptose compreende uma seqüência de eventos bioquímicos que irão levar a célula à morte. A presença de população celular na fase Sub-G1 do ciclo celular (Figuras 107 e 108) mostra que os compostos avaliados exercem seu efeito citotóxico através da indução de morte celular por apoptose, o que está de acordo com os resultados obtidos pelo teste de fluorescência.

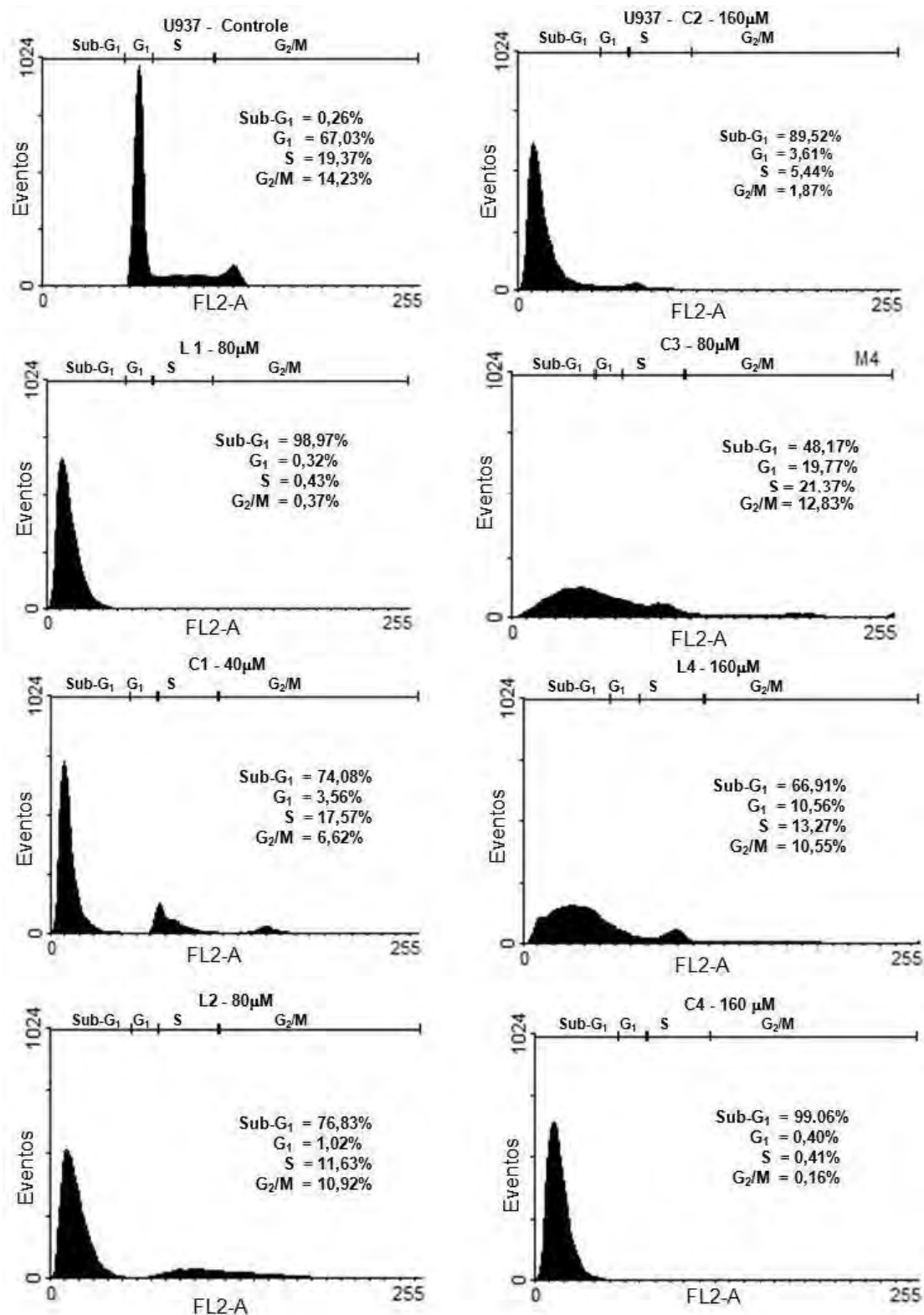


Figura 107. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem U937, após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos (L1, L2 e L4) e de coordenação (C1, C2, C3 e C4). Células controle (Branco) não foram submetidas a tratamento. As células foram coradas com iodoeto de propídio.

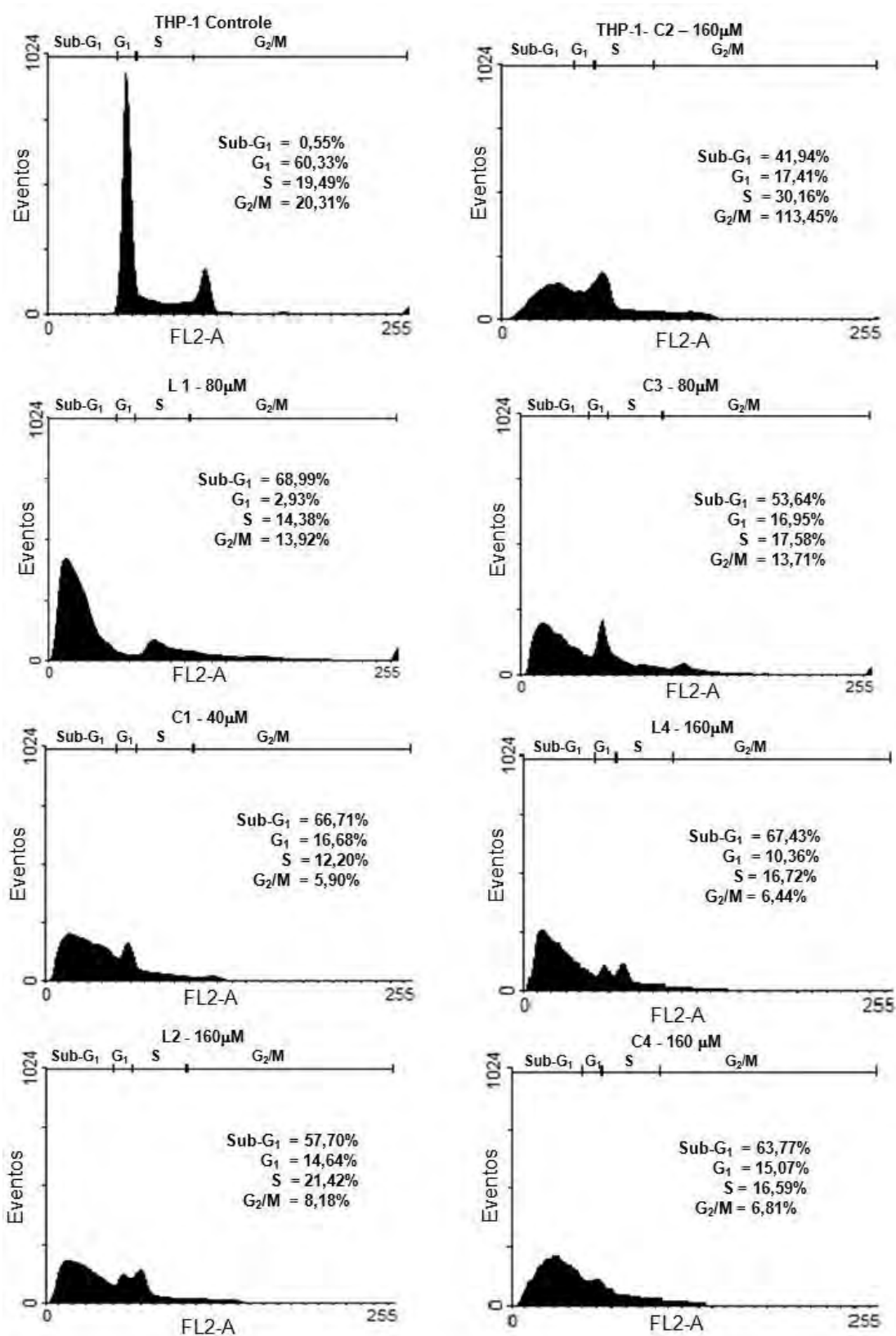


Figura 108. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem THP-1, após 36 horas de incubação com os compostos orgânicos (L1, L2 e L4) e de coordenação (C1, C2, C3 e C4). Células controle (Branco) não foram submetidas a tratamento. As células foram coradas com iodeto de propídio.

4.2.2.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)

A constatação do mecanismo de morte celular por apoptose é crucial para o desenvolvimento de novos compostos antitumorais. Como algumas características da apoptose e necrose acabam se sobrepondo, o uso de várias técnicas independentes somam resultados importantes para a confirmação do mecanismo de morte induzido por compostos com atividade antineoplásica.

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial pode ser feita utilizando o marcador catiônico lipofílico fluorescente JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) que difunde livremente para o interior da célula. Na mitocôndria, que apresenta potencial de membrana normal, a carga residual negativa da matriz mitocondrial, gerada pelo bombeamento de prótons para o espaço intermembranoso, permite o acúmulo deste fluorocromo no interior da mitocôndria. Quando a concentração do JC-1 se torna elevada na matriz mitocondrial ele forma agregados que fluorescem na região do vermelho. A forma monomérica do JC-1 emite fluorescência verde, assim, em células onde ocorreu o colapso do potencial de membrana mitocondrial não ocorre a formação de agregados de JC-1 e as células apresentam citoplasma com fluorescência verde (SMILEY *et al.*, 1991; COSSARIZZA *et al.*, 1993). O citômetro de fluxo quantifica as células que possuem mitocôndria normal e com potencial de membrana alterado por meio do detector FL1 (fluorescência 1) que capta luz na região do verde (510-527 nm) e do detector FL2 (Fluorescência 2) que capta luz na região do laranja (585-590 nm).

As concentrações empregadas neste experimento foram iguais às utilizadas para a avaliação do ciclo celular (Sub-G₁). Os gráficos *Density plot* representam os parâmetros de intensidade de fluorescência verde (FL1) e vermelha (FL2). A porcentagem de células com dissipação do potencial mitocondrial de membrana foi determinada a partir da redução da intensidade de fluorescência vermelha das amostras. Os resultados referentes à análise do PMM estão apresentados na Figura 109 para a linhagem U937 e na Figura 110 para a linhagem THP-1. Para melhor visualizar os resultados obtidos, os gráficos *Density plot* foram divididos em quatro quadrantes (A, B, C e D). Pode

ser observado nos grupos controle, para ambas as linhagens avaliadas (Figuras 109 e 110), que a população celular se concentra predominantemente no quadrante “C” que corresponde a região do gráfico *Density plot* onde se encontram células com mitocôndrias viáveis (FL2).

Nas células das linhagens U937 e THP-1, submetidas ao tratamento com os compostos orgânicos e de coordenação, foi verificado um deslocamento da população celular do quadrante “C” para o quadrante “D”, onde se observa células com dissipação do potencial mitocondrial de membrana (FL1). Estes resultados indicam que a apoptose pode estar sendo deflagrada pela via mitocondrial, uma vez que todos os compostos testados demonstraram comprometer o PMM para ambas as linhagens estudadas. Os resultados do teste de viabilidade celular, que avalia a capacidade da mitocôndria em reduzir o MTT, corrobora com os resultados obtidos para a avaliação da integridade mitocondrial a partir do JC-1, uma vez que confirmou alterações no potencial de membrana que comprometem a funcionalidade da mitocôndria.

A mitocôndria é uma organela celular responsável pela produção aeróbia de ATP que ocorre a partir da cadeia respiratória onde o citocromo C atua como acceptor de elétrons. O gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial pode ser afetado pela formação de poros na membrana mitocondrial externa por meio de dímeros formados pelas proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad e Bid), o que acarreta em extravasamento do citocromo C para o citosol, que por sua vez pode deflagrar o processo de apoptose (NARITA *et al.*, 1998; DESAGHER *et al.*, 1999). A alteração do potencial de membrana é um passo importante na indução da apoptose pela via mitocondrial e todos os compostos estudados frente as linhagens leucêmicas U937 e THP-1 comprometeram o potencial de membrana mitocondrial.

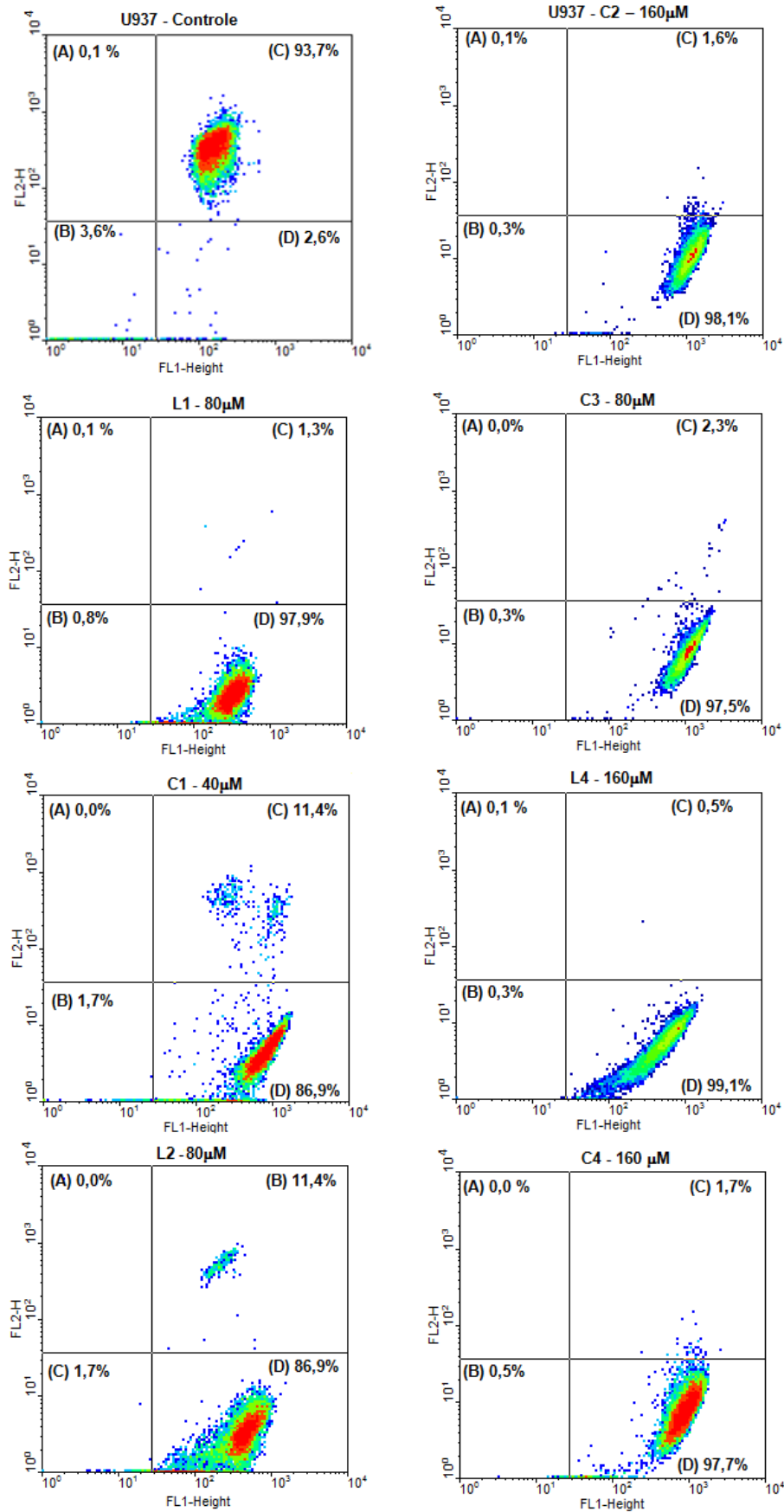


Figura 109. *Density plot* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células (U937) submetidas a incubação de 36 horas com compostos orgânicos (L1, L2 e L4) e de coordenação (C1, C2, C3 e C4).

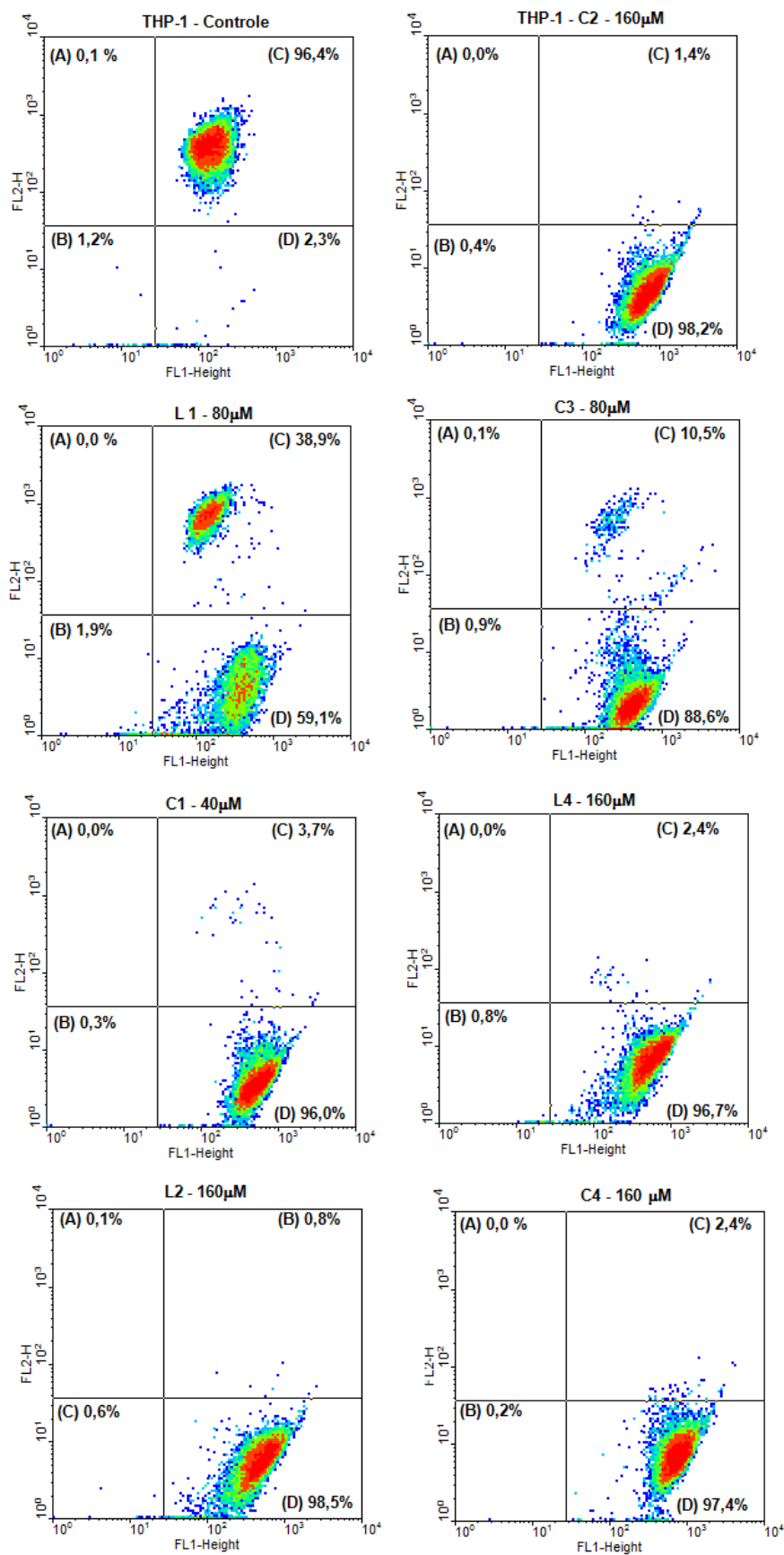


Figura 110. *Density plot* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para células (THP-1) submetidas a incubação de 36 horas com compostos orgânicos (L1, L2 e L4) e de coordenação (C1, C2, C3 e C4).

4.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O câncer representa um dos mais graves problemas de saúde em todo mundo e o estudo dos processos bioquímicos e fisiológicos envolvidos nesta patologia mostram que a maioria dos fármacos antitumorais, orgânicos ou de coordenação como a cisplatina, promovem a morte das células cancerígenas pelo mecanismo de apoptose. As alterações genéticas das células tumorais que ocorrem nos centros regulatórios da apoptose e de suas vias de sinalização, tem enfatizado a maquinaria apoptótica como um interessante alvo potencial no planejamento de novos farmacos antitumorais.

Neste trabalho foram sintetizados uma séire de compostos orgânicos e de coordenação de cobre contendo o naftol ou cumarina em suas estruturas, os quais foram estudados frente a duas linhagens de células neoplásicas (U937 e THP-1). Os ensaios de atividade biológica mostraram que hibridação molecular foi uma estratégia racional para a obtenção de novos candidatos antineoplásicos uma vez que possibilitou a obtenção de compostos orgânicos com significativa atividade antineoplásica. Esse compostos orgânicos, que foram planejados de forma a permitirem sua reação com sais metálicos, possibilitaram a obtenção de compostos de coordenação com elevada atividade biológica, mostrando que a obtenção de complexos metálicos é mais uma estratégia importante na busca de novos candidatos a protótipos anticancerígenos.

A obtenção de complexos com outros sais metálicos (cobalto, ferro, zinco, platina) e a avaliação das suas atividades poderão fornecer informações de como estes afetam a estrutura do ligante a exercem as suas atividades biológicas.

Apesar dos compostos obtidos a partir do naftol induzem morte celular por apoptose, para a confirmação da via moduladora da apoptose se faz necessário a avaliação da expressão protéica das caspases, estudo da clivagem do DNA plasmidial em diferentes condições e avaliação dos níveis de citocromo C citoplasmático e mitocondrial.

O estudo de atividade frente a outras linhagens celulares e a avaliação das alterações morfológicas destas células por meio da microscopia eletrônica de transmissão (M. E. T.) também poderão fornecer subsídios para a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de apoptose. Todos estes testes, a serem realizados, serão imprescindíveis para a elucidação da via utilizada por estes compostos na indução da apoptose em células neoplásicas.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Este trabalho permite concluir que as metodologias empregadas nas sínteses dos compostos orgânicos (L1-L8) e de coordenação (C1-C8), inéditos na literatura, foram adequadas uma vez que as análises físico-químicas (ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , análise elementar, ponto de fusão, espectroscopias de infravermelho e eletrônica, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS, voltametria cíclica e condutividade) confirmaram a obtenção dos compostos sintetizados com elevado teor de pureza.

A técnica de espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e os dados de condutivimetria, confirmaram a saída de íons cloreto das esferas de coordenação dos complexos de cobre quando em solução, demonstrando a presença de posições de coordenação livres e ligantes lábeis, o que pode estar relacionado com a atividade biológica dos complexos.

O ensio de viabilidade celular (MTT) mostrou que todos os compostos orgânicos e de coordenação apresentaram atividade citotóxica frente as linhagens testadas, exceto o ligante L6. Dentre os compostos avaliados o complexo C1 foi aquele que apresentou maior atividade biológica, sendo esta estatisticamente semelhante para a linhagem U937 e estatisticamente maior para a linhagem THP-1 em comparação com a cisplatina.

Os compostos que possuem o naftol (L1, L2, L4, C1, C2, C3 e C4) em sua estrutura foram mais citotóxicos para células neoplásicas do que para células humanas normais (PBMC), o que demonstrou elevada seletividade. Já os compostos contendo a cumarina apresentaram elevada citotoxicidade para células normais indicando baixa seletividade. De forma geral, os compostos orgânicos e de coordenação que possuem o grupo naftol em sua estrutura foram mais ativos e mais seletivos para as células neoplásicas do que os compostos com grupos cumarínicos.

Os resultados da microscopia de fluorescência e de avaliação do ciclo celular (Sub-G1) demonstram que todos os compostos orgânicos e de coordenação obtidos a partir do naftol induziram morte celular por apoptose nas linhagens

neoplásicas estudadas (U937 e THP-1). Avaliação do potencial mitocondrial de membrana demonstra a participação da mitocôndria no processo de indução de apoptose promovido por estes compostos.

Foram também obtidos compostos muito promissores como os ligantes L1 e L2 e o complexo C3 os quais apresentaram valores de IC_{50} próximos aos observados para a cisplatina.

Este trabalho fornece subsídio para futuros testes “*in vitro*” e “*in vivo*” uma vez que foram sintetizados compostos orgânicos (L1, L2 e L4) e de coordenação (C1, C2, C3 e C4) seletivos para células neoplásicas que exerceram a sua atividade citotóxica por meio da indução de apoptose.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, D. J. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Chemotherapeutic Agents**, New York: Wiley-Interscience, 6 ed., v. 5, p. 1125, 2003.

ADAMS, J.M., CORY, S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. **Trends in Biochemical Sciences.**, v. 26, p. 61-66, 2001.

ADAMS, J.M., CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, v.281, p. 1322-1326, 1998.

ADSULE, S., BARVE, V., CHEN, D., AHMED, F., DOU, Q. P., PADHYE, S., SARKAR, F. Novel Schiff Base Copper Complexes of Quinoline-2 Carboxaldehyde as Proteasome Inhibitors in Human Prostate Cancer Cells. **Journal of Medicinal Chemistry.**, v. 49,p. 7242-7246, 2006.

AI-WADEI, H. A., AI-WADEI, M. H., SCHULLER, H. M. Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol, **Anticancer Drugs**, v. 20, p. 477-482, 2009.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., RAFF, L., WALTER, RL. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 5 ed., p.1268, 2010.

ALBRECHT, H., BRODBECK-HUMMEL, D., HOEVER, M., NICKEL, B., REGENASS, U. Cellular Assays in Drug Discovery In: DINGERMANN, T., STEINHILBER, D., FOLKERS, G. **Molecular Biology in Medicinal Chemistry**, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 3-39, 2004.

ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., BARRETT, L. C., MONTANARI, C. A., CONNICI, 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, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., BARRETT, L. C., MONTANARI, C. A., CONNICI, 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.

ANTONSSON, B., Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim, the mitochondrion. **Cell and Tissue Research**, v. 306, p. 347-361, 2001.

ANTONSSON, B., MONTESSUIT, S., LAUPER, S., ESKES, R., MARTINOU, J-C. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and

to trigger cytochrome c release from mitochondria. **Biochemical Journal.**, v. 345, p. 271-278, 2000.

AVENDAÑO, C., MENÉNDEZ, J. C. **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs.** Elsevier, p. 442, 2008.

BAKHTIAR, R., OCHIAI, E. Pharmacological applications of inorganic complexes. **General Pharmacology**, v. 32, p. 535–548, 1999.

BARBOSA, K. B., TRAINA, F., TAKAHASHI, T., OLIVEIRA, G. B., ROSSINI, M. S., LORAND-METZE, I., VIGORITO, A. C., MIRANDA, E. C. M., DE SOUZA, C. A. **Conventional chemotherapy for acute myeloid leukemia: a Brazilian experience**, Sao Paulo Med J/Rev Paul Med v. 118(6), p. 173-8, 2000.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**, Porto Alegre: Artmed, 2 ed., p.536, 2008.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos A. M.; MIRANDA, Ana L. P. and RODRIGUES, Carlos R.. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova** ., v. .25, n.1, p. 129-148, 2002.

BECKER, A. A., LARIVE, C. K. Probing the Binding of Propranolol Enantiomers to α 1-Acid Glycoprotein with Ligand-Detected NMR Experiments. **Journal of Physical Chemistry**, v. 112, p.13581-13587, 2008.

BENNETT S, BREIT S.N. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. **Journal of Leukocyte Biology.** v.56, p. 236-240, 1994.

BENNION, S. D., DAVID-BAJAR, K. CUTANEOUS REACTIONS TO NUCLEAR, BIOLOGICAL, AND CHEMICAL WARFARE, In: JAMES. W. D. **MILITARY DERMATOLOGY**, Office of The Surgeon General Department of the Army, United States of America, p. 69-110, 1994.

BERGHE, V., DECLERCQ, W., VANDENABEELE, P. NADPH oxidases: new players in TNF-induced necrotic cell death. **Molecular Cell.**, v. 22, 2007.

BOIM, M.A., SCHOR, N., SANTOS, O. F. P. **Medicina celular e molecular: Bases moleculares da biologia, da genética e da farmacologia**, São Paulo: Editora Atheneu, p. 382, 2003.

BONER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v.9, p. 615-647, 2003.

BOULSOURANI, Z., GEROMICHALOS, G. D, REPANA, K., YIANNAKI, E., PSYCHARIS, V. RAPTOPOULOU, C. P., HADJIPAVLOU-LITINA, D., PONTIKI,

E., DENDRINOUS-SAMARA, C. Preparation and pharmacochimical evaluation of mixed ligand copper(II) complexes with triethanolamine and thiophenyl-2 saturated carboxylic acids. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 839-849, 2011.

BRUIJNINCX, P. C. A., SADLER, O. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p.197-206, 2008.

BULL, E. S. **Síntese, Caracterização e Avaliação das Atividades de Nuclease e Antitumoral de Compostos de Coordenação de Cobre**. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2008.

CASSIDY, J., BISSETT, D., OBE, R. A. J. **Oxford Handbook of Oncology**: Oxford: Oxford University Press, p. 698, 2002.

CEPEDA, V. FUERTES, M. A., CASTILLA, J., ALONSO, C., QUEVEDO, C. PÉREZ, J. M. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 3-18, 2007.

CHAST, F.A History of Drug Discovery:From first steps of chemistry to achievements in molecular pharmacology. In: WERMUTH, C. G., **The Practice of Medicinal Chemistry**, Elsevier, 3 ed, p. 3-62, 2008.

COHEN, G. M., WILSON, G. D., GIBBY, E. M., SMITH, M. T., DOHERTY, M. D., CONNORS, T. A. I-naphthol: a potential selective antitumor agent. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 2363-2365, 1983.

COLIGAN, J.E., KRUISBEEK, A.M., MARGULIES, D.H., SHEVACH, E.M., STROBER, W. (Eds.), **Current Protocols in Immunology**, John Wiley, New York, v. 3, 1996.

CONNELL-CROWLEY, L., HARPER, J. W., GOODRICH, D. W. Cyclin D1/Cdk4 Regulates Retinoblastoma Proteinmediated Cell Cycle Arrest by Site-specific Phosphorylation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 8, p. 287-301, 1997.

CONTERAS, J., SIPPL, W., Homo and Heterodimer Ligands: the Twin Drug Approach. In: WERMUTH, C. G., **The Practice of Medicinal Chemistry**. Elsevier, 3 ed, p. 380-414, 2008.

CORRÊA, C. M. PRÁTICA V.4-SÍNTESE DO PROPRANOLOL-SYNTHESIS OF PROPANOLOL, **International Union of Pure and Applied Chemistry**, 2006. http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-V-4.pdf

COSSARIZZA, A., BACCARANI-CONTRI, M., KALASHNIKOVA, G., FRANCESCHI, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of

mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical Biophysical Research Communications.**, v. 197, p. 40-45, 1993.

COTRAN, R.S., Kumar, V., Collins, T., **Patologia Estrutural e Funcional.** Rio de Janeiro: Guanabara, 6 ed., p.1251, 2000.

D'AMICO, A.V., MCKENNA, W. G. Apoptosis and a reinvestigation of the biologic basis for cancer therapy. **Radiother & Oncology**, v. 33, p. 3-10, 1994.

DAINO, H., MATSUMURA, I., TAKADA, K., ODAJIMA, J., TAMAKA, H., UEDA, S., SHIBAYAMA, H., IKEDA, H., HIBI, M., MACHII, T., HIRANO, T., KANAKURA, Y. Induction of apoptosis by extracellular ubiquitin in human hematopoietic cells: possible involvement of STAT3 degradation by proteasome pathway in interleukin 6-dependent hematopoietic cells. **Blood**, v. 95, p. 2577-2585, 2000.

DASH, P. Apoptosis. **Basic Medical Sciences, St.George's, University of London**, p. 1-6. Disponível em:<<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/apoptosis.pdf>>, Acesso em: 24/09/2011.

DEBATIN, K. M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy, **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v.53, p. 153-159, 2004.

DESAGHER, S., OSEN-SAND, A., NICHOLS, A., ESKES, R., MONESSUIT, S., LAUPER, S., MAUNDRELL, K., ANTONSSON, B., MARTINOU, J. C. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. **Journal Cell Biology**. v. 144, p 891-901, 1999.

DONNELLYM, A. C., MAYS, J. R., BURLISON, J. A., NELSON, J. T., VIELHAUER, G., HOLZBEIERLEIN, J., BLAGG, B. S. J.The Design, Synthesis, and Evaluation of Coumarin Ring Derivatives of the Novobiocin Scaffold that Exhibit AntiproliferativeActivity. **The Journal Organic Chemistry.**, v. 73, p.8901-8920, 2008.

DORSAN, R.T., GUTKIND, S. G-protein-coupled receptors and cancer. **Nature reviews/Cancer**, v. 7, p. 79-94, 2007.

ESPINOZA-FONSECA, L.M. The benefits of multi-target approach in drug design and discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.14, p.896-897, 2006.

FARIAS, M. G., LUCENA, N. P., D.BÓ, S., BITTAR, C. M., CASTRO Jr, C. G., GREGIANIN, L. J., BRUNETTO, A., Leucemia mielomonocítica juvenil: relato de caso **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 32, p. 173-176, 2010.

FINN, G., CREAVER, B., EGAN, D. Modulation of mitogen-activated protein kinases by 6-nitro-7-hydroxycoumarin mediates apoptosis in renal carcinoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v.28, p. 159-167, 2003.

FISCHER, U., SCHULZE-OSTHOFF, K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 187-215, 2005.

FRITSCH, M. HAESSLER, C., BRADNER, G. Induction of nuclear accumulation of the tumour suppressor protein p53 by DNA damaging agents. **Oncogene**, v. 8, p. 307-318, 1993.

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 7, p. 81-122, 1971.

GERSCHEINSON, L.E., ROTELLO, R.J. Apoptosis: A different type of cell death. **The FASEB Journal**, v. 6, p.2450-2455, 1992.

GOLAN, D. E., ARMSTRONG, A. W., ARMSTRONG, E. J., TASHJUAN, A. H., **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2 ed., p. 914, 2009.

GOLSTEIN, P., KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v.32, p. 37-43, 2006.

GONG, J. G., CONSTANZO, A., YAN, H, Q., MELINO, G., KAELIN, W. G. Jr., LEVRERO, M., WANG, J. Y. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. **Nature**, v. 399, p. 806-809, 1999.

GONG, J., TRAGANOS, F., DARZYNKIEWICZ, Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. **Analytical Biochemistry**. v.218, p.314–319, 1994.

GONZALEZ, V.M.; FUERTES, M. A., ALONSO, C., PEREZ, J. M. Is Cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 657-663, 2001.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill, 10 ed, p. 1647, 2005.

GOSWAMI, T. K., CHAKRAVARTHI, B. V. S. K., ROY, M., KARANDE, A. A., CHAKRAVARTY, A. R. Ferrocene-Conjugated L-Tryptophan Copper(II)

Complexes of Phenanthroline Bases Showing DNA Photocleavage Activity and Cytotoxicity. **Inorganic Chemistry**, v. 50, p. 8452-8464, 2011.

GROSS, A., MCDONNELL, J. M., KORSMEYER, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, v. 13, p. 1899-1911, 1999.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem Journal**, v. 219, p. 1-14, 1984.

HANAHAHAN, D., WEINBER, R. A., The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HANNUM, Y. A., Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. **Blood**, v. 86, p. 1845-1853, 1997.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HICKMAN, J. A. Apoptosis induced by anticancer drugs. **Cancer Metastasis Review**, v. 11, p. 121-139, 1992.

HOULT, J. R. S., PAYDT, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **General Pharmacology**, v. 27, p. 713-722, 1996.

HUANG, D. C., STRASSER, A. BH3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. **Cell**, v. 103, p. 839-842, 2000.

IARC - **International Agency for Research on Cancer**. Global Cancer Statistics: All Cancers (excluding non-melanoma skin cancer) Incidence and Mortality Worldwide in 2008. 2010a. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/all.asp>>, Acesso em: 30/07/2011.

IARC - **International Agency for Research on Cancer**. Global Cancer Statistics: WORLD-Most frequent cancers: both sexes. 2010b. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>>, Acesso em: 30/07/2011.

IARC - **International Agency for Research on Cancer**. Global Cancer Statistics: BRASIL-Most frequent cancers: both sexes. 2010c. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>>, Acesso em: 30/07/2011.

IMMING, P. Medicinal Chemistry: Definitions and Objectives, Drug Activity Phases, Drug Classification Systems, In: WERMUTH, C. G., **The Practice of Medicinal Chemistry**, Elsevier, 3 ed, p. 63-72, 2008.

INCA - **A situação do câncer no Brasil**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância.-Rio de Janeiro, INCA, 2006. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/situacao/>>. Acesso em: 10/09/2011.

INCA – **Instituto Nacional de Câncer**. Atlas de Mortalidade por Câncer, 2011. Disponível em: <<http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/prepararModelo00.action>>, Acesso em: 30/07/2011.

JIAMG, P., DU, W., WU, M., p53 and Bad: remote strangers become close friends. **Cell Research**, v. 17, p. 283-285, 2007. JIMÉNEZ-OROZCO, F. A., LÓPEZ GONZÁLEZ, J. S., NIETO-RODRIGUEZ, A., VELASCO-VELÁSQUEZ, M. A., MOLINA-GUARNEROS, J. A., MENDOZA-PATIÑO, N., GARCÍA-MONDRAGÓN, M. J., ELIZALDE-GALVAN, P., A., LEÓN-CEDEÑO, F., MANDOKI, J. J., Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. **Lung Cancer**, v. 34, p. 185-194, 2001.

JONES, C., THORNBACK, J. Medicinal Applications of Coordination Chemistry. **Cambridge: The Royal Society of Chemistry**, p. 353, 2007.

JORDAN, P., CARMO-FONSECA, M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. **Cellular and Molecular Life Sciences**., v, 57, p. 1229-1235, 2000.

JUIN, P., GENESTE, O., RAIMBAUD, E., HICKMAN, J. A. Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1644, p. 251–260, 2004.

KELLNER, U., RUDOLPH, P. PARWARESCH, R. Human DNA-topoisomerase-diagnostic and therapeutic implications for cancer. **Onkologie**, v. 23, p. 424-430, 2000.

KERR, J. F. R., WINTERFORD, C. M. ,HARMON, B. V. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2013-2026, 1994.

KIM, B., NEVITT, T., THIELE, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. **Nat Chem Biol**, v. 4, p. 176-185, 2008.

KNUDSON, C. M., TUNG, K. S., TOURTELLOTTE, W. G., BROWN, G. A., KORSMEVER, S. J. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. **Science**, v. 270, p. 96-99, 1995).

KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E.S., BAEHRECKE, E.H., BLAGOSKLONNY, M.V., EL-DEIRY, W.S., GOLSTEIN, P., GREEN, D.R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R.A., KUMAR, S., LIPTON, S.A., MALORNI, W., NUÑEZ, G., PETER,

M.E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death & Differentiation**, v.16, p. 3-11, 2008.

KUMAR, V; COTRAN, RS; ROBBINS, SL. **Patologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 7 ed., 2005.

LEE, J. D. **Química Inorgânica não tão Concisa**, Tradução da 5ª edição inglesa. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1999.

LEWIS, A., OUGH, M., LI, L., HINKHOUSE, M. M., RITCHIE, J. M., SPITZ, D. R., CULLEN, J. Treatment of pancreatic cancer cells with dicumarol induces cytotoxicity and oxidative stress. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 4550-4558., 2004.

LIAO, X., CHE, X., ZHAO, W., ZHANG. D., BI, T., WANG, G. The β -adrenoceptor antagonist, propranolol, induces human gastric cancer cell apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting nuclear factor κ B signaling. **Oncology Reports**, v.24., p. 1669-1676, 2010.

LISTON, P., FONG, W. G., KORNELUK, R. G. The inhibitors of apoptosis:there is more to life than Bcl2. **Oncogene**, v. 24, p. 8568-8580, 2003.

LOCKSLEY, R. M., KILLEEN, N., LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487-501, 2001.

LODISH, L., BERK, A., MATSUDARIA, P., KAISER, C.A., KRIEGER, M., SCOTT, M.P., ZIPURISKY, L., DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. Artmed, 5 ed, p. 973, 2005.

LORENZO, H. K., SUSIN, S. A., PENNINGER, J, KROEMER, G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase- independent effector of cell death. **Cell Death Differ.** v. 6, p. 516-524, 1999.

MAINO, G. JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American Journal of Pathology.**, v. 146, p. 3-15, 1995 .

MARSHALL, M. E., BUTLER, K., FRIED, A. Phase I evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine in patients with advanced malignancies. **Molecular Biotherapy**, v. 3, p. 170-178, 1991.

MARTINEZ, J., PARKER, M. T., IGNATENKO, N., GERNER, E. W. Molecular Biology of Cancer. In: ABRAHAM, J. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery: Chemotherapeutic Agents**, John Wiley & Sons, 6 ed., v. 5, p. 1-50, 2003.

MICWHINNEY, S. R., GOLDBERG, R. M., MCLEOD, H. L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, p. 10-16, 2009.

MORPHY, R., RANKOVIC, Z. Multi-target Drugs: Strategies and Challenges for Medicinal Chemists In: WERMUTH, C. G., **The Practice of Medicinal Chemistry**. Elsevier, 3 ed, p. 549-571, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays p.55-63, 1983.

MURAD, A.M.; KATZ, A. **Oncologia: Bases Clínicas do Tratamento**. Guanabara: Rio de Janeiro, p. 41, 2000.

NAFISI, S., SABOURY, A. A., KERAMAT. N., NEAULT, J-C, TAJMIR-RIahi, H-A. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. **Journal of Molecular Structure**, v. 827. P. 35-43, 2007.

NAGATA, S. Apoptosis regulated by a death factor and its Receptor: Fas ligand and Fas. **Philosophical Transactions Royal Society: Biological Sciences**, v 345, p. 281-287, 1994.

NARITA, M., SHIMIZU, S., ITO, T., CHITTENDEN, T., LUTZ, R. J., MATSUDA, H., TSUJIMOTO, Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 14681-14686, 1998.

NELSON, W. G., KASTAN, M. B. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger P53-dependent DNA damage response pathways. **Molecular Cell Biology**, v. 14, p. 1815-1823, 1994.

NEVES, A., BRITO, M. A., DRAGO, V. A. New Asymmetric N₅O₂-donor Binucleating Ligand and First FeII/FeIII Complex as a Model for Redox Properties of Uteroferrin, **Inorganica Chimica Acta**, v. 237, p. 131-135, 1995.

NEVES, A.; BRITO, M. A.; VENCANTO, I.; DRAGO, V.; GRIESAR, L. R.; SCHENK, G. Synthesis, Crystal Structure and Properties of a New Binuclear Iron (III) Complex as a Model for the Purple Acid Phosphatases, **Inorganica Chimica Acta**, v. 214, p. 5-8, 1993.

NEW, D. C., WONG, N. Y. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. **Journal of Molecular Signaling**, v.2, p. 1-15, 2007.

NGUEWA, P. A., FUERTES, M. A., CEPEDA, V., IBORRA, S. CARRIÓN, J., VALLADARES, B., ALONSO, C., PÉREZ, J. M. Pentamidine is an antiparasitic

and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p. 1387-1400, 2005.

NOVÁK, B., SIBLE, J. C., TYSON, J. J. Checkpoints in the Cell Cycle. **Encyclopedia of life sciences**, p. 1-8, 2002.

NUNEZ, R. DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. **Current Issues in Molecular Biology**, v.3, p. 67-70, 2001.

NUSSBAUM, R.L., McINNES, R. R. WILLARD. H. F. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. Editora Guanabara Koogan, 6 ed.,p. 387, 2002.

NYGREN, P. What is cancer chemotherapy? **Acta Oncologica**, v. 40, p. 166-174, 2001.

OLDHAM, W. M., HAMM. H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. **Nature reviews/Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 60-71, 2008.

OLIVIERI, A., POGGIASPALLA, M., POLONO, A. The role of hematopoietic stem cell transplantation in the elderly patient with acute myeloid leukaemia, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30(Supl. 2), p. 37-41, 2008.

OSOWOLE, A. A., KEMPE, R., SCHOBERT, R. EFFENBERGER, K. Synthesis, Spectroscopic, Thermal, and In Vitro Anticancer Properties of Some M(II) Complexes of 3-(-1-(4,6-Dimethyl-2-pyrimidinylimino)methyl-2-Naphthol. **Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry**, v. 41, p.825-833, 2011.

OTSUKI., M. D. Y., ZHONGLIAN, M. D., MASSA-AKI SHIBATA, D. Apoptotic detection methods — from morphology to gene. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 38, p. 275-339, 2003.

PÉREZ, R. P. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. **European Journal of Cancer**, v. 34, p. 1535-1544, 1998.

PUTHALAKATH, H., HUANG, D. C. S., O'REILLY, L. A., KING, S. M., STRASSER, A. The pro-apoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. **Molecular Cell**, v. 3, 287-296, 1999.

RAE T.D., SCHMIDT, P.J., PUFAHL, R. A., CULOTTA, V. C., O'HALLORAN, T. V. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. **Science**, v. 284, p. 805-808, 1999.

RAJENDRAN, U., VISWANATHAN, R., PALANIANDAVAR, M., LAKSHMINARAYANAN, M. Copper(II) complexes of novel tripodal ligands containing phenolate and benzimidazole/pyridine pendants: synthesis, structure, spectra and electrochemical behavior. **Dalton Transactions**, p. 1219-1226, 1994.

RAJESWARAN, A., TROJAN, A., BURNAND, B., GIANNELLI, M. Efficacy and side effects of cisplatin- and carboplatin-based doublet chemotherapeutic regimens versus non-platinum-based doublet chemotherapeutic regimens as first line treatment of metastatic non-small cell lung carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. **Lung Cancer**, v.59, p. 1-11, 2008.

RAJSKI, S. R.; WILLIAMS, R. M. DNA Cross-Linking Agents as Antitumor. **Drugs Chemical Review**, v.17, p. 2723-2796, 1998.

RAMAKRISHNAN, S., SHAKTHIPRIYA, S., SURESH, E., PERIASAMY, V. S., AKBARSHA, M. A., PALANIANDAVAR, M. Ternary Dinuclear Copper(II) Complexes of a Hydroxybenzamide Ligand with Diimine Coligands: the 5,6-dmp Ligand Enhances DNA Binding and Cleavage and Induces Apoptosis. **Inorganic Chemistry**, v. 50, p. 6458-6471, 2011.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., MOORE, P. K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5 ed., p.904, 2004.

REED, J.C. BCL-2: Prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 9, p. 451-473, 1995.

REED, J. C. Apoptosis-targeted therapies for cancer. **Cancer Cell**, v. 3, p. 17-22, 2003.

REMOIZE, C., BIOLA, A., PALLARDY, M., BREARD, J. Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 14, p. 111-120, 1998.

RIEGER, A. J., NELSON, K. L., KONOWALCHUK, J. D., BARREDA, D. R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. **Journal of Visualized Experiments**, v. 50, p. 1-4, 2011.

ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., KRIGAS, T.,. Inhibition of cell division in *Escherchia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, p. 698-699, 1965.

ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., TROSKO, J.E., MANSOUR, V.H., Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. **Nature**, v. 222, p. 385-386, 1969.

ROSENBERG, B.,. Platinum coordination complexes in cancer chemo- therapy. **Naturwissenschaften**, v. 60, p. 399-406, 1973.

ROUVIER, E., LUCIANI, M-F., GOLSTEIN, P. Fas involvement in Ca²⁺-independent T cell-mediated cytotoxicity. **The Journal of Experimental Medicina**, v. 177. P. 195-200, 1993.

SALINAS-JAZMÍN, N., DE LA FUENTE, M., JAIMES, R., PÉREZ-TAPIA, M., PÉREZ-TORRES, A., VELASCO-VELÁZQUEZ, M. A. Antimetastatic, antineoplastic, and toxic effects of 4-hydroxycoumarin in a preclinical mouse melanoma model. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 65, p. 931-940, 2010.

SARASTE, A., PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45. p. 528-537, 2000.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, **Oncogene**, v. 22, p. 7265-7279, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6^a Ed., Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SIM/MS-SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE MORTALIDADE-MINISTÉRIO DA SAÚDE. Indicadores de Dados Básicos (IDB): Indicador de Mortalidade, 2009. Disponível em:<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2009/c10.def>>, Acesso em: 28/04/2011.

SMILEY, S. T., REERS, M., MOTTOLA-HARTSHORN, C., LIN, M., CHEN, A., SMITH, T. W., STEELE, G. D., CHEN, L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate forming lipophilic cation JC-1. Proc. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 3671-3675, 1991.

SMITH, C. A., FARRAH, T., GOODWIN, R.G. The TNF receptor super family of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. **Cell**, v. 76, p. 959-962, 1994.

SMITH, G. F., NEUBAUER, B. L., SUNDBOOM, J. L., BEST, K. L., GOODE, L. R., TANZER, L. R., MERRIMAN, R. L., FRANK, J. D., HERRMANN, R. G. Correlation of the in vivo anticoagulant, antithrombotic and antimetastatic efficacy of warfarin in the rat. **Thrombosis. Research**, v. 50, p. 163-174, 1988.

SOUCEK, T., PUSCH, O., HENGSTSCHLAEGER-OTTNAD, E., ADAMS, P. D., HENGSTSCHLAEGER M. Deregulated expression of E2F-1 induces cyclin A- and E-associated kinase activities independently from cell cycle position. **Oncogene**, v.14, p. 2251-2257, 1997.

STEFAN, J., SALVESEN, R., SALVESEN, S. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Natural Review**, v.8, p. 405-413, 2007.

STORR, T. THOMPSON, K. H., ORVIG, C. Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 534-544, 2006.

STRASSER, A., O'CONNOR, L., DIXIT, V.M. Apoptosis signaling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 217-245, 2000.

THOMADAKI, H., KARALIOTA, A., LITOS, C., SCORILAS, A. Enhanced Concentration-Dependent Cytotoxic Effect of the Dinuclear Copper(II) Complex of L-Carnitine $[Cu_2(L\text{-carnitine})_2Cl_2(H_2O)_2]Cl_2$, Compared to L-Carnitine or Copper Chloride Dihydrate, in Human Leukemic Cell Lines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p.3713-3719, 2008.

THOMAS, G. **Medicinal Chemistry: An Introduction**. New York: John Wiley & Sons Ltd, 2 ed., p. 621, 2007.

VASHISHTHA, S. C., NAZARALI, A. J., DIMMOCK, J. R. Application of Fluorescence Microscopy to Measure Apoptosis in Jurkat T Cells After Treatment with a New Investigational Anticancer Agent (N.C.1213). **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 4, p. 437-445, 1998.

VELASCO-VELAZQUEZ, M. A., AGRAMONTE-HEVIA, J., BARRERA, D., JIMÉNEZ-OROZCO, A., GARCÍA-MONDRAGÓN, M. J., MENDOZA-PATIÑO, N. LANDA, A., MANDOKI, J. 4-Hydroxycoumarin disorganizes the actin cytoskeleton in B16-F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesion to extracellular matrix proteins and motility. **Cancer Letters**, v. 20, p. 179-186, 2003.

VERMEULEN, K., BOCKSTAEKE, D. R. V., BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v.36, p. 131-149, 2003.

WEINBERG, R. A. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control Review. **Cell**, v.81, p.323-330, 1995.

WERMUTH, C. G. Strategies in the Search for New Lead Compounds or Original Working Hypotheses, In: WERMUTH, C. G., **The Practice of Medicinal Chemistry**. Elsevier, 3 ed, p. 143-125, 2008.

WERMUTH, C. G., GANELLIN, C. R., LINDBERG, P., MITSCHER, L. A. GLOSSARY OF TERMS USED IN MEDICINAL CHEMISTRY. **Pure and applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 1998.

WILSON, G. D., DOHERTY, M. D. COHEN, G, M. Selective toxicity of 1-naphthol to human colorectal tumour tissue. **British Journal of Cancer**, v. 51, p. 853-863, 1985.

ZHANG, D., MA, QY. SHEN, SG. HU, HT. Inhibition of Pancreatic Cancer Cell Proliferation by Propranolol Occurs Through Apoptosis Induction: The Study of [beta]-Adrenoceptor Antagonist's Anticancer Effect in Pancreatic Cancer Cell. **Pancreas**, v. 38, p. 94-100, 2009.

ZIEGLER, U., GROUSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiological Science**, v. 19, p. 124-28, 2004.