

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE COMPOSTOS DE
COORDENAÇÃO DE COBALTO E FERRO**

SAMILA RIBEIRO MORCELLI

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO - 2016**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE COMPOSTOS DE
COORDENAÇÃO DE COBALTO E FERRO**

SAMILA RIBEIRO MORCELLI

"Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais."

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christiane Fernandes Horn

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2016**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE COMPOSTOS DE
COORDENAÇÃO DE COBALTO E FERRO**

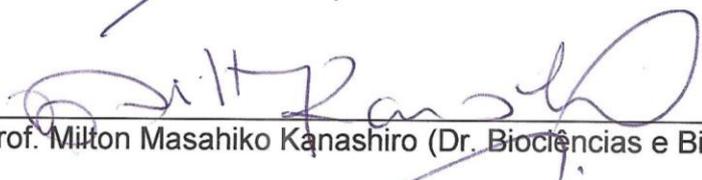
SAMILA RIBEIRO MORCELLI

“Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais”

Aprovada em 17 de março de 2016.

Comissão Examinadora:


Prof. Marcos Dias Pereira (Dr. em Ciências) – IQ/UFRJ


Prof. Milton Masahiko Kanashiro (Dr. Biociências e Biotecnologia) – CBB/UENF


Prof. Josane Alves Lessa (Dr^a. Química) – IQ/UERJ


Prof. Christiane Fernandes Horn (Dr^a. Química) - UENF
ORIENTADORA

Aos meus pais, Alcenir e Fátima, com todo amor.

A Manoel José Ribeiro *In Memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais essa conquista, por me guiar, me dar forças em todos os momentos da minha vida.

Minha eterna gratidão aos meus pais, Alcenir e Fátima por toda confiança, amor, incentivo, dedicação, paciência e apoio, por todos os sacrifícios que fizeram para que eu chegasse até aqui. Vocês são tudo pra mim!

Ao meu irmão Renan, por todo amor e incentivo, por me ensinar e lutar pela vida e a ter fé. Você é uma pessoa incrível e sou agradecida por fazer parte da minha vida. Te amo demais e não vivo sem você!

Ao meu namorado Wesley Grigolato, por sua absoluta compreensão, apoio e companheirismo. Por nunca ter deixado que eu desanimasse, nem na mais difícil provação, por estar ao meu lado incondicionalmente. Amo você!

À toda minha família pelo, apoio, amor e ajuda em todos os momentos. Amo muito vocês.

À Monique e o Léo, que se tornaram parte da minha família, por todo apoio, incentivo e amizade.

.À minha orientadora Prof^a. Christiane Fernandes por toda paciência, compreensão e confiança. Por contribuir de forma relevante para minha formação.

Ao professor Adolfo Horn, por sua dedicação e auxílio.

Aos amigos Geizila Abib, Manuela Oliveira, Laís Setimi, Iane Rozino, Ana Paula Fernandes, Rafaela Moreira pela amizade e apoio.

À minha amiga Luísa Mendes por toda ajuda, dedicação e incentivo.

Ao grupo de pesquisa em Química de Coordenação e Bioinorgânica – Luísa Mendes, Clícia Gomes, Larissa Reis, Vagner Assis, Ísis Leal, Rafael Costa, Nathália Florença, Ana Carolina de Carvalho, em especial a Rafaela Moreira, Érika Bull e Wagner Terra, pela colaboração no testes biológicos, dicas e pelas conversas.

Aos amigos de laboratório Ruth Evelyn, Thiago Rezende, Thayana Portal, Camila Nunes, Polyana Barcellos, Luana Batista e demais alunos e professores do laboratório Wilson Gazotti e a todos aqueles cujo nome não foi citado neste trabalho, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste, vocês estarão sempre guardados em meu coração.

Aos técnicos Marcelo Mathias e por sua dedicação e eficiência, por estar sempre disposto a nos ajudar.

Ao Prof. Adailton J. Bortoluzzi, do Departamento de Química- UFSC, pela obtenção dos dados cristalográficos.

Ao Prof. Dalber Ruben Sanchez Candela (Departamento de Física- UFF), pela obtenção dos espectros de Mössbauer.

Aos nossos colaboradores Luciana da Silva Mathias e Olney Vieira-da-Motta (LSA – UENF), Franz Viana Borges e Milton Kanashiro pela (LBR – UENF), Leide Laura Maciel e João Carlos de Aquino (LFBM – UENF), Daniela Dias Queiroz e Marcos Dias Pereira (LCG – UFRJ), pela colaboração na realização dos testes biológicos.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, assim como aqueles que, de alguma forma, me ajudaram a chegar até aqui.

RESUMO

Complexos de metais de transição são de interesse no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, antibacterianos, antioxidantes, anticâncer, antiparasitário, devido às interessantes propriedades biológicas oriundas da interação metal-ligante. Dentre as atividades investigadas, destacam-se as atividades antioxidante e antitumoral, visto que o estresse oxidativo está relacionado ao desenvolvimento de diversas doenças, entre elas o câncer, este responsável por inúmeras mortes no mundo. O objetivo deste trabalho é sintetizar, caracterizar e investigar a atividade antioxidante e a atividade antitumoral, usando modelos eucarióticos, de compostos de coordenação de cobalto e ferro contendo ligantes N,O-doadores. Os ligantes H2L1, H2L2 e H2L3 foram sintetizados utilizando-se rotas sintéticas previamente descritas na literatura, sendo H2L1= N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina; H2L2= 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol e H2L3= 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(2-naftiloxi)-2-propanol, foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN). Em seguida, foram feitas reação de complexação com sais metálicos de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) sendo obtidos seis complexos, dentre eles cinco inéditos (**1** - **3** e **5** - **6**, respectivamente). Os mesmos foram caracterizados através das técnicas de espectroscopia no infravermelho, difração de raios-X de monocristal (para o **3**), análise elementar (C, H, N), condutividade elétrica, ponto de fusão, espectroscopia eletrônica, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS), voltametria cíclica e espectroscopia Mössbauer (para os compostos de ferro). Foram realizados estudos de atividade antioxidante (Sod e CAT) *in vitro* e *in vivo* empregando-se *S. cerevisiae*. O composto de cobalto **1** mostrou-se promissor, motivando estudos futuros. Foi realizada ainda investigação da atividade antitumoral contra as linhagens de linfoma histiocítico (U937), leucemia monocítica aguda (THP-1), leucemia linfocítica aguda (MOLT-4), câncer de pulmão (H460) e câncer de cólon (COLO 205). A investigação inicial da atividade biológica dos compostos foi realizada através do teste de viabilidade celular empregando-se o ensaio de metabolização do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio). Posteriormente, para os compostos mais ativos foram realizados estudos

de viabilidade celular contra células mononucleares do sangue periférico (PBMC do inglês, “peripheral blood mononuclear cells”). Para o composto mais ativo, foram feitos testes de marcação com anexina V e iodeto de propídio (PI), avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (sub-G1), avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) por citometria de fluxo (JC-1) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), a fim de identificar o tipo de morte induzido. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o composto de cobalto **3** é ativo contra todas as linhagens investigadas e induz morte celular por apoptose. Ele é pouco tóxico às células normais (PBMC), sendo promissor para estudos *in vivo*.

Em virtude da baixa atividade antitumoral observada para o composto **1**, conclui-se que, para este composto em estudo, as atividades antioxidante e antitumoral são antagônicas.

Palavras-chave: cobalto(II), ferro(III), antioxidante, metalofármacos, apoptose.

ABSTRACT

Transition metal complexes are of interest in the development of new antifungal agents, antibacterial, antioxidant, anticancer, antiparasitic due to the interesting biological properties derived from the metal-ligand interaction. Among the mentioned activities the antioxidant and antitumor activities are of great relevance, since oxidative stress is related to the development of various diseases, including cancer, which is responsible by numerous deaths worldwide. The objective of this work is to synthesize, characterize and investigate the antioxidant activity and antitumor activity using eukaryotic models, cobalt coordination compounds and iron containing binders N, O-donors. The ligands H2L1, H2L2 and H2L3 were synthesized employing synthetic routes described previously in the literature, H2L1 = N-(2-hydroxybenzyl) - N-(2-pyridylmethyl) [(3-chlorophenyl) (2-hydroxy)] propylamine; H2L2 = 2-hydroxybenzyl {1-(2-pyridylmethyl) amino} -3-(1-naphthoxy) -2-propanol and H2L3 = {2-hydroxybenzyl 1-(2-pyridylmethyl) amino} -3-(2-naphthoxy) -2-propanol. The ligands were characterized by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance of hydrogen (^1H RMN). The reactions between these ligands and $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ allowed the isolation of six complexes, five of them are new. (**1** - **3** and **5** - **6**, respectively). They were characterized by means of spectroscopic techniques in the infrared, diffraction X-ray crystallography (for complex **3**), elemental analysis (C, H, N), electrical conductivity, melting point, electronic spectroscopy, mass spectrometry ionization electrospray (ESI (+) - MS and ESI (+) - MS / MS), cyclic voltammetry and Mössbauer spectroscopy (for iron(III) complexes). Studies *in vitro* and *in vivo* employing *S. cerevisiae* have been conducted in order to evaluate the antioxidant activity (mimetic to Sod and CAT) of these complexes. Complex **1** showed high activity, motivating future studies. Furthermore, the antitumoral activity of the corresponding complexes was assessed *in vitro* through the evaluation of IC_{50} , against histiocytic lymphoma cell lines (U937), acute monocytic leukemia (THP-1), acute lymphocytic leukemia (MOLT-4), lung cancer (H460) and colon cancer (COLO 205). The initial investigation of the biological activity of the compounds was performed by cell viability assay employing the metabolism of MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Thereafter, for the more active complexes, cell viability studies against the

peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were performed. For the more active compounds, marking tests were made with annexin V and propidium iodide (PI), evaluation of the cell cycle by flow cytometry (sub-G1), evaluation of mitochondrial membrane potential (MMP) by flow cytometry (JC-1) and transmission electron microscopy (TEM), in order to determine the type of induced death. The results of this study indicate that the compound of cobalt **3** is active against all strains investigated, and induces cell death by apoptosis. Furthermore, it presents low toxicity to normal cells (PBMC), motivating studies *in vivo* studies.

Due to the low antitumor activity observed for compound **1**, can be concluded, that, for these investigated compounds, the antioxidant and antitumor activities can be considered antagonistic.

Keywords: Cobalt (II), iron (III), antioxidant, metallodrugs, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Redução tetravalente do oxigênio molecular até a formação de água, formação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre (Adaptado de COHEN, 1989).	23
Figura 2. Cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e formação das EROs nos complexos I e III (BHAT, et al., 2015).....	24
Figura 3. Principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica (Adaptado de AYALA, et al., 2014.....	26
Figura 4. Antioxidantes presentes em células eucarióticas e sua distribuição na célula (MANDAL, 2015).....	27
Figura 5. Eficácia de alguns antioxidantes no corpo humano. (Adaptado de DASGUPTA e KLEIN, 2014).	28
Figura 6. Mn-Sod mitocondrial humano (esquerda). À direita sítio ativo da Mn-Sod (IRANZO, 2011).	29
Figura 7. Sítio ativo da Sod1 ($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$) (HUSTON-LUDLAM, 2003).....	29
Figura 8. Reações de Haber-Weiss e Fenton (Adaptado de AYALA, et al., 2014)....	29
Figura 9. Sítio ativo da catalase de ferro (PUTNAM, et al., 2000).....	30
Figura 10. Mapas de densidade eletrônica, mostrando o sítio ativo da catalase de manganês <i>Lactobacillus plantarum</i> (BARYNIN, et al., 2001).	30
Figura 11. Etapas das reações de desproporcionamento do peróxido de hidrogênio (Adaptado de JAESCHKE, 2010).....	31
Figura 12. (a) Glutathiona peroxidase 1 e (b) Glutathiona peroxidase 4 (THESGC, 2015).	32
Figura 13. Estrutura dos compostos de coordenação de cobalto (1) e (2) descritos por Manikandan e colaboradores (MANIKANDAN, et al., 2014).	33
Figura 14. Estrutura dos compostos de níquel, ferro e vanádio (BAL-DEMIRCI, et al., 2014).	35
Figura 15. Estrutura geral para os compostos de cobre e zinco (RAMAN E PRAVIN, 2014).	36
Figura 16. Características das células de <i>S.cerevisiae</i> que se parecem às células humanas (KHURANA e LINDQUIST, 2010).....	39

Figura 17. a) Estrutura do composto de cobre; b) estrutura de difração de raios-X (ALMEIDA, et al., 2013).	39
Figura 18. Inibição da redução do NBT pelo composto de cobre (1,3 mmol.dm ⁻³) (ALMEIDA, et al., 2013).	40
Figura 19. Porcentagem de sobrevivência das cepas selvagem e mutante antes e depois do tratamento com composto de cobre e estresse com menadiona. Células em metabolismo fermentativo (ALMEIDA, et al., 2013).	40
Figura 20. Efeito do tratamento com composto de cobre na sobrevivência das células durante o estresse com H ₂ O ₂ . Células em metabolismo fermentativo (BY4741 – Glicose) e células em metabolismo respiratório (<i>ctt1Δ</i> -glicerol) (ALMEIDA, et al., 2013).	41
Figura 21. Estrutura dos compostos de Cu, Fe e Mn (RIBEIRO, et al., 2015).	42
Figura 22. Efeitos dos compostos de Cu, Fe e Mn na sobrevivência das células de <i>S. cerevisiae</i> selvagens (BY4741 e EG103) e mutantes (<i>sod1Δ</i> e <i>ctt1Δ</i>) expostas ao estresse oxidativo com menadiona (a) e H ₂ O ₂ (b) (RIBEIRO, et al., 2015).	43
Figura 23. Níveis de peroxidação lipídica da células de <i>S. cerevisiae</i> após o tratamento e exposição ao estresse com menadiona (a) e H ₂ O ₂ (b) (RIBEIRO, et al., 2015).	44
Figura 24. Esquema de surgimento e propagação do câncer (Adaptado de Nova Escola, 2015).	46
Figura 25. Características morfológicas de apoptose, autofagia e necrose (TAN, et al., 2014).	51
Figura 26. Estrutura dos compostos de cobalto(III) (1) e (2) (MANIKANDAN, et al., 2014).	52
Figura 27. Estrutura dos compostos de cobre (1), (2), (3) e (4) (FERNANDES, et al., 2015).	52
Figura 28. Micrografia eletrônica de transmissão. (A) Controle U937, (B) U937 incubada com 40 μmol dm ⁻³ do complexo (2) por 12 h, (C) U937 incubada com 40 μmol dm ⁻³ do complexo (2) por 24 h (FERNANDES, et al., 2015).	54
Figura 29. Esquema de síntese do precursor P1 (NEVES et al., 1993).	58
Figura 30. Esquema de síntese do ligante H2L1 (Horn et al., 2000).	59
Figura 31. Esquema de síntese do precursor P2 (FERNANDES, et al., 2015).	59
Figura 32. Esquema de síntese do ligante H2L2 (FERNANDES, et al., 2015).	60

Figura 33. Esquema da rota sintética do precursor P3 (FERNANDES, et al., 2015).	60
Figura 34. Esquema de síntese do ligante H2L3 (FERNANDES, et al., 2015).	61
Figura 35. Esquema de síntese do composto 1.	61
Figura 36. Esquema de síntese do composto 2.	62
Figura 37. Esquema de síntese do composto 3.	62
Figura 38. Esquema de síntese do composto 4 (SILVA et al., 2008).....	63
Figura 39. Esquema de síntese do composto 5.	63
Figura 40. Esquema de síntese do composto 6.	64
Figura 41. Representação esquemática da redução do NBT pelo radical superóxido (Adaptado de GOULART, et al., 2009).....	68
Figura 42. Estratégia experimental para a diluição e plaqueamento para a determinação da sobrevivência das células de <i>S. cerevisiae</i>	70
Figura 43. Esquema da redução do MTT a formazan pela succinato desidrogenase mitocondrial.....	73
Figura 44. Espectro na região do infravermelho para o composto 1.....	86
Figura 45. Espectro na região do infravermelho para o composto 2.....	87
Figura 46. Espectro na região do infravermelho para o composto 3.	88
Figura 47. Espectro na região do infravermelho para o composto de ferro 5.....	89
Figura 48. Espectro na região do infravermelho para o composto de ferro 6.....	90
Figura 49. Estrutura de raios X para o composto de cobalto 3. A molécula de solvente foi omitida para fins de clareza.	91
Figura 50. Propostas de estrutura, com base na caracterização físico-química, para os compostos de coordenação de cobalto e ferro.....	95
Figura 51. Espectro eletrônico para o composto 1, obtido em DMF, nas concentrações $1,6 \cdot 10^{-3}$ mol.dm ⁻³ , $1,8 \cdot 10^{-3}$ mol.dm ⁻³ , $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol.dm ⁻³ , $2,2 \cdot 10^{-3}$ mol.dm ⁻³ . Em destaque, curva das Concentrações vs Absorvâncias em 595 e 682 nm.	97
Figura 52. Espectro eletrônico para o composto 2, obtido em DMF, nas concentrações $2,5 \cdot 10^{-3}$ mol.dm ⁻³ , $3,5 \cdot 10^{-3}$ mol.dm ⁻³ , $4,5 \cdot 10^{-3}$ mol.dm ⁻³ e $5,5 \cdot 10^{-3}$ mol.dm ⁻³ . Em destaque, curva das Concentrações vs Absorvâncias em 497, 556, 607 e 677 nm.	98

Figura 53. Espectro eletrônico para o composto 3, obtido em DMF, nas concentrações $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$, $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$, $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ e $5,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$. Em destaque, curva das Concentrações vs Absorvâncias em 498, 557, 599 e 676 nm.	98
Figura 54. Espectro eletrônico para o composto 5, obtido em acetonitrila, nas concentrações $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$, $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$, $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$, $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$. Em destaque, curva das Concentrações vs Absorvâncias em 282, 356 e 580 nm.	99
Figura 55. Espectro eletrônico para o composto 6, obtido em acetonitrila, nas concentrações $9 \cdot 10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$, $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$, $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$, $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$. Em destaque, curva das Concentrações vs Absorvâncias em 261, 272, 312, 357 e 582 nm.	100
Figura 56. Espectro de ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1), obtido para o composto 1 e as propostas de estruturas para os sinais de m/z 364, 410 e 670.	102
Figura 57. Espectro de ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1), obtido para o composto 2 e as propostas de estruturas para os sinais de m/z 472, 886 e 943.	103
Figura 58. Espectro de ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1), obtido para o composto 3 e as propostas de estruturas para os sinais de m/z 472, 508 e 886.	103
Figura 59. Espectro de ESI(+)-MS para o composto 5, evidenciando a proposta de estruturas para a espécie de m/z 971.	105
Figura 60. Espectro de ESI(+)-MS para o composto 6, evidenciando a proposta de estruturas para a espécie de m/z 971.	105
Figura 61. Voltamograma cíclico para o composto de ferro 5. Eletrodo de trabalho: platina; eletrodo de referência: platina; contra-eletrodo: platina; eletrólito suporte: hexafluorofosfato de tetrabutilamônio $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; solvente DMSO, referência interna Fc^+/Fc^0	107
Figura 62. Voltamograma cíclico para o composto de ferro 6. Eletrodo de trabalho: platina; eletrodo de referência: platina; contra-eletrodo: platina; eletrólito suporte: hexafluorofosfato de tetrabutilamônio $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; solvente DMSO.	108
Figura 63. Espectros Mössbauer, à temperatura ambiente de ^{57}Fe para os compostos 4, 5 e 6. À direita o gráfico de distribuição para cada espectro.	109
Figura 64. Gráfico de redução do NBT, sendo a leitura em 560 nm, na ausência (controle) e na presença dos compostos de cobalto 1, 2 e 3.	111
Figura 65. Gráfico de redução do NBT, sendo a leitura em 560 nm, na ausência (controle) e na presença dos compostos de ferro 4, 5 e 6.	111

Figura 66. Gráfico de eliminação de H ₂ O ₂ sendo realizada a leitura em 240 nm, na presença dos dos compostos de cobalto 1, 2 e 3 na concentração de 4.10 ⁻⁵ mol dm ⁻³	113
Figura 67. Gráfico de eliminação de H ₂ O ₂ sendo a leitura realizada em 240 nm, na presença dos compostos de ferro 4, 5 e 6, na concentração de 2.10 ⁻⁵ mol dm ⁻³ ...	113
Figura 68. Sobrevivência das células de <i>S. cerevisiae</i> EG103 após 1h de exposição aos ligantes e compostos sintetizados neste trabalho. A concentração do DMSO foi de 0,1%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (ST).	115
Figura 69. Sobrevivência celular da cepa de <i>S. cerevisiae</i> EG103 após o tratamento com os compostos (25 μmol dm ⁻³) e estresse oxidativo com menadiona (fonte de radical superóxido) (30 mmol dm ⁻³). A concentração do DMSO foi de 0,1%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (ST).....	116
Figura 70. Sobrevivência celular da cepa de <i>S. cerevisiae</i> EG103 após o tratamento com os compostos (25 μmol.dm ⁻³) e estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio (70 mmol.dm ⁻³). A concentração do DMSO foi de 0,1%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (ST).	117
Figura 71. Detecção do tipo de morte por marcação com Anexina V/iodeto de propídio induzido pelos complexos de cobalto 2 e 3 e pela cisplatina, em células de U937, após 24 horas de tratamento. A) controle, B) células de U937 tratadas com o complexo 2, na concentração de 80 μmol.dm ⁻³ , C) células de U937 tratadas com o complexo 3, na concentração de 80 μmol.dm ⁻³ , D) células de U937 tratadas com cisplatina, na concentração de 40 μmol.dm ⁻³ . A distribuição de células em cada quadrante representa: porcentagem de morte celular por necrose (Q1), apoptose secundária (Q2) e apoptose primária (Q4) e células viáveis (Q3). A porcentagem de células em cada quadrante é apresentado.	121
Figura 72. <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem U937, (A) controle; (B) tratada com o composto de cobalto 2 após 24h de incubação; (C) tratada com o composto de cobalto 3 após 24h de incubação; (D) tratada com o composto cisplatina após 24 h de incubação. Q2: células que apresentam mitocôndrias com potencial de membrana normal; Q4: células que apresentam mitocôndrias com perda do potencial de membrana.	124
Figura 73. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem U937, corado com iodeto de propídio (PI), após 24h de incubação, controle e com o composto de cobalto 3. Cada experimento, por amostra, foi determinado com base 10.000 eventos. (A) células do controlo (sem tratamento); (B) células após o tratamento com 80 μmol.dm ⁻³ do composto de cobalto 3.	126

Figura 74. Microscopia eletrônica de transmissão de células leucêmicas humanas. (A) Controle, (B) U937 incubada com o composto 3 ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), por 4 h, (C) e (D) U937 incubada com composto 3 ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), por 8 h. Seta – mitocôndrias alongadas; Cabeça de seta – fragmentação de DNA; Estrela – matriz mitocondrial elétron-lucente; M – perfis mitocndriais ampliados..... 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais moléculas encarregadas pela defesa antioxidante (DASGUPTA e KLEIN, 2014).....	27
Tabela 2. Valores de IC ₅₀ obtidos para os ligantes, compostos de cobalto, BHT e vitamina C contra a vários radicais (MANIKANDAN, et al., 2014).....	34
Tabela 3. Coeficiente TEAC e percentagem da taxa de inibição para os compostos 1a, 1b, 1c, 1d 1e (BAL-DEMIRCI, et al., 2014).....	35
Tabela 4. Atividade antioxidante obtida para os ligantes, complexos de cobre e zinco , vitamina C e BHT contra DPPH e peróxido de hidrogênio (RAMAN E PRAVIN, 2014).	37
Tabela 5. Atividade Sod mimética dos compostos de Cu e Zn (RAMAN E PRAVIN, 2014).	38
Tabela 6. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, entre os homens, estimados para 2016/2017 (exceto pele não melanoma) (INCA, 2016).	48
Tabela 7. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, entre as mulheres, estimados para 2016/2017 (exceto pele não melanoma) (INCA, 2016). ..	49
Tabela 8. Concentração que inibe ou lesa 50% das células (IC ₅₀) dos complexos, ligantes, sal de cobre e cisplatina, contra linhagens de leucemia humana (THP-1 e U937) e PBMC (FERNANDES, et al., 2015).	53
Tabela 9. Principais bandas observadas no espectro no infravermelho para o precursor P1 e o ligante H2L1, obtido em pastilha de KBr e comparação com os dados relatados na literatura.	77
Tabela 10. Principais bandas observadas no espectro no infravermelho para os precursores P2 e P3, obtidos em pastilha de KBr, e comparação com dados relatados na literatura.....	78
Tabela 11. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho para os ligantes H2L2 e H2L3, obtido pastilha de KBr.	79
Tabela 12. Dados de ¹ H RMN para o precursor P1, obtidos em CDCl ₃ , atribuições e comparação com valores relatados na literatura.	80
Tabela 13. Dados de ¹ H RMN ¹ H para o ligante H2L1, obtidos em CDCl ₃ , atribuições e comparação com os valores relatados na literatura.	81

Tabela 14. Dados obtidos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) do precursor P2 e suas respectivas atribuições e comparação com os dados relatados na literatura.....	82
Tabela 15. Dados de ^1H RMN para o precursor P3, obtidos em CDCl_3 , atribuições e comparação com valores relatados na literatura.....	83
Tabela 16. Dados de ^1H RMN para o ligante H2L2, obtidos em CDCl_3 , e comparação com valores relatados na literatura.....	84
Tabela 17. Dados de ^1H RMN para o ligante H2L3, obtidos em CDCl_3 , e comparação com valores relatados na literatura.....	85
Tabela 18. Principais bandas observadas no espectro no infravermelho para os compostos de cobalto.....	88
Tabela 19. Principais bandas observadas no espectro no infravermelho para os compostos e ferro.....	90
Tabela 20. Parâmetros cristalográficos do composto de cobalto 3.....	92
Tabela 21. Principais comprimentos (Å) e ângulos de ligação ($^\circ$) observados para o composto de cobalto 3.....	93
Tabela 22. Dados da análise de C,H e N para os compostos de ferro e de cobalto.....	93
Tabela 23. Dados de análise condutivimétrica para os compostos inéditos.....	96
Tabela 24. Resultados dos voltamogramas cíclicos para os compostos de ferro 5 e 6.....	106
Tabela 25. Parâmetro hiperfinos obtidos via Espectroscopia Mössbauer para os compostos de ferro, à temperatura ambiente. Os espectros foram equipados com uma distribuição quadrupolar considerando 40 dupletos mantendo a largura de linha (Γ) fixada a 0,3 mm/s. $\square E_Q$ e IS são os valores mais prováveis da distribuição. Os valores dos desvios isómero são em relação ao ferro metálico.....	110
Tabela 26. Porcentagem de inibição da redução do NBT obtido para os compostos de cobalto e ferro.....	111
Tabela 27. Valores de IC_{50} obtido para compostos de coordenação, ligantes, sais metálicos e cisplatina contra as linhagens de leucemia (THP-1 e MOLT-4), cólon (COLO 205), linfoma (U937) e pulmão (H460) em 36 h.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS

β -anel – Deformação angular do anel

δ – Deslocamento químico

Γ - largura da linha do espectro Mössbauer

ΔE_q – Desdobramento quadripolar

BHT – hidroxitolueno butilado (2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol)

CAT – catalase

DMF – dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

$E_{1/2}$ – Potencial de meia célula

IARC - Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer

IC_{50} – concentração que provoca a morte ou afeta o crescimento 50% das células

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IP – iodeto de propídio

IS – deslocamento isomérico

H2L1 - N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina

H2L2 - 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol

H2L3 - 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(2-naftiloxi)-2-propanol

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MTT – (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio)

m/z – massa/carga

NBT - azul de nitrotetrazólio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBMC – células mononucleares de sangue periférico

RMN – ressonância magnética nuclear

Sod – superóxido dismutase

TCLM – transferência de carga ligante metal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Química Bioinorgânica	22
1.2. Estresse oxidativo	22
1.2.1. Mecanismos de defesa antioxidante.....	26
1.2.2. Antioxidantes sintéticos – compostos de coordenação	32
1.3. Câncer.....	45
1.3.1. Atividade antitumoral de compostos de coordenação	51
2. OBJETIVOS	56
2.1. Objetivo Geral	56
2.2. Objetivos específicos	56
3. MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1. Síntese dos compostos orgânicos	58
3.1.1. Síntese do precursor (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1)	58
3.1.2. Síntese do ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina (H2L1).....	58
3.1.3. Síntese do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P2).....	59
3.1.4. Síntese do ligante 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (H2L2).....	59
3.1.5. Síntese do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (composto precursor para a obtenção do ligante L4) (P3)	60
3.1.6. Síntese do ligante 1-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina-3-(2-naftiloxi)-propan-2-ol (H2L3)	60
3.2. Síntese dos compostos de coordenação	61
3.2.1. Síntese do composto de coordenação 1	61
3.2.2. Síntese com composto de coordenação 2.....	62
3.2.3. Síntese do composto de coordenação 3	62
3.2.4. Síntese do composto de coordenação 4	63
3.2.5. Síntese do composto de coordenação 5	63
3.2.6. Síntese do composto de coordenação 6	64

3.3. Técnicas empregadas	64
3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H	65
3.3.2. Espectroscopia no infravermelho.....	65
3.3.3. Difração de raios X	65
3.3.4. Ponto de Fusão	65
3.3.5. Análise elementar	66
3.3.6. Condutividade elétrica	66
3.3.7. Espectroscopia Eletrônica	66
3.3.8. Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS	66
3.3.9. Voltametria Cíclica.....	66
3.3.10. Espectroscopia Mössbauer de ⁵⁷ Fe.....	67
3.4. Estudo da atividade antioxidante	67
3.4.1. Estudos da atividade Sod mimética.....	67
3.4.2. Estudos da atividade CAT mimética	68
3.4.3. Cultura de células <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (EG103), para Estudos da atividade de proteção celular	68
3.4.4. Estudo da atividade antioxidante utilizando modelo eucariótico	69
3.5. Investigação da atividade antitumoral	71
3.5.1. Diluição, concentrações e armazenamento dos compostos.....	71
3.5.2. Cultura das linhagens de células cancerígenas	71
3.5.3. Cultura das linhagens de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	72
3.5.4. Cálculo da concentração de células cancerígenas.....	72
3.5.5. Avaliação do efeito dos compostos na viabilidade celular através do método de metabolização do MTT	73
3.5.6. Avaliação do tipo de morte celular através da marcação com Anexina V e iodeto de propídio	74
3.5.7. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (JC-1)	74
3.5.8. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1).....	75

3.5.9. Estudo das alterações morfológicas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.)	76
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1. Caracterização dos compostos orgânicos.....	76
4.1.1. Espectroscopia no infravermelho.....	77
4.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹ H RMN)	79
4.2. Caracterização físico-química dos compostos de coordenação	86
4.2.1. Espectroscopia no infravermelho.....	86
4.2.2. Difração de raios-X.....	90
4.2.3. Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio.....	93
4.2.4. Condutividade elétrica	96
4.2.5. Espectroscopia eletrônica.....	96
4.2.6. Espectrometria de Massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS)	100
4.2.7. Voltametria Cíclica.....	106
4.2.8. Espectroscopia Mössbauer	108
4.3. Atividade antioxidante	110
4.3.1. Atividade mimética a metaloenzima Superóxido Dismutase (Sod).....	110
4.3.2. Atividade mimética à metaloenzima catalase (CAT).....	112
4.3.3. Capacidade de proteção celular	114
4.4. Atividade antitumoral.....	117
4.4.1. Avaliação do efeito dos compostos na viabilidade celular através do método de metabolização do MTT	117
4.4.2. Marcação com Anexina V e Iodeto de propídio (PI)	120
4.4.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)	122
4.4.4. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1).....	125
4.4.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	126
5. CONCLUSÕES	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química Bioinorgânica

O uso de compostos contendo metais no tratamento de diversas enfermidades vem sendo realizado, de forma empírica, há pelo menos 5 mil anos. Há 3500 anos na Arábia, China e Índia o ouro era empregado na fabricação de medicamentos, pois acreditava-se que por ser um metal nobre, este traria benefícios ao organismo (SCHWIETERT, et al., 1999; BERALDO, 2005; MEDICI, et al., 2015).

O uso do ouro tem descrições até mesmo na Bíblia, da sua utilização no combate à ansiedade e impaciência. Na Idade Média, o ouro era usado por suas propriedades restaurativas da saúde. A alquimia, a química de medicamentos baseada na escola iatroquímica, fundada por Paracelsus, precursor da farmacologia moderna, tinha em seu bojo, desenvolvimento de medicamentos contendo elementos metálicos, incluindo o ouro, ferro, mercúrio, cobre, platina, entre outros, com curas excepcionais, segundo relatos históricos. (ROSENBERG, et al., 1969; SCHWIETERT, et al., 1999; BERALDO, 2005; MEDICI, et al., 2015).

Novos complexos de metais de transição têm sido alvo de grande interesse, pois vários deles têm apresentado significativas atividades biológicas, tais como antifúngicas, antibacteriana, antioxidante, antitumoral, antimalária, antitripanossomíase, antitoxoplasmose, antileishmaniose, entre outras (ALMEIDA, et al., 2013; FERNANDES, et al 2014; TAN, et al., 2014; FERNANDES, et al., 2015; RIBEIRO, et al., 2015; EL-WAKIEL, et al 2015).

Dentre as atividades investigadas, destacam-se as atividades antioxidante e antitumoral, visto que o estresse oxidativo está relacionado ao desenvolvimento de diversas doenças, entre elas o câncer, este é responsável por inúmeras mortes no mundo (LÜ, et al., 2010; OMS, 2015).

1.2. Estresse oxidativo

Os radicais livres são moléculas, átomos ou íons que possuem elétrons desemparelhados, sendo estes altamente reativos (LÜ, et al., 2010).

Os radicais livres foram descobertos em 1900 por Gomberg que atribuiu a decomposição do hexafeniletano a radicais trifenilmetila. Michaelis, em 1930,

investigou a atividade dos radicais livres no campo da bioquímica, entretanto estes estudos foram considerados prematuros devidos à falta de tecnologia para a detecção dos radicais. Mais tarde, em 1940, tais estudos foram impulsionados pelo desenvolvimento de um novo método para a detecção de radicais livres, a ressonância paramagnética de eletrônica (RPE) (BERGENDI, et al., 1999).

Nos sistemas biológicos, os radicais livres são frequentemente derivados de moléculas de oxigênio, nitrogênio e enxofre. Estes radicais livres são partes de grupos de moléculas chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e espécies reativas de enxofre (ERSs). EROs inclui radicais livres, como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), o radical hidroxila ($\cdot OH$), o óxido nítrico (NO), e outras espécies, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singleto (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito ($ONOO^-$). ERNs são derivados do NO, este reage com o radical superóxido para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). ERS são facilmente formados a partir da reação de tióis com EROs (Figura 1) (LÜ et al., 2010; CHE, et al., 2015).

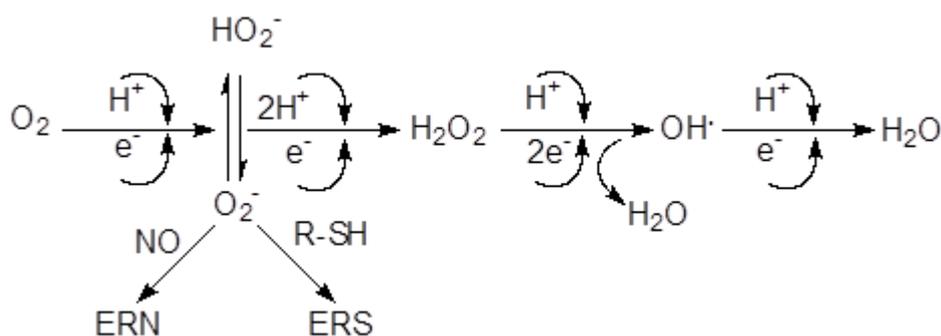


Figura 1. Redução tetravalente do oxigênio molecular até a formação de água, formação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre (Adaptado de COHEN, 1989).

Em células eucarióticas, as EROs são geradas no metabolismo celular, durante a respiração mitocondrial, ou em reações catalisadas por enzimas, tais como a NADPH oxidase, xantina oxidase e citocromo P450 (BHAT, et al., 2015).

A respiração mitocondrial é uma importante fonte das EROs, como resultado da produção de $O_2^{\cdot-}$ a partir do complexo I e III da cadeia transportadora de elétrons, que representam 1-2% do oxigênio consumido pelas células (Figura 2) (CHE, et al 2015).

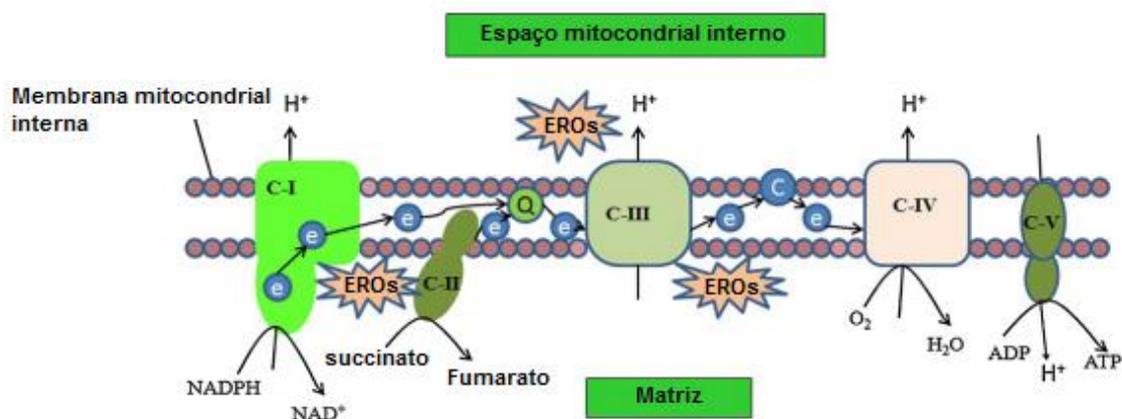


Figura 2. Cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e formação das EROs nos complexos I e III (BHAT, et al., 2015).

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é pouco estável e sofre reação de dismutação rapidamente, formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). Este radical pode reduzir o Fe(III) a Fe(II), como pode ser observado na reação a seguir (VASCONCELOS, et al., 2007; MAURYA, et al., 2016).



O peróxido de hidrogênio tem a capacidade de permear membranas e difundir-se dentro e fora da célula. É um fraco agente redutor e fraco agente oxidante, reage lentamente com proteínas do tipo heme e peroxidases dando início a reações radiculares e peroxidações lipídicas. Reage com metais como Fe(II) ou Cu(I) para formar o radical hidroxila, através da reação de Fenton (VASCONCELOS, et al., 2007; BATTIN e BRUMAGHIM, 2008; MAURYA, et al., 2016):



O radical hidroxila é o mais reativo dos radicais conhecidos, para o qual o organismo humano não dispõe de mecanismos de defesa. Ele causa danos ao DNA (modificação das bases e quebra das fitas), às proteínas, enzimas, promovendo a peroxidação lipídica. Outra forma de obter o radical hidroxila é através da reação de Haber – Weiss (KEHRER, J. P., 2000).



A produção de espécies reativas de oxigênio tem sido relacionada a diferentes fatores, tais como uma função mitocondrial (incompleta redução do oxigênio molecular - escape de elétrons da cadeia transportadora de elétrons), respostas fisiológicas (sinalização celular e mecanismo de defesa antioxidante), e

exposição ambiental (radiação UV, micro-organismos patogênicos, alergênicos, cigarros, produtos químicos, etc.) (BIANCHI e ANTUNES, 1999; SÁ, et al., 2013; DASGUPTA e KLEIN, 2014; RIBEIRO, et al., 2015). Além da mitocôndria, outras organelas têm a habilidade de produzir EROs como os peroxissomos (armazenam enzimas oxidativas, tal como a catalase), retículo endoplasmático (síntese de proteínas e lipídeos), lisossomos (armazenam enzimas que participam da degradação de organelas intracelulares mortas), autofagossomos (um lisossomo especializado em digerir partes da célula que o contém), núcleo, entre outras (HALLIWELL, 1992; HALLIWELL 2006; NAVARRO-YEPES, et al., 2014).

As funções desempenhadas pelos radicais livres nos organismos só começaram a ser relatadas nas décadas de 70 e 80, destacando assim, os pontos positivos destas espécies e não apenas seus aspectos negativos (DRÖGE, 2002). As espécies reativas de oxigênio desempenham importante papel na sinalização celular, apoptose, expressão de genes, regulação dos transportadores e canais de íons, fagocitose, regulação do crescimento celular, secreção e ação da insulina em mamíferos, entre outras funções (ALVES, et al., 2010; LÜ, et al., 2010; MACEDO-MÁRQUEZ, 2012).

A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio pode apresentar efeitos deletérios a muitas moléculas, como proteínas, lipídios, RNA, DNA, a organelas como mitocôndrias e membranas levando a alterações estruturais e perda de função, tais condições são conhecidas como estresse oxidativo (LÜ, et al., 2010; ALVES, et al., 2010; MACEDO-MÁRQUEZ, 2012; SÁ, et al., 2013; ZHAO, et al., 2014).

Esses danos são devidos a peroxidação lipídica, que podem levar a morte celular, e é descrita geralmente como um processo em que oxidantes tais como radicais livres ou espécies não radicalares, atacam lipídios que contêm ligação dupla carbono-carbono, especialmente ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, também conhecido como lipoperoxidação (LPO), que resulta em radicais peroxil lipídico e hidroperóxidos (AYALA, et al., 2014; LÜ, et al., 2010).

O processo global da peroxidação lipídica é constituído por três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na etapa de iniciação, um agente oxidante, como o radical hidroxila, retira um hidrogênio alílico, formando a radical lipídico (L·).

Na fase de propagação, o radical lipídico ($L\cdot$) reage rapidamente com o oxigênio para formar um radical peroxila ($LOO\cdot$), que sequestra um hidrogênio a partir de uma outra molécula de lipídio gerando outro radical lipídico ($L\cdot$) (que continua a reação em cadeia) e hidroperóxido lipídico ($LOOH$) (Figura 3) (AYALA, et al., 2014).

Nos sistemas biológicos, a LPO pode ocorrer principalmente por duas vias, uma enzimática (envolve as ciclo-oxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos ácidos graxos poli-insaturados) e outra não enzimática (envolve a participação das EROs, ERNs, metais de transição e outros radicais livres (AYALA, et al., 2014).

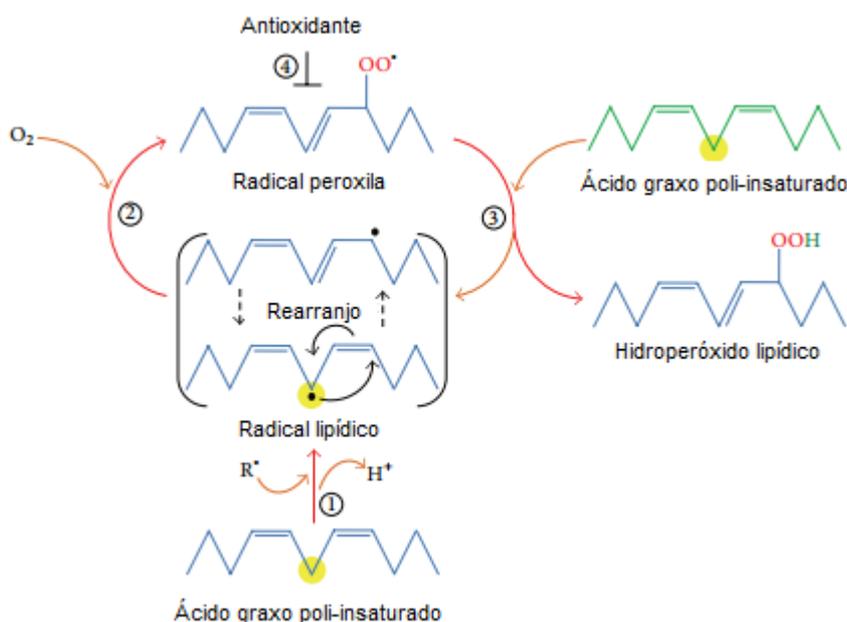


Figura 3. Principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica (Adaptado de AYALA, et al., 2014).

1.2.1. Mecanismos de defesa antioxidante

As células eucarióticas, em geral possuem mecanismos antioxidantes de controle dos níveis das EROs. Estes são definidos como qualquer substância que retarde, previna ou remova o dano oxidativo a uma molécula alvo (MEDINA-NAVARRO, et al., 2010). A Figura 4 apresenta a distribuição de antioxidantes em uma célula eucariótica.

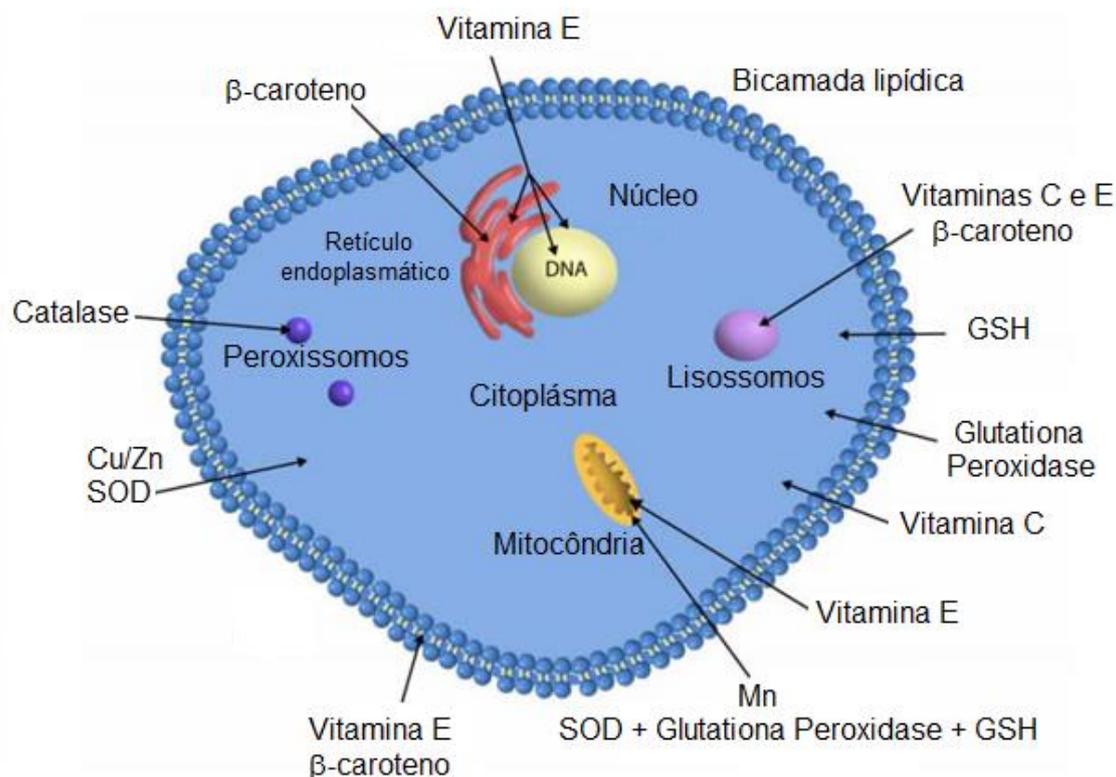


Figura 4. Antioxidantes presentes em células eucarióticas e sua distribuição na célula (MANDAL, 2015)

Os mecanismos de defesa antioxidante podem ser enzimáticos e/ou não enzimático (SÁ, et al., 2013). Na Tabela 1 são apresentados os principais agentes de defesa antioxidante.

Tabela 1. Principais moléculas encarregadas pela defesa antioxidante (DASGUPTA e KLEIN, 2014).

Não enzimático	Enzimático
α-tocoferol (vitamina E)	Superóxido dismutase (Sod)
β-caroteno	Catalase (CAT)
Ácido ascórbico (vitamina C)	NADPH – quinona oxidoreductase
Ácido úrico	Glutaciona peroxidase
Albumina	
Bilirrubina	Coenzima q10 (ubiquinona)
Flavonóides	
Glutaciona	

Os mecanismos antioxidantes não são igualmente eficazes na eliminação dos radicais. A Figura 5 apresenta a ordem de eficácia de alguns agentes

antioxidantes, sugerindo que os mecanismos enzimáticos são mais eficientes que os não-enzimáticos. (DASGUPTA e KLEIN, 2014).

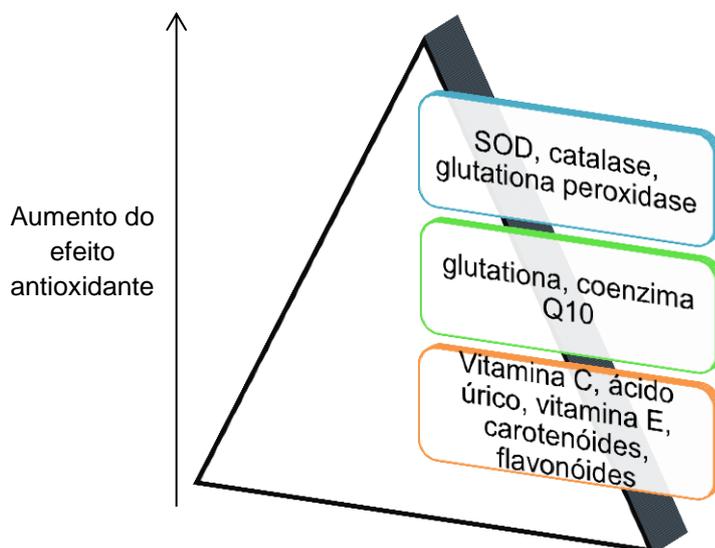


Figura 5. Eficácia de alguns antioxidantes no corpo humano. (Adaptado de DASGUPTA e KLEIN, 2014).

Dentre os mecanismos de defesa, destacam-se as metaloenzimas superóxido dismutase (Sod - contendo $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ ou Mn^{3+}) a catalase (CAT - Fe) (DASGUPTA e KLEIN, 2014).

O radical superóxido é a espécie reativa de oxigênio mais frequentemente gerada na célula. A enzima superóxido desmutase (Sod) representa a primeira linha de defesa contra o radical superóxido. Nas células não parênquimatosas e em hepatócitos a $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -Sod (Sod1) é encontrada no núcleo e no citoplasma e a Mn^{3+} -Sod (Sod2) está presente na mitocôndria (JAESCHKE, 2010). A Figura 6 apresenta a estrutura da Sod com o centro metálico de manganês.

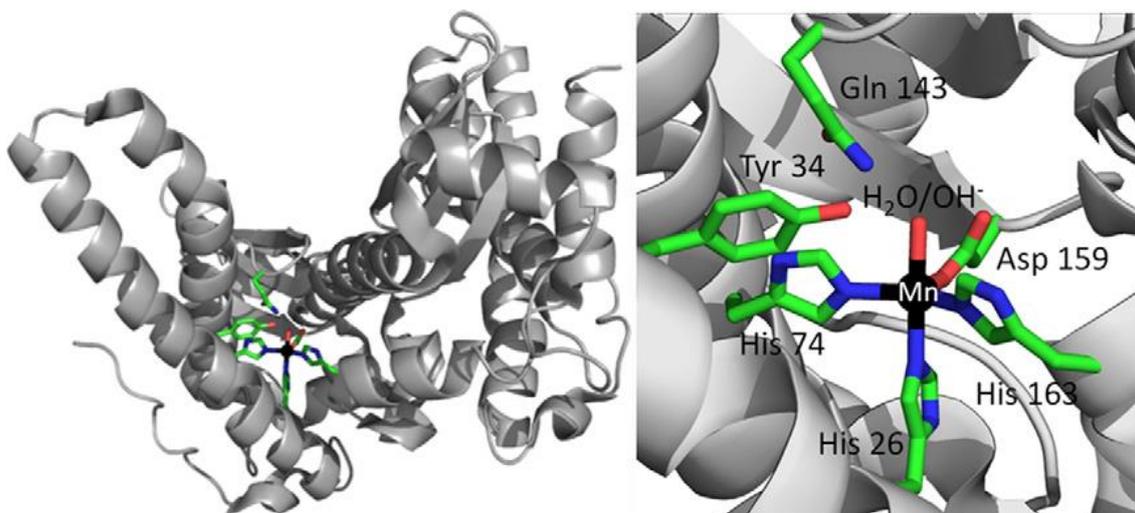


Figura 6. Mn-Sod mitocondrial humano (esquerda). À direita sítio ativo da Mn-Sod (IRANZO, 2011).

A Sod extracelular (Sod3 ECSod) encontra-se ancorada à superfície das células através de um domínio de ligação à heparina, esta possui centro de $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ assim como a Sod1 (NAVARRO-YEPES, et al., 2014).

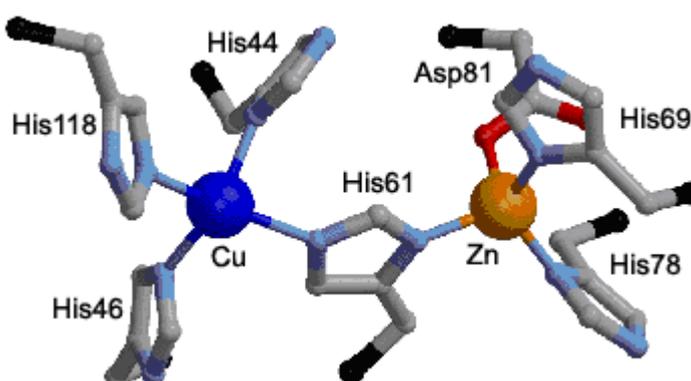


Figura 7. Sítio ativo da Sod1 ($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$) (HUSTON-LUDLAM, 2003).

O metal redox-ativo (Cu^{2+} ou Mn^{3+}) em cada enzima é reduzido pela primeira molécula de radical superóxido formando oxigênio molecular. Uma segunda molécula de radical superóxido é reduzida a peróxido de hidrogênio pelo íon metálico (JAESCHKE, 2010; AYALA, et al., 2014). A Figura 8 apresenta as reações de Fenton e Haber-Weiss.

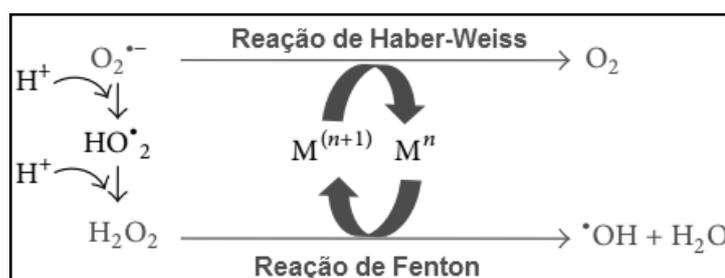


Figura 8. Reações de Haber-Weiss e Fenton (Adaptado de AYALA, et al., 2014).

A catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase são metaloenzimas que decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. A CAT possui ferro ou manganês em seu sítio ativo e algumas glutacionas peroxidase possuem selênio. A CAT contendo ferro em seu sítio ativo, possui este ligado a um grupo porfirínico (Figura 9). A Figura 10 apresenta o sítio ativo da catalase de manganês. (MCGILL E LAESCHKE, 2013; NAVARRO-YEPES, et al., 2014; DASGUPTA E KLEIN, 2014).

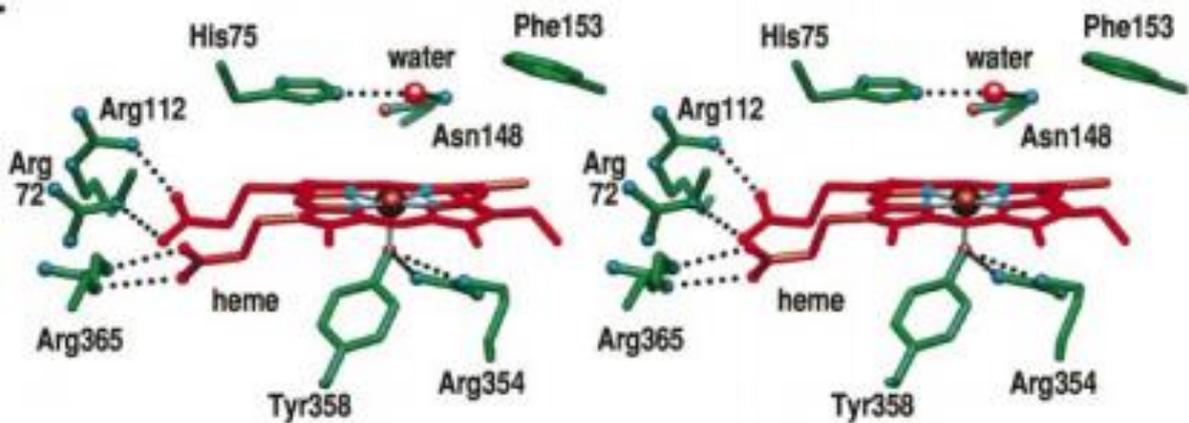


Figura 9. Sítio ativo da catalase de ferro (PUTNAM, et al., 2000).

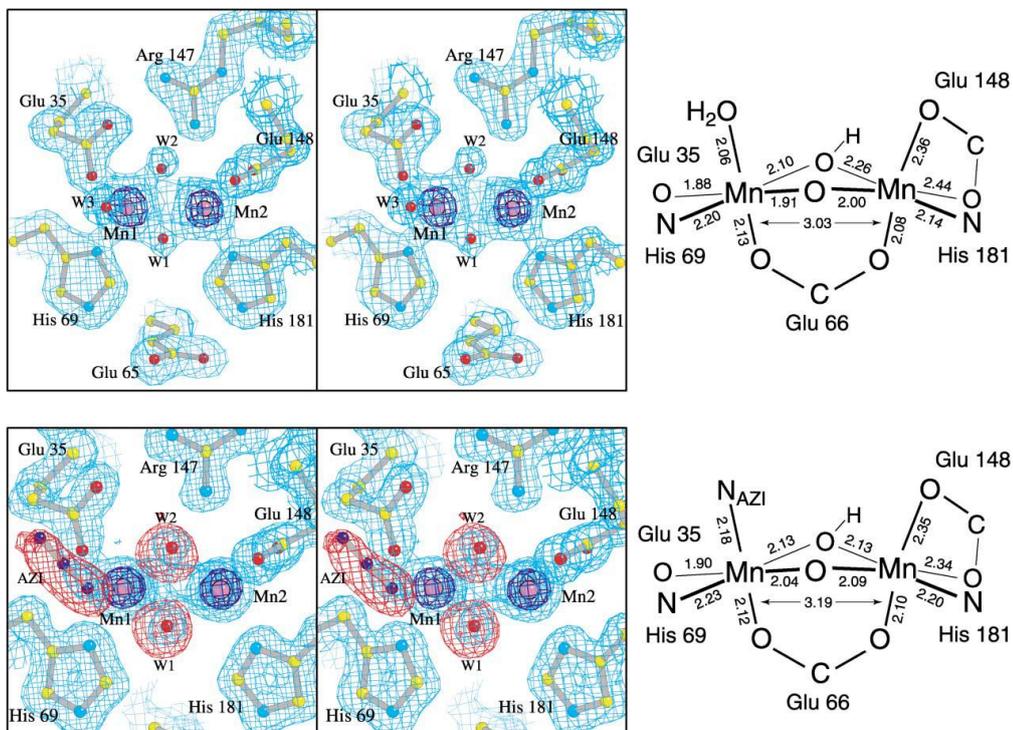


Figura 10. Mapas de densidade eletrônica, mostrando o sítio ativo da catalase de manganês *Lactobacillus plantarum* (BARYNIN, et al., 2001).

O peróxido de hidrogênio se liga ao átomo de ferro do grupo heme presente na FeCAT e em seguida a ligação O-O do peróxido de hidrogênio é clivada, uma molécula de água é formada e um átomo de oxigênio continua ligado ao átomo de ferro, formando assim um radical $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$. Esta espécie reage então com uma segunda molécula de peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio molecular e o centro metálico de ferro é reduzido, retornando ao seu estado inicial, como descrito a seguir (JAESCHKE, 2010).

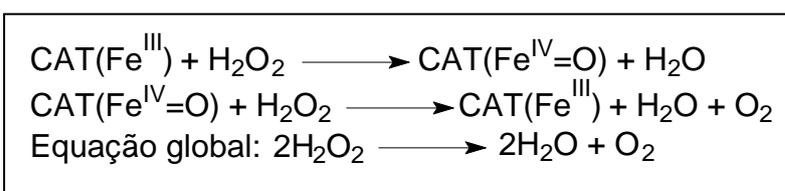


Figura 11. Etapas das reações de desproporcionamento do peróxido de hidrogênio (Adaptado de JAESCHKE, 2010).

O peróxido de hidrogênio produzido na mitocôndria ou no citoplasma é decomposto pela glutathiona peroxidase (NAVARRO-YEPES, et al., 2014).

A glutathiona peroxidase (GPx) (Figura 12) pertence a uma família de enzimas que compreende oito glutathionas peroxidases (GPx1 - GPx8). Algumas GPx contêm selênio (GPx1 - 4 e 6), e outra não (GPx5, 7 e 8). Nos seres humanos as isoformas da GPx 1 - 4 e 6 contêm selenocisteína (um aminoácido semelhante a cisteína, com um átomo de selênio), resíduos que são importantes para as suas atividades catalíticas. Todos os membros deste grupo utilizam glutathiona reduzida para catalisar a redução de peróxido de hidrogênio em água. GPx1 foi a primeira selenoproteína (proteínas que contêm selenocisteína) identificada. É um homotetrâmero (quatro unidades de proteína) e uma das mais abundantes que desempenham um papel importante na recuperação global de células após estresse oxidativo.

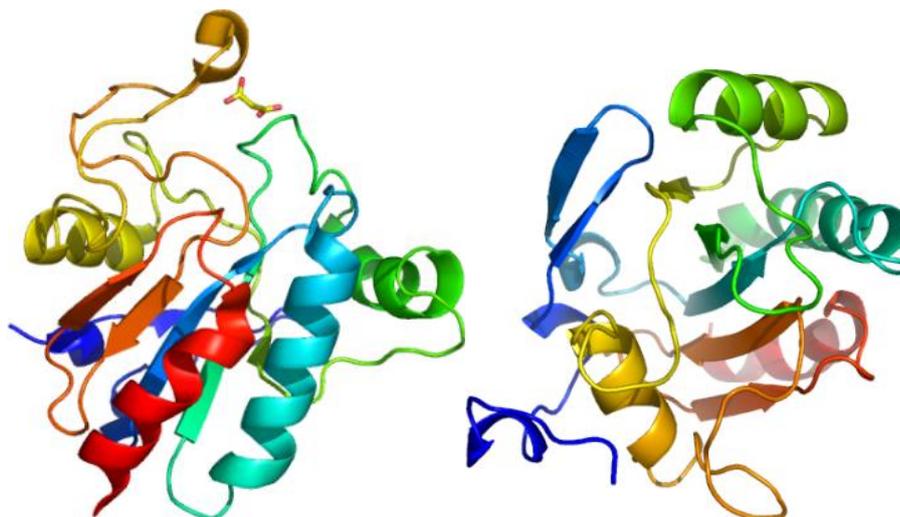


Figura 12. (a) Glutathione peroxidase 1 e (b) Glutathione peroxidase 4 (THESGC, 2015).

Sob condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre as atividades de defesa antioxidante enzimático e os níveis intracelulares de antioxidantes não enzimáticos, e a produção das EROS/ERNS como moléculas de sinalização essenciais para o funcionamento celular adequado (NAVARRO-YEPES, et al., 2014). O estresse oxidativo é caracterizado pela quebra da homeostase redox celular, quando o sistema de defesa antioxidante se torna incapaz de eliminar o excesso das EROs produzidas (MORANO, et al., 2012).

O estresse oxidativo, gerado pela superprodução das EROs e os danos que este acúmulo de espécies oxidantes causam nas células, estão associados ao desenvolvimento de diversas doenças como o câncer, Alzheimer, inflamação crônica, doenças cardiovasculares, diabetes, catarata, autismo, envelhecimento precoce, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, isquemia cerebral, obesidade, aterosclerose, artrite reumatoide, doença de Wilson, entre outras (VASCONCELOS, et al., 2007; LÜ, et al., 2010; MACEDO-MÁRQUEZ, 2012; SÁ, et al., 2013; BAL-DEMIRCI, et al., 2014; NAVARRO-YEPES et al., 2014).

1.2.2. Antioxidantes sintéticos – compostos de coordenação

1.2.2.1. Estudos *in vitro*

Compostos de coordenação têm sido amplamente estudados quanto a atividade antioxidante, a fim de mimetizar as metaloenzimas Sod e CAT. Isto se

deve ao fato da grande versatilidade dos ligantes e da possibilidade de obter alguns compostos com estruturas muito similares às exibidas pelas referidas metaloenzimas. Muitos trabalhos têm sido publicados, relatando a atividade antioxidante de compostos de coordenação de cobre, ferro, cádmio, cobalto, zinco, níquel, manganês, rutênio entre outros. Além da variedade de metais, muitos compostos incluem como ligantes porfirinas, Salen, compostos cíclicos não aromáticos (BUKHARI, et al., 2008; LESSA, et al., 2009; ŠTARHA, et al., 2009; ANITHA, et al., 2013; WEITNER, et al., 2013; RAVICHANDRAN, et al., 2014a; RAVICHANDRAN, et al., 2014b; SELVAGANAPATHY, et al., 2014; VIVEKANAND, et al., 2015; RIBEIRO, et al., 2015).

Manikandan e colaboradores relataram recentemente a atividade antioxidante *in vitro* de dois compostos de cobalto(III), a estrutura dos mesmos é apresentada na Figura 13. Os ligantes e os compostos de coordenação foram estudados quanto a capacidade de eliminação dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), radical hidroxila (método de Nash (NASH, 1953)) e o óxido nítrico (Reagente de Greiss). A vitamina C e o hidroxitolueno butilado (BHT) foram usados como controles positivos. (MANIKANDAN, et al., 2014). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

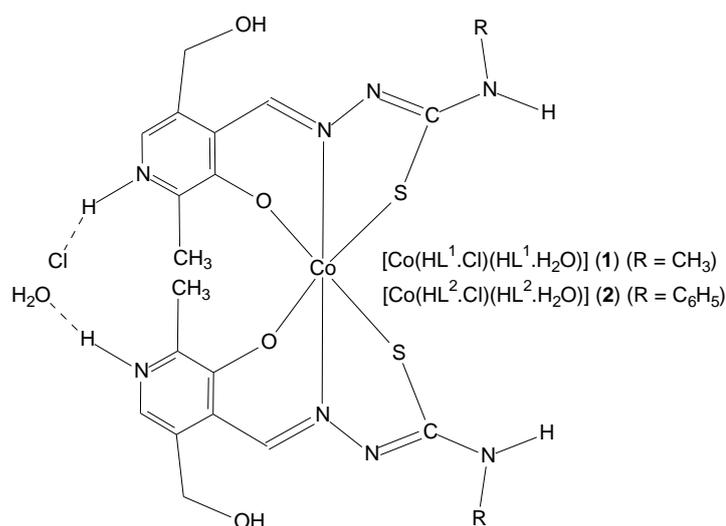


Figura 13. Estrutura dos compostos de coordenação de cobalto (1) e (2) descritos por Manikandan e colaboradores (MANIKANDAN, et al., 2014).

Tabela 2. Valores de IC₅₀ obtidos para os ligantes, compostos de cobalto, BHT e vitamina C contra a vários radicais (MANIKANDAN, et al., 2014).

Compostos	IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)		
	DPPH	OH [·]	NO
H ₃ L ¹ .Cl	65,32±0,5	47,45±0,3	33,92±0,2
H ₃ L ¹ .Cl	61,21±0,2	43,74±0,4	32,29±0,4
(1)	48,73±0,3	39,83±0,1	27,39±0,2
(2)	45,27±0,4	33,68±0,6	26,53±0,3
BHT	86,53±0,6	163,80±0,5	154,30±0,8
Vitamina C	147,20±0,8	232,20±0,7	215,72±0,9

Os compostos de coordenação de cobalto apresentaram menor IC₅₀ quando comparados aos ligantes. Tanto os compostos quanto os ligantes foram mais eficazes na eliminação do óxido nítrico quando comparado ao radical DPPH e ao radical hidroxila (MANIKANDAN, et al., 2014).

Os resultados obtidos indicam que os ligantes e complexos apresentam maior capacidade de eliminação de radicais do que os antioxidantes convencionais (BHT e vitamina C).

A atividade antioxidante de compostos de níquel(II), ferro(III) e vanádio(IV) (Figura 14) foi descrita por Bal-Demirci e colaboradores. Foram investigadas a capacidade antioxidante total e a eficiência na eliminação de peróxido de hidrogênio (método CUPRAC), do radical hidroxila (método CUPRAC) e do radical superóxido (redução do NBT (YU, et al., 2005)) (BAL-DEMIRCI, et al., 2014).

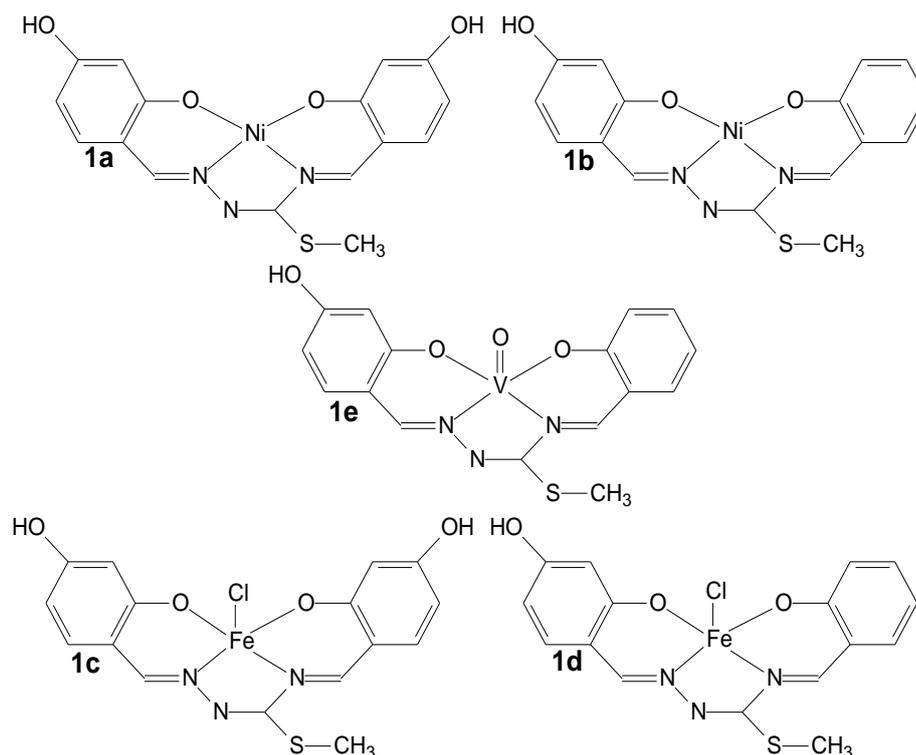


Figura 14. Estrutura dos compostos de níquel, ferro e vanádio (BAL-DEMIRCI, et al., 2014).

A atividade antioxidante, foi determinada ainda, pelo método TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (análogo da vitamina E)), através da razão do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) dos compostos e coeficiente de absorvidade molar do trolox sob as mesmas condições, obtendo assim o coeficiente da TEAC (BAL-DEMIRCI, et al., 2014).

Os resultados da atividade de eliminação do radical hidroxila, do peróxido de hidrogênio e do radical superóxido foram expressos em percentagem da taxa de inibição. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Coeficiente TEAC e percentagem da taxa de inibição para os compostos 1a, 1b, 1c, 1d 1e (BAL-DEMIRCI, et al., 2014).

Compostos ($5 \cdot 10^{-4}$ mol.L ⁻¹)	Coeficiente TEAC	% Taxa de inibição		
		H ₂ O ₂	O ₂ ^{•-}	•OH
1a	1,22	16,37±0,74	18,23±0,50	83,48±0,20
1b	0,49	18,07±0,68	2,74±0,07	81,84±1,15
1c	2,05	48,18±2,72	74,40±1,07	74,02±1,42
1d	0,74	28,72±1,24	81,90±0,60	75,17±1,47
1e	1,71	67,98±1,18	90,09±0,89	79,11±0,89
Trolox	1,00	17,00	36,30	81,90

Para os compostos de Fe(III) e Ni(II), aqueles com mais grupos OH em sua estrutura apresentaram maior coeficiente TEAC. A atividade antioxidante varia geralmente com aumento do número de grupos OH na estrutura do composto. O composto de vanádio apresentou elevada atividade antioxidante. Entre os compostos estudados, 1a, 1c e 1e mostraram-se mais eficazes, apresentando boa capacidade antioxidante quando comparado ao trolox. Estes apresentaram TEAC superiores a do trolox ($TEAC_{trolox} = 1,0$) (BAL-DEMIRCI, et al., 2014).

A capacidade de eliminação do radical hidroxila, pelos compostos estudados foi similar à atividade do trolox. Já para a eliminação do peróxido de hidrogênio, apenas o composto 1a teve atividade inferior ao trolox. Os compostos 1c, 1d e 1e apresentaram alta atividade na eliminação do radical superóxido quando comparados ao trolox (BAL-DEMIRCI, et al., 2014). Entretanto os autores não sugerem um mecanismo de ação para tais atividades.

Raman e Pravin relataram recentemente a atividade antioxidante de oito compostos de cobre e zinco (Figura 15). A mesma foi investigada através do método de sequestro do DPPH, eliminação do peróxido de hidrogênio e do radical superóxido (RAMAN E PRAVIN, 2014). A vitamina C e o BHT foram usados como controle positivo. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

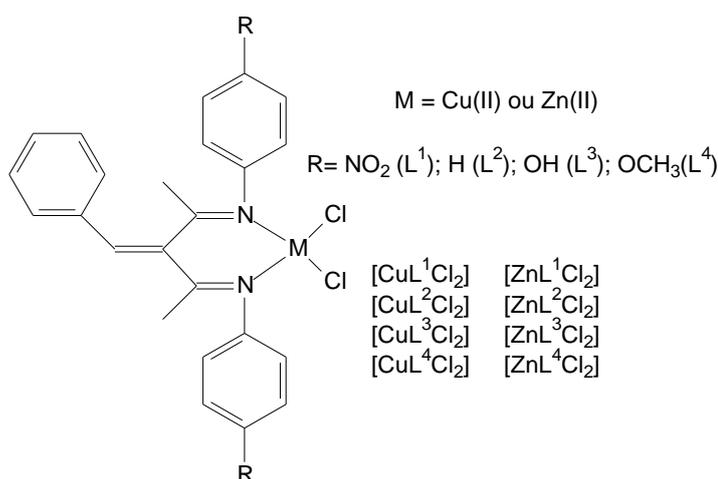


Figura 15. Estrutura geral para os compostos de cobre e zinco (RAMAN E PRAVIN, 2014).

Tabela 4. Atividade antioxidante obtida para os ligantes, complexos de cobre e zinco, vitamina C e BHT contra DPPH e peróxido de hidrogênio (RAMAN E PRAVIN, 2014).

Compostos	IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)	
	DPPH	H ₂ O ₂
[L ¹]	99,6±1,2	102,3±1,5
[L ²]	102,7±1,6	104,2±0,9
[L ³]	104,3±1,9	109,8±1,2
[L ⁴]	107,4±0,8	111,5±1,5
[CuL ¹ Cl ₂]	69,6±0,2	65,5±2,9
[CuL ² Cl ₂]	71,4±0,5	68,4±1,6
[CuL ³ Cl ₂]	74,4±1,3	70,9±0,4
[CuL ⁴ Cl ₂]	77,5±1,1	76,7±1,6
[ZnL ¹ Cl ₂]	72,3±1,4	67,2±0,7
[ZnL ² Cl ₂]	75,6±0,7	73,4±1,3
[ZnL ³ Cl ₂]	81,2±1,7	76,8±0,4
[ZnL ⁴ Cl ₂]	81,3±1,4	83,5±0,5
Vitamina C	146,8±3,6	215,3±2,4
BHT	87,4±2,2	143,6±3,8

Os ligantes apresentaram maior atividade que a vitamina C na eliminação do DPPH e do peróxido de hidrogênio. Quando comparados ao BHT, os ligantes apresentaram menor atividade na eliminação do DPPH e maior atividade na eliminação do peróxido de hidrogênio. Os compostos de coordenação de cobre e zinco mostraram-se mais ativos que seus respectivos ligantes, que a vitamina C e o composto BHT. O composto [CuL¹Cl₂] apresentou maior atividade dentre todos os compostos investigados (RAMAN E PRAVIN, 2014).

A atividade Sod mimética *in vitro* foi investigada através da redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) e os resultados são apresentados na Tabela 5 (RAMAN E PRAVIN, 2014).

Todos os compostos estudados apresentaram atividade superior à atividade da enzima superóxido dismutase. O composto de cobre com o ligante L¹ apresentou maior atividade *in vitro*, ou seja, na concentração 2,96 μmol dm⁻³ o composto apresenta a mesma atividade que a Sod na concentração de 40 μmol.L⁻¹. Os compostos estudados são candidatos a Sod miméticos (RAMAN E PRAVIN, 2014).

Tabela 5. Atividade Sod mimética dos compostos de Cu e Zn (RAMAN E PRAVIN, 2014).

Compostos	Concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) ^a
[CuL ¹ Cl ₂]	2,96±0,04
[CuL ² Cl ₂]	4,34±0,06
[CuL ³ Cl ₂]	5,68±0,04
[CuL ⁴ Cl ₂]	7,03±0,03
[ZnL ¹ Cl ₂]	3,26±0,04
[ZnL ² Cl ₂]	4,53±0,06
[ZnL ³ Cl ₂]	6,74±0,04
[ZnL ⁴ Cl ₂]	7,83±0,03

^a atividade equivalente a 1U de Sod (40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)

1.2.2.2. Estudos com levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são comumente usadas para realizar estudos de atividade antioxidante. Estas células são eucarióticas e possuem várias características similares às células humanas, tais como, a composição da membrana lipídica, propriedades e funcionamento das mitocôndrias, controle do ciclo celular, mecanismos de enovelamento proteico, mecanismos de morte celular regulada e propriedades do transporte vesicular (Figura 16). Assim, o estudo empregando-se esta levedura possibilita a realização de testes de atividade antioxidante de maneira reprodutível, rápida, econômica e permite a extrapolação dos resultados para o ser humano, sendo considerados estudos *in vivo* (SOARES et al., 2005; KHURANA e LINDQUIST, 2010; SÁ et al., 2013).

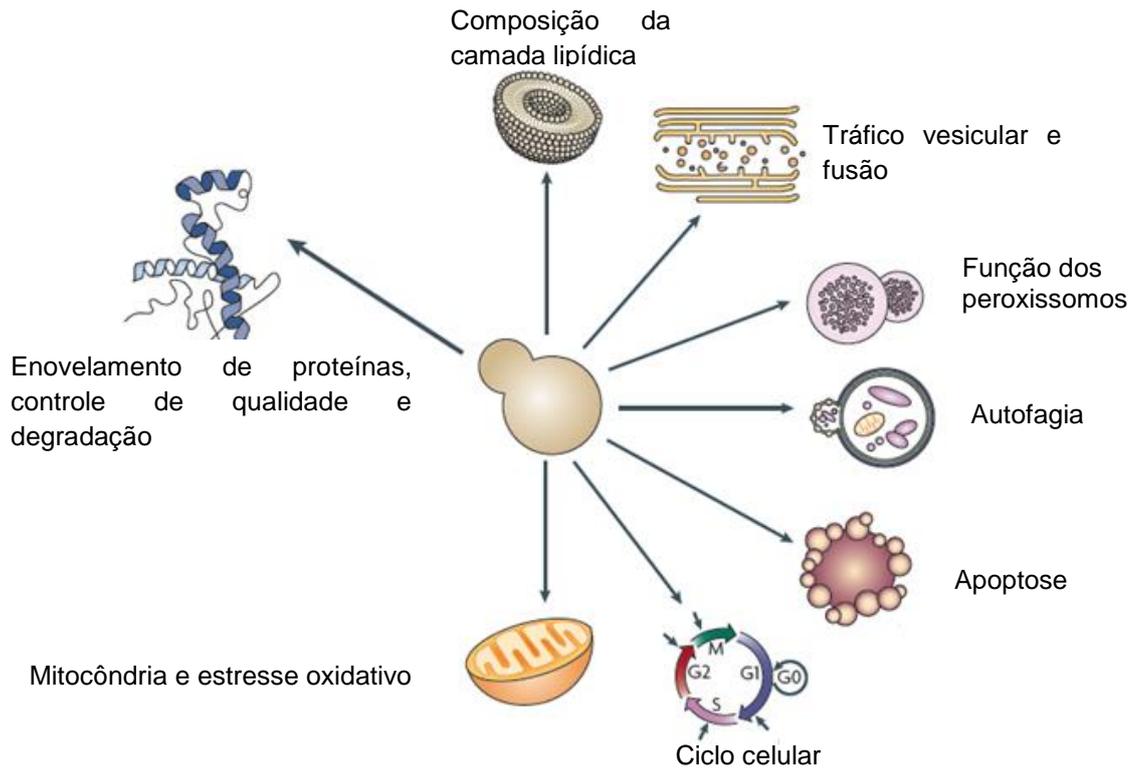


Figura 16. Características das células de *S.cerevisiae* que se assemelham às células humanas (KHURANA e LINDQUIST, 2010).

Almeida e colaboradores investigaram a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de um composto de cobre apresentado na Figura 17 (ALMEIDA, et al., 2013).

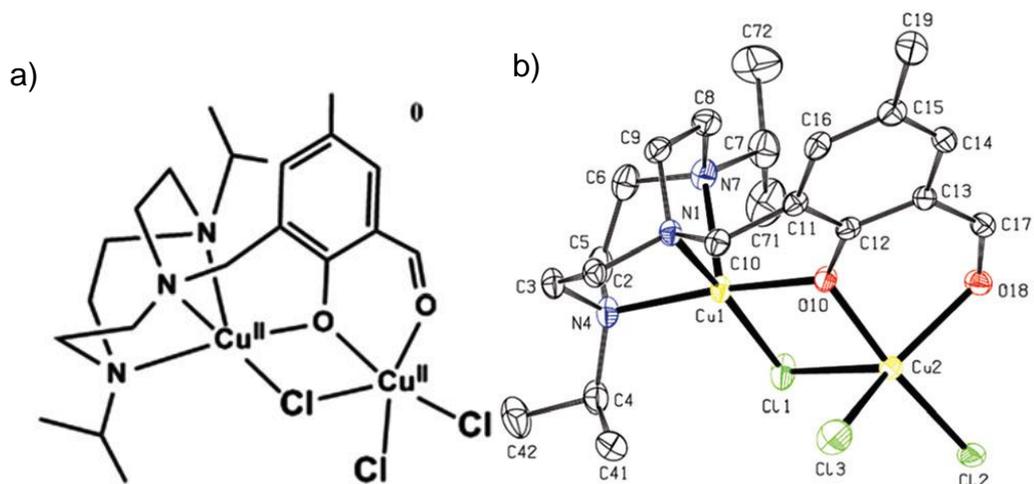


Figura 17. a) Estrutura do composto de cobre; b) estrutura de difração de raios-X (ALMEIDA, et al., 2013).

A determinação da atividade *in vitro* foi realizada através do método de redução do NBT. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 18.

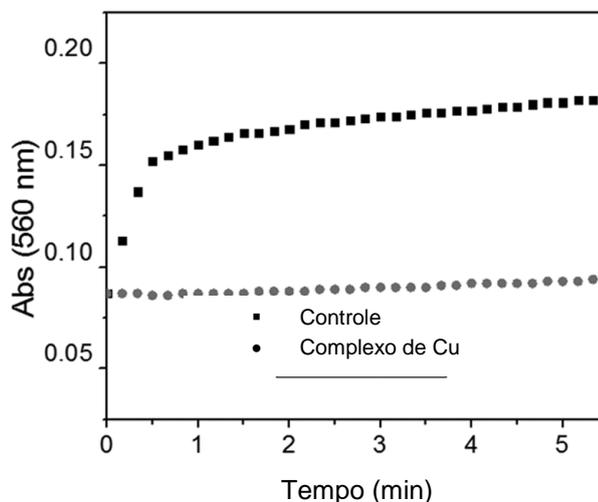


Figura 18. Inibição da redução do NBT pelo composto de cobre ($1,3 \text{ mmol.dm}^{-3}$) (ALMEIDA, et al., 2013).

O composto de cobre apresentou elevada atividade de inibição da redução do NBT devido à eliminação do radical superóxido. Este resultado indica que o composto catalisa a dismutação do radical superóxido, atuando como Sod mimético (ALMEIDA, et al., 2013).

A atividade *in vivo* do composto foi investigada usando cepas selvagem (BY4741) e mutantes (*sod1Δ* e *ctt1Δ*) de *S. cerevisiae* que foram expostas ao estresse oxidativo gerado, pela adição direta a cultura, de peróxido de hidrogênio e menadiona (fonte de radical superóxido) (Figura 19) (ALMEIDA, et al., 2013).

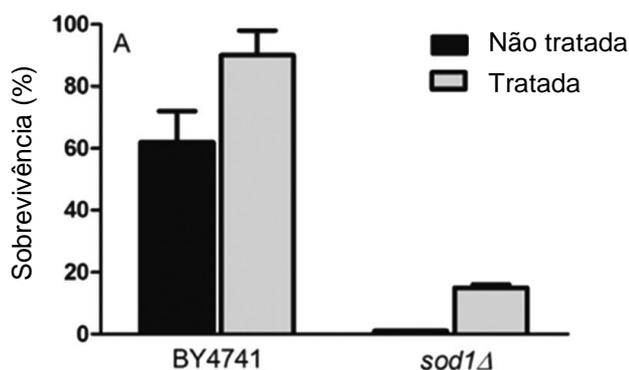


Figura 19. Porcentagem de sobrevivência das cepas selvagem e mutante antes e depois do tratamento com composto de cobre e estresse com menadiona. Células em metabolismo fermentativo (ALMEIDA, et al., 2013).

O tratamento com o composto aumentou a sobrevivência da cepa selvagem em aproximadamente 30 % e a cepa mutante, que não sobreviveu ao estresse, após o tratamento teve sobrevivência de 15%, confirmando assim que o composto de

cobre pode atuar como mimético a Sod, eliminando o radical superóxido do meio intracelular (ALMEIDA, et al., 2013).

Os resultados obtidos após o tratamento com composto de cobre e estresse com peróxido de hidrogênio são apresentados na Figura 20.

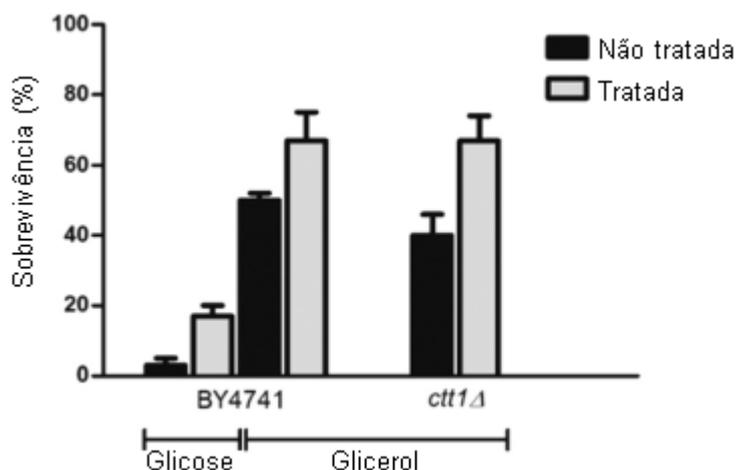


Figura 20. Efeito do tratamento com composto de cobre na sobrevivência das células durante o estresse com H_2O_2 . Células em metabolismo fermentativo (BY4741 – Glicose) e células em metabolismo respiratório (*ctt1Δ*-glicerol) (ALMEIDA, et al., 2013).

O composto de cobre protegeu a célula contra o estresse com H_2O_2 . Tanto a cepa selvagem quanto a mutante em CAT tiveram a sobrevivência aumentada em comparação com o controle (célula não tratada). Para a cepa BY4741, em metabolismo fermentativo, a sobrevivência aumentou em 15% e em metabolismo respiratório, a sobrevivência aumentou cerca de 20%. A cepa *ctt1Δ* teve um aumento na sobrevivência de aproximadamente 30%. Sendo assim, o composto de cobre apresentou atividade Sod e CAT mimética (ALMEIDA, et al., 2013).

Ribeiro e colaboradores demonstraram a atividade antioxidante *in vivo* de compostos de cobre, ferro e manganês (Figura 21) usando como modelo de estudo cepas de *S. cerevisiae*. Neste estudo foram utilizadas cepas selvagens (BY4741 e EG103) e mutantes em Sod1 e CAT (*sod1Δ* e *ctt1Δ*) (RIBEIRO, et al., 2015).

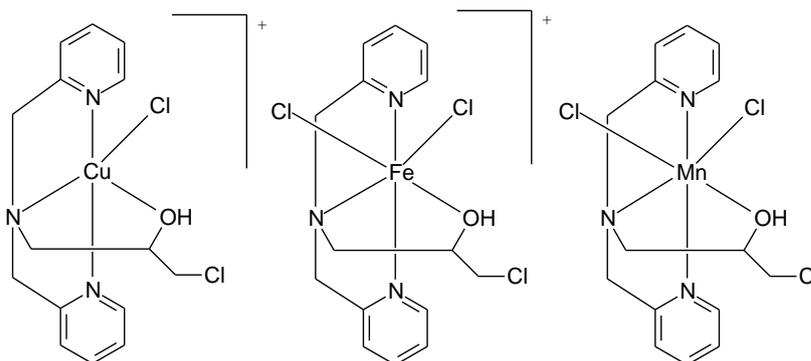


Figura 21. Estrutura dos compostos de Cu, Fe e Mn (RIBEIRO, et al., 2015).

Os compostos foram incubados com as células de *S. cerevisiae*, nas concentrações de 25 – 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, afim de determinar a citotoxicidade dos mesmos. E em seguida a atividade de proteção foi investigada usando a concentração de 25 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. As células foram incubadas por uma hora com os compostos e em seguida foram lavadas e estressadas com peróxido de hidrogênio ou menadiona. Os resultados são apresentados na Figura 22 (RIBEIRO, et al., 2015).

As células não tratadas e estressadas com menadiona ou H_2O_2 tiveram sobrevivência menor que 20%, enquanto as células tratadas tiveram sua sobrevivência aumentada. A cepa BY4741, em metabolismo fermentativo, exposta ao estresse com menadiona e tratada com o composto de Fe(III), teve aumento de 70% em sua sobrevivência. Para as células tratadas com os compostos de Cu e Mn o aumento da sobrevivência foi de 61% e 47%, respectivamente. Os sais metálicos foram testados, mas estes não apresentaram atividade, confirmando assim que o efeito de proteção é devido a presença do ligante e diretamente dependente do composto de coordenação (RIBEIRO, et al., 2015).

A sobrevivência das células não tratadas da cepa BY4741 é devido a presença da Sod1 (Cu/Zn-SOD). A remoção da enzima Sod1 acarreta o aumento da sensibilidade ao estresse com o radical superóxido. Na Figura 22, é possível observar que a cepa mutante *sod1* Δ , sem tratamento não sobrevive ao estresse com menadiona, já as células tratadas com os compostos de Cu(II), Fe(III) e Mn(II) apresentam sobrevivência de aproximadamente 50, 60 e 40%, respectivamente (RIBEIRO, et al., 2015).

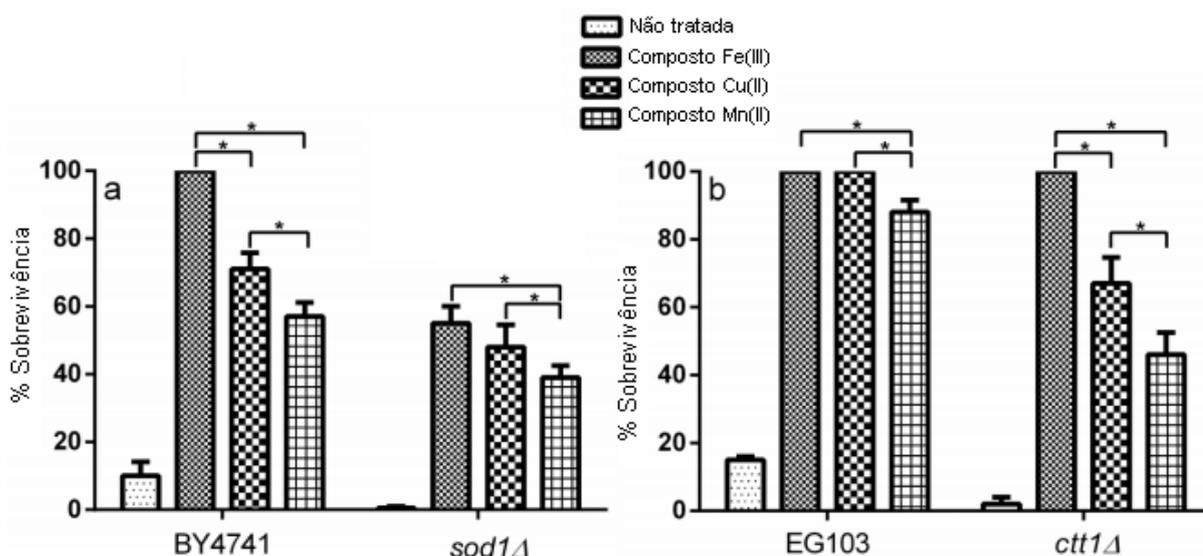


Figura 22. Efeitos dos compostos de Cu, Fe e Mn na sobrevivência das células de *S. cerevisiae* selvagens (BY4741 e EG103) e mutantes (*sod1Δ* e *ctt1Δ*) expostas ao estresse oxidativo com menadiona (a) e H_2O_2 (b) (RIBEIRO, et al., 2015).

Os experimentos foram realizados ainda em condições aeróbicas usando as cepas EG103 (selvagem) e *ctt1Δ* (mutante – deficiente em catalase) e subsequente estresse com peróxido de hidrogênio. As células tratadas com os compostos de Cu(II) e Fe(III) apresentaram 100% de sobrevivência e para as células tratadas com o composto de Mn(II) a sobrevivência foi de 85%. As células mutantes tratadas com os compostos de Cu(II), Fe(III) e Mn(II) tiveram sobrevivência de aproximadamente 75, 100 e 50%, respectivamente (RIBEIRO, et al., 2015).

Durante as condições de estresse, tais como o estresse oxidativo, o controle da homeostase redox celular é fortemente dependente da ativação de fatores de transcrição, tais como Yap1, Hsf1 (fatores de transcrição em resposta ao choque térmico), Msn2 e Msn4 (supressor multicópias da SNF1). Todos estes fatores estão envolvidos na regulação e na expressão de genes de proteção celular, sendo que mais de 500 genes são regulados em resposta ao tratamento com H_2O_2 (RIBEIRO, et al., 2015).

A fim de verificar se a atividade antioxidante dos compostos em estudo envolve a indução da transcrição de genes de proteção, foram avaliadas as respostas de cepas selvagem (BY4741) e mutante deficiente em Yap1 (*yap1Δ*) tratadas e estressadas com H_2O_2 . As células deficientes em Yap1 não tratadas tiveram sobrevivência menor que 3%, já para as células tratadas a sobrevivência foi

aumentada em aproximadamente 11, 7 e 8 vezes para os compostos de Fe(III), Cu(II) e Mn(II), respectivamente (RIBEIRO, et al., 2015).

A cepa deficiente em Yap1 teve sua sobrevivência aumentada, o que indica que os compostos não induzem a transcrição de genes de proteção. Para confirmar este resultado, foi avaliada a resposta ao choque térmico (51 °C/8min) das células selvagens (EG103). Após tratamento com os compostos, os resultados mostram que estes não aumentaram a sobrevivência, confirmando assim que os compostos não induzem a ativação de fatores de transcrição (RIBEIRO, et al., 2015).

Foram realizados estudos com inibidor de síntese de proteína para garantir que o efeito protetor dos compostos não está relacionado a síntese de outras proteínas de proteção celular. Os resultados indicam que este não é o mecanismo de ação dos compostos, uma vez que mesmo na presença do inibidor, a sobrevivência foi aumentada (RIBEIRO, et al., 2015).

Para verificar o efeito de proteção dos compostos contra o dano à membrana, foram realizados experimentos de peroxidação lipídica. Foram verificadas as concentrações de MDA após o tratamento e estresse com H₂O₂ ou menadiona (RIBEIRO, et al., 2015). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 23.

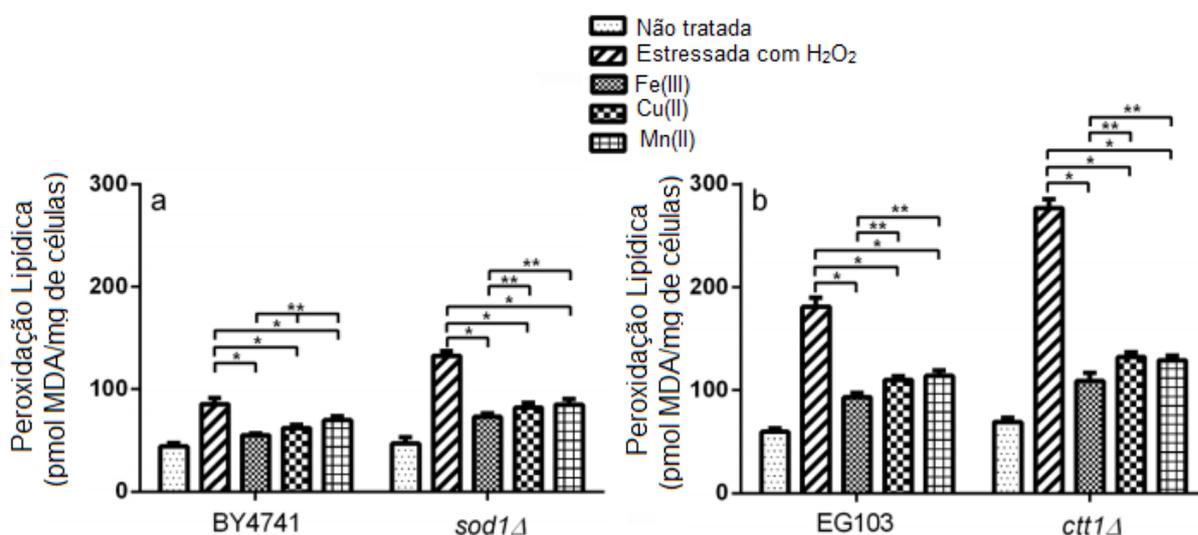


Figura 23. Níveis de peroxidação lipídica da células de *S. cerevisiae* após o tratamento e exposição ao estresse com menadiona (a) e H₂O₂ (b) (RIBEIRO, et al., 2015).

Todos os compostos reduziram a peroxidação lipídica, as células tratadas e estressadas com menadiona apresentaram níveis de MDA semelhantes ao da célula não estressada. As células tratadas e estressadas com peróxido de hidrogênio

também apresentaram níveis reduzidos de MDA. Para as células tratadas com os compostos, os níveis de MDA foram reduzidos em 50% quando comparada às células não tratadas e estressadas. O composto de Fe(III) mostrou-se mais eficaz na proteção das membranas em ambos os casos. Com base neste amplo estudo os autores acreditam que estes compostos atuam como miméticos a Sod e CAT, removendo o excesso de $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 devido a suas intrínsecas atividades miméticas (RIBEIRO, et al., 2015).

Os antioxidantes naturais (β -caroteno, vitamina E, vitamina C, selênio, retinol, zinco, riboflavina, molibdênio entre outros) não têm apresentado resultados satisfatórios *in vivo*. Estudos clínicos realizados com 7000 pessoas não produziram evidências convincentes para justificar o uso de vitaminas ou minerais tradicionais relacionados com antioxidantes na prevenção do câncer (GOODMAN, et al., 2011).

O desenvolvimento de novas moléculas complexas que possam proteger eficazmente os organismos dos agentes que provocam o estresse oxidativo, podem contribuir para o desenvolvimento de novas drogas que apresentem efeitos colaterais menos severos no tratamento de doenças oriundas dos danos causados pelo estresse oxidativo, tais como doenças neurodegenerativas e câncer (ALMEIDA, et al., 2013).

Durante as últimas décadas, muitas pesquisas têm sido realizadas em torno de antioxidantes e seus efeitos sobre a saúde. Os resultados publicados até agora são de difícil comparação entre si devido a falta de padronização de métodos (CAROCHO e FERREIRA, 2013).

As novas tendências em tratamentos antioxidantes incluem compostos que sejam miméticos às metaloenzimas Sod e CAT e a genética, que visa produzir plantas geneticamente modificadas que possam produzir maiores quantidades de antioxidantes para que os níveis destas substâncias sejam aumentadas nas células (CAROCHO e FERREIRA, 2013).

1.3. Câncer

O câncer é um conjunto de mais de 200 doenças que têm em comum o crescimento desordenado e difuso de células (INCA, 2015).

O desenvolvimento do câncer passa por vários estágios (Figura 24) (ALMEIDA, et al., 2005):

Estágio de iniciação: as células sofrem o efeito de um agente carcinogênico que provoca modificações em alguns de seus genes. As células geneticamente modificadas ainda não apresentam características que permitam a identificação de um tumor clinicamente.

Estágio de promoção: As células geneticamente modificadas sofrem o efeito dos oncopromotores (agentes cancerígenos). A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual.

Estágio de progressão: caracterizado pela multiplicação descontrolada é um processo irreversível. O câncer está instalado e evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (ALMEIDA, et al., 2005).

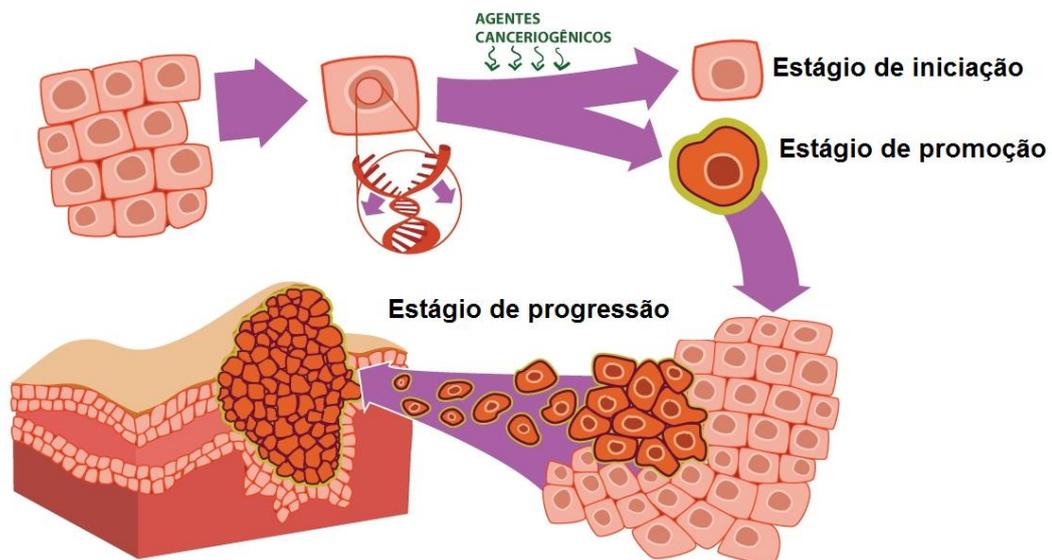


Figura 24. Esquema de surgimento e propagação do câncer (Adaptado de Nova Escola, 2015).

O câncer é classificado de acordo com a célula da qual se originou, com a velocidade de multiplicação celular e com a capacidade de invadir os tecidos ou órgãos vizinhos (metástase) (INCA, 2015).

Os carcinomas são originados de células que revestem o corpo (pele (ectodermas) e uma série de revestimentos internos (endodermas)). Os sarcomas originam-se de tecidos de suporte (ossos, tecido gorduroso, músculo e tecido fibroso de reforço). Linfomas são oriundos de células conhecidas como linfócitos, presentes nas glândulas linfáticas e sangue. Os linfomas são divididos em Hodgkin e não-Hodgkin, de acordo com o tipo de célula afetada. A leucemia é originada de células da medula óssea que produzem as células sanguíneas brancas. Mielomas são originadas das células plasmáticas da medula óssea que produzem os anticorpos.

Os tumores das células germinativas desenvolvem-se a partir de células dos testículos e/ou dos ovários,. Melanomas originam-se das células da pele que produzem pigmento, os melanócitos. Gliomas são originados a partir de células do tecido de suporte cerebral ou da medula espinhal, raramente ocorre metástase. Neuroblastomas são derivados de células malignas embrionárias advindas de células neuronais primordiais (ALMEIDA, et al., 2005).

O câncer pode ser originado por causas externas ou internas. As causas externas estão relacionadas ao meio em que o indivíduo vive (fumo, alimentação, exposição a substâncias químicas etc.). Os fatores de risco ambientais de câncer são denominados cancerígenos ou carcinógenos, estes atuam modificando a estrutura genética das células. O aparecimento do câncer pode depender da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores de câncer. As causas internas estão relacionadas a fator estocástico, relacionado a mutações aleatórias que surgem durante a replicação do DNA em células normais e a fatores genéticos. (TOMASETTI & VOGELSTEIN, 2015; INCA, 2015).

O câncer é umas das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, com aproximadamente 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas ao câncer em 2012. O número de novos casos deverá aumentar em cerca de 70% nas próximas 2 décadas. (OMS, 2015).

Entre os homens, os 5 tipos mais comuns de câncer diagnosticados em 2012 foram câncer de pulmão, próstata, colo retal, estômago e fígado. Entre as mulheres foram câncer de mama, colo retal, pulmão, colo do útero e estômago (OMS, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de um terço das mortes por câncer são devidas aos 5 principais riscos comportamentais e nutricionais: índice de massa corporal elevado, baixa ingestão de frutas e legumes, falta de atividade física, tabagismo, consumo de álcool. O uso do tabaco é o fator de risco mais importante para o câncer causando cerca de 20% das mortes por câncer globais e cerca de 70% das mortes globais de câncer de pulmão. Os cânceres causados por infecções virais, tais como hepatite B e C e HPV (papilomavírus humano) são responsáveis por até 20% das mortes por câncer em países de baixa e média renda (OMS, 2015).

Em 2012, as mortes por câncer eram relacionadas, principalmente aos seguintes cânceres: pulmão (1,59 milhão de mortes); fígado (745000 mortes);

estômago (723000 mortes); colo retal (694000 mortes); mama (521000 mortes); esofágico (400 000 mortes) (OMS, 2015).

Em 2030, estima-se que serão 21,4 milhões de novos casos de câncer no mundo e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

No Brasil, a estimativa para o biênio 2016/2017, indica o surgimento de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2014). O câncer é hoje, no Brasil, um problema de saúde pública, cujos controle e prevenção deverão ser priorizados em todas as regiões (INCA, 2016). Os dados da estimativa de 2016/2017 para o câncer no Brasil, em homens e mulheres são apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, entre os homens, estimados para 2016/2017 (exceto pele não melanoma) (INCA, 2016).

Localização primária	Casos		HOMENS
Próstata	61.200	28,6%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	
Cólon e Reto	16.660	7,8%	
Estômago	12.920	6,0%	
Cavidade Oral	11.140	5,2%	
Esôfago	7.0950	3,7%	
Laringe	6.360	3,0%	
Bexiga	7.200	3,4%	
Leucemias	5.540	2,6%	
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	

Tabela 7. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, entre as mulheres, estimados para 2016/2017 (exceto pele não melanoma) (INCA, 2016).

MULHERES	Localização primária	Casos	
	Mama	57.960	28,1%
	Cólon e Reto	17.620	8,6%
	Colo e útero	16.340	7,9%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
	Estômago	7.600	3,7%
	Corpo do Útero	6.950	3,4%
	Ovário	6.150	3,0%
	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
	Sistema nervoso central	4.830	2,3%

O diagnóstico correto do câncer é essencial para o tratamento adequado e eficaz, cada tipo de câncer exige um regime de tratamento específico que abrange uma ou mais modalidades, tais como cirurgia e/ou radioterapia e/ou quimioterapia entre outros (OMS, 2015). Dentre as formas de tratamento para o câncer, destaca-se a quimioterapia que é um tratamento que utiliza medicamentos para destruir as células cancerosas (INCA, 2015).

A busca por quimioterápicos mais específicos e menos tóxicos às células saudáveis é cada vez maior. Após a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina, que foi considerada como um dos agentes quimioterápicos mais eficazes, apresentando atividade clínica contra uma ampla variedade de tumores sólidos, muitos complexos de platina foram sintetizados. Estes foram obtidos a fim de investigar as suas propriedades químicas e identificar novos complexos com atividades antitumorais melhoradas em comparação a cisplatina (VUJIC, et al., 2012). Isso motivou o estudo da atividade antitumoral de outros complexos com diferentes metais de transição, tais como zinco, níquel, estanho, cobre, ferro, vanádio, rutênio, ouro, cobalto, gálio, irídio, ósmio, titânio, etc (ENYEDY, et al., 2014; TAN, et al., 2014; WANG, et al., 2014; DHAHAGANI, et al., 2014; HANIF, et al., 2014; FERNANDES, et al., 2015; EL-WAKIEL, et al., 2015; MEDICI, et al., 2015; ENYEDY, et al., 2015).

O sucesso da cisplatina e a comprovada eficiência de vários destes compostos em ensaios *in vitro* contra distintas linhagens tumorais, tais como mama, próstata, pulmão, cólon, leucemia, ovário etc e os crescentes casos de câncer na

população mundial, a eficácia limitada e alta toxicidade dos medicamentos convencionais e a incidência de indução de resistência motivaram a busca de novos metalofármacos que apresentem amplo espectro de atuação e menor toxicidade sistêmica (JAIVIDHYA et al, 2012; MONIM-UL-MEHBOOB, et al., 2013; WANG, et al., 2014; MANIKANDAN, et al., 2014; ZHANG, et al., 2014; MEDICE, et al., 2015; OMS, 2015).

Um fator decisivo para o estudo de determinado composto como agente biológico é o tipo de morte que este induz. A morte celular pode ocorrer por vários mecanismos. De acordo com as mais recentes recomendações do Comitê de Nomenclatura de Morte celular, existem, pelo menos, 13 tipos diferentes de morte celular. Evidenciando que o mecanismo de morte celular é altamente complexo (TAN, et al., 2014).

Em geral, os mecanismos de morte celular dividem-se em PCD e não-PCD. Atualmente, PCD é dividido em três categorias principais: tipo I (apoptose), tipo II (autofagia), e outros (necroptose). As distinções entre a apoptose, necrose, e autofagia são refletida nas diferenças entre os modos de morte e alterações morfológicas e bioquímicas (Figura 25) (TAN, et al., 2014).

A apoptose tem sido extensivamente estudada, e a contribuição de apoptose para a patogênese do câncer tem sido bem documentada. A característica morfológica principal da apoptose é o encolhimento da célula e seu núcleo, condensação da cromatina, a fragmentação nuclear e a formação de corpos apoptóticos. Durante a apoptose, os componentes internos da célula são embalados de forma ordenada, e, em seguida, eles são liberados, engolfado e digerido por células vizinhas (TAN, et al., 2014).

A autofagia é um processo catabólico fortemente regulado. Durante a autofagia, os materiais indesejáveis, citoplasmáticos e organelas são inicialmente capturado em vesículas de dupla membrana conhecido como autofagossomas. Em seguida, os autofagossomas fundem-se aos lisossomos, formando autolisossomos, para serem degradados (TAN, et al., 2014).

As características morfológicas de necrose, distintas aqueles da apoptose, incluem o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, causando o inchaço das células e rompimento da membrana que extravasa o conteúdo intracelular para o meio extracelular (TAN, et al., 2014).

A Figura 25 apresenta as características morfológicas de células eucarióticas em morte por apoptose, autofagia e necrose.

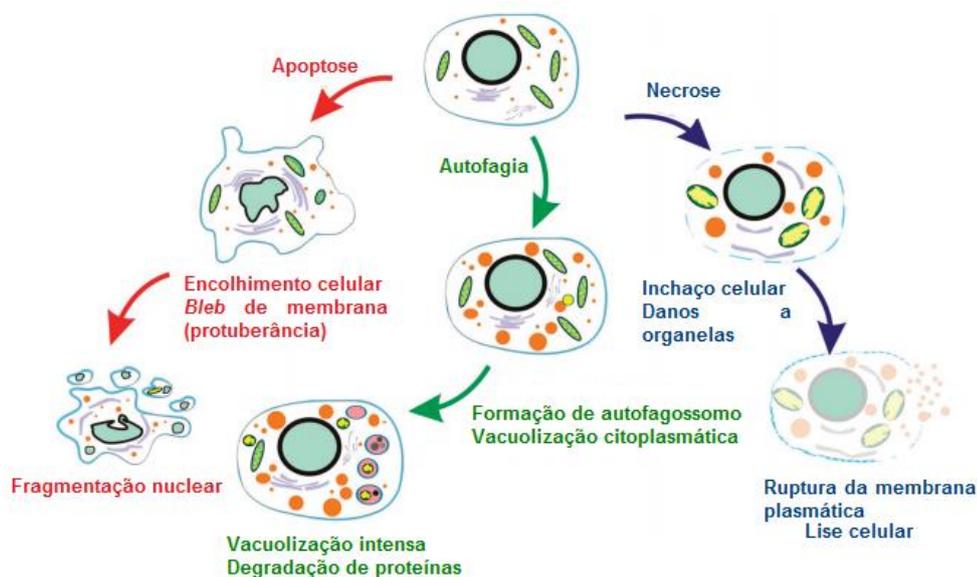


Figura 25. Características morfológicas de apoptose, autofagia e necrose (TAN, et al., 2014).

1.3.1. Atividade antitumoral de compostos de coordenação

Medicamentos à base de platina, usados como agentes anticâncer, têm apresentado efeitos colaterais graves e alta toxicidade. Estas desvantagens motivam o desenvolvimento de compostos mais eficazes, menos tóxicos e com especificidade para as células cancerígenas (EL-WAKIEL, et al., 2015)

A atividade antitumoral de compostos de zinco, contendo ligantes N,O-doadores foi investigada contra três linhagens leucêmicas (THP-1, U937 e MOLT-4) e os resultados indicam que o composto de Zn, o qual possui um grupo piridínico e um grupo álcool em sua estrutura é o mais promissor. Este apresenta IC_{50} de $75 \mu\text{mol dm}^{-3}$ contra a linhagem U937. A avaliação do tipo de morte com Anexina V e iodeto de propídio indica que este composto promove a morte das células majoritariamente por apoptose, sendo assim um candidato a metalofármaco (FERNANDES, et al., 2014).

Manikandan e colaboradores relataram recentemente a atividade de dois compostos de cobalto (Figura 26) contra linhagens de câncer de mama (MCF-7) e de carcinoma do colo do útero (HeLa). O teste de citotoxicidade dos compostos via metabolização do MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio]) mostrou que os compostos apresentam maior atividade quando comparados aos

ligantes contra as duas linhagens celulares utilizadas na investigação. O composto 2 apresentou IC₅₀ menor do que a cisplatina (MANIKANDAN, et al., 2014).

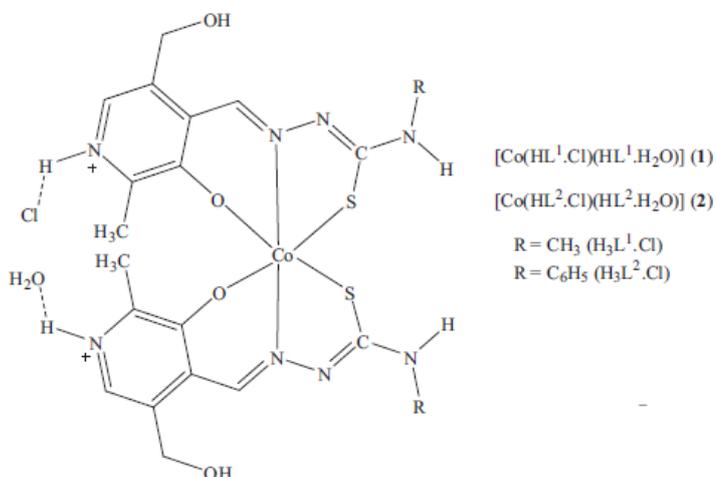


Figura 26. Estrutura dos compostos de cobalto(III) (1) e (2) (MANIKANDAN, et al., 2014).

Fernandes e colaboradores investigaram a atividade antitumoral de quatro compostos de cobre (Figura 27), contra duas linhagem cancerígenas, THP-1 (leucemia monocítica aguda) e U937 (linfoma histiocítico) (FERNANDES, et al., 2015).

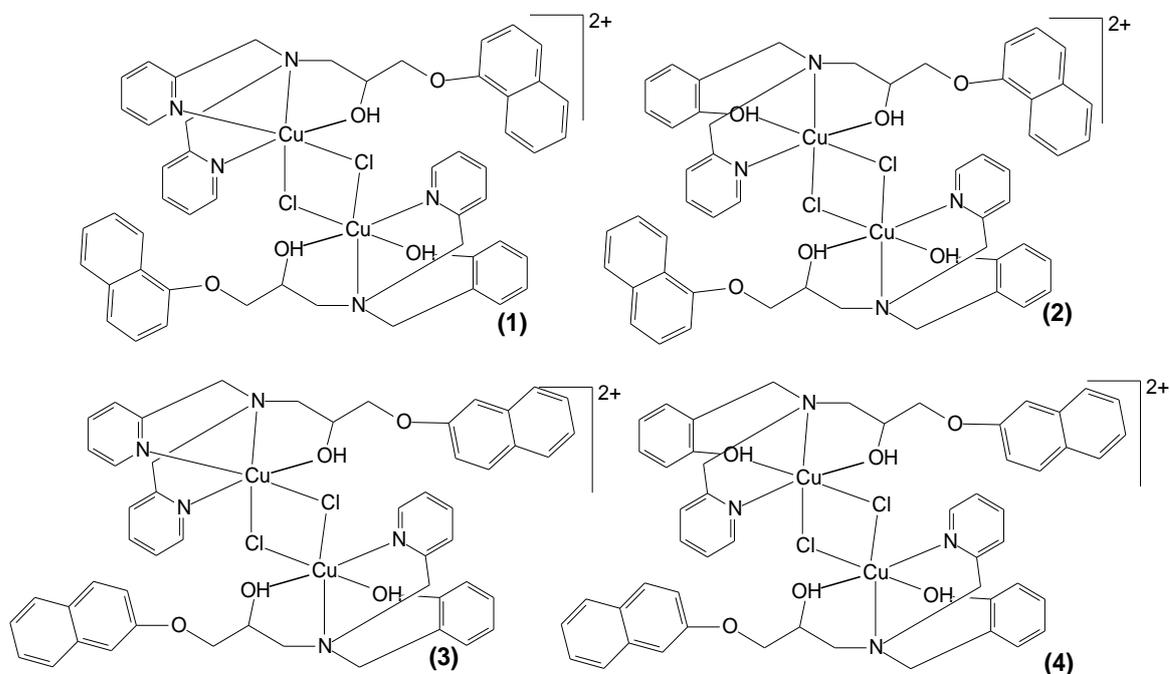


Figura 27. Estrutura dos compostos de cobre (1), (2), (3) e (4) (FERNANDES, et al., 2015).

Os resultados do teste colorimétrico usando MTT, são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Concentração que inibe ou lesa 50% das células (IC_{50}) dos complexos, ligantes, sal de cobre e cisplatina, contra linhagens de leucemia humana (THP-1 e U937) e PBMC (FERNANDES, et al., 2015).

Compostos	$IC_{50}/\mu\text{mol dm}^{-3}$		
	THP-1	U937	PBMC
HL1	43,67 ± 1,09	32,22 ± 1,11	> 100
(1)	30,72 ± 1,09	58,51 ± 1,09	79,64 ± 1,10
H2L2	66,97 ± 1,07	30,95 ± 1,06	> 100
(2)	11,30 ± 1,06	8,20 ± 1,04	16,35 ± 1,11
HL3	87,79 ± 1,09	38,56 ± 1,17	> 100
(3)	25,44 ± 1,07	54,75 ± 1,19	86,99 ± 1,13
H2L4	> 100	> 100	> 100
(4)	34,03 ± 1,04	39,34 ± 1,04	36,25 ± 1,10
Cisplatina	11,84 ± 1,05	16,25 ± 1,05	37,50 ± 1,13
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	> 100	> 100	> 100

O composto (2) mostrou-se mais ativo contra as linhagens leucêmicas, porém apresentou maior toxicidade contra as células normais (PBMC) do que a cisplatina. Por esse motivo foram feitos testes para determinar a toxicidade aguda *in vivo* do composto (2), e comparar com os dados correspondentes disponíveis para a cisplatina (FERNANDES, et al., 2015).

Camundongos C57BL/6, com 4-5 semanas de idade, foram divididos em grupos de quatro animais para cada condição de tratamento. As concentrações de complexo (2) usadas foram 13, 75, 27, 50, 55 e 110 mg kg^{-1} . A DL_{50} (dose letal mediana que mata 50% dos animais) de complexo (2) foi de 55 mg kg^{-1} *versus* 14,51 mg kg^{-1} para a cisplatina. Estes dados indicam que (2) complexo, embora mais tóxico para as células normais (PBMC) do que a cisplatina, é menos tóxico do que a cisplatina *in vivo*. Isto é uma indicação de que o complexo (2) pode ser mais seguro e mais eficaz do que um medicamento aprovado (FERNANDES, et al., 2015).

Estes resultados motivaram a investigação do mecanismo de morte induzido pelos compostos mais ativos [H2L2, (2) e (4)] (FERNANDES, et al., 2015).

Na presente família de complexos de cobre observa-se que aqueles que contêm o grupo fenol (complexos (2) e (4)) são mais eficientes do que aqueles que não possuem esta unidade (complexos (1) e (3)). Além disso, para os compostos de cobre, foi observado que os complexos contendo a unidade α -naftol são mais ativos do que as que contêm o isômero β -naftol, destacando a relevância da substituição no anel do grupo naftol para a atividade anticâncer (FERNANDES, et al., 2015).

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 28) indicam que após 12 h de incubação ocorre dano na mitocôndria, sendo possível observar a matriz mitocondrial vazia (indicada pelas setas) (FERNANDES, et al., 2015).

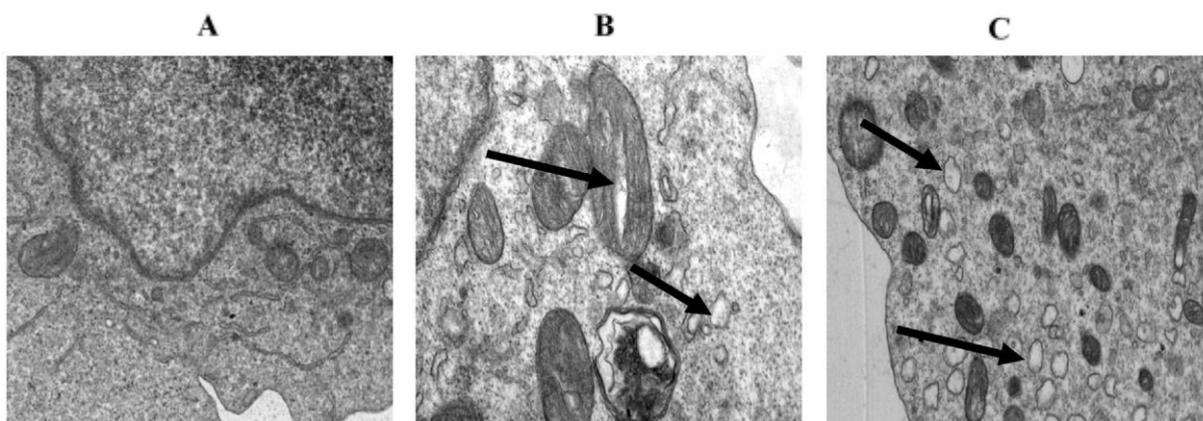


Figura 28. Micrografia eletrônica de transmissão. (A) Controle U937, (B) U937 incubada com $40 \mu\text{mol dm}^{-3}$ do complexo (2) por 12 h, (C) U937 incubada com $40 \mu\text{mol dm}^{-3}$ do complexo (2) por 24 h (FERNANDES, et al., 2015).

Um grande número de técnicas (microscopia de fluorescência, anexina V, ensaio de ciclo celular, detecção do potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo c, microscopia eletrônica de transmissão) confirmaram que o composto (2) induz a apoptose em células cancerosas, com comprometimento da mitocôndria uma vez que tanto a perda de potencial de membrana e liberação de citocromo c foi observado. No entanto, as mitocôndrias não são o primeiro alvo para o composto (2) uma vez que a caspase-8 é ativada primeiro, promovendo a ativação subsequente da caspase-3 (efetora) (FERNANDES, et al., 2015).

Este resultado é de grande relevância já que ativação da caspase-8 pelo composto (2) indica a interação deste composto com receptores de morte na membrana da célula, o que sugere que o composto (2) não precisa entrar nas células cancerosas para matá-las. Neste modo de ação não há problema associado com a absorção da droga, como é frequentemente observada para a cisplatina. Por conseguinte, os receptores de morte são um alvo interessante para o desenvolvimento de drogas anticâncer (FERNANDES, et al., 2015).

Os resultados obtidos por Fernandes e colaboradores motivam o estudo de compostos que contenham o grupo naftol em sua estrutura, uma vez que os compostos de cobre apresentaram elevada atividade.

Devido ao metabolismo aberrante, células cancerosas acumulam quantidades excessivas das EROs, o que pode causar graves danos celulares e induzir morte celular por apoptose (GORRINI, et al., 2013). A diminuição da eficiência das defesas antioxidantes aumentam o nível das EROs, que causa estresse oxidativo, danos no DNA e promove carcinogênese. Por outro lado, as células cancerosas são

conhecidas por terem um elevado teor das EROs e tornar-se cada vez mais dependentes de antioxidantes, tais como a Sod1, que evita o dano celular excessivo e apoptose durante a progressão tumoral (CHE, et al., 2015).

As células de câncer em estágio final são dependentes de um sistema antioxidante altamente ativo para sustentar a sobrevivência e proliferação rápida. Esta característica das células cancerígenas indica que interromper o sistema de defesa antioxidante pode ser uma estratégia útil para maior seletividade das células malignas (WEINBERG, et al., 2010; CHE, et al., 2015). As atividades antioxidante e antitumoral podem ser antagônicas, uma vez que um dos possíveis mecanismos de ação de compostos com atividade antitumoral pode ser a inativação do sistema antioxidante, causando o acúmulo das EROs e a indução de morte por apoptose (CHE, et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho é sintetizar e caracterizar uma série de compostos de coordenação de cobalto e ferro, contendo ligantes N,O-doadores, além de avaliar suas atividades antioxidante e antitumoral.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar três ligantes, os quais possuem grupos N, O doadores em suas estruturas e promover a caracterização dos mesmos por espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H ;
- Sintetizar compostos de coordenação de cobalto e ferro, através de reações entre os sais metálicos e os ligantes sintetizados;
- Caracterizar os compostos de coordenação obtidos pelas técnicas de difração de raios-X de monocristal (quando possível), ponto de fusão, análise elementar (C, H, N), condutividade elétrica, espectroscopia no infravermelho, espectroscopia eletrônica, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS), eletroquímica e espectroscopia Mössbauer;
- Investigar a atividade Sod e CAT mimética *in vitro*;
- Estudar a capacidade de proteção celular dos compostos no novo modelo celular, *Saccharomyces cerevisiae*;
- Determinar a concentração de composto que inviabiliza 50% das células (IC_{50}) das linhagens COLO 205, H460, THP-1, U937 e MOLT-4, através de ensaio colorimétrico utilizando o corante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina);
- Investigar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos sintetizados contra células mononucleares do sangue periférico (PBMC);
- A partir dos valores de IC_{50} obtidos contra as linhagens tumorais e normal, eleger os compostos mais promissores;

- Realizar, para os compostos mais ativos, avaliações do tipo de morte celular através das técnicas de marcação com Anexina V e iodeto de propídio, avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (sub-G1), avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) por citometria de fluxo (JC-1) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Síntese dos compostos orgânicos

Neste item são apresentadas as rotas de síntese dos compostos orgânicos (P1-P3; H2L1, H2L2 e H2L3).

3.1.1. Síntese do precursor (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (P1)

O precursor P1 foi sintetizado utilizando-se a metodologia previamente descrita na literatura (NEVES et al., 1993), através da reação de formação de base de Schiff, seguida da redução com borohidreto de sódio, em metanol, originando um sólido branco (Figura 29). Rendimento: 4,40g; 72%. Ponto de fusão: 55°C.

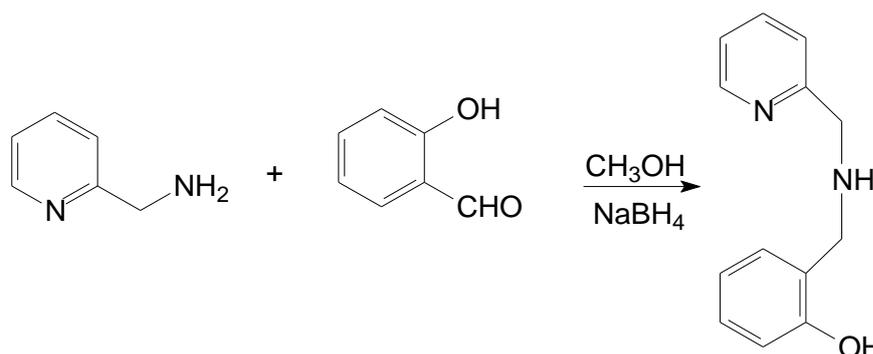


Figura 29. Esquema de síntese do precursor P1 (NEVES et al., 1993).

3.1.2. Síntese do ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina (H2L1)

A síntese do ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil) [(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina (H2L1) (Figura 30) foi realizada empregando-se a metodologia previamente descrita na literatura (HORN et al., 2000), originando um óleo castanho-claro. Rendimento: 4,5 g; 74%.

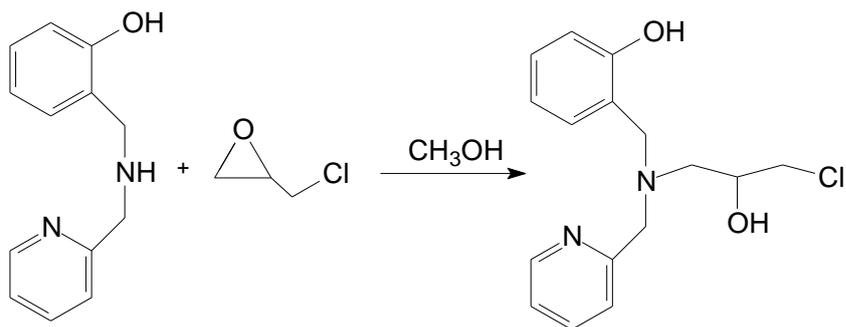


Figura 30. Esquema de síntese do ligante H2L1 (Horn et al., 2000).

3.1.3. Síntese do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P2)

O precursor P2 foi sintetizado segundo metodologia previamente relatada na literatura (FERNANDES, et al., 2015), obtendo-se um óleo castanho escuro. Rendimento: 13,6 g (97%). A Figura 31 apresenta o esquema de síntese para tal precursor.

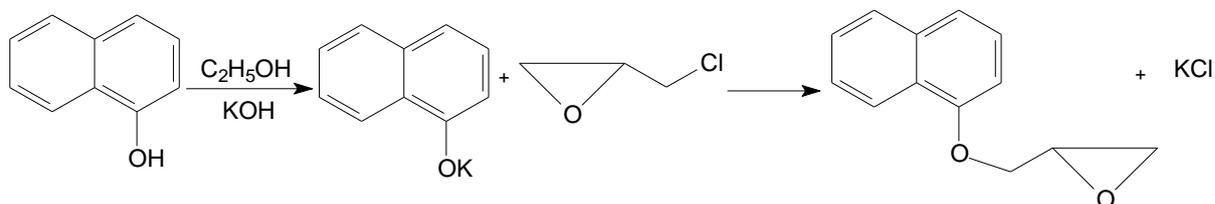


Figura 31. Esquema de síntese do precursor P2 (FERNANDES, et al., 2015).

3.1.4. Síntese do ligante 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (H2L2)

O ligante H2L2 (Figura 32) foi sintetizado conforme a rota sintética relatada previamente, originando um óleo castanho (FERNANDES, et al., 2015). Rendimento: 8,7 g; 83 %.

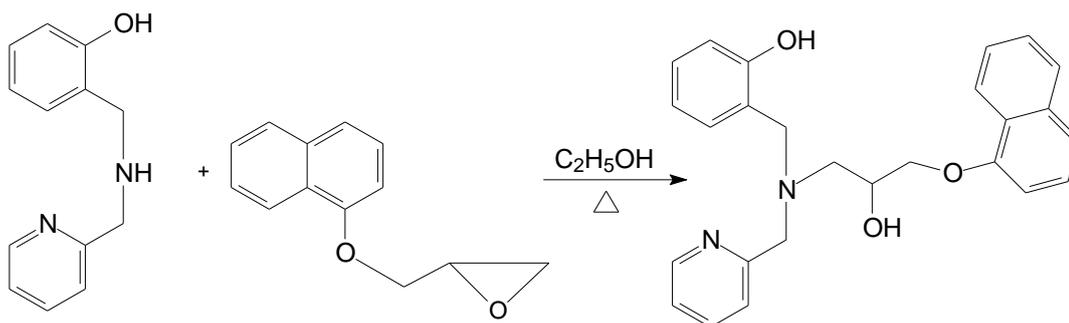


Figura 32. Esquema de síntese do ligante H2L2 (FERNANDES, et al., 2015).

3.1.5. Síntese do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (composto precursor para a obtenção do ligante L4) (P3)

O precursor P3 (Figura 33) foi obtido segundo metodologia descrita previamente (FERNANDES, et al., 2015), obtendo-se um sólido branco. Rendimento: 7,3 g; 52 %. Ponto de fusão: 45° C.

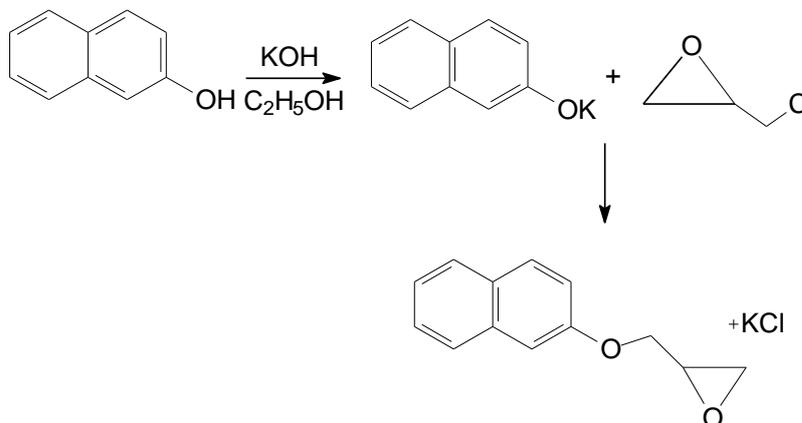


Figura 33. Esquema da rota sintética do precursor P3 (FERNANDES, et al., 2015).

3.1.6. Síntese do ligante 1-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina-3-(2-naftiloxi)-propan-2-ol (H2L3)

O ligante H2L3 foi sintetizado conforme a rota sintética apresentada na Figura 34, segundo metodologia previamente descrita (FERNANDES, et al., 2015), originando um sólido branco. Rendimento: 8,6 g; 83 %. Ponto de fusão: 140°C.

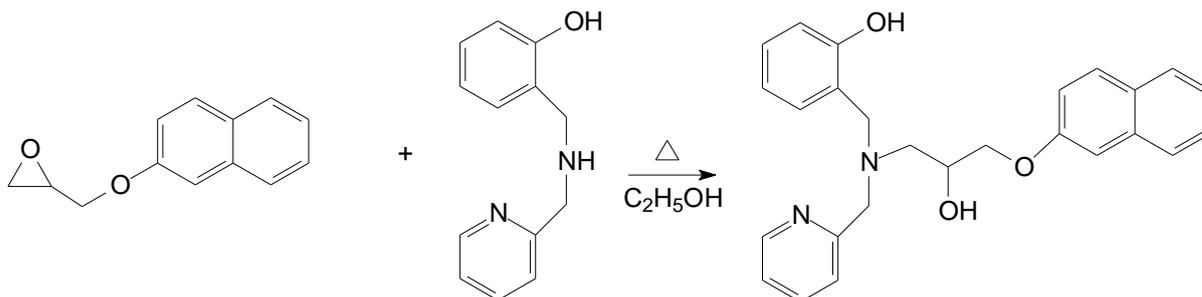


Figura 34. Esquema de síntese do ligante H2L3 (FERNANDES, et al., 2015).

3.2. Síntese dos compostos de coordenação

Neste item são apresentadas as rotas sintéticas dos compostos de coordenação de cobalto (**1 - 3**) e ferro (**4 - 6**) com os ligante H2L1, H2L2 e H2L3.

3.2.1. Síntese do composto de coordenação 1

Em 20 cm³ de metanol foi dissolvido 1 mmol (0,306 g) do ligante H2L1 e adicionou-se 1 mmol de hidróxido de lítio (0,041 g) com o intuito de promover a desprotonação do ligante H2L1. Após 10 min, quantidade equimolar de CoCl₂·6H₂O (0,238 g) dissolvido em 20 cm³ de isopropanol foi adicionada à solução, a qual adquiriu uma coloração roxa. A solução foi agitada magneticamente por 5 h à temperatura ambiente. Após esse período, a mesma foi filtrada e deixada em repouso à temperatura ambiente (Figura 35). Desta solução, após uma semana, foi isolado um sólido de coloração roxa, este foi lavado com isopropanol gelado. Rendimento: 0,179 g; 42 %. Ponto de fusão: 215° C. O sólido foi recristalizado sucessivas vezes na tentativa de obter monocristais para estudos cristalográficos e para realização das análises físico-químicas.

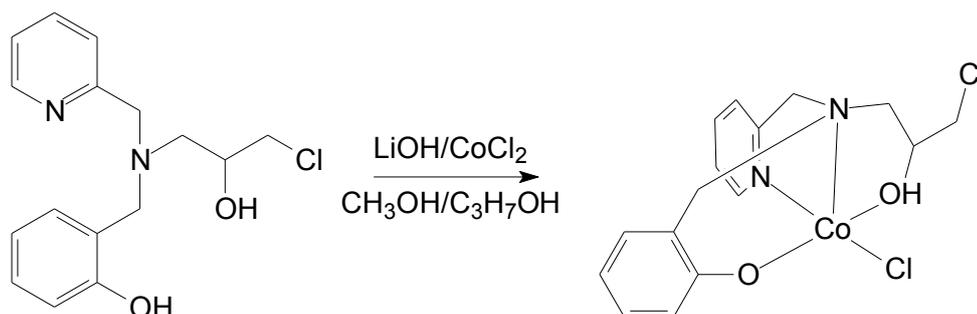


Figura 35. Esquema de síntese do composto 1.

3.2.2. Síntese com composto de coordenação 2

Em uma solução etanólica do ligante H2L2 (0,414 g; 1,0 mmol, 15 cm³ de etanol) adicionou-se 15 cm³ de uma solução de CoCl₂.6H₂O (0,239 g, 1 mmol), em etanol. A coloração do meio reacional se tornou roxa e a reação ficou sob agitação e refluxo brando à 60° C, por 2 h (Figura 36). Formou-se um sólido de coloração rosa. A solução resultante foi filtrada e o sólido lavado com etanol. O sólido foi recristalizado sucessivas vezes na tentativa de obter monocristais para estudos cristalográficos e para realização das análises físico-químicas. Rendimento: 0,179 g; 32 %. Ponto de fusão: 250° C.

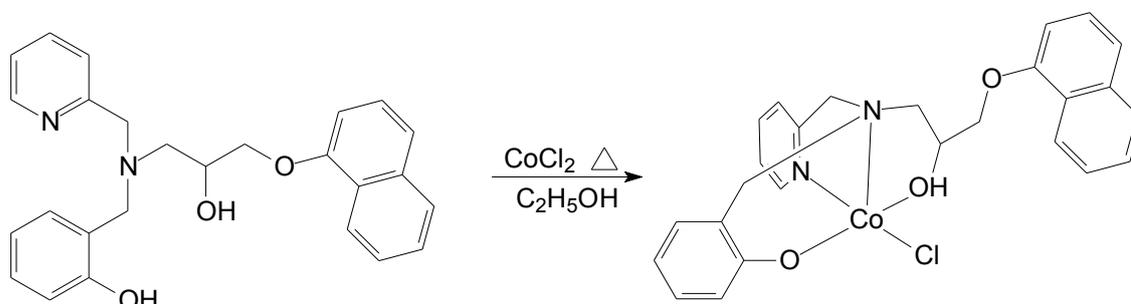


Figura 36. Esquema de síntese do composto 2.

3.2.3. Síntese do composto de coordenação 3

Em 30 cm³ de metanol foi dissolvido 1 mmol (0,414 g) do ligante H2L3. Em seguida, quantidade equimolar de CoCl₂.6H₂O (0,238 g) dissolvido em 30 cm³ de isopropanol e foi adicionada à solução, a qual adquiriu uma coloração roxa. A solução ficou sob agitação e refluxo brando à 60° C, por 2 h. Após esse período, a mesma foi filtrada e deixada em repouso à temperatura ambiente (Figura 37). Desta solução, após uma semana, foi isolado um sólido cristalino de coloração roxa. Rendimento: 0,372 g; 65,2 %. Ponto de fusão: 220° C.

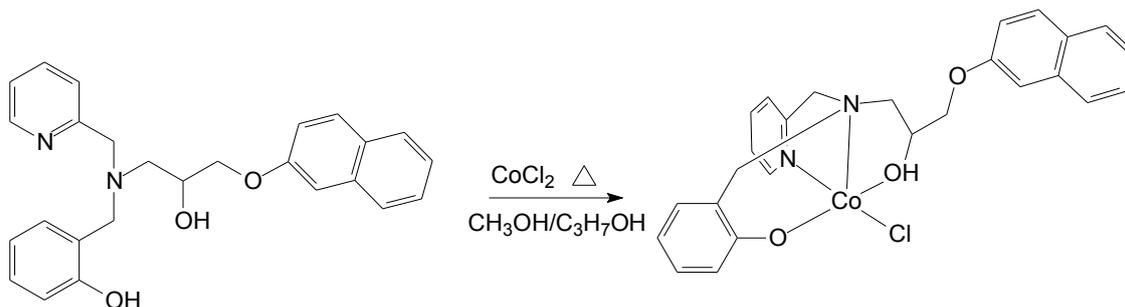


Figura 37. Esquema de síntese do composto 3.

3.2.4. Síntese do composto de coordenação 4

A síntese do composto **4** (Figura 38) foi realizada segundo metodologia descrita na literatura, empregando-se o ligante H2L1 (SILVA et al., 2008). Foi obtido um sólido azul escuro, de aspecto microcristalino. Rendimento: 0,541 g; 67%.

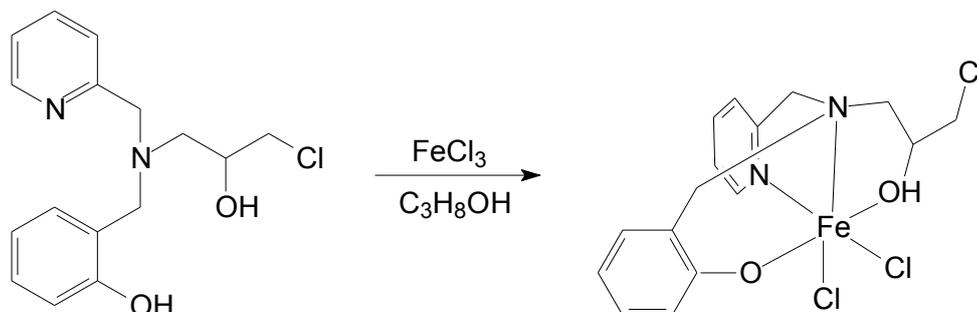


Figura 38. Esquema de síntese do composto **4** (SILVA et al., 2008).

3.2.5. Síntese do composto de coordenação 5

Em um béquer, adicionou-se 10 cm³ de uma solução etanólica do ligante H2L2 (0,414 g; 1,0 mmol) e FeCl₃.6H₂O (0,270 g, 1 mmol), dissolvido previamente em etanol (Figura 39). A coloração do meio reacional se tornou azul e a reação ficou sob agitação por 1 h à temperatura ambiente. Observou-se a formação de um sólido de coloração azul que foi isolado por filtração. O sólido foi recristalizado sucessivas vezes na tentativa de obter monocristais para estudos cristalográficos e para realização das análises físico-químicas. Rendimento: 0,146 g; 29%. Ponto de fusão: 150°C.

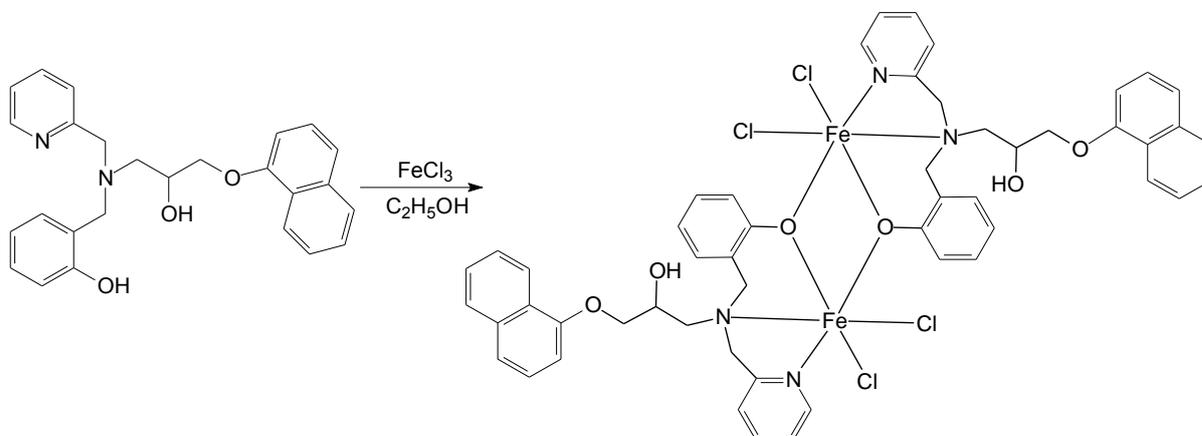


Figura 39. Esquema de síntese do composto **5**.

3.2.6. Síntese do composto de coordenação 6

Em um béquer adicionou-se a uma solução etanólica do ligante H2L3 (0,414 g; 1,0 mmol) e solução etanólica de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,270 g, 1 mmol) (Figura 40). A coloração do meio reacional se tornou azul e reação foi mantida em agitação por 1 h, à temperatura ambiente. Observou-se a formação de um sólido de coloração azul, filtrou-se a solução para isolá-lo. O sólido foi recristalizado sucessivas vezes na tentativa de obter monocristais para estudos cristalográficos e para realização das análises físico-químicas. Rendimento: 0,467 g; 85%. Ponto de fusão: 135°C.

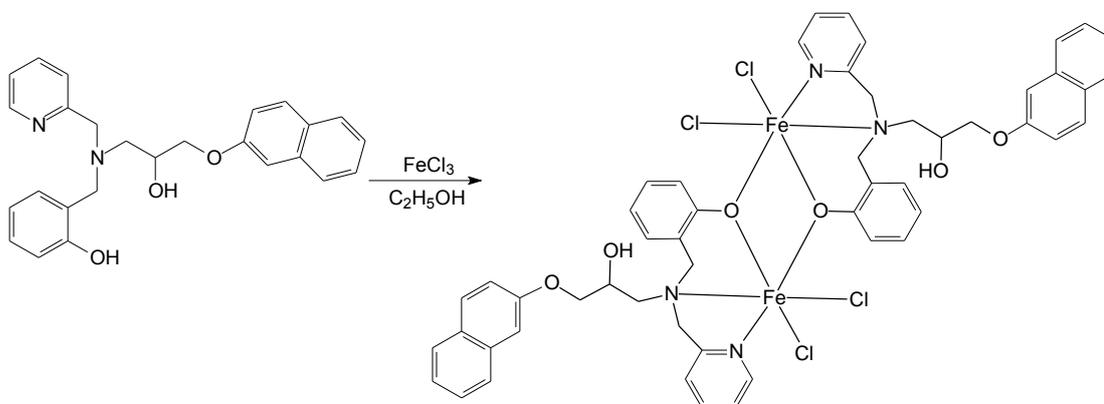


Figura 40. Esquema de síntese do composto 6.

3.3. Técnicas empregadas

As sínteses dos ligantes e dos complexos foram realizadas utilizando-se solventes grau PA e reagentes de fontes comerciais (Aldrich, Acros, Vetec, Synth e Merck), sem prévia purificação. As reações foram realizadas sob agitação magnética e algumas delas sob aquecimento; neste caso, foi utilizado banho-maria. Para tanto, foram utilizadas placas de agitação com aquecimento marca Fisatom ou Fisher e termômetro para o controle da temperatura do banho. Nas sínteses orgânicas foi utilizado, quando necessário, evaporador rotatório marca Fisatom, sendo estas acompanhadas por análise cromatográfica em camada delgada (CCD) (sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck), empregando-se solvente adequado.

3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

As análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram realizadas para os compostos orgânicos a fim confirmar a pureza e obtenção dos mesmos. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Jeol modelo Eclipse 400+ e em um espectrômetro Varian modelo NMR AS 400, operando a 400 MHz para ^1H , utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente. As soluções foram preparadas a partir de 10-15 mg de amostra, em $550 \mu\text{dm}^3$ de solvente em tubos de 2,5 mm de diâmetro com TMS (tetrametilsilano) como referência interna.

3.3.2. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho dos compostos orgânicos e inorgânicos foram obtidos utilizando-se um espectrômetro de infravermelho Shimadzu IRA ffinity-1. As amostras foram analisadas em pastilha de KBr, quando sólidos, e em filme sob pastilha de KBr, quando líquidas, empregando-se acetona como solvente.

3.3.3. Difração de raios X

Os dados das estruturas de raios X foram coletados em um difratômetro SMART1 BRUKER-AXS SMART1000 CCD 3-thiracle X-ray Diffractometer a temperatura ambiente. As estruturas foram resolvidas por métodos diretos e refinadas usando os programas SHELX, SAINT-PLUS, e X-Seed. Os dados foram obtidos no Departamento de Química da UFSC, com colaboração do Prof. Adailton J. Bortoluzzi.

3.3.4. Ponto de Fusão

A determinação do ponto de fusão dos compostos orgânicos e de coordenação foi realizada empregando um aparelho Fisatom, modelo 430.

3.3.5. Análise elementar

As porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram determinadas em um analisador de CHN Thermo Scientific Flash 2000.

3.3.6. Condutividade elétrica

As medidas de condutividade elétrica foram realizadas em um condutivímetro de bancada microprocessado Biocristal modelo PHN. Foram empregados solventes grau espectroscópico e concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol dm^3 das espécies analisadas. As medidas foram realizadas a 25°C e o condutivímetro fora previamente calibrado com uma solução padrão de cloreto de potássio (KCl) ($1412 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 25 °C).

3.3.7. Espectroscopia Eletrônica

Os espectros eletrônicos foram obtidos em um espectrofotômetro de UV-Vis Cary 50 Bio, Varian acoplado a um computador. As leituras foram efetuadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm, empregando-se solventes grau espectroscópico, de acordo com a solubilidade dos compostos em estudo.

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

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro MicroTOF Bruker Daltonics, equipado com uma fonte *electrospray*. Os espectros foram obtidos em modo positivo, o solvente utilizado foi uma mistura metanol/água (1:1) e as amostras foram injetadas no aparelho por infusão direta.

3.3.9. Voltametria Cíclica

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em um potenciostato/galvanostato PG-3901 Omnimetra em dimetilsulfóxido contendo $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hexafluorofosfato de tetrabutílamônio como o eletrólito de suporte, sob atmosfera de argônio à

temperatura ambiente. Empregou-se a seguinte configuração de eletrodos: eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, eletrodo de platina como eletrodo de referência e fio de platina como eletrodo auxiliar.

3.3.10. Espectroscopia Mössbauer de ^{57}Fe

As medidas foram realizada à temperatura ambiente, em geometria de transmissão. Os espectros foram obtidos empregando-se fonte de ^{57}Co em matriz de Rh. Os valores de deslocamento isomérico (IS) são dados em relação ao ferro metálico. Os espectros foram obtidos no Departamento de Física da UFF, com colaboração do Prof. Dalber R. S. Candela.

3.4. Estudo da atividade antioxidante

3.4.1. Estudos da atividade Sod mimética

A atividade Sod mimética *in vitro* foi avaliada através da eliminação do radical superóxido, utilizando o método de inibição da redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) à formazan, que apresenta coloração azul, segundo metodologia descrita previamente na literatura (YU et al., 2005). O sistema xantina/xantina oxidase foi usado como fonte de radical superóxido. A Figura 41 apresenta o esquema de redução do NBT.

O sistema foi montado da seguinte maneira, adicionou-se xantina, NBT e tampão fosfato pH 7,8 a cubeta, em seguida adicionou o composto de coordenação na concentração de $9 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (DMSO/água 1:9), após a homogeneização, adicionou-se a xantina oxidase a fim de produzir o radical superóxido. A eliminação do radical superóxido impede a redução do NBT e a consequente formação do formazan. As medidas foram feitas em 560 nm a cada 2 segundos por 20 minutos.

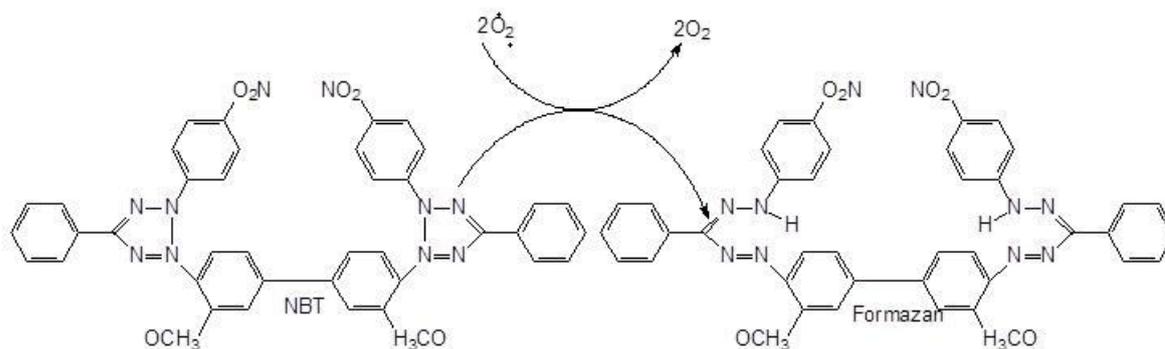


Figura 41. Representação esquemática da redução do NBT pelo radical superóxido (Adaptado de GOULART, et al., 2009).

3.4.2. Estudos da atividade CAT mimética

A atividade de catalase foi investigada segundo metodologia descrita previamente (BEERS e SIZER, 1952).

A medida da absorção da radiação ultravioleta pelo peróxido de hidrogênio em função do tempo permite o acompanhamento da reação de decomposição do mesmo (BEERS e SIZER, 1952).

Os testes foram realizados usando tampão fosfato pH 7,8, peróxido de hidrogênio $1,9 \cdot 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$, compostos de cobalto na concentração de $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ e compostos de ferro $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Para os compostos de cobalto usou-se piperazina ($0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) como co-catalisador. As leituras foram feitas a 240 nm por 25 minutos.

3.4.3. Cultura de células *Saccharomyces cerevisiae* (EG103), para Estudos da atividade de proteção celular

Estoques da cepa EG103 foram mantidos em meio YPD 2% sólido (1% de extrato de lêvedo, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar) em condições apropriadas (28 °C). Para todos os experimentos as células foram crescidas até a metade da primeira fase de crescimento exponencial na presença de glicose ($0,8$ a $1,0 \text{ mg}$ do peso seco de células/ cm^3), em meio YPD 2% líquido com a proporção de 5/1 volume do frasco/volume do meio, utilizando um agitador mantido a 28°C e 160 rpm.

3.4.4. Estudo da atividade antioxidante utilizando modelo eucariótico

O estudo da atividade antioxidante (Sod e CAT mimético) dos compostos e ligantes foi realizado com a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* EG103 (selvagem) crescendo em meio de cultura contendo glicose (YPD 2 % - 1 % de extrato de lêvedo, 2 % de peptona e 2 % de glicose) (Sod) ou glicerol (YPGLY 4 % - 1 % de extrato de lêvedo, 2 % de peptona, 4 % de glicerol) (CAT) a proporção de 5/1 volume do frasco/volume do meio, mantidas a 28°C e 160 rpm.

A concentração celular foi determinada através por espectrofotometria, a qual foi feita a medida da turbidez, de uma suspensão de células, em comprimento de onda de 570 nm. Em seguida a absorvância foi convertida em unidade de concentração (mg de peso seco de células/cm³) utilizando um fator de conversão que foi calculado previamente, a partir de uma curva de peso seco onde um volume adequado da suspensão de células foi filtrado em filtro Millipore (45 µm) e colocado em estufa até atingir peso constante. Paralelamente, foram feitas diferentes diluições da suspensão de células para leitura da absorvância a 570 nm no espectrofotômetro para posterior cálculo do fator de conversão.

Foram realizados estudos de citotoxicidade utilizando à cepa EG103, afim de verificar se os compostos seriam tóxicos para as células. Em erlenmeyer de 25 cm³, foram adicionados 5 cm³ de suspensão celular, na concentração de 0,8 a 1 mg de peso seco por cm³, com os compostos nas concentrações de 100 µmol dm⁻³ e 50 µmol dm⁻³, estes foram incubados por uma hora a 28 °C e 160 rpm e em seguida foi realizada diluição para o plaqueamento (Figura 42), este foi feito em triplicata, em placa de Petri com meio sólido YPD 2 % e incubadas por 72 horas a 28 °C. Após a incubação contabilizou-se o número de colônias formadas comparou-se com o controle (células sem tratamento). A Figura 42 apresenta a estratégia experimental utilizada nos testes *in vivo* usando *S. cerevisiae* como modelo.

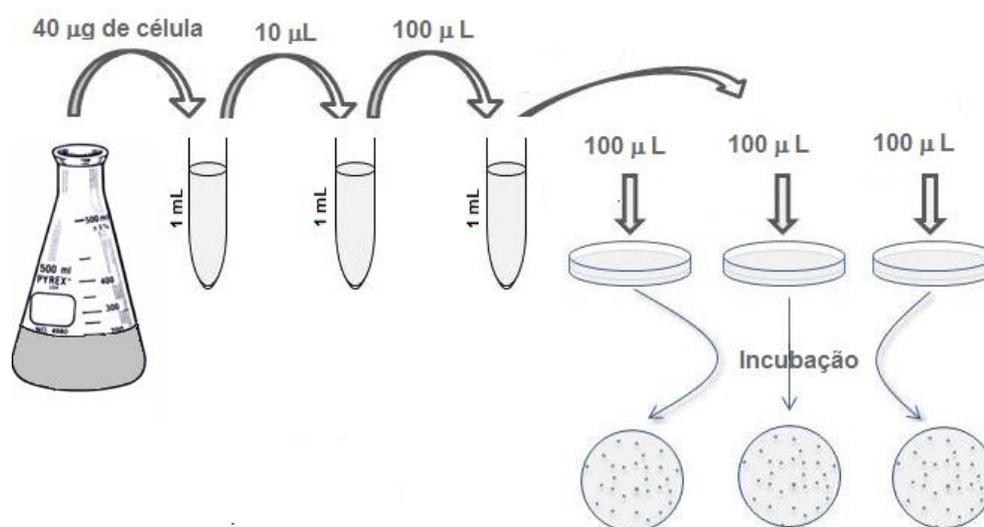


Figura 42. Estratégia experimental para a diluição e plaqueamento para a determinação da sobrevivência das células de *S. cerevisiae*.

Após o teste de citotoxicidade, foram realizados os testes de proteção celular. Para o estudo da atividade CAT mimética, induziu-se estresse oxidativo usando-se peróxido de hidrogênio (70 mmol dm^{-3}), já para o estudo da atividade Sod mimética, usou-se menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona (vitamina K3)) (20 mmol dm^{-3}) como fonte de radical superóxido.

Em Erlenmeyer de 25 cm^3 , foram adicionados 5 cm^3 de suspensão de células, na concentração de 0,8 a 1 mg de peso seco por cm^3 . O controle foi exposto a condições de estresse, enquanto outro grupo de células recebeu o pré-tratamento com os compostos e ligantes.

O inóculo foi feito usando o dobro do volume de meio necessário, após a adição dos compostos para o pré-tratamento, o restante do inóculo foi centrifugado, as células descartadas e meio reservado. Para o estresse com H_2O_2 , o experimento foi realizado em meio YPGLY 4%, para o estresse com menadiona, o experimento foi realizado em meio YPD 2%, em ambos experimentos, as células foram pré-tratadas com os compostos e ligantes na concentração de $25 \mu\text{mol.dm}^{-3}$, por durante 60 min a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o pré-tratamento a suspensão de células foi centrifugada e em seguida as células foram lavadas duas vezes com água destilada estéril ($5 \text{ cm}^3/\text{lavagem}$). Em seguida as células foram ressuspensas no meio de cultivo inicial (que foi reservado previamente) e expostas ao estresse com peróxido de hidrogênio ou menadiona por uma hora a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e 160 rpm. Após o pré-tratamento e o estresse as células foram então diluídas e plaqueadas em placas de petri com meio sólido YPD

2%. As placas foram incubadas por 72 horas a 28 °C e as colônias formadas foram contadas.

Estes estudos foram realizados em colaboração do Prof. Marcos Dias Pereira, no Departamento de Bioquímica da UFRJ.

3.5. Investigação da atividade antitumoral

3.5.1. Diluição, concentrações e armazenamento dos compostos

Para a realização dos estudos de atividade antitumoral, os compostos em estudo, na concentração de $2 \cdot 10^{-2}$ mol dm⁻³ (sais metálicos, ligantes orgânicos e compostos de coordenação), foram dissolvidos em DMSO (dimetilsulfóxido). A partir dessas soluções, foram feitas diluições até as concentrações de trabalho (400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6 µmol dm⁻³). Para alcançar as concentrações de trabalho os compostos, previamente solubilizados em DMSO, foram diluídos em meio DMEM/F-12 (Gibco, BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1 % de gentamicina (Gibco, BRL) a fim de reduzir ao máximo a concentração do DMSO, que passa a ser tóxico para células quando acima de 5% em volume. As soluções dos compostos (em DMSO) mantiveram-se estáveis armazenadas de -5 a -25 °C em *freezer* durante todo o período dos estudos.

O composto de coordenação Cisplatina, usado no tratamento de diversos tipos de câncer, foi utilizado como controle positivo.

3.5.2. Cultura das linhagens de células cancerígenas

As linhagens de células de linfoma histiocítico (U937), leucemia monocítica aguda (THP-1), leucemia linfocítica aguda (MOLT-4), câncer de pulmão (H460) e câncer de cólon (COLO 205), foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC). Todas as linhagens foram cultivadas em meio DMEM/F-12 (Gibco, BRL) suplementado com 0,1% de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As células foram mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) a 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade controlada e o meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias.

3.5.3. Cultura das linhagens de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram obtidas do sangue de voluntários saudáveis. O sangue venoso foi coletado pelo sistema de tubos "Vacutainer™" (*Becton Dickinson*) contendo heparina sódica e processado pela metodologia descrita por Bennett e Breit (1994). O sangue total coletado foi lentamente adicionado sobre o Ficoll-Paque™ Plus (1,08 g cm⁻³), na proporção de 2:1 (20 cm³ de sangue para 10 cm³ de Ficoll), em tubos de 50 cm³, e centrifugado (Centrifuga Sorval, RT7) a 100 xg por 40 min, 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/F-12) gelado e em seguida, centrifugado a 100 xg por 10 min a 4 °C. Após o processo de lavagem o "pellet" formado foi ressuspenso em DMEM/F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,1% de gentamicina e 0,25 µg cm⁻³ de enterotoxina B de *Staphilococcus* (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 periférico humano (PBMC), foram utilizadas para realização do teste de viabilidade celular por metabolização do MTT.

3.5.4. Cálculo da concentração de células cancerígenas

As células neoplásicas (U937, THP-1, MOLT-4, H460 e COLO 205) 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 posterior ajuste da concentração. A concentração de células usada em todos os testes biológicos foi 1x10⁶ células cm⁻³.

3.5.5. Avaliação do efeito dos compostos na viabilidade celular através do método de metabolização do MTT

O teste de viabilidade celular pelo ensaio de metabolização do MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio]) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983) com algumas alterações, que consiste na redução do MTT a formazan, composto de cor púrpura, pela succinato desidrogenase mitocondrial (Figura 43).

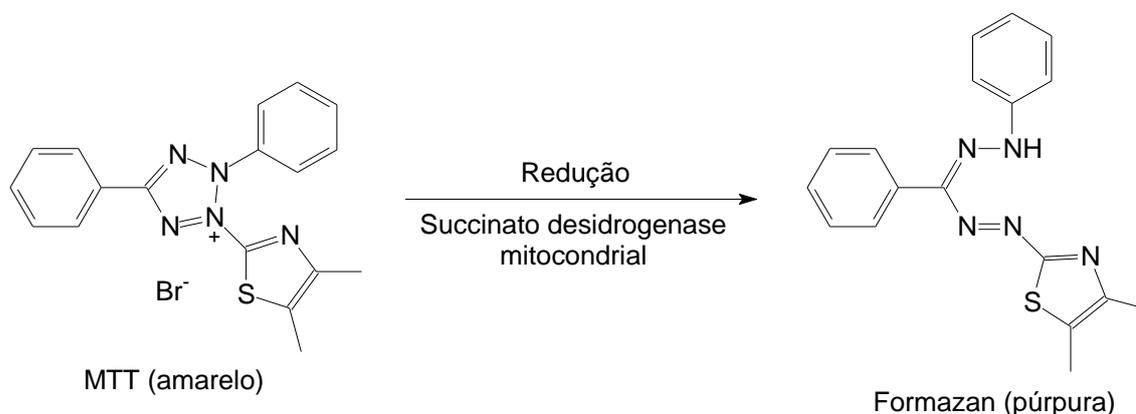


Figura 43. Esquema da redução do MTT a formazan pela succinato desidrogenase mitocondrial.

O estudo da atividade antitumoral foi realizado em uma linhagem de adenocarcinoma colorretal (COLO 205), duas linhagens leucêmicas (THP-1 e MOLT-4 (leucemia monocítica aguda e linfoblástica aguda, respectivamente)), uma linhagem de linfoma histiocítico (U937) e uma linhagem de carcinoma de pulmão de células não pequenas (H460).

As células foram plaqueadas em volume de 100 μdm^3 /poço em placas de 96 poços, tratadas com os compostos de coordenação, os ligantes orgânicos, sais metálicos e a cisplatina (0,1 cm^3 da solução dos tratamentos em meio DMEM/F-12 suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 0,1 % de gentamicina) nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ e mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ e umidade controlada por 36 horas. Após o tempo determinado (36 horas) foram adicionados 0,01 cm^3 de MTT (5 mg cm^{-3}) para cada 0,1 cm^3 de meio de cultivo e as placas foram mantidas na estufa por mais quatro horas. Após esse período foram retirados 0,15 cm^3 do sobrenadante de cada poço e em seguida, adicionado 0,12 cm^3 de uma solução de HCl (0,146 %) em isopropanol,

homogeneizando bem até a completa dissolução dos cristais de sal formados. Em seguida as placas foram centrifugadas e o sobrenadante transferido para uma placa de 96 poços limpa, que foi lida em espectrofotômetro (Epoch™, BioTek® Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicada com no mínimo duas repetições isoladas.

3.5.6. Avaliação do tipo de morte celular através da marcação com Anexina V e iodeto de propídio

Para a avaliação do tipo de morte usando a marcação com Anexina V e iodeto de propídio (PI), a linhagem U937 foi plaqueada ($1 \text{ cm}^3/\text{poço}$) na concentração de 1×10^6 células cm^{-3} em meio DMEM/F-12, em placa de 24 poços e tratada com os compostos C2 e C3 na concentração de $80 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, durante 24 horas. A marcação com Anexina V/PI foi feita de acordo com o protocolo do kit *AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit* (SIGMA-ALDRICH). Após a incubação lavadas duas vezes ($0,5 \text{ cm}^3$ por lavagem) em tampão fosfato-salino (PBS) e ressuspensas no tampão de ligação fornecido pelo kit (100 mmol dm^{-3} HEPES/NaOH, pH 7,5, contendo $1400 \text{ mmol dm}^{-3}$ de NaCl e 25 mmol dm^{-3} de CaCl_2). Em tubo de $1,5 \text{ cm}^3$, foram adicionados $0,5 \text{ cm}^3$ da solução de tampão de ligação contendo as células tratadas, $0,005 \text{ cm}^3$ de Anexina V e $0,01 \text{ cm}^3$ de Iodeto de Propídio (PI) para cada amostra. As amostras foram deixadas no escuro por exatamente 10 minutos. Imediatamente após esse tempo, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur). Foram contados 10.000 eventos por amostra. Os histogramas e as porcentagens de células em apoptose foram obtidos através do software WinMDI, versão 2.9.

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

Células da linhagem U937 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células cm^{-3} em placas de 24 poços, tratadas com $80 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ do composto C3, e incubadas por 24 horas em estufa (37°C e 5% de CO_2). Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço (1 cm^3) foi transferido para tubos de 2 cm^3 e

centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e as células incubadas por 15 minutos em estufa (37°C e 5% de CO₂) com 0,5 cm³ de solução de JC-1 (25 µg cm⁻³ diluído 1:1000 em meio de cultura DMEM/F-12). As células em suspensão foram lavadas duas vezes com 2 cm³ de meio de cultura DMEM/F-12 sem suplementação. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 0,5 cm³ de meio DMEM/F-12 sem soro fetal bovino. A leitura das amostras foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo (FACS Calibur). Foram contados 10.000 eventos por amostra e os gráficos *Dot-plot* e a porcentagem de células com mitocôndrias normais e comprometidas foram obtidos através do software WinMDI, versão 2.9.

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

Células da linhagem U937 foram plaqueadas na concentração de 1x10⁶ células cm⁻³ em placas de 24 poços (1 cm³/poço), tratadas com composto C3 (1 cm³/poço) na concentração de 80 µmol dm⁻³ e incubadas por 24 h em estufa à 37 °C e 5 % de CO₂. As células controle foram incubadas apenas com meio DMEM/F-12 (Gibco, BRL) suplementado com 1 % de gentamicina (Gibco, BRL). Em seguida as células foram processadas segundo método descrito por Gong e colaboradores (1994). Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço (2 cm³) foi transferido para tubos de 2 cm³ e centrifugado por 10 min a 200 xg. As células foram lavadas duas vezes com PBS (1 cm³/lavagem), foi adicionado lentamente 1 cm³ 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 200 xg por 5 min e lavadas com tampão fosfato-citrato (200 mmol dm⁻³, pH=7,8). O sobrenadante foi desprezado e as células foram incubadas com 0,05 cm³ de RNase (100 µg cm⁻³), à temperatura ambiente por 15 min. A seguir, foram adicionados 0,4 cm³ de iodeto de propídio (concentração final 50 µg cm⁻³). 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.

3.5.9. Estudo das alterações morfológicas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.)

Para a análise de M.E.T., utilizaram-se células de U937 na concentração de 1×10^6 células cm^{-3} . As células foram incubadas com o composto de cobalto, **3**, na concentração de $80 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ por 4 e 8 h em estufa a 37°C , com 5% de CO_2 e umidade controlada. As células foram centrifugadas, por 10 min a 200 xg e lavadas duas vezes com Tampão Salino Fosfato (PBS, pH 7,2). O “*pellet*” foi fixado por 1h com glutaraldeído 2,5% (Sigma ®, EUA) e tampão cacodilato de sódio $0,1 \text{ mol} \cdot \text{d}^{-3}$ pH 7.4. Após a fixação as células foram lavadas duas vezes no mesmo tampão, pós-fixadas por 20 minutos, protegidas da luz, em solução 1:1 com tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8%, lavadas três vezes com o mesmo tampão e desidratadas em séries crescentes de acetona: 50%, 70%, 90% e a 100% três vezes (durante 20 minutos cada etapa). Para a infiltração em resina foi utilizado uma mistura de acetona/EPON®, na proporção de 2:1, 1:1, 1:2 por 8h cada troca. Posteriormente as amostras foram embebidas em EPON puro, acomodadas em moldes de silicone e polimerizada por 48h a 60°C . Os blocos polimerizados foram seccionados em ultramicrótomo *Reichert Ultracult S* e os cortes ultrafinos colocados em grades de cobre. As micrografias foram tiradas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo TEM-900 (Zeiss, Alemanha).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos compostos orgânicos

Foram sintetizados três ligantes orgânicos para complexação com sais metálicos de cobalto(II) e ferro(III).

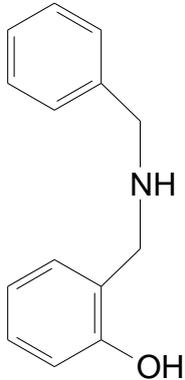
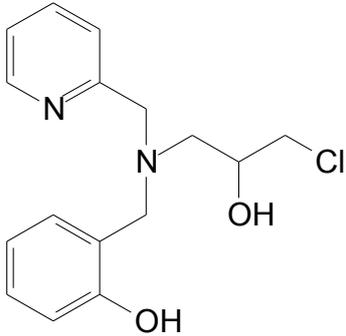
Neste item são apresentados os resultados da caracterização físico-química dos compostos orgânicos, a qual foi realizada por espectroscopia no infravermelho e RMN ^1H . Estas caracterizações tiveram por objetivo confirmar a obtenção e a pureza dos precursores e ligantes que foram sintetizados a partir de metodologias já descritas na literatura (H2L1, H2L2 e H2L3).

4.1.1. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos em pastilha de KBr e as principais bandas obtidas nos espectros e os respectivos valores descritos na literatura são apresentados a seguir.

A Tabela 9 apresenta os dados de espectroscopia no infravermelho, obtidos para o precursor P1 e para o ligante H2L1, a atribuição e os respectivos dados relatados na literatura.

Tabela 9. Principais bandas observadas no espectro no infravermelho para o precursor P1 e o ligante H2L1, obtido em pastilha de KBr e comparação com os dados relatados na literatura.

Atribuição	P1	Literatura*	H2L1	Literatura*
	Número de onda (cm ⁻¹)			
v NH	3263	3263	-	-
v OH	3063	200 – 3200	3500 - 2500	3500 – 2500
v CH _{aromático}	3047, 3012	3040, 3009	3032, 3014	3053, 3016
v _{as} CH ₂	2947	2947	2949	2951
v _s CH ₂	2860	2862	2841	2831
v C=C e C=N	1597, 1568, 1492, 1433	1589, 1566, 1458, 1427	1595, 1572, 1485, 1438	1595, 1587, 1487, 1435
v C-O	1284	1280	1249	1250
v C-N	1109	1111	1095	1095
γ-CH ^a ; β-anel ^b	769	756	754	756
v C-Cl	-	-	636	636

*Fonte: LUBE, 2011. a= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; b= deformação do anel de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos.

A Tabela 10 apresenta os dados de espectroscopia no infravermelho, para os precursores P2 e P3, respectivamente. Os precursores P2 e P3 apresentam uma banda no espectro de infravermelho atribuída ao estiramento OH da molécula de água proveniente de umidade da amostra.

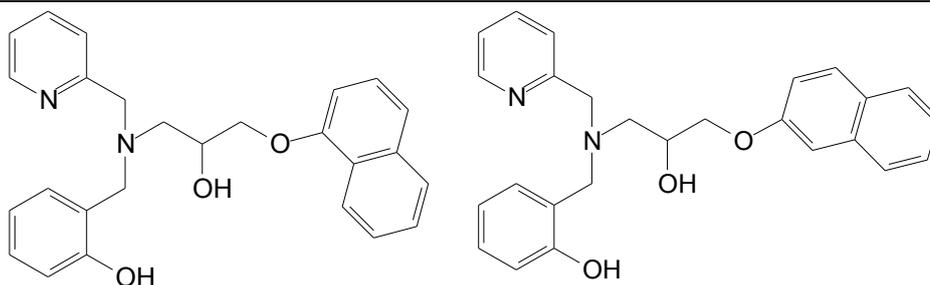
Tabela 10. Principais bandas observadas no espectro no infravermelho para os precursores P2 e P3, obtidos em pastilha de KBr, e comparação com dados relatados na literatura.

Atribuição	P2	Literatura*	P3	Literatura*
	Número de onda (cm ⁻¹)			
v OH	3495	-	3433	3482
v CH _{aromático}	3053, 3003	3055, 3003	3090, 3062	3057, 3001
v _{as} CH ₂	2926	2926	2974, 2931	2924
v _s CH ₂	2875	2874	2885	2874
v C=C	1627, 1595, 1579, 1508, 1462, 1396, 1348	1595, 1579, 1508, 1462, 1396	1618, 1507, 1425, 1396, 1355	1629, 1599, 1508, 1469, 1388
v _{as, s} C-O-C	1271, 1240	1271, 1240	1278, 1230	1258
δ CH _{aromático}	1219, 1178	1101	1207, 1155	1217, 1184
γ-CH ^b ; β-anel ^c	862, 792, 771	793, 771	831, 761	839, 748

*Fonte: FERNANDES, et al., 2015. a= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; b= deformação do anel de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos.

A Tabela 11 apresenta os dados obtidos nos espectros no infravermelho para os ligantes H2L2 e H2L3, as atribuições e os dados respectivos descritos na literatura.

Tabela 11. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho para os ligantes H2L2 e H2L3, obtido pastilha de KBr.



Atribuição	H2L2	Literatura*	H2L3	Literatura*
	Número de onda (cm ⁻¹)			
ν OH	3500 – 2800	3300 – 2800	3452	3300
ν CH _{aromático}	3053	3051	3053	3055
ν_{as} CH ₂	2930, 2875	2927	2949, 2872	2928
ν_s CH ₂	2833	2831	2835	2828
ν C=C; ν C=N	1581, 1508, 1489, 1458, 1398	1581, 1489, 1400	1627, 1599, 1508, 1450, 1395	1628, 1597, 1512, 1469
ν_{as} C-O-C	1269	1269	1257	1258
ν C-O ^a	1242	1242	1217	1217
δ CH _{aromático}	1103	1103	1180	1180
γ -CH ^b ; β -anel ^c	792, 756	791, 756	839, 763	837, 752

*Fonte: FERNANDES, et al., 2015; 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.

Para todos os precursores e ligantes os valores das bandas ficaram próximas às relatadas na literatura, confirmando a obtenção dos mesmos.

4.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H RMN)

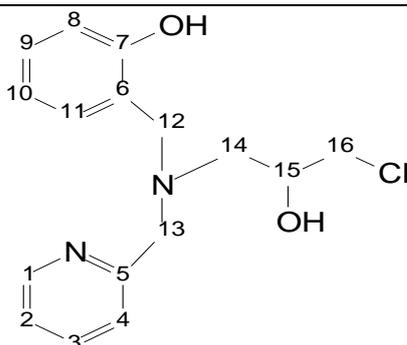
Os dados de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H RMN) foram obtidos em clorofórmio deuterado, tais dados são apresentados a seguir, assim como a atribuição, em comparação com os dados descritos na literatura (Tabela 12 a Tabela 17).

Tabela 12. Dados de ^1H RMN para o precursor P1, obtidos em CDCl_3 , atribuições e comparação com valores relatados na literatura.

	P1	Literatura* (CDCl_3)
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
C		
5	-	-
6	-	-
7	-	-
CH		
1	8,58 (dd, $J_{1-2} = 5$ Hz; $J_{1-3} = 2$ Hz)	8,58
2	7,15 - 7,23 (m)	7,15 - 7,23
3	$J_{3-2} = 8$ Hz; $J_{3-4} = 8$ z; $J_{3-1} = 2$ Hz)	7,65
4	7,15 - 7,23 (m)	7,15 - 7,23
8	6,86 (m)	6,86
9	7,15 - 7,23 (m)	7,15 - 7,23
10	6,77 (dt, $J_{10-11} = 7$ Hz; $J_{10-9} = 7$ Hz; $J_{10-8} = 1$ Hz)	6,78
11	6,97 (d, $J_{11-10} = 7$)	6,97
CH₂		
12	3,83 (s)	3,89
13	4,00 (s)	4,00
NH	2,90 (s)	Não observado
OH	Não observado	Não observado

* Fonte: LUBE, 2011. d= dupletto; dt= duplo triplete; m= multipletto; s= simpleto.

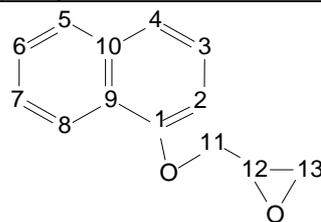
Tabela 13. Dados de ^1H RMN ^1H para o ligante H2L1, obtidos em CDCl_3 , atribuições e comparação com os valores relatados na literatura.



	H2L1 (CDCl_3)	Literatura* (CDCl_3)
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
C		
5	-	-
6	-	-
7	-	-
CH		
1	8,58 (m)	8,5 (d)
2	7,11 – 7,28 (m)	6,6 – 7,10 (m)
3	7,67 (dt, $J_{3-2} = 8$ Hz; $J_{3-4} = 8$ Hz; $J_{3-1} = 2$ Hz)	7,50 (dt)
4	7,11 – 7,28 (m)	6,6 – 7,10 (m)
8	6,74 – 6,90 (m)	6,6 – 7,10 (m)
9	7,11 – 7,28 (m)	6,6 – 7,10 (m)
10	6,74 – 6,90 (m)	6,6 – 7,10 (m)
11	7,01 (dd, $J_{11-10} = 7$ Hz; $J_{11-9} = 1$ Hz)	6,6 – 7,10 (m)
15	3,38 – 4,10 (m)	3,60 – 3,90 (m)
CH₂		
12	3,38 – 4,10 (m)	3,60 – 3,90 (m)
13	3,38 – 4,10 (m)	3,60 – 3,90 (m)
14	2,73 – 2,87 (m)	3,40 (dd)
16	3,48 (m)	2,70 (dd)

* Fonte: HORN et al., 2000. d= duplete; dd= duplo duplete; dt= duplo tripleto; m= multipleteo.

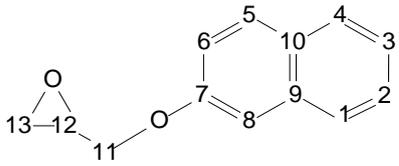
Tabela 14. Dados obtidos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) do precursor P2 e suas respectivas atribuições e comparação com os dados relatados na literatura.



	P2 (CDCl_3)	Literatura* (CDCl_3)
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
C		
1	-	-
9	-	-
10	-	-
CH		
2	6,83 ($J = 8\text{Hz}$)	6,83 (d; $J_{2-3} = 7,68\text{ Hz}$)
3	7,37 (t; $J = 8\text{Hz}$)	7,36 (t; $J_{3-4} = J_{3-2} = 8,00\text{ Hz}$)
4	7,46 (d; $J_{4-3} = 8\text{ Hz}$)	7,45 (d; $J_{4-3} = 7,60\text{ Hz}$)
5	7,80-7,82 (m)	7,78 – 7,81 (m)
6	7,50 (t, $J = 4\text{ Hz}$)	7,49 (m)
7	7,50 (t, $J = 4\text{ Hz}$)	7,49 (m)
8	8,30 – 8,32 (m)	8,29 – 8,31 (m)
12	3,49 – 3,54 (m)	3,47 – 3,51 (m)
CH₂		
11	4,42 (dd; $J_{11-11} = 11\text{ Hz}$; $J_{11-12} = 3\text{ Hz}$); 4,18 (dd; $J_{11-11} = 11\text{ Hz}$; $J_{11-12} = 6\text{ Hz}$)	4,39 (dd; $J_{11-11} = 11,00\text{ Hz}$; $J_{11-12} = 5,59\text{ Hz}$)
13	2,99 (t, $J = 4$); 2,87 – 2,88 (m)	2,96 (t; $J_{12-12} = 4,90\text{ Hz}$; $J_{12-11} = 4,20\text{ Hz}$); 2,84 (dd; $J_{10-10} = 11,00\text{ Hz}$; $J_{12-11} = 2,92\text{ Hz}$)

*Fonte: LOPES, 2012; d= duplete; dt= duplo tripleto; m= multiplete; s= simpleto.

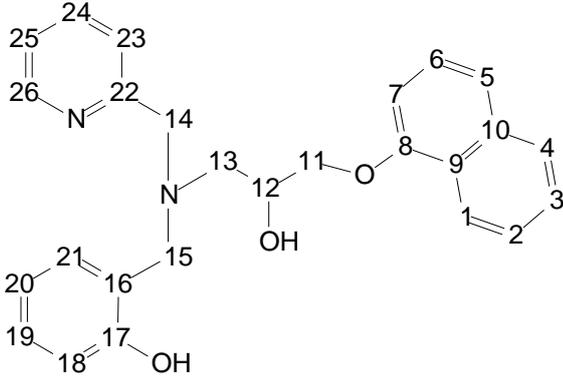
Tabela 15. Dados de ^1H RMN para o precursor P3, obtidos em CDCl_3 , atribuições e comparação com valores relatados na literatura.



	P3 (CDCl_3)	Literatura* (CDCl_3)
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
C		
7	-	-
9	-	-
10	-	-
CH		
1	7,72 – 7,79 (m)	7,71 – 7,78 (m)
2	7,36 (t; $J = 7,5$ Hz)	7,42 – 7,46 (m)
3	7,45 (t; $J = 7,5$ Hz)	7,32 – 7,36 (m)
4	7,72 – 7,79 (m)	7,71 – 7,78 (m)
5	7,72 – 7,79 (m)	7,71 – 7,78 (m)
6	7,19 (dd; $J_{6-5} = 9$ Hz; $J_{6-8} = 2,5$ Hz)	7,19 (dd; $J_{6-5} = 8,76$; $J_{6-8} = 3,6$)
8	7,16 (s)	7,14 (d; $J_{1-3} = 3,4$)
12	3,42 – 3,48 (m)	3,41 – 3,44 (m)
CH₂		
11	4,36 (dd; $J_{11-11} = 11$ Hz; $J_{11-12} = 3$ Hz); 4,10 (dd; $J_{11-11} = 11$ Hz; $J_{11-12} = 6$ Hz)	4,35 (dd; $J_{11-11} = 10,97$ Hz; $J_{11-12} = 3,40$ Hz); 4,08 (dd; $J_{11-11} = 10,76$ Hz; $J_{11-12} = 5,12$ Hz)
13	2,82 – 2,84 (m); 2,96 (t; $J_{13-13} = 4,5$ Hz)	2,95 (t; $J_{13-13} = 4,88$ Hz; $J_{13-12} = 4,16$ Hz); 2,82 (dd; $J_{13-13} = 5,56$ Hz; $J_{13-12} = 2,65$ Hz)

* Fonte: LOPES, 2012; d= dupleteo; dt= duplo tripleteo; m= multipleteo; s= simpleto.

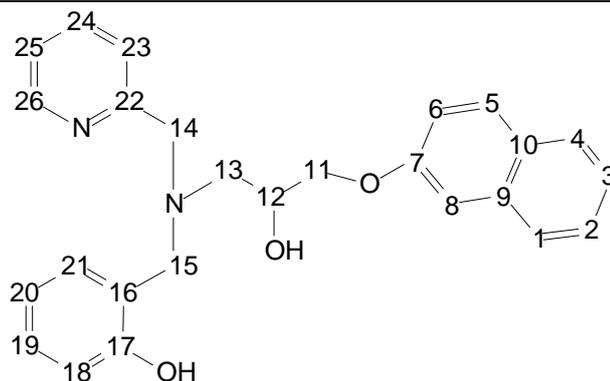
Tabela 16. Dados de ^1H RMN para o ligante H2L2, obtidos em CDCl_3 , e comparação com valores relatados na literatura.



	H2L2 (CDCl_3)	Literatura* (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
C		
7	-	-
9	-	-
10	-	-
16	-	-
17	-	-
22	-	-
CH		
1	8,03 (d)	8,03 (d)
2	7,49 – 7,46 (m)	7,48 (t)
3	7,49 – 7,46 (m)	7,48 (t)
4	7,78 (d)	7,78 (d)
5	7,43 – 7,41 (m)	7,44 – 7,41 (m)
6	7,34 (t)	7,34 (t)
7	6,76 (d)	6,77 (d)
12	4,40 – 4,36 (m)	4,39 – 4,35 (m)
18	6,93 – 6,88 (ddd)	6,89 (d)
19	7,24 – 7,18 (m)	7,25 – 7,17 (m)
20	6,81 (tt)	6,81 (t)
21	7,09 – 7,05 (ddd)	7,06 (d)
23	7,24 – 7,18 (m)	7,25 – 7,17 (m)
24	7,68 (td)	7,69 (t)
25	7,24 – 7,18 (m)	7,25 – 7,17 (m)
26	8,63 (d)	8,63 (d)
CH₂		
11	4,17 (m); 4,07 – 4,02 (m)	4,13 (d); 4,08 – 4,03 (m)
13	3,00 (d)	3,00 (d)
14	4,07 – 4,02 (m); 4,15 – 4,12 (m)	4,08 – 4,03 (m); 4,19 – 4,15 (m)
15	3,99 – 3,90 (m); 3,83 – 3,79 (m)	4,00 – 3,92 (m); 3,84 – 3,79 (m)

* Fonte: LOPES, 2012. d= duplete; dd= duplo duplete; t= tripleto; m= multiplete.

Tabela 17. Dados de ^1H RMN para o ligante H2L3, obtidos em CDCl_3 , e comparação com valores relatados na literatura.



	H2L3 (CDCl_3)	Literatura* (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
C		
7	-	-
9	-	-
10	-	-
16	-	-
17	-	-
22	-	-
CH		
1	7,66 – 7,77 (m)	7,68 – 7,71 (m)
2	7,66 – 7,77 (m)	7,42 (t)
3	7,44 (t; $J = 7,6$ Hz)	7,32 (t)
4	7,66 – 7,77 (m)	7,74 (d)
5	7,33 (t; $J = 7,5$ Hz)	7,17 (d)
6	7,20 (m)	7,07 – 7,10 (m)
8	7,25 (m)	7,07 – 7,10 (m)
12	4,27 (s)	4,25 – 4,28 (m)
18	7,20 (m)	6,87 (dd)
19	7,01 – 7,10 (m)	7,02 – 7,04 (m)
20	6,78 – 6,89 (m)	6,79 (t)
21	7,01 – 7,10 (m)	7,02 – 7,04 (m)
23	7,33 (t; $J = 7,5$ Hz)	7,17 (d)
24	7,66 – 7,77 (m)	7,65 (dd)
25	7,44 (t; $J = 7,6$ Hz)	7,20 – 7,24 (t)
26	8,60 – 8,64 (m)	8,61 (m)
CH₂		
11	3,96 – 4,14 (m)	4,02 – 4,06 (m); 3,92 – 4,00 (m)
13	2,87 – 2,96 (m)	2,91 (m)
14	3,96 – 4,14 (m)	4,11 (d); 3,92 – 4,00 (m)
15	3,96 – 4,14 (m); 3,79 (d; $J_{15-15} = 7$ Hz)	3,92 – 4,00 (m); 3,78 (d)

* Fonte: LOPES, 2012. d= duplete; dd= duplo duplete; t= triplete; m= multiplete.

Os dados de ^1H RMN obtidos para os precursores (P1 - P3) e para os ligantes (H2L1, H2L2 e H2L3) estão de acordo com os dados descritos previamente na literatura, comprovando a obtenção e pureza destes.

4.2. Caracterização físico-química dos compostos de coordenação

4.2.1. Espectroscopia no infravermelho

O espectro no infravermelho (Figura 44) para o composto de coordenação de cobalto **1** apresenta as bandas típicas do anel aromático (C=C e C=N) em 1600, 1570, 1477 e 1440 cm^{-1} e bandas características do anel 1,2-dissubstituído dos grupos piridínicos em 763 e 713 cm^{-1} , confirmando a presença do ligante H2L1 em sua estrutura. A presença dos grupos metilenos é confirmada pelo aparecimento do estiramento C-H assimétrico em 2958 cm^{-1} e simétrico em 2901 cm^{-1} (FERNANDES, et al., 2014; FERNANDES, et al., 2010). Em 3433 cm^{-1} observa-se uma banda alargada referente ao estiramento OH das moléculas de água (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

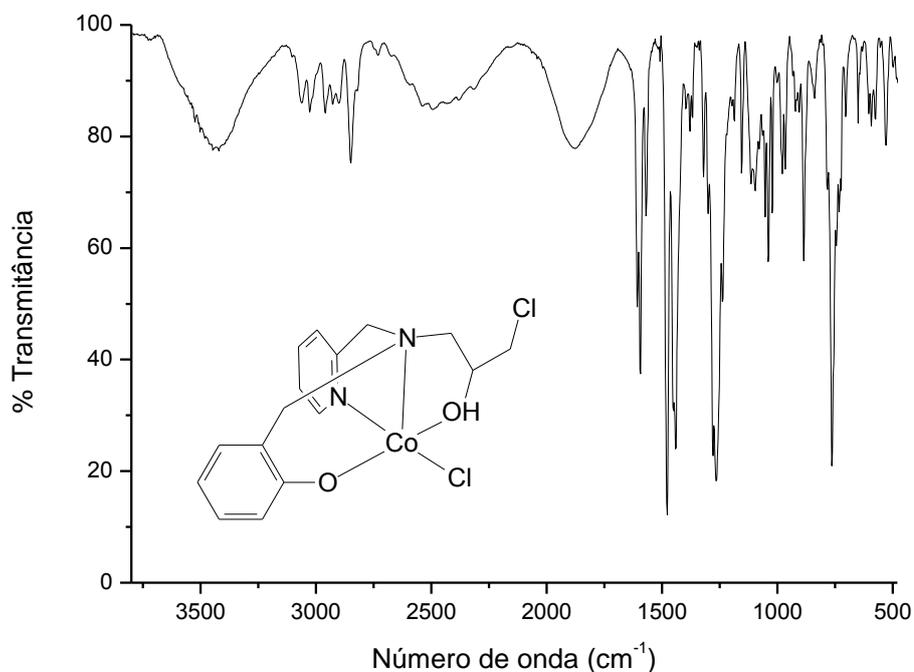


Figura 44. Espectro na região do infravermelho para o composto **1**.

O espectro no infravermelho do composto de cobalto **2** (Figura 45) apresenta as bandas características do ligante H2L2, confirmadas pela presença da deformação axial do anel aromático (C=C e C=N), presentes na região entre 1614 e 1448 cm^{-1} . A presença do grupo piridínico pode ser avaliada também pela banda característica de anel heteroaromático do grupo piridínico em 765 cm^{-1} . As bandas de deformação axial assimétrica e simétrica de C–H do grupo metileno em 2897 e 2868 cm^{-1} também confirmam a presença do ligante coordenado ao centro de cobalto.

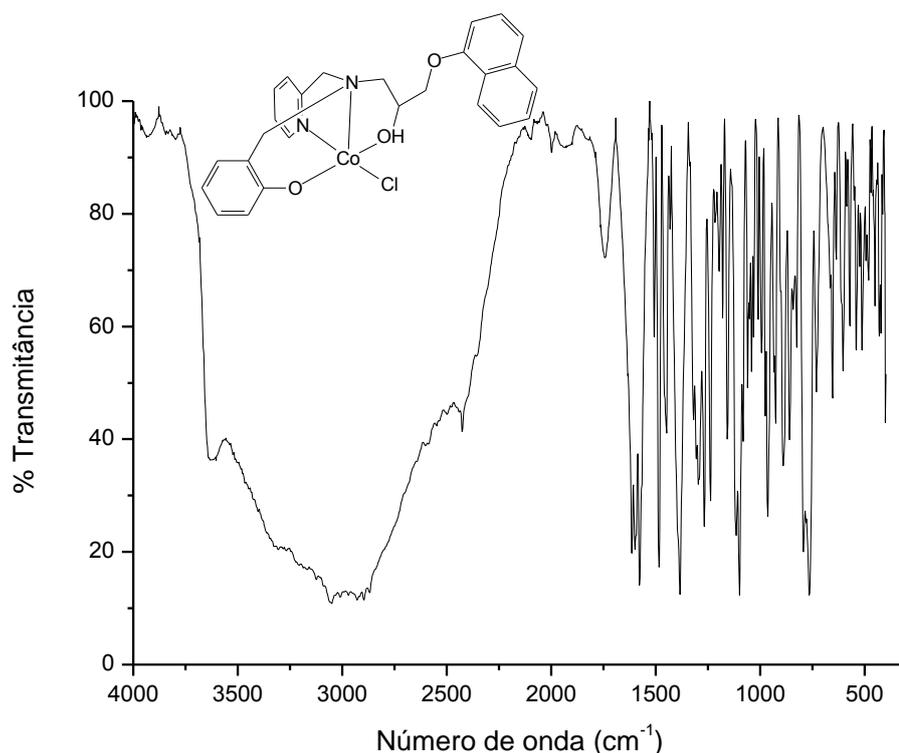


Figura 45. Espectro na região do infravermelho para o composto **2**.

O espectro no infravermelho do composto **3** (Figura 46) apresenta as bandas características do ligante H2L3, confirmadas pela presença da deformação axial do anel aromático (C=C e C=N), presentes na região entre 1626 e 1446 cm^{-1} . A presença do grupo piridínico pode ser avaliada também pela banda intensa característica de anel heteroaromático do grupo piridínico, em 761 cm^{-1} . As bandas de deformação axial assimétrica e simétrica de C–H do grupo metileno em 2962 e 2893 cm^{-1} também confirmam a presença do ligante coordenado ao centro de cobalto (FERNANDE, et al., 2015).

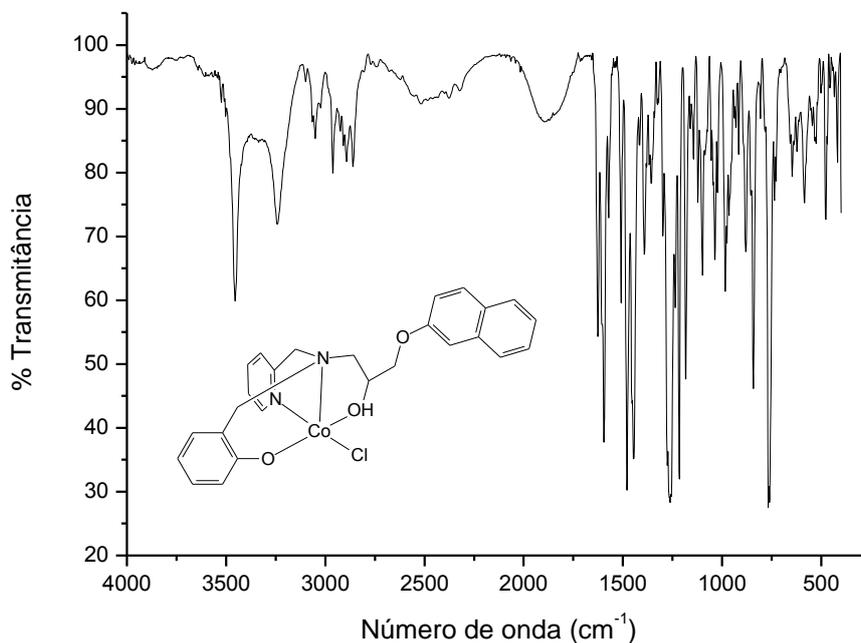


Figura 46. Espectro na região do infravermelho para o composto **3**.

A Tabela 18 apresenta os dados da espectroscopia na região do infravermelho para os compostos de cobalto **1**, **2** e **3** e suas respectivas atribuições.

Tabela 18. Principais bandas observadas no espectro no infravermelho para os compostos de cobalto.

Atribuição	1	2	3
	Número de onda (cm ⁻¹)		
ν OH	3433	3419	3452
ν CH _{aromático}	3061 e 3030	3084 e 3038	3053
ν_{as} CH ₂	2958	2941	2949, 2872
ν_s CH ₂	2901	2922	2835
ν C=C; ν C=N	1600, 1570, 1477, 1440	1614, 1577, 1485, 1448	1627, 1599, 1508, 1450, 1395
γ -CH ^b ; β -anel ^c	760, 732	765, 731	839, 763

Os dados de espectroscopia na região do infravermelho obtidos para o composto **4** e os dados descritos na literatura para o mesmo são apresentados na Tabela 19. Os dados obtidos estão de acordo com os dados descritos previamente (SILVA, et al., 2008) e com a estrutura proposta, o que confirma a obtenção do composto de ferro **4**.

O espectro na região do infravermelho para o composto de ferro **5** (Figura 47) apresenta vibrações características do ligante H2L2 um pouco deslocadas em relação à posição das mesmas no ligante livre, indicando a coordenação do ligante ao centro de ferro (III). O espectro apresenta as bandas características do anel aromático (C=C, C=N) em 1577, 1506, 1477 e 1452 cm^{-1} . A presença dos grupos metílenos é confirmada pelo estiramento C-H alifático assimétrico em 2926 cm^{-1} e o simétrico em 2874 cm^{-1} . As principais bandas e atribuição são apresentadas na Tabela 22 (FERNANDES, et al 2015).

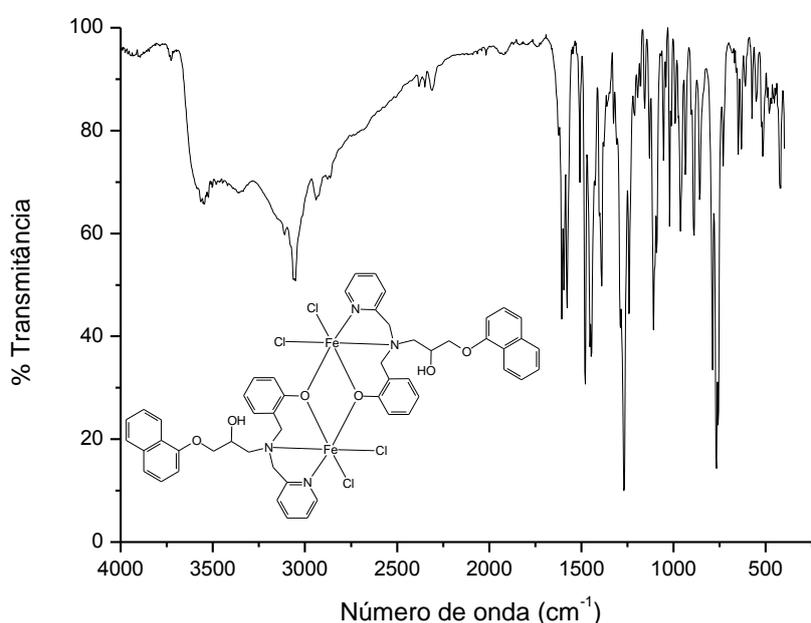


Figura 47. Espectro na região do infravermelho para o composto de ferro **5**.

O espectro na região do infravermelho para o composto de ferro **6** (Figura 47) apresenta bandas características do ligante H2L3, como as bandas de deformação axial do anel aromático (C=C e C=N) entre 1599, 1573, 1510, 1479 e 1454 cm^{-1} . A banda característica do anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico é observada em 773 cm^{-1} . Outra confirmação da presença do anel aromático na estrutura do complexo é a presença de bandas de deformação axial de C-H aromático em 3059 e 3038 cm^{-1} . A banda larga 3300 cm^{-1} é característica da deformação axial de O-H atribuída às moléculas de água de hidratação, os quais estão presentes na estrutura deste composto e foram devidamente confirmadas pela análise elementar de C, H, N (FERNANDES, et al., 2015).

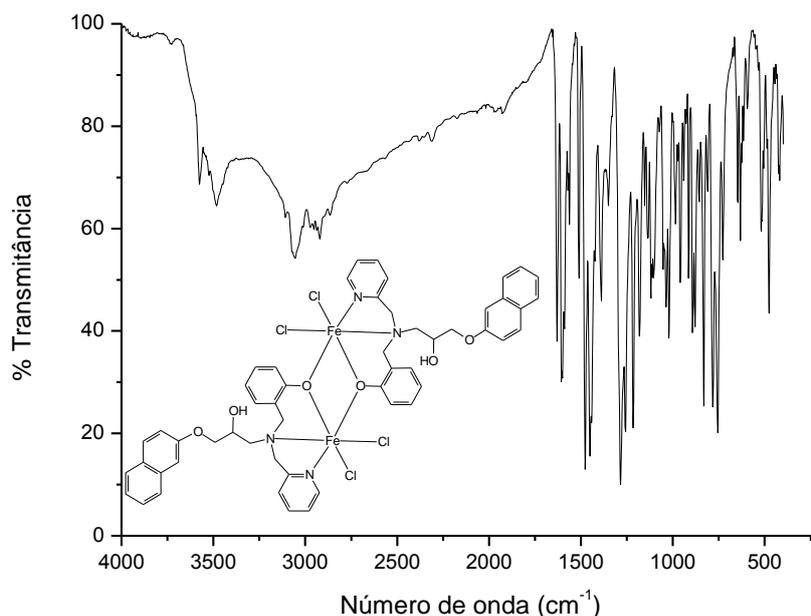


Figura 48. Espectro na região do infravermelho para o composto de ferro **6**.

Tabela 19. Principais bandas observadas no espectro no infravermelho para os compostos e ferro.

Atribuição	4	4*	5	6
	Número de onda (cm ⁻¹)			
ν OH	3323	3416	3547	3473
ν CH _{aromático}	3061	NI	3050	3056
ν_{as} CH ₂	2926	NI	2942	2922
ν_s CH ₂	2883	NI	2938	2866
ν C=C; ν C=N	1589, 1475, 1444	1591, 1479, 1449	1593, 1576, 1508, 1480, 1445	1562, 1510, 1478, 1451
γ -CH ^b ; β -anel ^c	757	756	767, 731	756, 728

a= deformação axial de C-O do fenol b= deformação C-H fora do plano de heteroaromáticos.

*Fonte: SILVA, et al., 2008 – NI = não informado.

4.2.2. Difração de raios-X

Foram obtidos monocristais adequados para a resolução da estrutura cristalina por difração de raios X para o composto de cobalto **3**, sendo os resultados apresentados e discutidos a seguir.

O composto **3** apresenta estrutura molecular composta por um átomo de cobalto(II) pentacoordenado, o qual está ligado a uma molécula do ligante H2L3 e a um ligante cloro (Cl1). O composto apresenta ainda molécula de solvente de

cristalização, sendo verificada a presença de meia molécula de isopropanol. A estrutura molecular obtida para o composto **3** é apresentada na Figura 49.

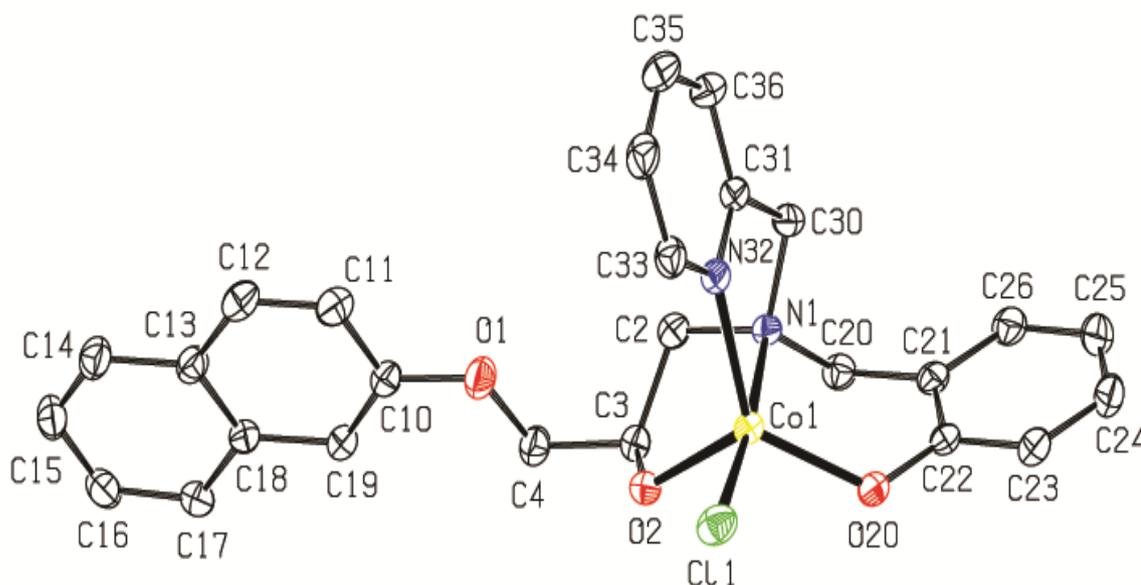


Figura 49. Estrutura de raios X para o composto de cobalto **3**. A molécula de solvente foi omitida para fins de clareza.

A molécula do ligante H2L3 está coordenada ao centro metálico através do átomo de nitrogênio piridínico N(32), do átomo de nitrogênio amínico N(1), do átomo de oxigênio do fenol O(20) que se encontra desprotonado e ao átomo de oxigênio do álcool O(2), o qual está protonado. No plano equatorial encontram-se um átomo de nitrogênio piridínico N(32), e os dois átomos de oxigênio, um do grupo álcool O(2) e outro do fenol O(20). No plano axial tem-se as ligações com o nitrogênio amínico N(1) e com o ligante cloro Cl(1), cujo comprimento de ligação de 2,317(6) Å é típico de ligação mais fraca devido a maior labilidade deste ligante. O centro metálico de cobalto (II) no composto **3** apresenta-se pentacoordenado, com geometria bipirâmide trigonal distorcida. O parâmetro τ define o grau de trigonalidade da estrutura de compostos pentacoordenados. Este parâmetro, para compostos com geometria piramidal de base quadrada perfeita, é igual a zero e igual a um para geometria bipirâmide trigonal perfeita. Assim a geometria bipirâmide trigonal distorcida pode ser confirmada pelo parâmetro τ obtido para o composto **3** ($\tau = 0,98$), onde $\tau = (\beta - \alpha)/60$ (ADDISON e RAO, 1984). $\beta = 174,86(4)^\circ$ para N(1)-Co(1)-Cl(1)

e $\alpha = 115,91(6)^\circ$ para O(20)-Co(1)-O(2). Os parâmetros cristalográficos para o composto **3** são apresentados na Tabela 20 e os principais comprimentos de ligação e ângulos são apresentados na Tabela 21.

Tabela 20. Parâmetros cristalográficos do composto de cobalto **3**.

Fórmula empírica	$C_{27,5}H_{29}ClCoN_2O_{3,5}$
Peso molecular	537,91
Temperatura	200(2) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P 21/c
Parâmetros de cela	$a = 10,2383(4)$ Å, $\alpha = 90^\circ$ $b = 22,8888(9)$ Å, $\beta = 105,971(2)^\circ$ $c = 11,4619(4)$ Å, $\gamma = 90^\circ$
Volume de cela	$2582,33(17)$ Å ³
Z	4
Densidade calculada	$1,384$ mg/m ³
Coeficiente de absorção	$0,802$ mm ⁻¹
F(000)	1120
Dimensões do cristal	$0,24 \times 0,18 \times 0,04$ mm ³
Intervalo de θ na coleta	$1,78$ para $31,16^\circ$
Intervalo de hkl na coleta	$-14 \leq h \leq 14$, $-33 \leq k \leq 33$, $-15 \leq l \leq 16$
Reflexões coletadas	55304
Reflexões independentes	8290 [R(int) = 0,0306]
Plenitude de teta = $31,16^\circ$	99,2 %
Correção de absorção	Semiempírico de equivalentes
Fatores de transmissão máx. e mín.	0,9686 e 0,8309
Método de refinamento	Matriz completa em F ²
Dados/parâmetros	8290 / 38 / 345
GOF	1,052
Índices finais R [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0,0450$, $wR2 = 0,1140$
Índices R (todos os dados)	$R1 = 0,0610$, $wR2 = 0,1241$
Picos máx. e mín.	$1,646$ e $-0,331$ e.Å

Tabela 21. Principais comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) observados para o composto de cobalto **3**.

Co(1)-O(20)	1,9724(13)	O(20)-Co(1)-N(1)	89,38(6)
Co(1)-O(2)	2,0466(14)	O(2)-Co(1)-N(1)	79,60(5)
Co(1)-N(32)	2,0814(15)	N(32)-Co(1)-N(1)	77,83(6)
Co(1)-N(1)	2,1897(15)	O(20)-Co(1)-Cℓ(1)	95,75(4)
Co(1)-Cℓ(1)	2,3179(6)	O(2)-Co(1)-Cℓ(1)	98,26(4)
O(20)-Co(1)-O(2)	115,91(6)	N(32)-Co(1)-Cℓ(1)	98,76(5)
O(20)-Co(1)-N(32)	127,71(6)	N(1)-Co(1)-Cℓ(1)	174,86(4)
O(2)-Co(1)-N(32)	111,22(6)	C(3)-O(2)-Co(1)	117,26(11)

4.2.3. Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio

Os dados da análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram obtidos para todos os compostos. A Tabela 22 apresenta os dados de CHN, onde os dados teóricos são apresentados entre parênteses.

Tabela 22. Dados da análise de C,H e N para os compostos de ferro e de cobalto.

	Composto	%C (calc.)	%H (calc.)	%N (calc.)
1	C₁₆H₁₇Cl₂CoN₂O₂	47,80 (48,02)	4,28 (4,29)	6,86 (7,00)
2	C₂₆H₂₅ClCoN₂O₃	61,46 (61,49)	4,79 (4,96)	5,40 (5,52)
3	C_{27,5}H₂₉ClCoN₂O_{3,5}	61,43 (61,40)	5,55 (5,43)	5,19 (5,21)
4	C₁₆H₂₀Cl₃FeN₂O₃	43,35** (42,84)	3,93 (4,04)	6,28 (6,24)
Literatura*	C₁₆H₂₀Cl₃FeN₂O₃	43,01 (42,84)	4,03 (4,04)	5,98 (6,24)
5	C₅₂H₅₆Cl₄Fe₂N₄O₉	55,21 (55,05)	4,91 (4,98)	5,03 (4,94)
6	C₅₂H₅₀Cl₄Fe₂N₄O₆	57,54 (57,80)	4,84 (4,66)	4,98 (5,19)

*Fonte: SILVA et al., 2008.

Valores experimental e teórico, este último entre parêntese, para o padrão metionina medido no mesmo dia da análise do composto **4: 40,77 (40,29).

Os dados da análise elementar confirmam a obtenção e pureza dos compostos. As propostas de estrutura molecular são apresentadas na Figura 50.

Os compostos de cobalto apresentam centro metálico pentacoordenado, estando ligados a um grupo amina, um grupo piridínico, um grupo álcool, um fenol do ligado orgânico e a um ligante cloro. Em todos os compostos existe apenas um centro metálico de Co^{II}, e o composto **3** apresenta isopropanol como molécula de cristalização.

Os compostos de ferro (**4**, **5** e **6**) são hexacoordenados e contém Fe^{III} . O composto **4** é mononuclear e além dos grupos N, O doadores do ligante, encontra-se coordenado a dois íons cloreto.

Os compostos **5** e **6** são binucleares, hexacoordenados e apresentam centro metálico de Fe^{III} . Cada centro metálico está coordenado a uma amina, uma piridina, dois grupos fenóis (um grupo de cada ligante, num total de dois ligantes por molécula) e dois íons cloreto. A análise elementar do composto **5** indica a presença de três moléculas de água de hidratação.

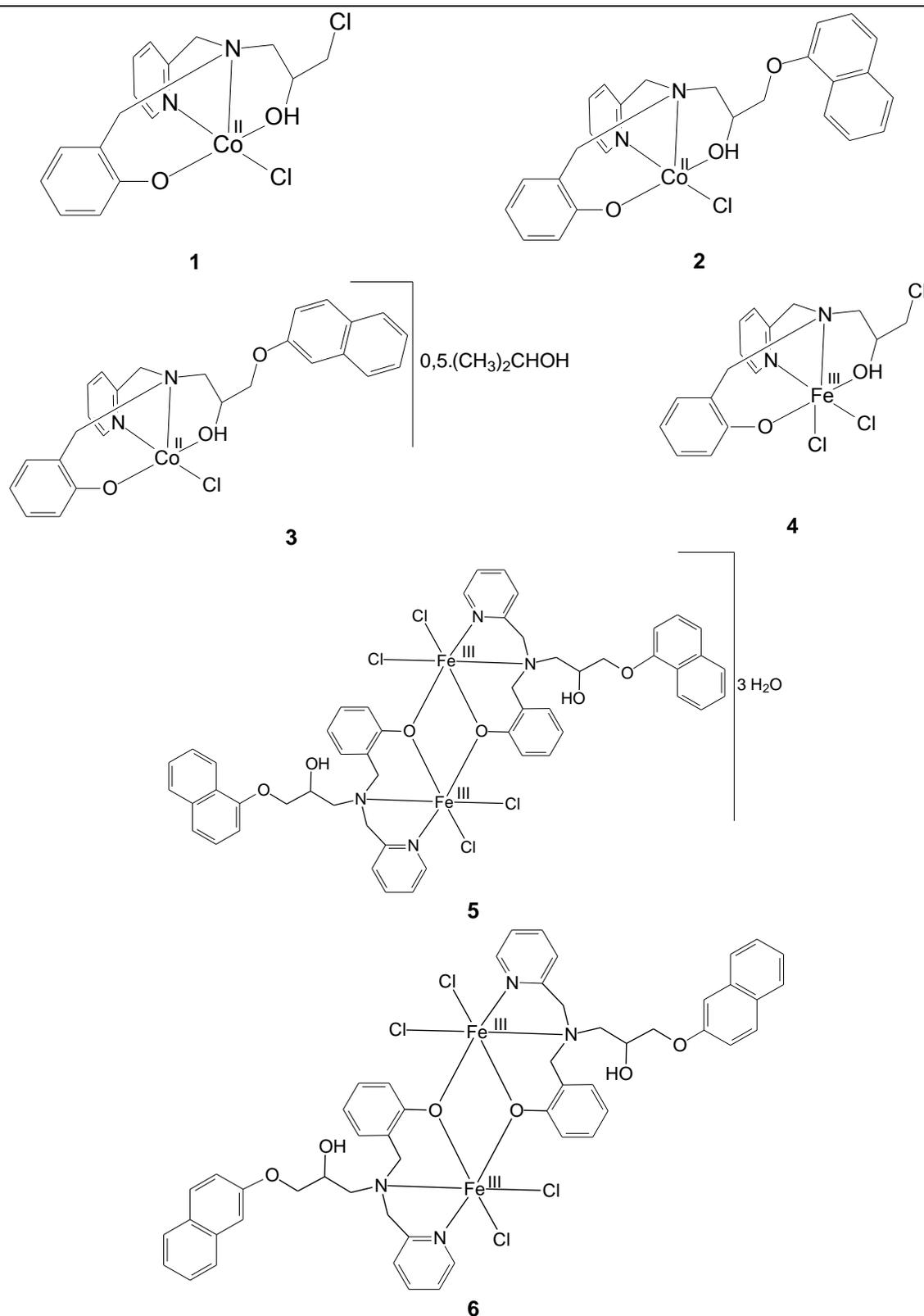


Figura 50. Propostas de estrutura, com base na caracterização físico-química, para os compostos de coordenação de cobalto e ferro.

4.2.4. Condutividade elétrica

As medidas de condutividade foram realizadas em solução de DMF para os compostos de cobalto (**1**, **2** e **3**) e em acetonitrila para os compostos de ferro **5** e **6**, na concentração de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Dados de análise condutivimétrica para os compostos inéditos.

Composto	Solvente	$\Lambda_M (\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{mol}^{-1})$	Espécie de eletrólito ^a
1	DMF	43	não-eletrólito
2	DMF	44	não-eletrólito
3	DMF	36	não-eletrólito
5	acetonitrila	10	não-eletrólito
6	acetonitrila	14	não-eletrólito

^aAtribuição conforme Geary (1971). Para acetonitrila: valores menores que $120 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ os compostos são denominados não-eletrólitos; Para DMF: valores menores que $65 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ os compostos são denominados não-eletrólitos.

Os valores obtidos para as medidas de condutividade elétrica indicam que todos os compostos são não-eletrólitos. Tal resultado está de acordo com as propostas de estrutura dos compostos de coordenação sintetizados, onde estes não apresentam contra-íon em suas estruturas, sendo espécies neutras. Acredita-se que estes compostos preservem, em solução, as mesmas estruturas observadas no estado sólido.

4.2.5. Espectroscopia eletrônica

Foram obtidos espectros eletrônicos dos compostos inéditos **1**, **2**, **3**, **5** e **6**. Dados para o composto de ferro **4** já foram obtido previamente (SILVA et al., 2008).

Os espectros eletrônicos para os compostos **1**, **2** e **3** foram obtidos em DMF, este solvente apresenta forte absorção na região de 200-400 nm atribuída às transições $n \rightarrow \pi^*$ (RAO, 1975). Devidos às absorções do solvente, não foi possível observar todas as transições dos ligantes presentes nos compostos e a escala dos espectros foi adaptada ao tipo de solvente, eliminando assim as absorções do DMF entre 200 e 400 nm.

O espectro eletrônico obtido para o composto **1** (Figura 51) apresenta duas transições. Sendo estas em 595 nm ($122 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$) e em 682 nm ($78 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$) atribuídas a transições d-d típicas do centro metálico. (HUHEEY et al., 1993; FERNANDES et al., 2010).

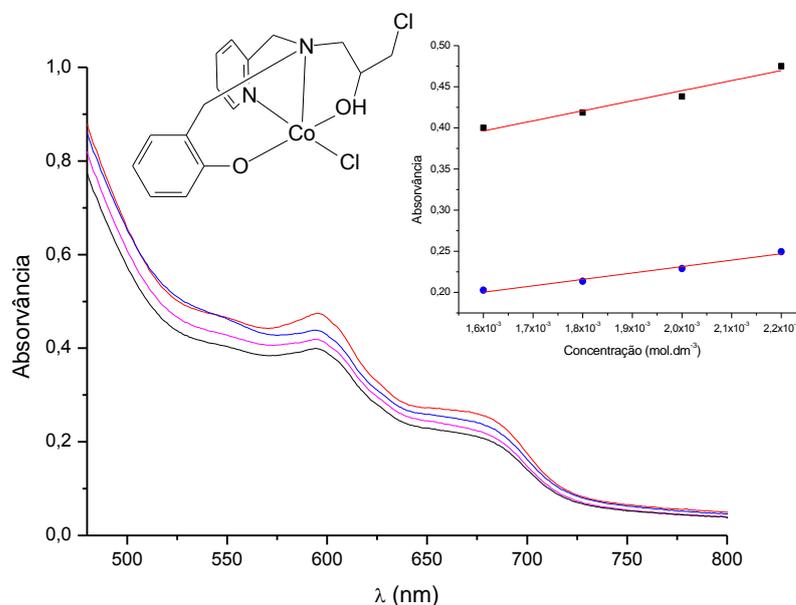


Figura 51. Espectro eletrônico para o composto **1**, obtido em DMF, nas concentrações $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $2,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Em destaque, curva das Concentrações vs Absorvâncias em 595 e 682 nm.

O espectro eletrônico para o composto **2** é apresentado na Figura 52. Neste observam-se quatro transições, em 497 nm ($32 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$), 556 nm ($45 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$), 607 nm ($143 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$) e 677 nm ($\epsilon = 205 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$) atribuídas a transições d-d do centro metálico de cobalto. (FERNANDES et al., 2010; HUHEEY et al., 1993).

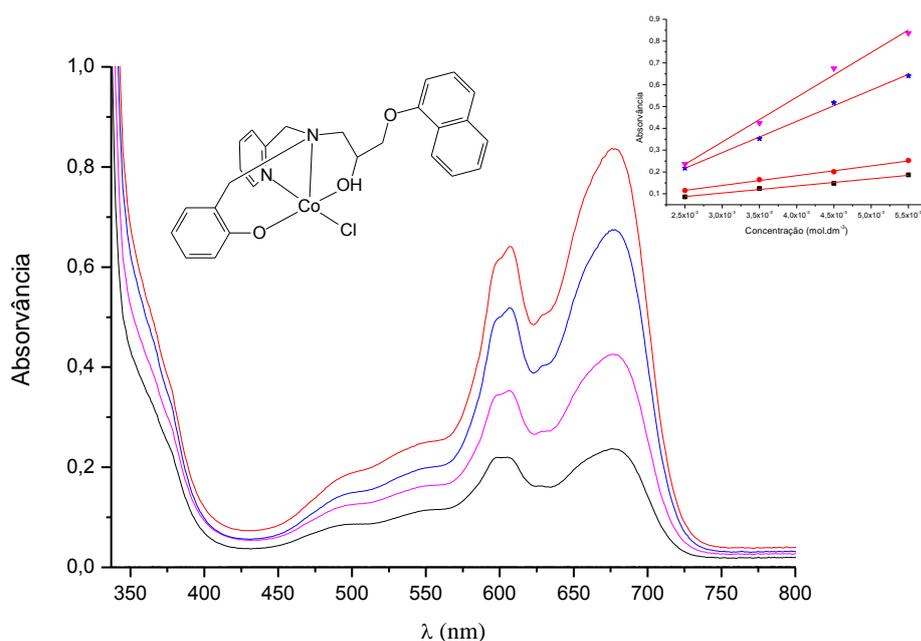


Figura 52. Espectro eletrônico para o composto **2**, obtido em DMF, nas concentrações $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$, $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$, $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ e $5,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$. Em destaque, curva das Concentrações vs Absorvâncias em 497, 556, 607 e 677 nm.

O espectro eletrônico para o composto **3** (Figura 53) apresenta quatro transições, em 498 nm ($25 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$), 557 nm ($35 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$), 599 nm ($75 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$) e 676 nm ($\epsilon = 94 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$) atribuídas a transições d-d do centro metálico. (FERNANDES et al., 2010; HUHEEY et al., 1993).

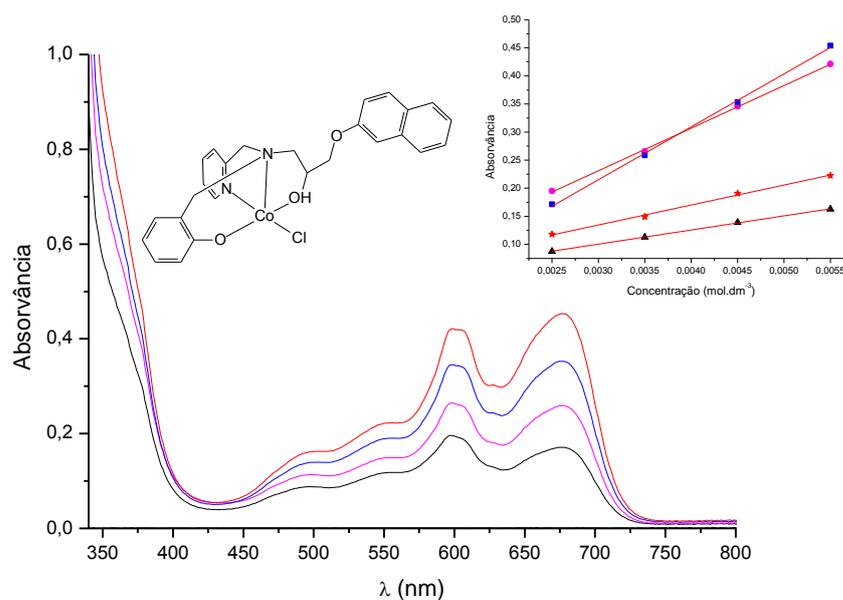


Figura 53. Espectro eletrônico para o composto **3**, obtido em DMF, nas concentrações $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$, $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$, $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ e $5,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$. Em destaque, curva das Concentrações vs Absorvâncias em 498, 557, 599 e 676 nm.

Os espectros eletrônicos obtidos para os compostos de cobalto **2** e **3** são similares, isso se deve a semelhança da esfera de coordenação dos compostos, sendo observado em ambos os espectros transições do centro metálico de cobalto (transições d-d). As transições intraligante não são observadas devido a absorção do solvente usando na análise (DMF).

O espectro eletrônico para o composto de ferro **5** apresenta três transições (Figura 54). Sendo estas em 282 nm ($3.10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{cm}^{-1}$) atribuída à transferência de carga intraligante $\pi \rightarrow \pi^*$ de grupos aromáticos presentes no ligante H2L2 (piridina) (PARRILHA et al., 2010), em 356 nm ($1.10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{cm}^{-1}$) atribuída a TCLM cloreto $\text{Cl} \rightarrow \text{Fe (III)}$ e em 580 nm ($4,6.10^3 \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{cm}^{-1}$), atribuída a TCLM fenolato $p\pi \rightarrow \text{Fe (III)} d\pi^*$. (SILVA et al., 2008; NEVES et al., 1995).

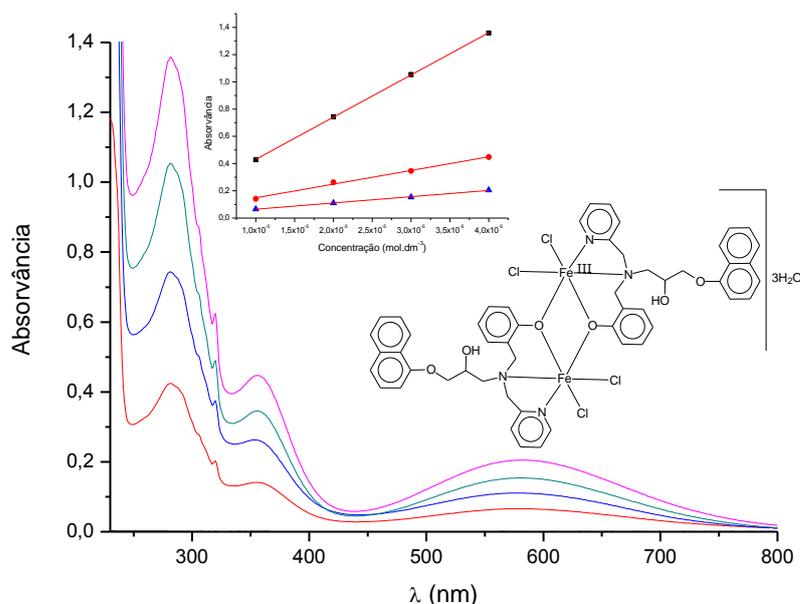


Figura 54. Espectro eletrônico para o composto **5**, obtido em acetonitrila, nas concentrações $1.10^{-5} \text{ mol}.\text{dm}^{-3}$, $2.10^{-5} \text{ mol}.\text{dm}^{-3}$, $3.10^{-5} \text{ mol}.\text{dm}^{-3}$, $4.10^{-5} \text{ mol}.\text{dm}^{-3}$. Em destaque, curva das Concentrações vs Absorvâncias em 282, 356 e 580 nm.

O espectro do composto de ferro **6**, mostrado na Figura 55, apresenta seis transições. As transições em 261 ($4,3.10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{cm}^{-1}$) e 272 nm ($4,4.10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{cm}^{-1}$) são atribuídas à transferência de carga intraligante $\pi \rightarrow \pi^*$ de grupos aromáticos presentes no ligante H2L3 (piridina) (PARRILHA et al., 2010). As bandas em 312 nm ($1,9.10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{cm}^{-1}$), 327 nm ($1,8.10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{cm}^{-1}$) e 357 nm ($1,5.10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{cm}^{-1}$) são atribuídas a TCLM cloreto $\text{Cl} \rightarrow \text{Fe(III)}$ e a banda em 582 nm ($7.10^3 \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{cm}^{-1}$) é atribuída a TCLM fenolato $p\pi \rightarrow \text{Fe (III)} d\pi^*$ (SILVA

et al., 2008; NEVES et al., 1995). Para os compostos de ferro **5** e **6** a presença de uma banda TCLM justifica a proposta de estrutura na qual o fenol se coordena de forma desprotonado aos centros de Fe(III).

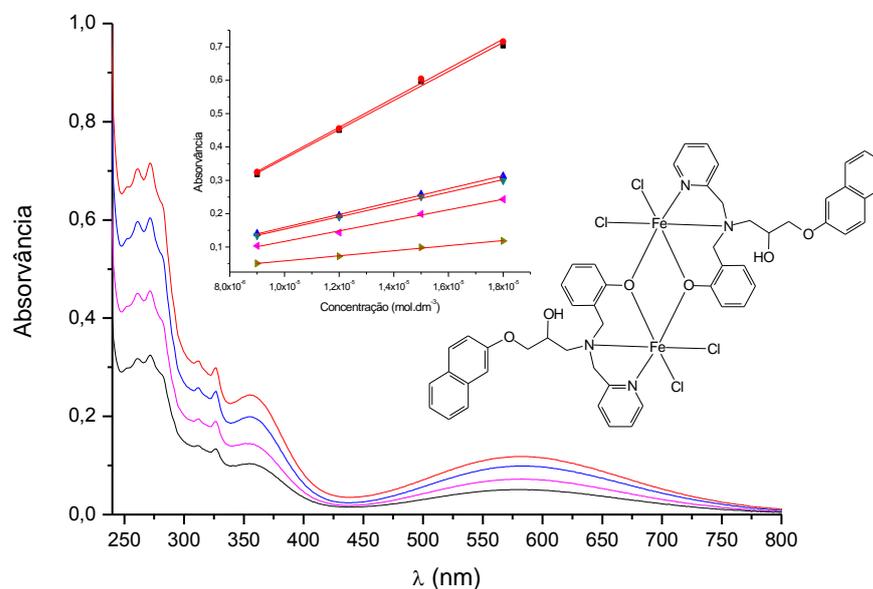


Figura 55. Espectro eletrônico para o composto **6**, obtido em acetonitrila, nas concentrações 9.10^{-6} mol.dm $^{-3}$, $1,2.10^{-5}$ mol.dm $^{-3}$, $1,5.10^{-5}$ mol.dm $^{-3}$, $1,8.10^{-5}$ mol.dm $^{-3}$. Em destaque, curva das Concentrações vs Absorvâncias em 261, 272, 312, 357 e 582 nm.

O composto **6**, o qual apresenta o ligante H2L3 em sua estrutura (isômero β do ligante H2L2), apresenta mais bandas que o composto similar **5**, sugerindo uma geometria mais distorcida para o centro de Fe(III) em comparação com o composto **5** contendo o ligante H2L2 (isômero α), refletindo o efeito do ligante na geometria do complexo.

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

Foram obtidos espectros de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para os compostos inéditos de cobalto e ferro: **1,2, 3, 5 e 6**.

Os espectros de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS obtidos para os compostos de cobalto **1, 2 e 3** apresentam um conjunto característico de perfis isotópicos devido principalmente à presença da centro metálico de cobalto e de átomos de Cl. Para o composto **1** os dados de ESI(+)-MS indicam a presença de sinais com m/z 307, 364, 410, 670, 727 e 763, revelando cátions mononucleares e binucleares, de forma

semelhante ao previamente observado para o complexo de níquel $[\text{Ni}_2(\mu\text{-HL})_2(\mu\text{-OAc})\text{Ni}](\text{C}\ell\text{O}_4)$, obtido com o mesmo ligante (HORN, et al., 2006).

O espectro de ESI(+)-MS, apresentado na Figura 56, obtido para o composto **1** apresenta dois sinais mais intensos de m/z 307 e 363, respectivamente. O sinal de m/z 307 é referente ao ligante H2L1 protonado (H3L1^+), já o sinal de m/z 363 é atribuído ao cátion mononuclear, na qual o centro de cobalto (II) encontra-se coordenado a uma molécula do ligante H2L1, onde o grupo fenol encontra-se desprotonado $[\text{CoHL1}]^+$. O sinal de m/z 410 é relacionado à espécie $[\text{Co}(\text{NaLiL1})(\text{OH})]^+$.

É possível observar um sinal de m/z 670 atribuído a um cátion com um centro metálico de cobalto e duas moléculas do ligante H2L1, onde o grupo fenol de uma das moléculas encontra-se desprotonado (HL1) e a outra molécula do ligante está na forma protonada (H2L2): $[\text{Co}(\text{HL1})(\text{H2L1})]^+$. São observados ainda sinais de m/z 727 e 763, estes são atribuídos à espécies catiônicas binucleares, sendo as mesmas atribuídas aos cátions $[\text{Co}(\mu\text{-HL1})(\mu\text{-L1})\text{Co}]^+$ e $[\text{Co}(\mu\text{-HL1})(\mu\text{-HL1})\text{CoC}\ell]^+$, respectivamente.

Estas propostas baseiam-se nos dados MS/MS, que indicam que a espécie de m/z 763 produz o cátion de m/z 727 (pela perda de uma molécula de $\text{HC}\ell$), a espécie de m/z 670 produz o cátion de m/z 307 (pela perda de uma molécula neutra de massa 363, descrito como um complexo neutro $[\text{Co}(\text{L})]$). A espécie de m/z 410 produz o cátion de m/z 364, complexo $[\text{Co}(\text{HL})]^+$, pela perda de uma molécula neutra de massa 46 (LiONa).

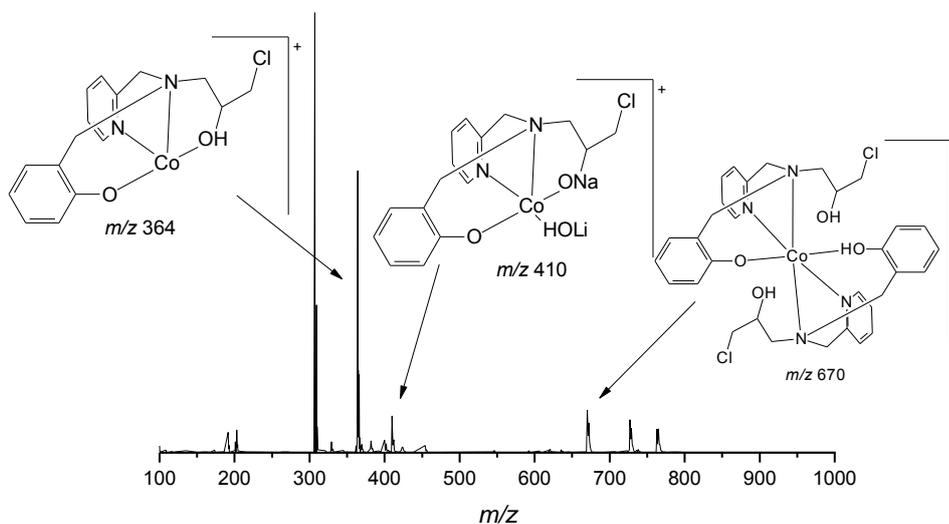


Figura 56. Espectro de ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1), obtido para o composto **1** e as propostas de estruturas para os sinais de m/z 364, 410 e 670.

Para os compostos isoméricos de cobalto **2** e **3**, os dados de ESI(+)-MS indicam a presença de picos idênticos de m/z 309, 415, 472, 728, 780, 886, 943 e 979, que revelam a formação de espécies idêntica para ambos os compostos. Assim, os dados de ESI(+)-MS sugerem que os compostos de cobalto **2** e **3** devem ter estruturas muito semelhantes no estado sólido.

Os sinais de m/z 309 e 415 são atribuídos à protonação dos ligantes (H3Lx, onde $x = 2$ ou 3) e a sua fragmentação, respectivamente. Os sinais de m/z 472 e 886 são atribuídos a espécies mononucleares: $[\text{Co}(\text{HLx})]^+$ e $[\text{Co}(\text{HLx})(\text{H2Lx})]^+$ onde $x = 2$ ou 3 , os sinais de m/z 943 e 979 são atribuídos as espécies binucleares $[\text{Co}(\mu\text{-Lx})(\mu\text{-HLx})\text{Co}]^+$ e $[\text{Co}(\mu\text{-HLx})_2\text{CoCl}]^+$, respectivamente.

Os dados de MS/MS para o composto **2** indicam que a espécie de m/z 979, gera a espécie de m/z 943, pela perda de uma molécula de HCl.

Os dados de MS/MS sugerem que a espécie com m/z 886 produz os cátions de m/z 780 (com a perda de uma molécula neutra de massa igual 106 g, que foi previamente detectada num complexo semelhante contendo níquel (HORN, et al., 2006) e de m/z 472, atribuída a $[\text{Co}(\text{HL2})]^+$. A espécie de m/z 472 produz o cátion de m/z 393 (pela perda de parte do ligante H2L2) e a espécie de m/z 415 produz o cátion de m/z 309 (ambos relacionados com a fragmentação do ligante H2L2).

Resultados semelhantes de MS/MS foram obtidos para composto **3**, devido à semelhança entre ambos. As Figura 57 e Figura 58 apresentam os espectros de ESI(+)-MS para compostos **2** e **3**, bem como propostas para alguns sinais observados.

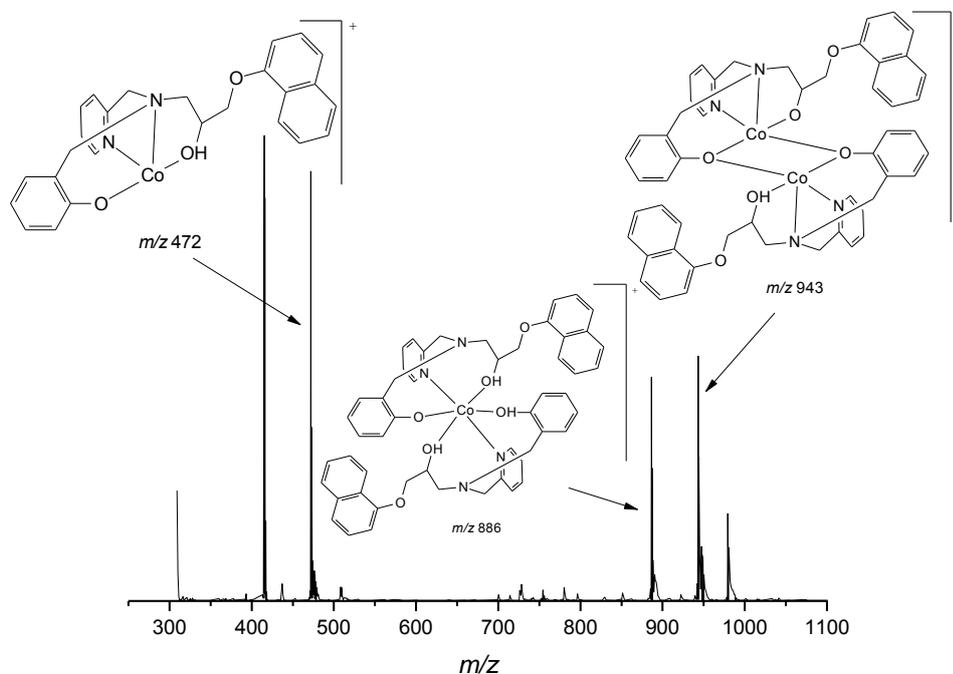


Figura 57. Espectro de ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1), obtido para o composto **2** e as propostas de estruturas para os sinais de m/z 472, 886 e 943.

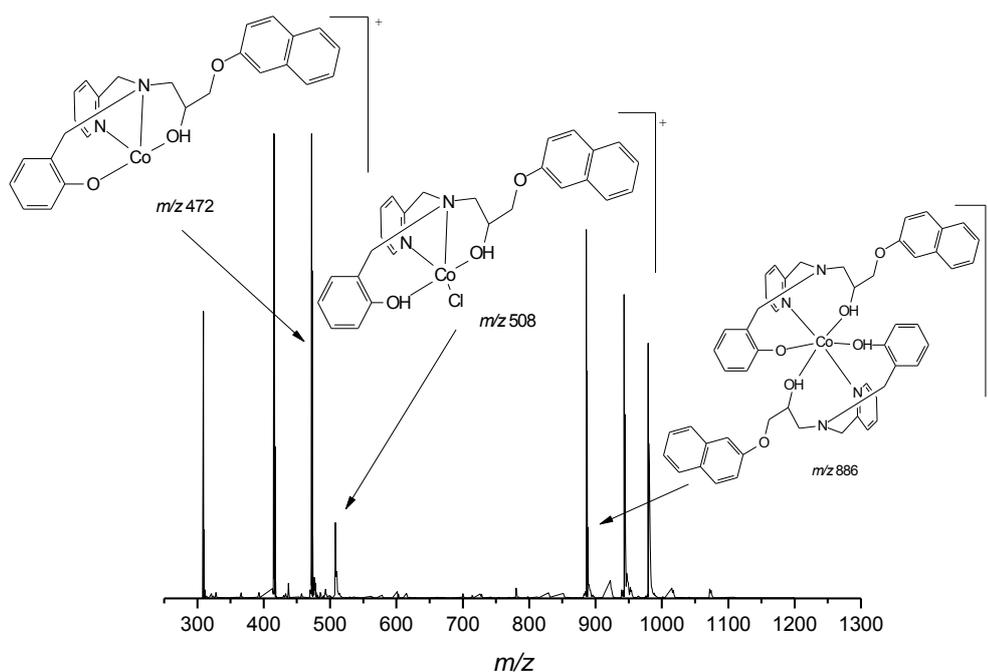


Figura 58. Espectro de ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1), obtido para o composto **3** e as propostas de estruturas para os sinais de m/z 472, 508 e 886.

Os resultados da espectrometria de massas suportam as atribuições feitas com base na análise elementar, espectroscopia no infravermelho e ultravioleta que indicam que os compostos de cobalto são mononucleares e o centro metálico de Co(II).

Dados de ESI(+)-MS obtidos para os compostos inéditos de ferro (**5** e **6**) indicam a presença de espécies binucleares. Os espectros de ESI(+)-MS obtidos para estes compostos são similares, o que se justifica no fato de ambos possuírem o mesmo ambiente de coordenação. O sinal de m/z 971 é atribuído como o cátion $[(\text{OH}_2)\text{Fe}(\text{III})(\mu\text{-Lx})_2\text{Fe}(\text{III})(\text{OH})]^+$, onde $x = 2$ ou 3 .

Os espectros apresentam sinais de m/z 415 e 311 que são atribuídos aos ligantes H2L2 e H2L3 em suas formas protonadas $[\text{H3L2}]^+$ e $[\text{H3L3}]^+$ e à fragmentações dos mesmos, respectivamente. Para os dois compostos, é possível observar sinais menos intensos de m/z 489 e 679. O sinal de m/z 489 é referentes a espécie mononuclear coordenada a uma molécula de água ($\text{FeLx}\cdot\text{H}_2\text{O}$) ($x = 2$ ou 3). O sinal de m/z 679 é atribuído a espécie com um centro metálico de Fe(III) coordenado a uma molécula do ligante e, provavelmente, coordenado a fragmentos do ligante, sendo a fórmula molecular $\text{C}_{39}\text{H}_{35}\text{FeN}_4\text{O}_4$ encontrada para ambos os compostos .

Os dados de MS/MS da espécie de m/z de 971 indicam que esta espécie gera o cátion de m/z 486, $[\text{Fe}(\text{III})(\text{Lx})(\text{OH}_2)]^+$, pela perda de uma molécula neutra $[\text{Fe}(\text{III})(\text{Lx})(\text{OH})]$, ($x = 2$ ou 3) e o cátion de m/z 679, pela perda de um átomo de Fe e fragmentos do ligante.

As Figuras 59 e 60 apresentam os espectros de ESI(+)-MS obtidos para os compostos de ferro **5** e **6**, respectivamente.

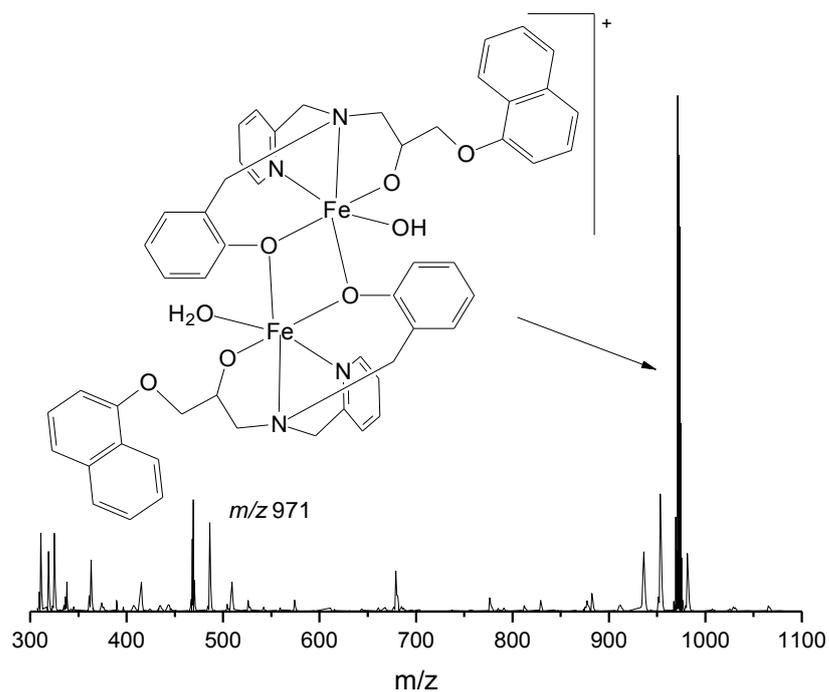


Figura 59. Espectro de ESI(+)-MS para o composto **5**, evidenciando a proposta de estruturas para a espécie de m/z 971.

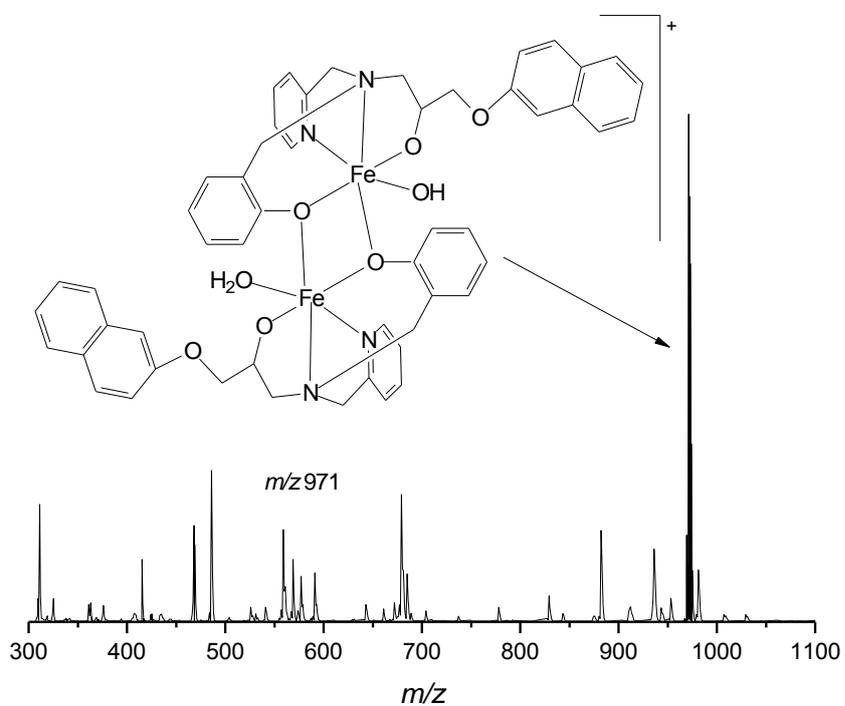


Figura 60. Espectro de ESI(+)-MS para o composto **6**, evidenciando a proposta de estruturas para a espécie de m/z 971.

Os resultados de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS para os compostos de ferro suportam as atribuições feita pela análise elementar e voltametria cíclica e confirmam as estruturas moleculares binucleares proposta para estes compostos.

4.2.7. Voltametria Cíclica

Os estudos eletroquímicos foram realizados para os compostos de ferro inéditos, **5** e **6**, utilizando-se a técnica de voltametria cíclica, empregando dimetilsulfóxido como solvente, hexafluorofosfato de tetrabutilamônio como eletrólito suporte na concentração de $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ e o par redox Ferrocínio/Ferroceno (Fc^+/Fc^0), como referência interna. Os dados dos voltamogramas cíclicos obtidos para os compostos **5** e **6** são apresentados na Tabela 24. Os compostos de cobalto não apresentaram solubilidade adequada para os estudos eletroquímicos.

Tabela 24. Resultados dos voltamogramas cíclicos para os compostos de ferro **5** e **6**.

Composto	* $E_{1/2}$ (V) $2\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$	* $E_{1/2}$ (V) $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow 2\text{Fe}^{\text{II}}$
5	-0,353	-0,809
6	-0,512	-0,857

* Potenciais vs Fc^+/Fc^0 .

Os voltamogramas cíclicos para os compostos de ferro **5** e **6** são semelhantes, ambos mostram a presença de dois processos redox, considerados *quasi* reversíveis. O voltamograma obtido para o composto **5** é apresentado na Figura 61. O primeiro processo redox apresenta um potencial de meia onda ($E_{1/2}$) de -0,353 V vs Fc^+/Fc^0 e diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p), de 0,142 V atribuído a redução de um dos centros metálicos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$. O segundo processo redox apresenta um potencial de meia onda ($E_{1/2}$) de -0,809 V vs Fc^+/Fc^0 e diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p), de -0,04 V atribuído a redução do segundo centro metálico $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$.

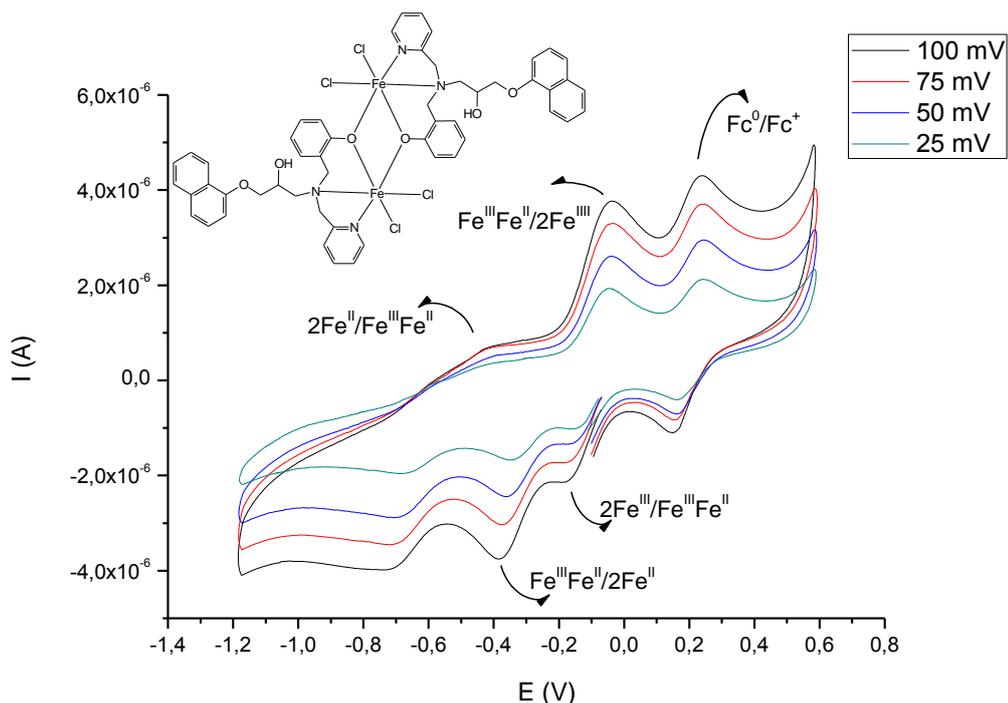


Figura 61. Voltamograma cíclico para o composto de ferro **5**. Eletrodo de trabalho: platina; eletrodo de referência: platina; contra-eletrodo: platina; eletrólito suporte: hexafluorofosfato de tetrabutilamônio $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; solvente DMSO, referência interna Fc^+/Fc^0 .

Para os compostos de ferro **6**, apresentado na Figura 62, o primeiro processo redox é atribuído a redução de um dos centros metálicos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$, tal processo apresenta potencial de meia onda ($E_{1/2}$) de $-0,512 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}^0$ e diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p), de $0,437 \text{ V}$. O segundo processo redox apresenta um potencial de meia onda ($E_{1/2}$) de $-0,857 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}^0$ e diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p), de $0,359 \text{ V}$ atribuído a redução do segundo centro metálico $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$. Os resultados e as atribuições condizem com os dados obtidos por Horn para um composto binuclear de ferro com a esfera de coordenação similar à dos compostos acima citados (HORN, 2000).

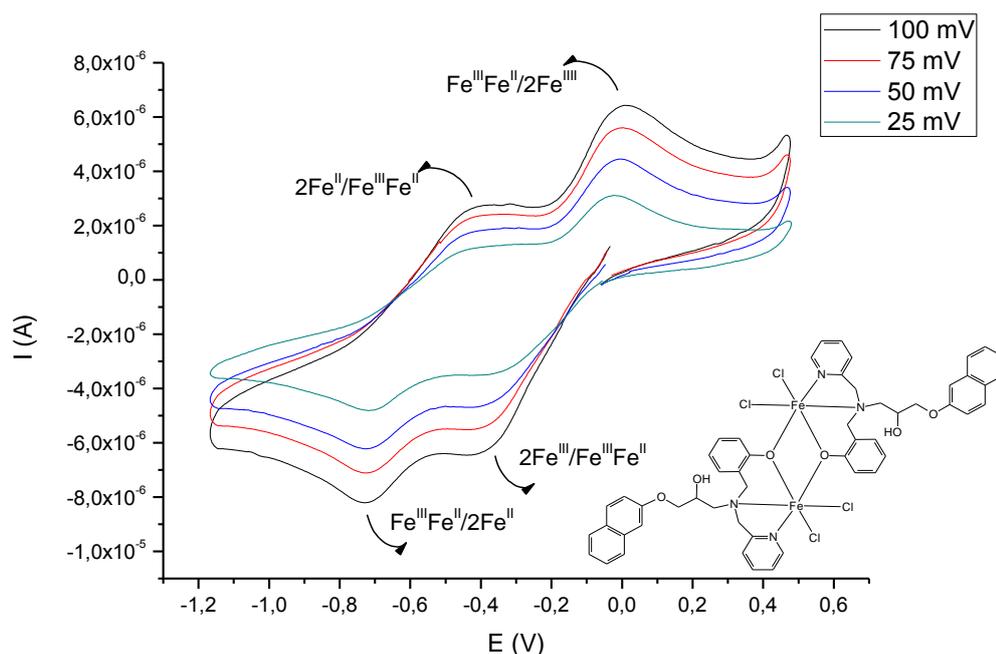


Figura 62. Voltamograma cíclico para o composto de ferro **6**. Eletrodo de trabalho: platina; eletrodo de referência: platina; contra-eletrodo: platina; eletrólito suporte: hexafluorofosfato de tetrabutylamônio $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$; solvente DMSO.

Estudos eletroquímicos, realizados por voltametria cíclica e as caracterizações por condutivimetria e de ESI(+)-MS sugerem a manutenção do arranjo binuclear em solução para os compostos de ferro **5** e **6**.

4.2.8. Espectroscopia Mössbauer

A presença do centro de ferro(III) em todos os compostos também foi confirmada por espectroscopia Mössbauer de ^{57}Fe , onde apenas um dubleto foi observado para cada amostra, indicando que os centros de Fe(III) são equivalentes, com o mesmo ambiente de coordenação para ambos, no caso dos compostos binucleares (**5** e **6**), estando estes resultados em excelente concordância com as propostas feitas com base nas demais análises. A Figura 63 apresenta os espectros de Mössbauer para os compostos de ferro **4**, **5** e **6**, obtidos à temperatura ambiente.

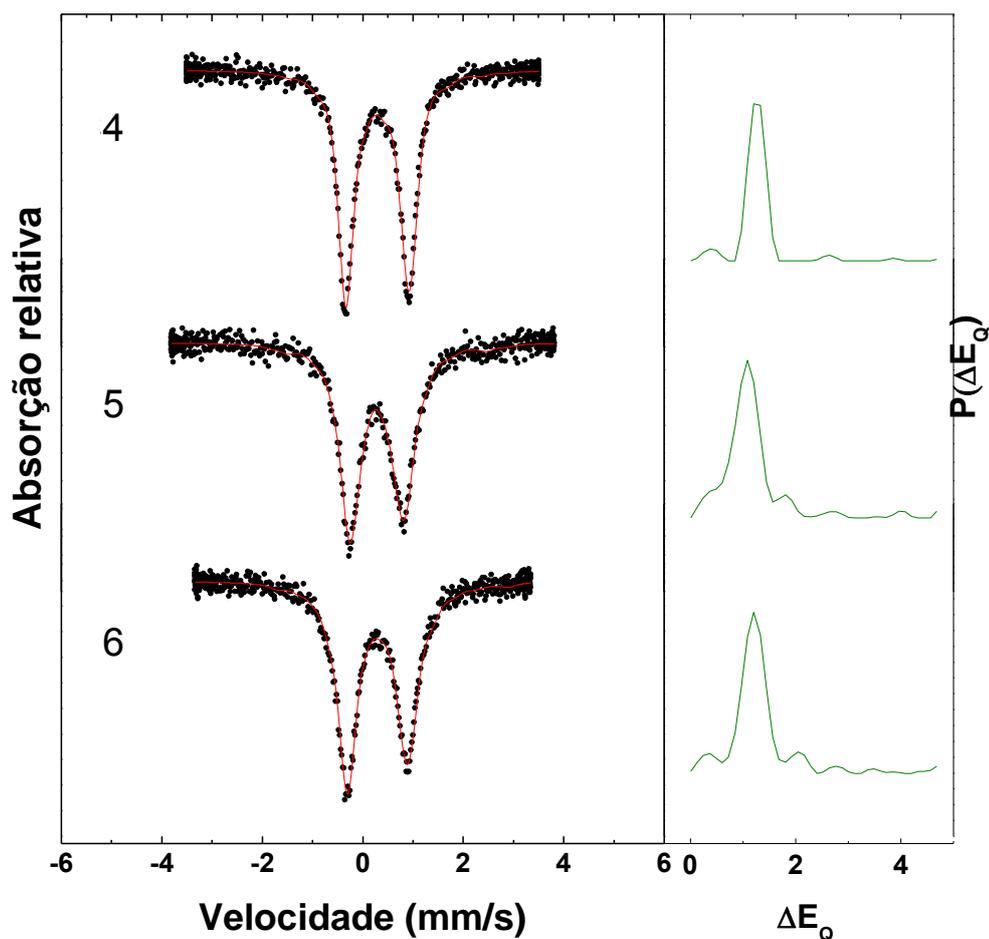


Figura 63. Espectros Mössbauer, à temperatura ambiente de ^{57}Fe para os compostos **4**, **5** e **6**. À direita o gráfico de distribuição para cada espectro.

Os valores de deslocamento isomérico (IS) (em relação ao Fe-alfa) observados, a temperatura ambiente, foram de 0,40, 0,39 e 0,40 mm/s, respectivamente para os compostos de ferro **4**, **5** e **6**, sugerindo que as densidades elétricas nos centros de ferro são semelhantes nestes complexos e típicas de ferro (III) alto spin. Para compostos de coordenação de Fe(III), alto spin, apresentando coordenação octaédrica, são comuns valores de deslocamento isomérico na faixa de 0,18 a 0,70 mm/s (DICKSON e BERRY, 1986; GREENWOOD e GIBB, 1971).

Os valores de ΔE_Q , (desdobramento quadrupolar) para compostos de coordenação contendo centros de Fe^{III} alto spin, mostram dependência com a simetria local e com o ambiente eletrônico no qual se encontra o centro metálico (CARVALHO et al, 2006). Os valores do desdobramento quadrupolar (ΔE_Q) de 1,10, 1,08 e 1,20 mm/s, respectivamente para os compostos **4**, **5** e **6**, indicam que o

centro de ferro no composto **5** é ligeiramente mais distorcido do que nos compostos **4** e **6**, refletindo o aumento da complexidade do ligante (comparando-se os compostos **4** e **5**) e a isomeria do ligante, já que o composto **5** contém o ligante com a unidade α -naftil e o composto **6** contém o ligante com a unidade β -naftil. Assim, atribui-se que o ligante H2L2 leva a um composto mais distorcido que o isômero H2L3.

Os valores de desdobramento quadrupolar (ΔE_Q) e deslocamento isômero (IS) mais prováveis para todos os compostos são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25. Parâmetro hiperfinos obtidos via Espectroscopia Mössbauer para os compostos de ferro, à temperatura ambiente. Os espectros foram equipados com uma distribuição quadrupolar considerando 40 dupletos mantendo a largura de linha (Γ) fixada a 0,3 mm/s. ΔE_Q e IS são os valores mais prováveis da distribuição. Os valores dos desvios isômero são em relação ao ferro metálico.

Composto	IS (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Γ (mm/s)
4	0.40	1.20	0.30
5	0.39	1.08	0.30
6	0.40	1.20	0.30

4.3. Atividade antioxidante

4.3.1. Atividade mimética a metaloenzima Superóxido Dismutase (Sod)

A atividade mimética à metaloenzima superóxido dismutase (Sod) foi investigada para todos os compostos de cobalto e ferro sintetizados (**1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6**). Foi investigada a taxa de redução do azul de nitrotetrazólio na ausência do composto (controle) e a taxa de redução do NBT promovida pelos compostos em estudo, empregando-se a concentração de $9 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ de compostos.

Os gráfico de redução do NBT promovida pelos complexos em estudo, sendo as leituras realizadas em 560 nm, são apresentados nas Figura 64 e Figura 65. A partir destes dados, foram calculadas as porcentagens de inibição de redução do NBT para cada complexo, sendo os valores apresentados na

Tabela 26. Para o cálculo foi utilizado o valor médio do coeficiente angular (taxa Abs/s) da curva referente à velocidade na ausência do complexo e o valor médio do coeficiente angular da curva referente à velocidade na presença do complexo.

Tabela 26. Porcentagem de inibição da redução do NBT obtido para os compostos de cobalto e ferro..

Composto	Inibição (%)	Composto	Inibição (%)
1	85	4	73
2	78	5	43
3	56	6	34

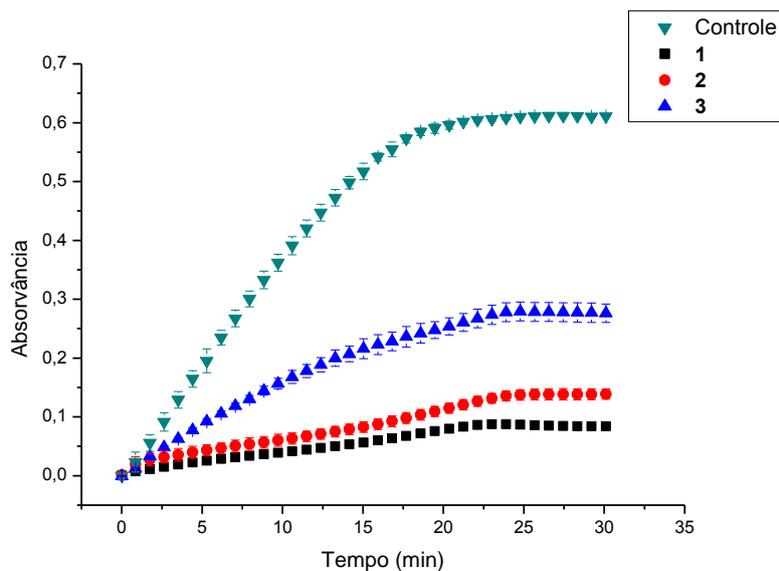


Figura 64. Gráfico de redução do NBT, sendo a leitura em 560 nm, na ausência (controle) e na presença dos compostos de cobalto 1, 2 e 3.

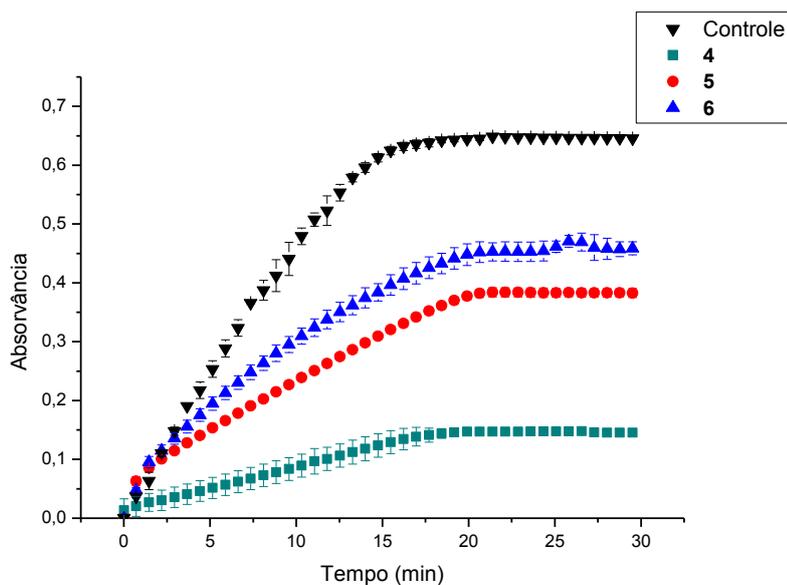


Figura 65. Gráfico de redução do NBT, sendo a leitura em 560 nm, na ausência (controle) e na presença dos compostos de ferro 4, 5 e 6.

Todos os compostos foram capazes de inibir a redução do NBT, impedindo a formação do formazan, agindo, desta forma, como complexos miméticos à metaloenzima Sod. Os compostos de cobalto foram mais eficientes que os compostos de ferro, nesse ensaio inicial, mostrando a influência da natureza do centro metálico na atividade mimética à Sod. Os complexos **1**, **2**, **3** e **4** apresentaram inibição da redução do NBT superior a 50%, sendo que para os compostos de ferro com os ligantes contendo o grupo naftol estes valores estão próximos de 40%, sendo esta uma atividade mimética a Sod moderada/baixa. A atividade dos compostos em ordem decrescente: **1>2>4>3>5>6**, permite concluir que os compostos contendo cobalto são mais ativos que os de ferro e que o grupo naftol não contribui para esta atividade.

Os valores de inibição de redução do NBT encontrados para os compostos de cobalto são animadores, especialmente para o composto **1**. Neste caso o composto não possui o grupo naftol em sua estrutura. Já para os compostos de cobalto contendo os ligantes contendo os grupos alfa naftol (H2L2) e beta naftol (H2L3), complexos **2** e **3** respectivamente, apresentaram percentuais de inibição que indicam que a isomeria tem grande efeito na atividade mimética a Sod, pois para o composto com alfa naftol (H2L2) a atividade é cerca de 20% maior do que para o composto similar, contendo o ligante na posição beta.

4.3.2. Atividade mimética à metaloenzima catalase (CAT)

A atividade mimética à metaloenzima catalase (CAT) foi investigada para todos os compostos sintetizados através da taxa de eliminação de peróxido de hidrogênio. Os compostos foram utilizados na concentração de $4 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} (compostos de cobalto) e $2 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} (compostos de ferro). Os gráficos de consumo de H_2O_2 promovido pelos complexos em estudo, sendo a leitura realizada a 240 nm, são apresentados nas Figura 66 e Figura 67.

O composto de cobalto **1** não apresentou atividade de catalase considerável, a concentração de peróxido de hidrogênio permaneceu praticamente constante durante todo o experimento (25 minutos).

Os compostos de cobalto **2** e **3**, que contêm o grupo naftol em suas estruturas, apresentaram atividade de catalase, *in vitro*, elevada. A atividade de ambos é muito parecida, sendo a diferença insignificante.

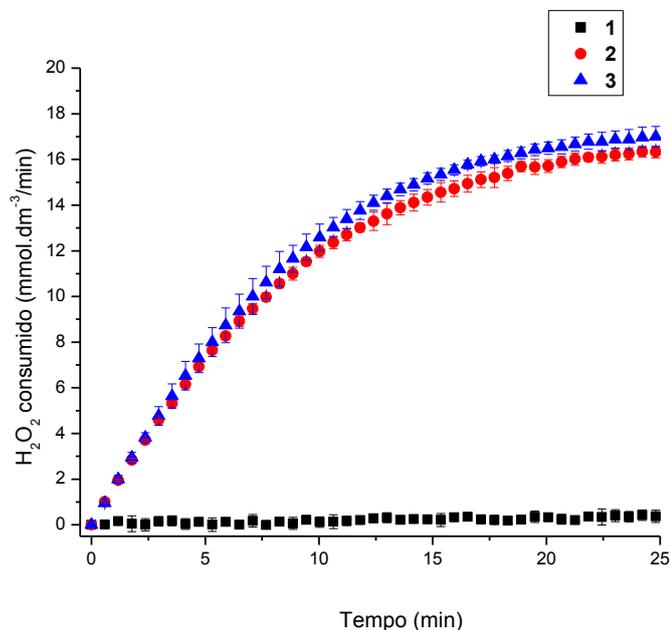


Figura 66. Gráfico de eliminação de H_2O_2 sendo realizada a leitura em 240 nm, na presença dos dos compostos de cobalto **1**, **2** e **3** na concentração de $4\cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Dentre os compostos de ferro, apenas o composto **5** apresentou atividade de catalase significativa sendo o consumo de peróxido de hidrogênio de aproximadamente $13 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}/\text{min}$.

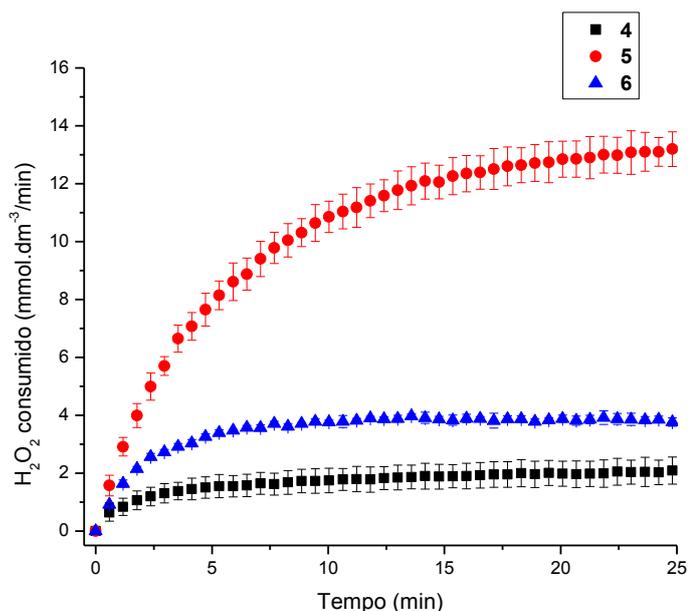


Figura 67. Gráfico de eliminação de H_2O_2 sendo a leitura realizada em 240 nm, na presença dos compostos de ferro **4**, **5** e **6**, na concentração de $2\cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Dentre os compostos testados, os compostos de cobalto **2** e **3** são os mais ativos, ou seja, estes são mais eficientes na decomposição do peróxido de hidrogênio.

A atividade catalase mimética varia com a estrutura do ligante e o metal. Dentre os compostos de cobalto os mais ativos são aqueles que possuem o grupo naftol em sua estrutura (compostos **2** e **3**), já para os compostos de ferro, apenas o composto **5**, com o ligante H2L2 em sua estrutura, apresentou atividade elevada, o seu isômero (composto **6**) não apresentou atividade significativa .

4.3.3. Capacidade de proteção celular

Para avaliar a capacidade de proteção antioxidante dos compostos de coordenação de cobalto e ferro *in vivo*, empregou-se uma cepa da levedura *S. cerevisiae* selvagem (EG103).

Foram realizados testes de citotoxicidade em células de *S. cerevisiae* para os ligantes H2L1, H2L2 e H2L3 e os compostos de cobalto e ferro inéditos **1**, **2**, **3**, **5** e **6**. Os estudos de atividade antioxidante para o composto de ferro **4**, já foram relatados previamente. Este aumentou em 30% a sobrevivência das células pré-tratadas (MELO, 2012).

O teste de citotoxicidade indica que as células da cepa EG103 de *S. cerevisiae* não sofreram danos quando expostas aos ligantes H2L1-H2L3 e aos compostos de cobalto **1** e **2** nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, sendo a sobrevivência similar a do controle (células sem tratamento). O composto de cobalto **3**, e de ferro **5** e **6** apresentaram toxicidade em ambas as concentrações estudadas. Entretanto, como a concentração usada nos testes de proteção celular (25 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) é inferior às concentrações usadas no teste de citotoxicidade, estes compostos podem ser considerados seguros às células. Os resultados dos testes de citotoxicidade são apresentados na Figura 68, sendo que estes representam a média e o desvio padrão (\pm) de no mínimo dois experimentos independentes.

O composto **4** não apresentou citotoxicidade contra as células de *S. cerevisiae* (MELO, 2012).

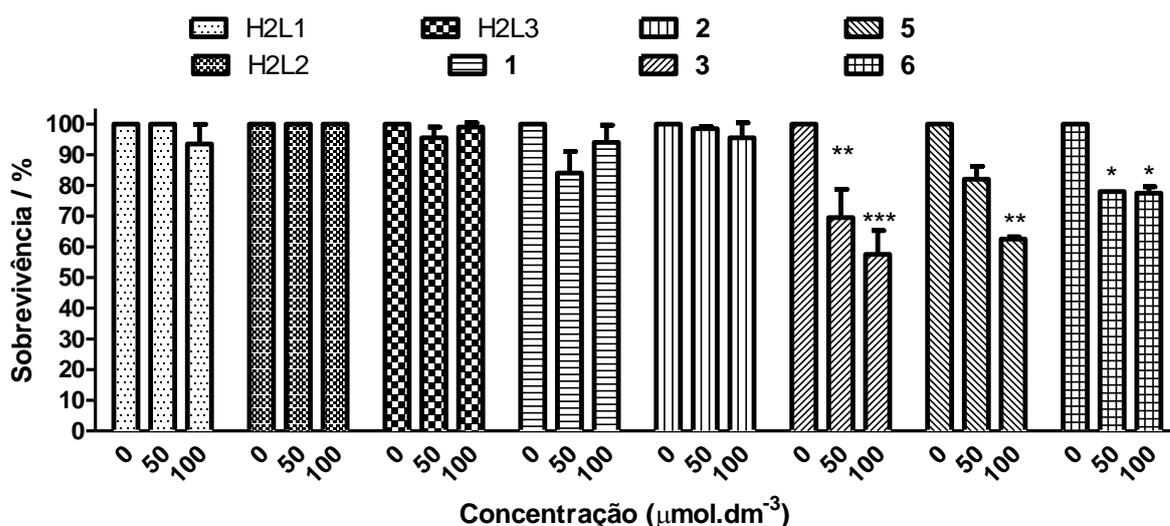


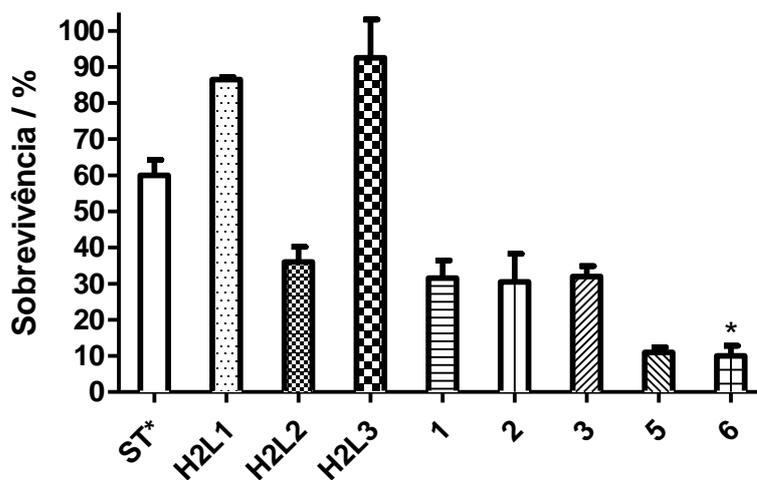
Figura 68. Sobrevivência das células de *S. cerevisiae* EG103 após 1h de exposição aos ligantes e compostos sintetizados neste trabalho. A concentração do DMSO foi de 0,1%. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (ST).

Nos testes de proteção celular, foram usados menadiona (fonte de radical superóxido) e peróxido de hidrogênio como agentes oxidantes.

Os compostos de coordenação mostraram-se incapazes de proteger as células contra o radical superóxido, assim como os ligantes (H2L1, H2L2 e H2L3). O pré-tratamento, com o ligante e H2L2 e os compostos de cobalto e ferro, associado a posterior exposição ao radical superóxido, resultou no aumento da toxicidade do sistema, uma vez que a sobrevivência destas células pré-tratadas com os compostos e o ligante H2L2 foi menor do que a sobrevivência das células que foram expostas ao estresse sem nenhum tratamento prévio.

Os ligantes H2L1 e H2L3 aumentaram a sobrevivência das células expostas ao estresse com radical superóxido em aproximadamente 20% e 30%.

Os resultados dos estudos de proteção celular são apresentados nas Figura 69 e Figura 70. Os gráficos representam a média e o desvio padrão (\pm) de no mínimo dois experimentos independentes.



*ST – sem tratamento

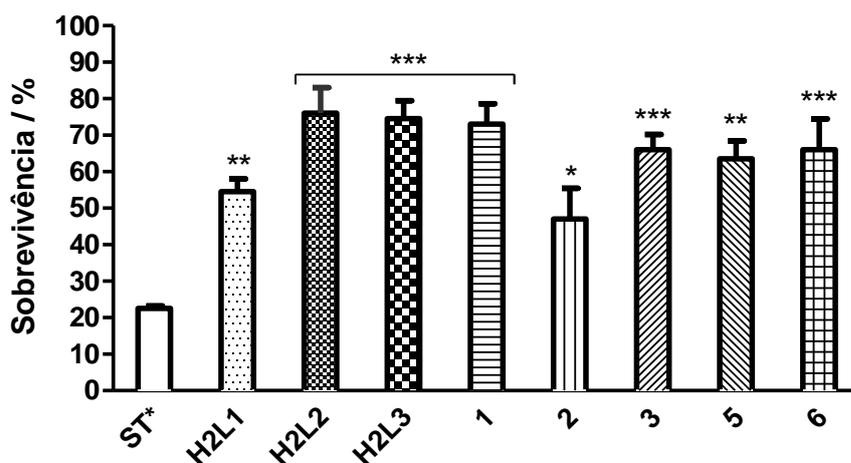
Figura 69. Sobrevivência celular da cepa de *S. cerevisiae* EG103 após o tratamento com os compostos ($25 \mu\text{mol dm}^{-3}$) e estresse oxidativo com menadiona (fonte de radical superóxido) (30 mmol dm^{-3}). A concentração do DMSO foi de 0,1%. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (ST).

As células pré-tratadas (com os compostos de cobalto e ferro e seus respectivos ligantes) e posteriormente estressadas com peróxido de hidrogênio apresentaram sobrevivência superior aquelas pré-tratadas e estressadas com radical superóxido. Todos os compostos de coordenação e ligantes testados foram capazes de aumentar a sobrevivência celular quando comparado às células controle (sem tratamento).

Os ligantes H2L2 e H2L3 e o composto **1** apresentaram as maiores porcentagens de proteção celular, aumentando a sobrevivência das células pré-tratadas em cerca de 60%. O composto **2** apresentou a menor capacidade de proteção contra o peróxido de hidrogênio. Os compostos **3**, **5** e **6** apresentaram aumento na sobrevivência de cerca de 50%.

Os ligantes H2L2 e H2L3 possuem em sua estrutura o grupo naftol, o que indica que este grupo tem influencia na atividade de proteção celular contra o H_2O_2 , *in vivo*. A complexação não potencializou a atividade antioxidante destes ligantes.

É possível observar que tanto a estrutura do ligante, quanto a variação do metal tem influência na atividade de proteção celular, contra o estresse com peróxido de hidrogênio, para os compostos investigados.



*ST – sem tratamento

Figura 70. Sobrevivência celular da cepa de *S. cerevisiae* EG103 após o tratamento com os compostos ($25 \mu\text{mol.dm}^{-3}$) e estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio (70mmol.dm^{-3}). A concentração do DMSO foi de 0,1%. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, valores estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (ST).

A atividade antioxidante *in vivo*, não está de acordo com os resultados da atividade *in vitro*, o que se deve ao fato do sistema *in vivo* ser muito mais complexo que o sistema *in vitro*.

4.4. Atividade antitumoral

4.4.1. Avaliação do efeito dos compostos na viabilidade celular através do método de metabolização do MTT

A citotoxicidade contra linhagens celulares cancerígenas (COLO 205, H460, THP-1, U937 e MOLT-4) e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foi determinada por meio do ensaio colorimétrico de metabolização de MTT e os valores de IC_{50} foram calculados a fim identificar os compostos mais citotóxicos. Para fins de comparação, a citotoxicidade da cisplatina também foi avaliada sob as mesmas condições experimentais. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 27.

Os compostos de cobalto **2** e **3**, que contêm grupos α e β naftol, respectivamente, apresentaram menor valor de IC_{50} do que os exibidos pelo composto **1**, que é menos ativo do que o respectivo ligante (H2L1). O complexo **3**, que contém o grupo β -naftol é ativo contra todas as linhas celulares sob investigação. Além disso, para o complexo **3**, fica evidenciado o efeito da

coordenação do cobalto ao ligante sobre a viabilidade celular, exceto para a linhagem MOLT-4. Os compostos de cobalto **2** e **3** exerceram efeito citotóxico significativo nas linhagens THP-1, U937 e MOLT-4, com $IC_{50} = 34$ e 54 (THP-1), 32 e 36 (U937) e 51 e 65 (MOLT-4) $\mu\text{mol dm}^{-3}$, respectivamente. Os ligantes de H2L2 e H2L3 foram menos ativos que os seus respectivos compostos de cobalto, exceto contra a linhagem MOLT-4 (H2L2 e H2L3 apresentam IC_{50} de 43 e 41 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, respectivamente, enquanto que os respectivos compostos apresentam IC_{50} de 51 e 65 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Os valores de IC_{50} indicam uma maior susceptibilidade das linhagens celulares de leucemia e linfoma THP-1, MOLT-4 e U937 para os compostos **2** e **3** do que para as linhagens COLO 205 e H460. O mesmo comportamento foi observado para a cisplatina.

Os valores de IC_{50} obtidos para o composto **3** são inferiores aos da cisplatina nas linhagens COLO 205 (90 e 196 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, respectivamente) e H460 (147 e 197 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, respectivamente).

Dentre os compostos de ferro (III), o composto **5** é mais ativo do que os compostos **4** e **6**. Curiosamente, o ligante H2L3 é mais ativo do que o composto de ferro **6**, especialmente contra o THP-1 e U937, não mostrando nenhum efeito de potencialização da atividade após a coordenação. Em geral, a atividade apresentada pelos compostos de ferro é moderada e indica que a coordenação com ferro (III), formando compostos binucleares (**5** e **6**) não favorece a atividade antitumoral dos mesmos.

A Tabela 27, apresenta ainda os valores de IC_{50} obtidos por MTT contra células normais (PBMC). Compostos de cobalto **2** e **3**, que contêm o grupo naftol nas suas estruturas, apresentaram valores IC_{50} superior a 400 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ contra PBMC. Esses valores são maiores do que aqueles valores de IC_{50} obtidos contra todas as linhagens celulares investigadas indicando que os compostos **2** e **3** são bastante seletivos para células tumorais.

Os compostos de ferro **5** e **6** apresentaram toxicidade para as células de PBMC ($IC_{50} = 108$ e 136 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, respectivamente), sendo o composto **6**, mais tóxico que seu respectivo ligante (H2L2) ($IC_{50} = 203$ $\mu\text{mol dm}^{-3}$). No entanto, todos os compostos investigados contra as células de PBMC mostraram-se menos citotóxicos que a cisplatina ($IC_{50} = 37$ $\mu\text{mol dm}^{-3}$, indicando que os mesmos são menos danosos às células normais do que a cisplatina (FERNANDES, et al., 2015).

Confrontando os dados obtidos para o composto de cobalto **3**, com aqueles obtidos para os compostos de cobre(II) e platina(II) contendo o ligante H2L2 previamente relatados, observa-se que embora os compostos de cobre e platina sejam mais ativos que o composto de cobalto **3** contra a linhagem celular estudada, U937, são também altamente tóxicos ao PBMC, enquanto o composto **3** não apresenta toxicidade as células normais (FERNANDES, et al 2015; MOREIRA, 2015).

Comparando os compostos de cobalto e ferro obtidos com os ligantes H2L1, H2L2 e H2L3, com compostos de cobre, platina e zinco que contêm os mesmos ligantes, observa-se que a presença de um arranjo binuclear em solução pode estar influenciando a atividade antitumoral, resultando em compostos menos ativos. Dentre os compostos de cobre e platina investigados, os compostos mais ativos apresentam o grupo α -naftil, enquanto o composto de cobalto mais ativo contra as mesmas linhagens celulares, apresenta grupo β -naftil, evidenciando o efeito da variação do metal e do isomerismo do ligante na atividade antitumoral dos compostos (FERNANDES, et al., 2015; MOREIRA, 2015).

Tabela 27. Valores de IC₅₀ obtido para compostos de coordenação, ligantes, sais metálicos e cisplatina contra as linhagens de leucemia (THP-1 e MOLT-4), cólon (COLO 205), linfoma (U937) e pulmão (H460) em 36 h.

Compostos	Linhagens					
	COLO 205	H460	THP-1	U937	MOLT-4	PBMC
	IC ₅₀ ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)					
H2L1	>400	>400	228 \pm 1	245 \pm 1	168 \pm 1	ND*
H2L2	351 \pm 1	>400	60 \pm 1	68 \pm 2	43 \pm 1	203 \pm 1
H2L3	>400	>400	>400	201 \pm 1	41 \pm 1	ND*
CoCl ₂ .6H ₂ O	>400	>400	>400	100 \pm 2	>400	ND*
FeCl ₃ .6H ₂ O	>400	>400	>400	>400	>400	ND*
1	>400	>400	>400	259 \pm 2	>400	ND*
2	>400	176 \pm 2	34 \pm 1	32 \pm 1	51 \pm 1	>400
3	90 \pm 2	147 \pm 2	54 \pm 2	36 \pm 2	65 \pm 1	>400
4	>400	>400	214 \pm 2	110 \pm 2	118 \pm 2	ND*
5	>400	>400	288 \pm 2	121 \pm 2	52 \pm 1	108 \pm 1
6	>400	>400	>400	>400	60 \pm 1	136 \pm 1
Cisplatina	196 \pm 2	197 \pm 1	12 \pm 1	16 \pm 1	22 \pm 1	37 \pm 1**

*ND - Não determinado

**Dados obtidos por Fernandes e colaboradores (FERNANDES, et al., 2015).

Os dados representam a média de dois experimentos em triplicata.

Este estudo possibilitou a identificação dos compostos mais ativos (**2** e **3**) e em seguida foram feitos estudos afim de identificar o tipo de morte celular desencadeada pelos compostos. Foram realizados experimentos de marcação com

Anexina V e iodeto de propídio, avaliação do potencial de membrana mitocondrial, avaliação do ciclo celular e estudos morfológicos por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

4.4.2. Marcação com Anexina V e Iodeto de propídio (PI)

A fim de identificar e quantificar o tipo de morte induzida pelos compostos de cobalto **2** e **3** na linhagem U937, foi utilizada a técnica de marcação dupla utilizando anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI). No histograma, obtido no citômetro de fluxo, no quadrante inferior esquerdo (negativo para anexina V e PI) encontra-se a população de células vivas (normais), no quadrante inferior direito (positivos para anexina V e negativo para PI) a população de células está na fase apoptótica, enquanto que o quadrante superior direito (positivo para anexina V e PI) e o quadrante superior esquerdo (negativo para anexina V e positivo para o IP) representam a população de células em fase de apoptose tardia e a população de células necróticas, respectivamente.

Os estudos foram realizados empregando-se os compostos de cobalto **2** e **3** na concentração de $80 \mu\text{mol dm}^{-3}$ e a cisplatina na concentração de $40 \mu\text{mol dm}^{-3}$, aproximadamente duas vezes o valor da IC_{50} e 24h de incubação. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 71.

O controle apresenta 94,24% das células viáveis (Q3, (A)). O composto **2** (B) não apresentou atividade significativa após 24h de incubação, sendo a porcentagem e morte por apoptose induzida por esse composto de 11,34% (Q2 + Q4) e a porcentagem de células viáveis de 88,23% (Q3), indicando que uma pequena redução da viabilidade, quando comparado ao controle.

O composto de cobalto **3** apresentou atividade superior ao composto **2**, induzindo morte por apoptose. Após 24 h de incubação o índice de morte observado foi de 95,42% (Q2 + Q4) e a porcentagem de células ainda viáveis foi de 3,58% (Q3), indicando redução significativa quando comparado com o controle.

A cisplatina, após 24h de incubação não apresentou indução de apoptose elevada (4,21% (Q2 + Q4)). Nessas condições 95,54% (Q3) das células tratadas com a cisplatina estavam viáveis.

A indução de necrose não foi significativa em nenhum dos tratamentos, sendo de 0,41%, 0,99% e 0,25% para os compostos **2**, **3** e cisplatina, respectivamente.

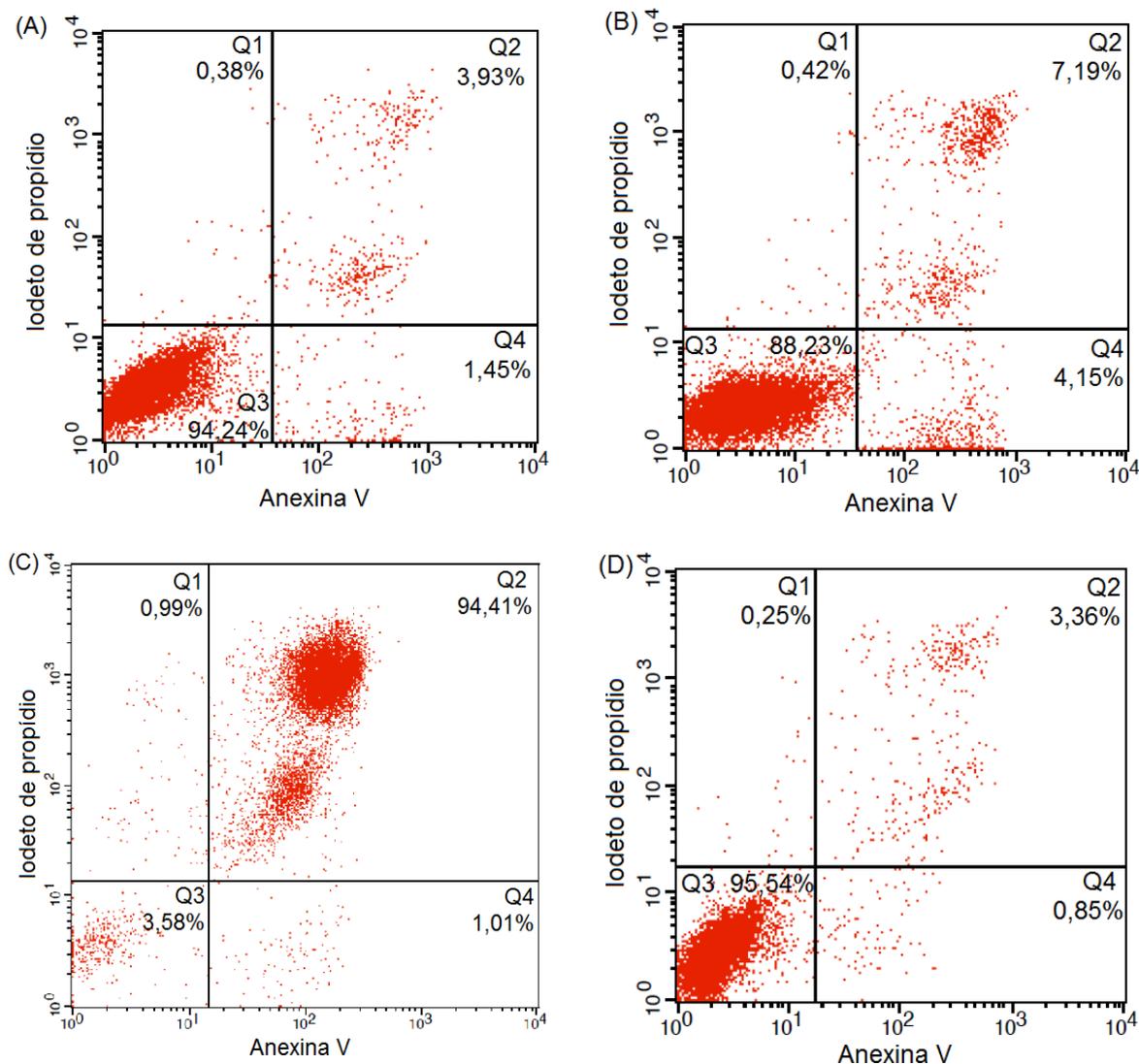


Figura 71. Detecção do tipo de morte por marcação com Anexina V/iodeto de propídio induzido pelos complexos de cobalto **2** e **3** e pela cisplatina, em células de U937, após 24 horas de tratamento. A) controle, B) células de U937 tratadas com o complexo **2**, na concentração de $80 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, C) células de U937 tratadas com o complexo **3**, na concentração de $80 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, D) células de U937 tratadas com cisplatina, na concentração de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. A distribuição de células em cada quadrante representa: porcentagem de morte celular por necrose (Q1), apoptose secundária (Q2) e apoptose primária (Q4) e células viáveis (Q3). A porcentagem de células em cada quadrante é apresentada.

Os compostos de cobalto **2** e **3** são isômeros, o que permite inferir se a atividade é dependente da isomeria. A atividade antitumoral dos compostos de cobalto mostrou dependência com a estrutura do ligante, uma vez que o composto **3** mostrou-se muito mais eficiente em induzir a morte por apoptose em células da linhagem U937 que o composto **2**.

Estudos anteriores, realizados com compostos de platina e cobre com os ligantes H2L2 e H3L2 (utilizando as linhagens U937, THP-1, MOLT-4, COLO 205 e H460), mostram que os compostos contendo o ligante H2L2 são mais ativos que os compostos com os respectivos metais e o ligante H2L3. Os compostos de platina com o ligante H2L3 (β -naftil) promove morte majoritariamente por necrose, enquanto o composto de cobalto contendo o mesmo ligante promove morte por apoptose (95,42%). Tais dados indicam que tanto o ligante como o metal tem influência sobre a atividade antitumoral (MOREIRA, 2015; FERNANDES, et al., 2015).

4.4.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada utilizando o marcador iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) que é marcador catiônico lipofílico fluorescente. Este se difunde livremente para o interior da célula e o acúmulo na matriz mitocondrial forma agregados fluorescentes (fluorocromo) na região do vermelho. A forma monomérica do JC-1 emite fluorescência na região do verde. O acúmulo na matriz mitocondrial se dá devido a carga negativa desta matriz que é gerada pelo bombardeamento de prótons para o espaço intermembranoso. Assim a formação de agregados de JC-1 no interior da mitocôndria só ocorre em células com potencial de membrana inalterado, células onde ocorreu o colapso do potencial de membrana fluorescem no verde (SMILEY, et al., 1991; COSSARIZZA, et al., 1993). O citômetro de fluxo quantifica as células que apresentam o PMM normal e 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).

Os resultados da avaliação do PMM de células U937 controle e tratadas com os compostos de cobalto **2** e **3** ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) na forma de gráficos *Dot-plot*, que representam os parâmetros de intensidade de fluorescência verde (FL1) e vermelha (FL2) são apresentados na Figura 72. A porcentagem de células com dissipação do potencial de membrana mitocondrial foi determinada a partir da redução da intensidade de fluorescência vermelha das amostras.

As células controle de U937 mostram forte fluorescência vermelha (Q2 - 94%), após coloração com JC-1. Após o tratamento das células U937 com os

compostos de cobalto **2** e **3**, durante 24 h, a fluorescência vermelha diminuiu de 94 (controle) para 90 e apenas 1%, respectivamente.

O quadrante inferior direito representa a população de células apoptóticas ou células com dano na mitocôndria. Após o tratamento com o composto de cobalto **3** a população de células nesse quadrante é de aproximadamente 98%, indicando que o tratamento com este composto acarreta danos na mitocôndria. As células controle, tratadas com o composto **2** e com cisplatina, que apresentam potencial de membrana alterado representam aproximadamente 5%, 9% e 12 % da população, respectivamente, mostrando que o dano a mitocôndria causado por estes compostos não é relevante neste tempo de incubação.

Estes resultados concordam com aqueles obtidos no ensaio de MTT e demonstram que a toxicidade do composto **3** contra a linhagem celular U937 está relacionada com a indução de apoptose, e que está diretamente relacionada à disfunção mitocondrial. Acredita-se que a perda de potencial de membrana mitocondrial pode ocorrer através da formação de poros na mitocôndria (FERNANDES, et al., 2015).

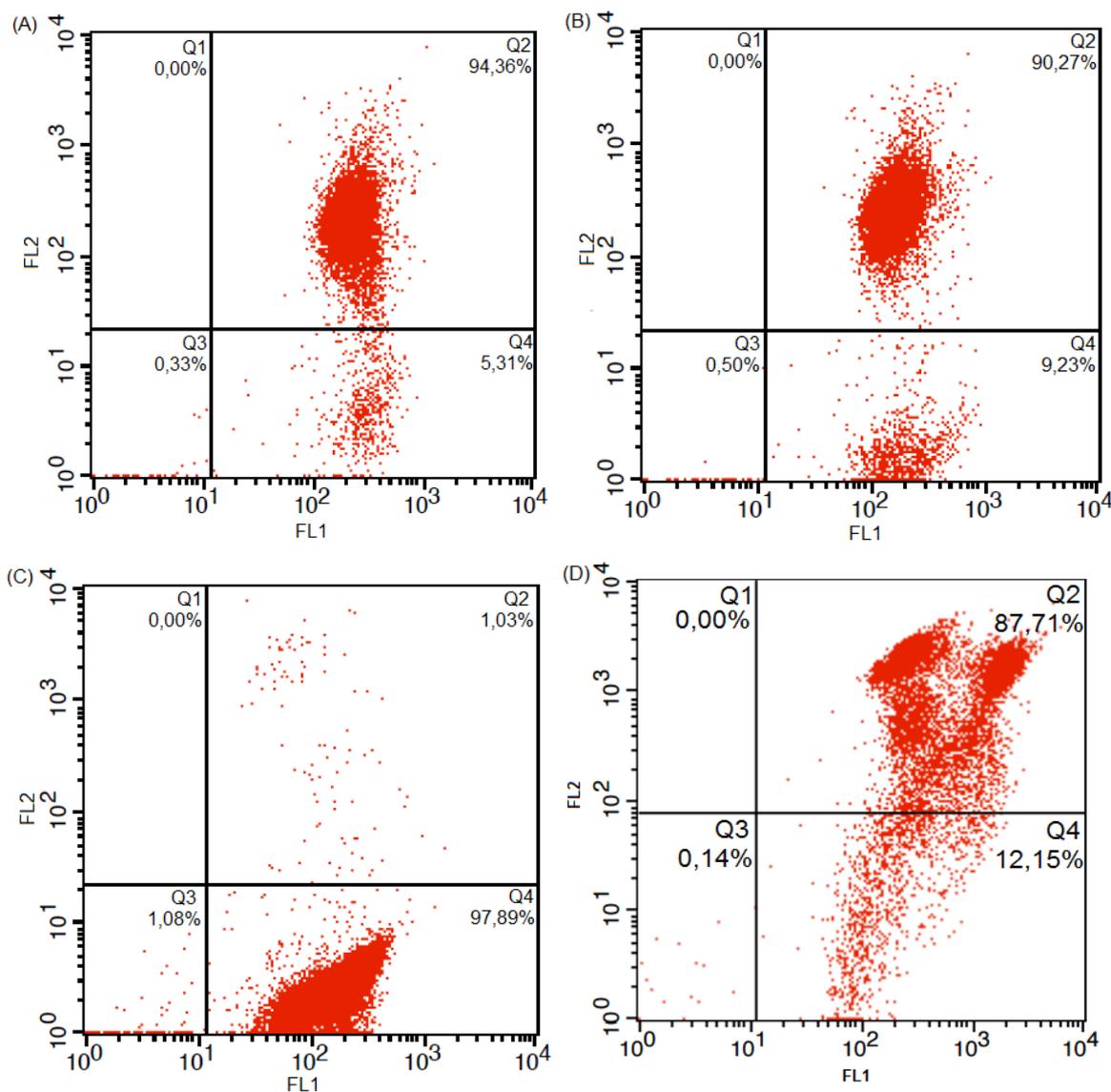


Figura 72. *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem U937, (A) controle; (B) tratada com o composto de cobalto **2** após 24h de incubação; (C) tratada com o composto de cobalto **3** após 24h de incubação; (D) tratada com o composto cisplatina após 24 h de incubação. Q2: células que apresentam mitocôndrias com potencial de membrana normal; Q4: células que apresentam mitocôndrias com perda do potencial de membrana.

Dentre os compostos estudados, o composto de cobalto **3** é o mais promissor, este induz apoptose em um período de tempo menor, quando comparado ao composto isomérico **2** e a cisplatina, contra a linhagem leucêmica U937. Este composto não apresentou citotoxicidade contra PBMC, indicando uma possível seletividade deste por células cancerígenas. O tipo de morte promovido pelo composto de cobalto **3** é desejado pois não causa processo inflamatório, sendo um tipo de morte regulada. Desta forma os estudos de mecanismo foram direcionados

apenas ao composto de cobalto **3**, por ser mais eficiente e apresentar as características desejadas para um metalofármaco.

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

A avaliação do ciclo celular foi realizada através da citometria de fluxo. Neste experimento, as fases são distinguidas pelo conteúdo do DNA das células em cada fase do ciclo celular, as células com conteúdo semelhante de DNA são agrupadas na mesma fase (NUNEZ, 2001; GONG, et al., 1994). As células com baixo conteúdo de DNA aparecem na região sub-G1 do histograma, a presença de células nesta região indicam morte celular por apoptose.

Os resultados demonstram que a população de células U937 em cada fase do ciclo celular foi afetada pelo tratamento com o composto de cobalto **3** (Figura 73). A população de células U937 em fase G1 no controle (sem tratamento) é de 41% e após o tratamento com $80 \mu\text{mol dm}^{-3}$ do composto **3** é de 7,7%. Nota-se que a população de células da linhagem U937 em sub-G1 aumentou significativamente, mediante o tratamento com o composto **3**, resultando na alteração de aproximadamente 8 para 84%. O aumento da população de células em sub-G1 corresponde às células cujo DNA foi clivado por nucleases celulares que foram ativadas pelo mecanismo de morte apoptótica. Esta interpretação está de acordo com os estudos realizados para o composto de cobre(II), obtido com o mesmo ligante, o qual promoveu uma diminuição de 60 a 20% na população de células U937 em fase G1, após o tratamento com $40 \mu\text{mol dm}^{-3}$ deste. Além disso, a população de células na fase sub-G1, após o tratamento com o cobre(II), aumentou significativamente, de 0,2 (controle) para 48% (FERNANDES et al., 2015).

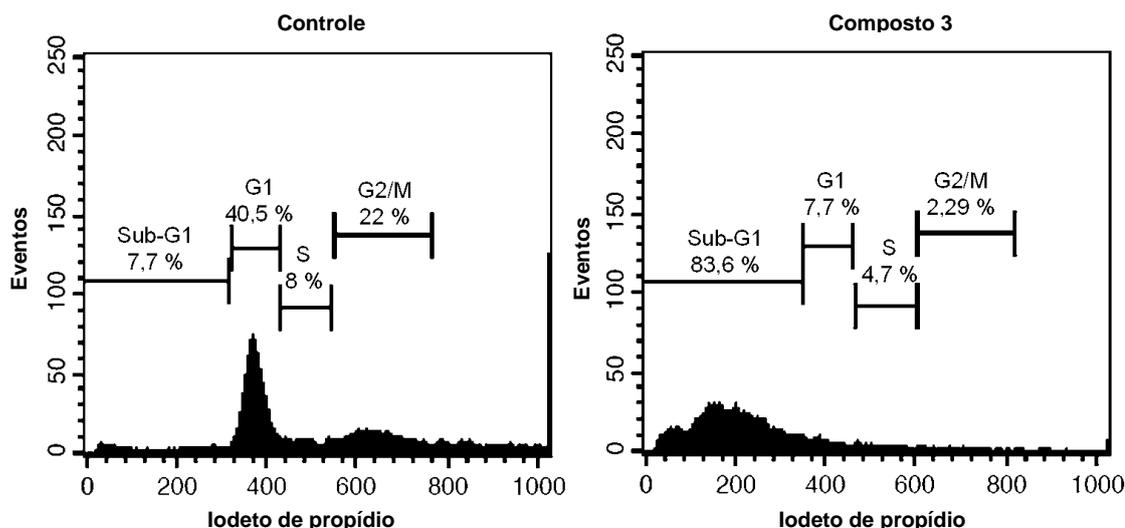


Figura 73. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem U937, corado com iodeto de propídio (PI), após 24h de incubação, controle e com o composto de cobalto **3**. Cada experimento, por amostra, foi determinado com base 10.000 eventos. (A) células do controle (sem tratamento); (B) células após o tratamento com $80 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do composto de cobalto **3**.

Assim como os resultados obtidos na marcação com Anexina V e iodeto de propídio, a avaliação do ciclo celular indica que o composto de cobalto **3** induz morte por apoptose.

4.4.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A identificação de alterações morfológicas em células de U937 tratadas com o composto de cobalto **3** foi realizada por MET e as imagens são apresentadas na Figura 74.

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das células do controle de U937 (não tratadas) (A) apresentam cromatina homogênea, perfis de retículo endoplasmático bem desenvolvido e um grande número de microvilosidades na superfície das células.

Após 4h de incubação com o composto de cobalto **3**, na concentração de $80 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pode-se observar uma ampliação de perfis de retículo endoplasmático, as mitocôndrias formam estruturas alongadas (seta). É possível observar a fragmentação do DNA e sua distribuição periférica (cabeça de seta).

Após 8h de incubação (C), observa-se um aumento considerável no número de vacúolos na matriz citoplásmica, o que pode ser um indicativo que a célula está

sofrendo apoptose. Em (D) é possível observar perfis mitocondriais ampliados (M) e com a matriz mitocondrial elétron-lucente em alguns pontos (estrelas). Uma associação intensa entre mitocôndrias e retículo endoplasmático (setas) também é observada. Estes dados estão de acordo com a perda de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) observada na avaliação do potencial de membrana mitocondrial (JC-1) e pode significar que a atividade do composto **3** contra linhagens de células leucêmicas, é mediada por um mecanismo apoptótico associado a disfunção mitocondrial.

A análise por MET mostrou mudanças significativas na mitocôndria, vacuolização celular, esvaziamento de matriz citoplasmática, demonstrando a eficácia do composto em afetar drasticamente a fisiologia celular. Tais alterações correspondem a morfologia da apoptose, intensa vacuolização e núcleo picnótico. Ao todo, os estudos do tipo de morte celular, indicam o disparo de sinal de apoptose, demonstrando a eficácia deste composto de cobalto na atividade contra células de linfoma histiocítico. As alterações morfológicas observadas são semelhantes aquelas observadas por Fernandes e colaboradores em células de U937 tratadas com um composto de zinco contendo em sua estrutura um grupo piridínico. Após 6h de incubação ($100 \mu\text{mol dm}^{-3}$) é possível observar associação mitocôndria-retículo endoplasmático e após 12h ($200 \mu\text{mol dm}^{-3}$) observa-se intensa vacuolização (FERNANDES, et al., 2014).

Todos os estudos do tipo de morte celular induzido pelo composto **3** em células da linhagem U937, indicam majoritariamente morte por apoptose. O composto **3** é um candidato promissor a metalofármaco, sendo capaz de induzir a morte por apoptose, e pouco citotóxico contra as células normais (PBMC), o que pode indicar especificidade por células cancerígenas.

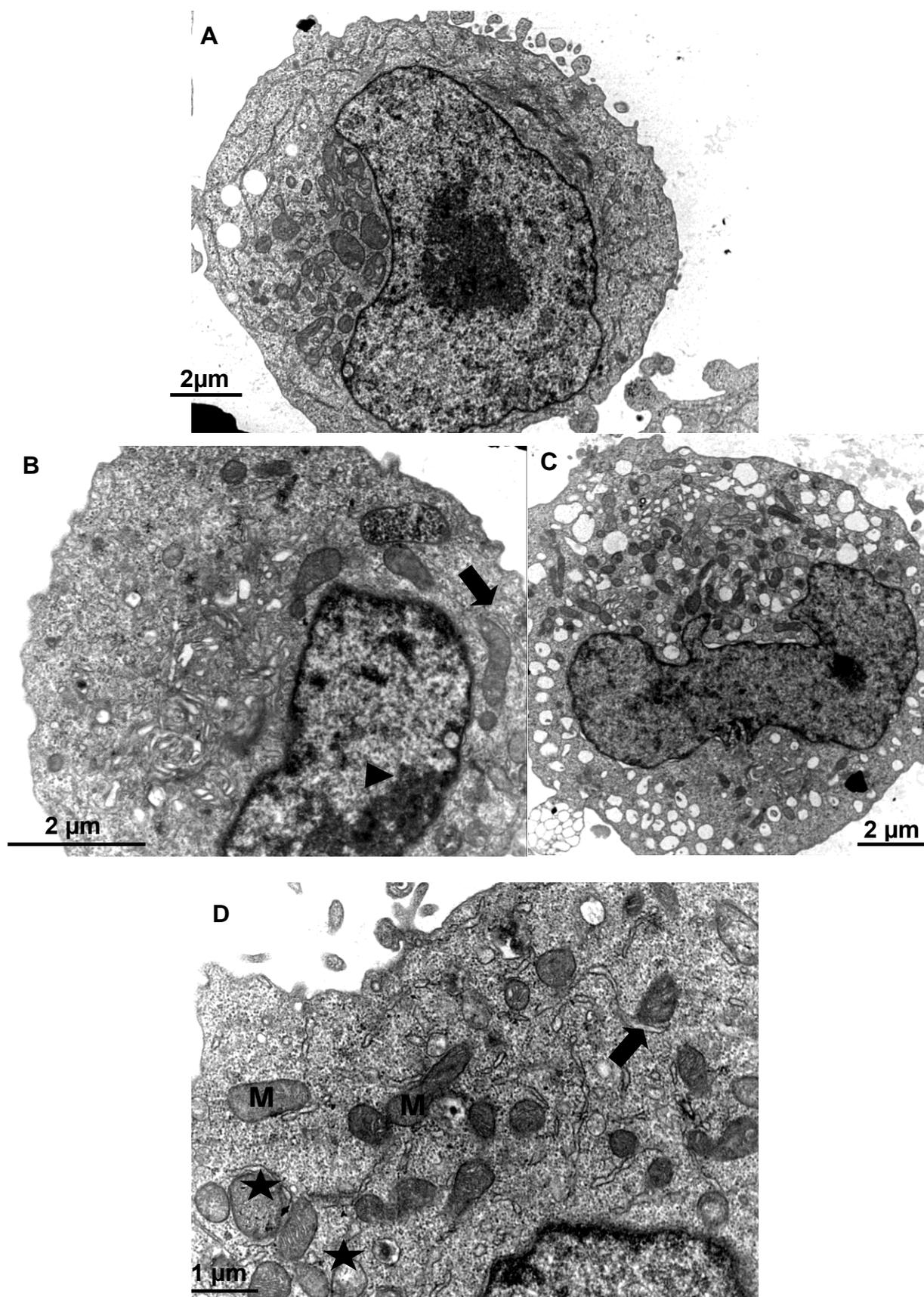


Figura 74. Microscopia eletrônica de transmissão de células leucêmicas humanas. (A) Controle, (B) U937 incubada com o composto **3** ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), por 4 h, (C) e (D) U937 incubada com composto **3** ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), por 8 h. Seta – mitocôndrias alongadas; Cabeça de seta – fragmentação de DNA; Estrela – matriz mitocondrial elétron-lucente; M – perfis mitocondriais ampliados.

5. CONCLUSÕES

Foram sintetizados e caracterizados seis compostos de coordenação de cobalto(II) e de ferro(III). Os compostos de cobalto são inéditos, assim como os compostos de ferro contendo os ligantes H2L2 e H2L3. Estes foram caracterizados e foram propostas estruturas mononucleares para os compostos de Co(II) e binucleares para os compostos inéditos de Fe(III), os quais mantêm as suas estruturas binucleares em solução, de acordo com dados eletroquímicos. Dados de raios-X para o composto de cobalto **3** permitem inferir que o composto **2** também tenha estrutura similar, devido à semelhança entre as propriedades espectrais de ambos.

Os compostos não apresentaram citotoxicidade contra a cepa, de *S. cerevisiae*, EG103. Os compostos de cobalto e ferro não apresentaram atividade de proteção celular contra o estresse oxidativo promovido pelo radical superóxido. Entretanto, os três ligantes e seus respectivos compostos apresentaram atividade de proteção celular contra o estresse promovido pelo peróxido de hidrogênio. Destacam-se os resultados obtidos para os ligantes H2L2 e H2L3 e para o composto **1**, os quais apresentaram maior capacidade de proteção celular, dentre os compostos estudados.

Através do ensaio de viabilidade celular (metabolização do MTT) foi possível identificar os compostos mais ativos contra diferentes linhagens de câncer, sendo o composto de cobalto **3** o mais ativo da série de compostos estudados.

Os compostos de coordenação de ferro mostraram-se mais citotóxicos contra as células normais (PBMC), quando comparado com os compostos de cobalto, indicando que os compostos de cobalto apresentam certa seletividade.

Os estudos de identificação do tipo de morte celular (anexina V, ciclo celular e potencial de membrana mitocondrial (JC-1)) induzida pelo composto **3**, indicam que este induz majoritariamente morte por apoptose. Estudos de microscopia eletrônica de transmissão indicaram dano a mitocôndria, o que condiz com os dados de JC-1 que indicam perda de potencial de membrana.

Os resultados obtidos indicam que o composto de cobalto **3** é um candidato promissor a metalofármaco e motivam estudos da atividade antitumoral *in vivo*.

PERSPECTIVAS

Estudos *in vivo* para o composto **3** contra a linhagens tumorais como U937, THP-1 e MOLT-4.

Estudos via MET da atividade antioxidante (proteção celular *in vivo* contra o estresse com peróxido de hidrogênio) do composto de cobalto **1** , empregando-se a levedura *S. cerevisiae* como modelo de estudo.

Estudos da atividade antitumoral *in vitro* dos compostos mais promissores obtidos neste trabalho contra linhagens como mama, próstata, neuroblastoma, melanoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDISON, A.W.; RAO, T.N. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen-sulphur donor ligands ; the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(n-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) perchlorate. **Journal Chemical Society Dalton Transactions**, v. 22, p. 1349 – 1356, 1984.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T .P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118 – 129, 2005.

ALMEIDA, V. R.; XAVIER, F. R.; OSÓRIO, R. E. H. M. B.; BESSA, L. M.; SCHILLING, E. L.; COSTA, T. G.; BORTOLOTTI, T.; CAVALETTI, A.; CASTRO, F. A. V.; VILHENA, F.; ALVES, O. C.; TERENCEZI, H.; ELEUTHERIO, E. C. A.; PEREIRA, M. D.; HAASE, W.; TOMKOWICZ, Z.; SZPOGANICZ, B.; BORTOLUZI, A. J.; NEVES, A. *In vitro* and *in vivo* activity of a new unsymmetrical dinuclear copper complex containing a derivative ligand of 1,4,7-triazacyclononane: catalytic promiscuity of [Cu₂(L)Cl₃]. **Dalton Transactions**, v. 42, p. 7059 – 7073, 2013.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202 – 2210, 2010.

ANITHA, P.; CHITRAPRIYA, N.; JANG, Y. J.; VISWANATHAMURTHI, P. Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidant and anticancer activity of new ruthenium(II) complexes of thiosemicarbazone/semicarbazone bearing 9,10-phenanthrenequinone. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 129, p. 17 – 26, 2013.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1 – 31, 2014.

BAL-DEMIRCI, T.; SAHIN, M.; ÖZYÜREK, M.; KONDAKÇI, E.; ÜLKÜSEVEN, B. Synthesis, antioxidant activities of the nickel(II), iron(III) and oxovanadium(IV) complexes with N₂O₂ chelating thiosemicarbazones. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.126. p. 317 – 323, 2014.

BATIN, E. E.; BRUMSGHIM, J. L. Metal specificity in DNA damage prevention by sulfur antioxidants. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 2036 – 2042, 2008.

BEERS, Jr., R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Biological Chemistry**, v. 195, p. 133 – 140, 1952.

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.

BERALDO, H. Contribuições da Química Inorgânica para a Química Medicinal. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 6, p. 4 – 6, 2005.

BERGENDI, L.; BENEŠ, L.; ĎURAČKOVÁ, Z.; FERENČIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Science**, v. 65, p. 1865 – 1874, 1999.

BHAT, A. H.; DAR, K.B.; ANEES, S.; ZARGAR, M. A.; MASSOD, A.; SOFI, M. A.; GANIE, S. A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101 – 110, 2015.

BIANCHI, M. L.P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123 – 130, 1999.

BUKHARI, S. B.; MEMON, S.; TAHIR, M. M.; BHANGER, M.I. Synthesis, characterization and investigation of antioxidant activity of cobalt-querceetin complex. **Journal of Molecular Structure**, v. 892, p. 39 – 46, 2008.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15 – 25, 2013.

CARVALHO, N. M. F.; HORN, A. Jr.; BORTOLUZZI, A. J.; DRAGO, V.; ANTUNES, O. A. C. Synthesis and characterization of three mononuclear Fe(III) complexes containing bipodal and tripodal ligands: X-ray molecular structure of the dichloro[N-propanamide-N,N-bis-(2-pyridylmethyl)amine]iron(III) perchlorate, **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, p. 90 – 98, 2006.

CHE, M.; WANG, R.; LI, X.; WANG, H.; ZHENG, X. F. S. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. **Drug Discovery Today**, 2015.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine** v. 111, p. 918 – 31, 1989.

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.

DASGUPTA, A.; KLEIN, K. Introduction to Free Radicals and the Body's Antioxidant. **Defense Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements**, p. 1 – 18, 2014.

DHAHAGANI, K.; MATHAN KUMAR, S.; CHAKKARAVARTHI, G.; ANITHA, K.; RAJESH, J.; RAMU, A.; RAJAGOPAL, G. Synthesis and spectral characterization of Schiff base complexes of Cu(II), Co(II), Zn(II) and VO(IV) containing 4-(4-aminophenyl) morpholine derivatives: Antimicrobial evaluation and anticancer studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 117, p. 87 – 94, 2014.

DICKSON, D. P. E.; BERRY, F. J. **Mössbauer Spectroscopy**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.

DRÖGE, W. Free Radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p. 47 – 95, 2002.

EL-WAKIEL, N.; EL-KEIY, M.; GABER, M. Synthesis, spectral, antitumor, antioxidant and antimicrobial studies on Cu(II), Ni(II) and Co(II) complexes of 4-[(1H-Benzoimidazol-2-ylimino)-methyl]-benzene-1,3-diol, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 147, p. 117 – 123, 2015.

ENYEDY, E. A.; BOGNÁR, G. M.; NAGY, N.V.; JAKUSCH, T.; KISS, T.; GAMBINO, D. Solution speciation of potential anticancer metal complexes of salicylaldehyde semicarbazone and its bromo derivative. **Polyhedron**, v. 67, p. 242 – 252, 2014.

FERNANDES, C.; HORN JR, A.; LOPES, B. F.; BULL, E. S.; AZEREDO, N. F. B.; KANASHIRO, M. M.; BORGES, F. V.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B.; PIRES, A. B.; FRANCO, R. W. A; ALMEIDA, J. C. A.; MACIEL, L. L. F.; RESENDE, J. A. L. C.; SCHENK, G. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by new copper(II) complexes containing naphthyl groups *via* interaction with death receptors. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 153, p. 68 – 87, 2015.

FERNANDES C.; HORN JR., A.; VIEIRA-DA-MOTTA O.; ASSIS V. M.; ROCHA M. R.; MATHIAS L. S.; BULL E. S.; BORTOLUZZI A. J.; GUIMARÃES E. V.; ALMEIDA

J. C.; RUSSELL D. H. Synthesis, characterization and antibacterial activity of FeIII, CoII, CuII and ZnII complexes probed by transmission electron microscopy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, p. 1214 – 1223, 2010.

FERNANDES C.; HORN JR., A.; VIEIRA-DA-MOTTA O.; KANASHIRO, M. M.; ROCHA, M. R.; MOREIRA, R. O.; MORCELLI, S. R.; LOPES, B. F.; MATHIAS, L. S.; BORGES, F. V.; BORGES, L. J. H.; FREITAS, W. R.; VISENTIN, L. C.; ALMEIDA, J. C. A.; SCHENK, G. Synthesis, characterization, antibacterial and antitumoral activities of mononuclear zinc complexes containing tridentate amine based ligands with N3 or N2O donor groups. **Inorganica Chimica Acta**, v. 416, p. 35 – 48, 2014.

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.

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.

GOODMAN, M.; BOSTICK, R. M.; KUCUK, O.; JONES, D. P. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: Past, present, and future. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 1068 – 1084, 2011.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p. 931 – 947, 2013.

GOULARD, M. O. F.; VALENTIM, I. B.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidante. **Química Nova**, v. 32, p. 689 – 702, 2009.

GREENWOOD, N. N.; GIBB, T. C. **Mossbauer Spectroscopy**, Chapman and Hall Ltd., 1971.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609 – 1623, 1992.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration. Where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 1634 – 1658, 2006.

HANIF, M.; BABAK, M. V.; HARTINGER, C. G. Development of anticancer agents: wizardry with osmium. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 10, p. 1640 – 1648, 2014.

HORN Jr., A.; NEVES, A.; VENCATO, I.; DRAGO, V.; ZUCCO, C.; RÜDIGER, W.; HAASE, W. A New Dinuclear N,O Donor Ligand (H₂BPCINOL) and the Structural and Magnetic Properties of two Diiron Complexes with the di- μ -Alkoxo Motif. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 1, p. 7-10, 2000.

HORN JR., A.; FIM, L.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, M. S.; NOVAK, M. A.; BENASSI NETO, M.; EBERLIN, L. S.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; FERNANDES, C.; *Journal Molecular Structure*, v. 797, p. 154 – , 2006.

HORN JR., A.; RIBEIRO, T.; FERNANDES, C.; MELO, K. V.; FERREIRA, S. S.; LESSA, J. A.; SCHENK, G.; PEREIRA, M. D. Superoxide dismutase and catalase mimetics that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**. Manuscrito sob revisão, 2014.

HUHEEY, J.; KEITER, L. R. **Coordenation Chemistry: Bonding, spectra and magnetism. Inorganic Chemistry: Principles of structure and reactivity**. 4^a Ed. New York: Harper Collins College Publishers. 1993.

INCA – **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>, acesso em: 22/02/2016.

INCA – **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Câncer, 2015. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>, acesso em: 04/11/2015.

JAESCHKE, H. Antioxidant Defense Mechanisms. **Comprehensive Toxicology**, v. 9, p. 319 – 337, 2010.

JAIVIDHYA, P.; DHIVYA, R.; AKBARSHA, M. A.; PALANIANDAVAR, M. Efficient DNA cleavage mediated by mononuclear mixed ligand copper(II) phenolate complexes: The role of co-ligand planarity on DNA binding and cleavage and anticancer activity, **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 114, p. 94 – 105, 2012.

KEHRER J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**. v.149, p. 43 – 50, 2000.

KHURANA, V. & LINDQUIST, S. Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, p. 436 – 449, 2010.

KHURANA, V. & LINDQUIST, S. Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, p. 436-449, 2010.

LESSA, J. A.; HORN, A.; BULL, E. S.; ROCHA, M. R.; BENASSI, M.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; CASELLATO, A.; NOBLE, C. J.; HANSON, G. H.; SCHENK, G.; SILVA, G. C.; ANTUNES, O. A. C.; FERNANDES, C. Catalase vs peroxidase activity of a manganese(II) compound: identification of a Mn(III)-(μ-O)₂-Mn(IV) reaction intermediate by electrospray ionization mass spectrometry and electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Inorganic Chemistry**, v. 48, p. 4569 – 4579, 2009.

LOPES, B. F. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antineoplásica de compostos orgânicos e de coordenação de cobre: influência do naftol e da cumarina na atividade biológica**, 2012. Tese (Doutorado em Ciências Naturais), Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes - RJ, 2012. 234f.

LUBE, L. M. **Oxidação de hidrocarbonetos cíclicos catalisada por complexos de ferro modelos para a metano monoxigenase**, 2011. Tese (Doutorado em Ciências Naturais), Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes - RJ, 2011. 200f.

LÜ, J.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, p. 840 – 860, 2010.

MACEDO-MÁRQUEZ, A. La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) em las mitocôndrias de *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Especializada em Ciências Químico-Biológicas**, v. 15, p. 97 – 103, 2012.

MANIKANDAN, R.; VIJAYAN, P.; ANITHA, P.; PRAKASH, G.; VISWANATHAMURTHI, P.; BUTCHER, R. J.; VELMURUGAN, K.; NANDHAKUMAR, R. Synthesis, structure and in vitro biological activity of pyridoxal N(4)-substituted thiosemicarbazone cobalt(III) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 421, p. 80 – 90, 2014.

MANDAL, A. **Sistemas Antioxidantes da Enzima**, 2012. Disponível em: <[http://www.news-medical.net/health/Antioxidant-Enzyme-Systems-\(Portuguese\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Antioxidant-Enzyme-Systems-(Portuguese).aspx)>, acesso em 03/12/2015.

MAURYA, P. K.; NOTO, C.; RIZZO, L. B.; RIOS, A. C.; NUNES, S. O. V.; BARBOSA, D. S.; SETHI, S.; ZENI, M.; MANSUR, R. B.; MAES, M.; BRIETZKE, E. The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder.

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, v. 65, p. 134 – 144, 2016.

MCGILL, M. R.; JAESCHKE, H. Oxidant stress, antioxidant defense, and liver injury. **Drug-induced Liver Disease**, p. 71 – 84, 2013.

MEDICE, S.; PEANA, M.; NURCHO, V. M.; LACHOWICZ, J. I.; CRISPONI, G.; ZORODDU, M. A. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 329 – 350, 2015.

MEDINA-NAVARRO, R.; DURÁN-REYES, G.; DÍAZ-FLORES, M.; VILAR-ROJAS, C. Protein antioxidant response to the stress and the relationship between molecular structure and antioxidant function. **Plos One**, v. 5, p.1 – 11, 2010.

MELO, K. V. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de complexos de ferro**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ, 2012. 138f.

MORANO, K. A.; GRANT, C. M.; MOYE-ROWLEY, W. S. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, p. 1157–1195, 2012.

MOREIRA, R. O. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de compostos de coordenação de platina e zinco**, 2015. Tese (Doutorado em Ciências Naturais), Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes - RJ, 2015, 103f.

MONIM-UL-MEHBOOB, M.; ALTAF, M.; FETTOUHI, M.; ISAB, A. A.; WAZEER, M. I. M.; SHAIKH, M. N.; ALTUWAIJRI, S. Synthesis, spectroscopic characterization and anti-cancer properties of new gold(III)–alkanediamine complexes against gastric, prostate and ovarian cancer cells; crystal structure of $[Au_2(pn)_2(Cl)_2]Cl_2 \cdot H_2O$. **Polyhedron**, v. 61, p. 225-234, 2013.

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

NASH T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. **Biochemical Journal**, v. 55, p. 416 – 421, 1953.

NAVARRO-YEPES, J.; ZAVALA-FLORES, L.; ANANDHAN, A.; WANG, F.; SKOTAK, M.; CHANDRA, N.; LI, M.; PAPPA, A.; MASTINEZ-FONG, D.; RAZO, L. M. D.;

QUINTANILLA-VEJA, B.; FRANCO, R. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 142, p. 206 – 230, 2014.

NEVES, A.; BRITO, M. A.; VENCATO, I. Synthesis, Crystal Structure and Properties of a New Binuclear Iron (III) Complexes as a Model for the Purple Acid Phosphatase, **Inorganica Chimica Acta**, v. 214, p. 5 – 8, 1993.

NEVES, A.; BRITO, M. A.; DRAGO, V. A New Asymmetric N₅O₂-donor Binucleating Ligand and First Fe^{II}Fe^{III} Complex as a Model for Redox Properties of Uteroferrin. **Inorganica Chimica Acta**, v. 237, p. 131 – 135, 1995.

NOVA ESCOLA. Se liga: você pode ajudar a evitar o câncer! Disponível em: <http://rede.novaescolaclub.org.br/planos-de-aula/se-liga-voce-pode-ajudar-evitar-o-cancer>, acesso 04/11/2015.

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

OMS – **Organização Mundial da Saúde**. Cancer, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, acesso em 06/11/2015.

PUTNAM, C. D.; ARVAI, A. S.; BOURNE, Y.; TAINER, J. A. Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, p. 295 – 309, 2000.

RAMAN, N.; PRAVIN, N. Lasing the DNA fragments through b-diketimine framed Knoevenagel condensed Cu(II) and Zn(II) complexes – Na *in vitro* and *in vivo* approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 118, p. 867 – 882, 2014.

RAO, C. N. R. Ultra-violet and visible spectroscopy: chemical applications. **Butterworths** (London), 1975.

RAVICHANDRAM, R.; GURUMOORTHY, P.; MUSTHAFA, M. A. I.; RAHIMAN, A. K. Antioxidant, DNA binding and nuclease activities of heteroleptic copper(II) complexes derived from 2-((2-(piperazin-1-yl)ethylimino)methyl)-4-substituted phenols and diimines. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 785 – 793, 2014a.

RAVICHANDRAM, R.; RAJENDRAN, M.; DEVAPIRIAM, D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. **Food Chemistry**, v. 146, p. 472 – 478, 2014b.

RIBEIRO, T. P.; FERNANDES, C.; MELO, K. V.; FERREIRA, S. S.; LESSA, J. A.; FRANCO, R. W. A.; SCHENK, G.; PEREIRA, M. D.; HORN Jr. A. Iron, copper and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 67 – 76, 2015.

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.

SÁ, R. A.; CASTRO, F. A. V.; ELEUTHERIO, E. C. A.; SOUZA, R. M.; SILVA, J. F. M.; PEREIRA, M. D. Brazilian propolis protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 993 – 1000, 2013.

SCHWIETERT, C.; MCCUE, J.; BORTOLUZZI, A. Coordination compounds in medicinal chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 184p. 67 – 89, 1999.

SEVAGANAPATHY, M.; PRAVIN, N.; POTHIRAJ, K.; RAMAN, N. Photo biological activation of NSO donor mixed-ligand complexes: In vivo and preclinical perspectives. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 256 – 272, 2014.

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

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 3671 – 3675, 1991.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 95 – 100, 2005.

ŠTARHA, P.; TRÁVNÍČEK, Z.; HERCHEL, R.; POPA, I.; SUCHÝ, P.; VANČO, J. Dinuclear copper(II) complexes containing 6-(benzylamino)purines as bridging

ligands: Synthesis, characterization, and *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 432 – 440, 2009.

SILVA, G. C.; PARRILHA, G. L.; CARVALHO, N. M. F.; DRAGO, V.; FERNANDES, C.; HORN Jr., A.; ANTUNES, O. A. C. A bio-inspired Fe(III) complex and its use in the cyclohexane oxidation, **Catalysis Today**, v. 133-135, p. 684 – 688, 2008.

TAN, C.; LU, Y.; JI, L.; MAO, Z. Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds, **Metallomics**, v. 6, p. 953 – 1098, 2014.

THESGC - **Structural Genomics Consortium**. Human glutathione peroxidase, 2015. Disponível em: <http://www.thesgc.org/structures/2f8a>, acesso em 24/11/2015.

TOMASETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **Science**, v. 347, n. 6217, p. 78 – 81, 2015.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M. M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de nano oxidativo em sangue humano: principais métodos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323 – 1338, 2007.

VIVEKANAND, B.; RAJ, K. M.; MRUTHYUNJAYASWAMY, B. H. M. Synthesis, characterization, antimicrobial, DNA-cleavage and antioxidant activities of 3-((5-chloro-2-phenyl-1H-indol-3-ylimino) ethyl)quinoline-2(1H)-thione and its metal complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1079, p. 214 – 224, 2015.

VUJIĆ, J. M.; KALUD-EROVIC´, G. N.; ZMEJKOVSKI, B. B.; MILOVANOVIC´, M.; VOLAREVIC´, V.; ARSENIJEVIC´, N.; STANOJKOVIC´, T. P.; TRIFUNOVIC. S. R. Stereospecific ligands and their complexes. Part X: Synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral activity of platinum(IV) complexes with O,O'-dialkyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoate ligands, **Inorganica Chimica Acta**, v. 390, p. 123 – 128, 2012.

WANG, F.; YIN, H.; CUI, J.; ZHANG, Y.; GENG, H.; HONG, M. Synthesis, structural characterization, *in vitro* cytotoxicities, DNA-binding and BSA interaction of diorganotin (IV) complexes derived from hydrazone Schiff base. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 759, p.83 – 91, 2014.

WEITNER, T.; KOS, I.; SHENG, H.; TOVMASYAN, A.; REBOUCAS, J. S.; FAN, P.; WARNER, D. S.; VUJASKOVIC, Z.; BATINIC-HARBELE, I.; SPASOJEVIC, I. Comprehensive pharmacokinetic studies and oral bioavailability of two Mn porphyrin-based SOD mimics, MnTE-2-PyP⁵⁺ and MnTnHex-2-PyP⁵⁺. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 58, p. 73 – 80, 2013.

WEINBERG, F.; HAMANAKA, R.; WHEATON, W. W.; WEINBERG S.; JOSEPH, J.; LOPEZ, M.; KALYANARAMAN, B.; MUTLU, G. M.; BUDINGER, G. R. S.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 8788 – 8793, 2010.

YU, H.; LIU, X.; XING, R.; S. LIU, S.; LI, C.; LI, P. Radical scavenging activity of protein from tentacles of jellyfish *Rhopilema esculentum*. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 2659 – 2664, 2005.

ZHAO, H.; LI, J.; HAN, B.; LI, X.; CHEN, J. Improvement of oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through global transcription machinery engineering. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 869 – 878, 2014.

ZHANG, J.; YU, Q.; LI, Q.; YANG, L.; CHEN, L.; ZHOU, Y.; LIU, J. A ruthenium(II) complex capable of inducing and stabilizing bcl-2 G-quadruplex formation as a potential cancer inhibitor. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 134, p. 1 – 11, 2014.