

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTITUMORAIS DE NOVOS COMPLEXOS DE ZINCO**

MICHELLE RODRIGUES E ROCHA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

FEVEREIRO/2011

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAIS DE NOVOS COMPLEXOS DE ZINCO

MICHELLE RODRIGUES E ROCHA

"Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Naturais."

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

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO - 2011

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAIS DE NOVOS COMPLEXOS DE ZINCO

MICHELLE RODRIGUES E ROCHA

“Dissertação de mestrado apresentado ao Centro de Ciências Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais”

Aprovado em 15 de fevereiro de 2011

Comissão Examinadora:

Prof. Dr^a. Nadia Maria Comerlato- IQ/UFRJ

Prof. Dr. Luís César Passoni – LCQUI/UENF

Prof. Dr. João Carlos de Aquino Almeida-LFBM/CBB/UENF

Prof. Dr^a. Christiane Fernandes Horn- LCQUI/CCT/UENF

ORIENTADORA

Ao meu avô, Antônio Rodrigues de Paula,

por todo o amor.

AGRADECIMENTOS

- A Deus;
- Aos meus pais, pelo incentivo diante às dificuldades;
- À Prof^a. Christiane pela orientação e por ter despertado o interesse pelo trabalho e pesquisa;
- Ao Prof. Adolfo pelo auxílio e discussões;
- Aos professores João Carlos de Aquino Almeida, Lorenzo C. Viscentin, Marcos N. Eberlin e Milton M. Kanashiro pela colaboração na realização deste trabalho;
- À Rafaela pela ajuda, companheirismo e amizade;
- Aos companheiros de laboratório e amigos Bruna, Camila, Franz, Karen, Leo, Luíza, Érika, Sarah, Marcione e Samila e os demais alunos do laboratório 103, pela ajuda nestes dois anos;
- Aos professores João Carlos de Aquino Almeida, Nadia Maria Comerlato e Luís César Passoni, que fizeram parte da banca;
- A UENF e CAPES pela estrutura e concessão de bolsa;
- Ao Leandro por todo amor, companheirismo e paciência.

RESUMO

Neste trabalho apresentamos a síntese, caracterização e estudo da atividade biológica frente às linhagens de células leucêmicas humanas (THP-1 e U937) promovida por seis complexos mononucleares de zinco: $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ **(1)**, $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ **(2)**, $[Zn(HL_3)Cl]$ **(3)**, $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ **(4)**, $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ **(5)**, $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl \cdot H_2O$ **(6)**, onde $L_1 =$ N-bis-(2-piridilmetil)amina; $HL_2 =$ (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina; $H_2L_3 =$ N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina; $HL_4 =$ 1[(piridina-2-il-metil)-amino]-propan-2-ol; $HL_5 =$ 2-[piridil-(2-il-metil)amino]etanol; $H_2L_6 =$ N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol. Os ligantes foram previamente sintetizados e caracterizados por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de 1H e ^{13}C . Após a caracterização dos ligantes, reagiu-se estes com $ZnCl_2$ obtendo-se os respectivos complexos de zinco. Estes complexos foram caracterizados por técnicas físico-químicas, como espectroscopia de infravermelho, análise elementar (C, H e N), determinação do ponto de fusão, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) e difração de raios X, sendo esta última utilizada para a caracterização dos complexos **(1)**, **(2)**, **(3)** e **(5)**. Foi investigada a atividade dos seis complexos e dos seus respectivos ligantes frente às linhagens de células leucêmicas humanas (THP-1 e U937). A indução de morte celular por apoptose promovida pelos complexos foi avaliada por microscopia de fluorescência utilizando-se o método de coração e empregando-se diferentes concentrações dos complexos (400, 200, 100 e 50 $\mu mol/L$), nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h. Os complexos **(1)**, **(2)** e **(6)** não foram capazes de induzir significativas taxas de morte celular por apoptose frente às células THP-1 e U937. Os complexos **(3)**, **(4)** e **(5)** induziram taxas razoáveis de morte celular por apoptose frente às células U937, a partir da concentração de 200 $\mu mol/L$ e após 12 h de incubação. A fim de melhor comparar os resultados, foi obtido o valor da IC_{50} para todos os compostos investigados.

Palavras-chave: complexos de zinco, Raios X, ESI(+)-MS, células leucêmicas, atividade antitumoral, IC_{50} .

ABSTRACT

This work presents the synthesis, characterization and studies of the biological activity against human leukemia cell lines (THP-1 and U937) of six mononuclear zinc complexes: $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**), $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**), $[Zn(HL_3)Cl]$ (**3**), $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ (**4**), $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (**5**), $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl \cdot H_2O$ (**6**), where $L_1 =$ (bis-2-pyridylmethyl)amine); $L_2 =$ (2-hydroxybenzyl-2-pyridylmethyl)amine $L_3 =$ (*N*-(2-hydroxybenzyl)-*N*-(2-pyridylmethyl)[(3-chloro)(2-hydroxy)]propylamine); $L_4 =$ 1-[(pyridine-2-ylmethyl)-amino]-propan-2-ol; $L_5 =$ *N*-2-[(pyridine-2-ylmethyl)amino]ethanol; $L_6 =$ *N*-Ftaloil-*N*-(2-hydroxybenzyl)-*N*-(2-pyridylmethyl)-1,3-propanodiamine-2-ol. The ligands were synthesized previously and characterized by IR spectroscopy and 1H and ^{13}C NMR. After the characterization of the ligands, reactions with Zn(II) salts were performed in order to obtain the zinc complexes. The complexes were characterized by physical-chemical analysis, such as IR spectroscopy, elemental analyses, conductivimetry, mass spectrometry (ESI(+)-MS) and (ESI(+)-MS/MS) and X-ray diffraction, the last of which was utilized for the characterization of complexes (**1**), (**2**), (**3**) and (**5**). X-ray studies indicate the formation of tetraordinated and pentacoordinated mononuclear zinc(II) complexes, with tetrahedral and square-pyramidal geometry. The apoptosis induced by the complexes was evaluated by acridine orange/ethidium bromide staining, varying the concentration of the complexes (400, 200, 100 and 50 $\mu\text{mol/L}$) and the time (12, 24, 36 and 48 h). Complexes (**1**), (**2**) and (**6**) no induced apoptosis of THP-1 and U937 cells at highest concentrations while complexes (**3**), (**4**) and (**5**) induced apoptosis of THP-1 and U937 cells at the highest concentrations (200 and 400 $\mu\text{mol/L}$). In order to compare the results, the IC_{50} for all the complexes under investigation were obtained. These results indicate that the structures of the complexes have a great influence on the biological activity. To directly observe the morphological changes of the internal structure of leukemia cells after the treatment, Transmission Electron Microscopy (TEM) was employed.

Key words: zinc(II) complexes, X-ray, ESI(+)-MS, antitumor activity, leukemia cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Estrutura da cisplatina. B) Estrutura do seu análogo carboplatina.....	26
Figura 2. Mecanismo de clivagem oxidativa do DNA.....	27
Figura 3. Mecanismo de clivagem hidrolítica do DNA	28
Figura 4. Estruturas das antraciclinas	29
Figura 5. Diferentes estruturas para o composto de cobre, em função do pH, obtidos por titulação potenciométrica	32
Figura 6. Gráfico da clivagem do DNA plasmidial pelo composto de cobre em diferentes concentrações e em diferentes valores de pH, a 50°C após 16 h de incubação.....	33
Figura 7. Gráfico da clivagem do DNA plasmidial pelo composto de cobre em diferentes concentrações, na presença da distamicina e do controle. O DNA foi incubado previamente com distamicina (30 µM) por 30 min, em seguida foi incubado por 4h com o composto de cobre a, 50°C e pH 7,5.....	34
Figura 8. Gráfico da clivagem do DNA plasmidial pelo composto de cobre em diferentes concentrações e em condições anaeróbicas (esquerda) e aeróbicas (direita) após 2h de incubação a 50°C e pH 7,5, onde FI= forma superenovelada, FII= forma circular e FIII= forma linear.....	35
Figura 9. Estrutura do ligante (L).....	36
Figura 10. Estruturas dos compostos de coordenação: A) [Co(L)(NO ₃) ₂], B) [Ni(L)(NO ₃) ₂], C) [Cu(L)(NO ₃) ₂], D) [Zn(L)(NO ₃) ₂].....	37
Figura 11. Estruturas dos compostos de coordenação de zinco.....	39
Figura 12. Estruturas dos compostos de coordenação de zinco.....	41
Figura 13. Immunoblots de pAkt e p21 extraídos de células PC-3 tratadas por 48 h com os compostos de zinco.....	43
Figura 14. Espectro de infravermelho para o ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L ₁) obtido em filme.....	61
Figura 15. Espectro de infravermelho para o ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL ₂), obtido em filme.....	62

Figura 16. Espectro de infravermelho para o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H ₂ L ₃), obtido em filme.....	64
Figura 17. Espectro de infravermelho para o ligante 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL ₄), obtido em filme.....	65
Figura 18. Espectro de infravermelho para o ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL ₅) obtido em filme.....	67
Figura 19. Espectro de infravermelho para o precursor ftalimida potássica, obtido em filme.....	68
Figura 20. Espectro de infravermelho para o precursor (Ftalimidometil)oxirano, obtido em filme.....	69
Figura 21. Espectro de infravermelho para o ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H ₂ L ₆), obtido em filme.....	71
Figura 22. Espectro de RMN ¹ H para o ligante N-bis-(2-piridilmetil) amina (L ₁), obtido em CDCl ₃	72
Figura 23. Espectro de RMN ¹³ C (APT) para o ligante N-bis-(2-piridilmetil) amina (L ₁), em CDCl ₃	74
Figura 24. Espectro de RMN ¹ H para o ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL ₂), obtido em CDCl ₃	75
Figura 25. Espectro de RMN ¹³ C (APT) do ligante HL ₂ , em CDCl ₃	77
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H para o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H ₂ L ₃), obtido em CDCl ₃	78
Figura 27. Espectro de RMN ¹³ C (APT) do ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H ₂ L ₃), em CDCl ₃	79
Figura 28. Espectro de RMN ¹ H para o ligante [(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL ₄), obtido em CDCl ₃	82
Figura 29. Espectro de RMN ¹³ C (APT) do ligante [(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL ₄), em CDCl ₃	83
Figura 30. Espectro de RMN ¹ H para o ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL ₅), obtido em CDCl ₃	85
Figura 31. Espectro de RMN ¹³ C (APT) para o ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL ₅), em CDCl ₃	86
Figura 32. Espectro de RMN ¹ H para o ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H ₂ L ₆), obtido em CDCl ₃	88

Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C do ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxi-benzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6), em CDCl_3	90
Figura 34. Estrutura de raios X do complexo $[\text{Zn}(\text{L}_1)(\text{Cl})_2]$ (1)	93
Figura 35. Estrutura de raios X do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (2)	95
Figura 36. Estrutura de raios X do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (2) com as interações intramoleculares representadas.....	97
Figura 37. Estrutura de raios X do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (2) com as interações intramoleculares e intermoleculares representadas.....	97
Figura 38. Estrutura de raios X do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ (5)	99
Figura 39. Estrutura de raios X do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ (5) com as interações intermoleculares representadas.....	100
Figura 40. Espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Zn}(\text{L}_1)(\text{Cl})_2]$ (1) , obtido em pastilha de KBr.....	103
Figura 41. Espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (2) , obtido em pastilha de KBr.....	104
Figura 42. Espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl})_2]$ (4) , obtido em pastilha de KBr.....	105
Figura 43. Espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ (5) , obtido em pastilha de KBr.....	106
Figura 44. Espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_6)(\text{Cl})\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (6) , obtido em pastilha de KBr.....	106
Figura 45. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[\text{Zn}(\text{L}_1)(\text{Cl})_2]$ (1)	112
Figura 46. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (2)	113
Figura 47. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (2) , na região de m/z 210 a 420.....	114
Figura 48. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (2) , na região de m/z 450 a 580.....	115
Figura 49. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (2) , na região de m/z 580 a 700.....	116
Figura 49. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (2) , na região de m/z 580 a 700.....	118

Figura 51. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (5)	119
Figura 52. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl \cdot H_2O$ (6)	120
Figura 53. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (1) e do ligante L_1 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h.....	127
Figura 54. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (1) , nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h.....	127
Figura 55. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (1) e do ligante L_1 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h.....	128
Figura 56. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (1) , nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h.....	129
Figura 57. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (2) e do ligante HL_2 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h.....	130
Figura 58. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (2) , nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h.....	130
Figura 59. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (2) e do ligante HL_2 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h.....	131
Figura 60. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (2) , nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h.....	132
Figura 61. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_3)(Cl)]$ (3) e do ligante H_2L_3 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h.....	133
Figura 62. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_3)(Cl)]$ (3) , nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h.....	133
Figura 63. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_3)(Cl)]$ (3) e do ligante H_2L_3 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h.....	134

Figura 64. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_3)(Cl)]$ (3), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h.....	135
Figura 65. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ (4) e do ligante HL_4 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h.....	136
Figura 66. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ (4), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h.....	136
Figura 67. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ (4) e do ligante HL_4 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h.....	137
Figura 68. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ (4), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h.....	138
Figura 69. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (5) e do ligante HL_5 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h.....	139
Figura 70. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (5), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h.....	139
Figura 71. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (5) e do ligante HL_5 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h.....	140
Figura 72. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (5), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h.....	141
Figura 73. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl$ (6) e do ligante H_2L_6 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h.....	142
Figura 74. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl$ (6), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h.....	142
Figura 75. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl$ (6) e do ligante H_2L_6 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h.....	143

Figura 76. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl$ (6), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h.....	144
Figura 77. Estrutura dos complexos (2), (3) e (6).....	146
Figura 78. Estrutura dos complexos (4) e (5).....	146
Figura 79. Células U937 visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão após 6 h de incubação. A) e B) Grupo controle. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático.....	148
Figura 80. A) e B) Células U937 tratadas com o composto $[Zn(HL_4)(Cl_2)]$ (4) na concentração 50 μM e após 6 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático.....	149
Figura 81. Células U937 tratadas com o composto $[Zn(HL_4)(Cl_2)]$ (4) na concentração de 100 μM e após 6 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. A) Associação M e RE. B) Complexo de Golgi. CG – complexo de Golgi, M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático.....	151
Figura 83. Células U937 visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão após 12 h de incubação. A) e B) Grupo controle. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático.....	153
Figura 84. A) e B) Células U937 tratadas com o composto $[Zn(HL_4)(Cl_2)]$ (4) na concentração de 50 μM e após 12 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático.....	154
Figura 85. A) e B) Células U937 tratadas com o composto $[Zn(HL_4)(Cl_2)]$ (4) na concentração de 100 μM e após 12 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático.....	156
Figura 86. A) e B) Células U937 tratadas com o composto $[Zn(HL_4)(Cl_2)]$ (4) na concentração de 200 μM e após 12 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático, V – vacúolos.....	157
Figura 87. Células U937 tratadas com o composto $[Zn(HL_4)(Cl_2)]$ (4) na concentração de 200 μM e após 12 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. A) dilatação do RE. B) condensação de cromatina e presença de vacúolos. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático, V – vacúolos.....	158

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Esquema de síntese do ligante L_1	50
Esquema 2. Esquema de síntese do ligante HL_2	51
Esquema 3. Esquema de síntese do ligante H_2L_3	51
Esquema 4. Esquema de síntese do ligante HL_4	52
Esquema 5. Esquema de síntese do ligante HL_5).....	52
Esquema 6. Esquema de síntese do ligante H_2L_6	54
Esquema 7. Síntese do complexo $[Zn(HL_1)(Cl)_2]$ (1)	55
Esquema 8. Síntese do complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (2)	56
Esquema 9. Síntese do complexo $[Zn(HL_3)(Cl)]$ (3)	57
Esquema 10. Síntese do complexo $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ (4)	57
Esquema 11. Síntese do $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (5)	58
Esquema 12. Síntese do $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl \cdot H_2O$ (6)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados das atividades antitumorais apresentados pelos compostos de coordenação.....	38
Tabela 2. Resultados das atividades antitumorais apresentados pelos compostos de coordenação de zinco, expresso por IC ₅₀ (M).....	40
Tabela 3. Resultados das atividades antitumorais apresentados pelos compostos de coordenação de zinco, expresso por IC ₅₀ (µM ±s.d.).....	42
Tabela 4. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L ₁), com suas respectivas atribuições.....	61
Tabela 5. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL ₂) com suas respectivas atribuições.....	63
Tabela 6. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H ₂ L ₃) com suas respectivas atribuições.....	64
Tabela 7. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL ₄), com suas respectivas atribuições.....	66
Tabela 8. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL ₅), com suas respectivas atribuições.....	67
Tabela 9. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do precursor ftalimida potássica, com suas respectivas atribuições.....	68
Tabela 10. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do precursor (Ftalimidometil)oxirano, com suas respectivas atribuições.....	70
Tabela 11. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H ₂ L ₆), com suas respectivas atribuições.....	71
Tabela 12. Resultados de RMN ¹ H para o ligante N-bis-(2-piridilmetil) amina (L ₁).....	73
Tabela 13. Dados para espectro de RMN ¹³ C (APT) para o ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L ₁).....	74
Tabela 14. Resultados de RMN ¹ H para o ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL ₂).....	76
Tabela 15. Dados para espectro de RMN ¹³ C (APT) para o ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL ₂).....	78
Tabela 16. Resultados de RMN ¹ H para o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H ₂ L ₃).....	79

Tabela 17. . Dados para espectro de RMN ¹³ C (APT) para o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H ₂ L ₃).....	80
Tabela 18. Resultados de RMN ¹ H para o ligante [(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL ₄).....	82
Tabela 19. . Dados para espectro de RMN ¹³ C (APT) para o ligante HL ₄	84
Tabela 20. Resultados de RMN ¹ H para o ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL ₅).....	85
Tabela 21. Dados para espectro de RMN ¹³ C (APT) para o ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL ₅).....	87
Tabela 22. Resultados de RMN ¹ H para o ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H ₂ L ₆).....	89
Tabela 23. Dados para espectro de RMN ¹³ C para o ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H ₂ L ₆).....	91
Tabela 24. Parâmetros cristalográficos para o complexo [Zn(L ₁)(Cl) ₂] (1)	94
Tabela 25. Principais comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) para o complexo [Zn(L ₁)(Cl) ₂] (1)	95
Tabela 26. Parâmetros cristalográficos para o complexo [Zn(HL ₂)(Cl) ₂] (2)	98
Tabela 27. Principais comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) para o complexo [Zn(HL ₂)(Cl) ₂] (2)	99
Tabela 28. Parâmetros cristalográficos para o complexo [Zn(HL ₅)(Cl) ₂] (5)	101
Tabela 29. Principais comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) para o complexo [Zn(HL ₅)(Cl) ₂] (5)	102
Tabela 30. Principais números de onda observados no espectro de infravermelho do complexo [Zn(L ₁)(Cl) ₂] (1) , com suas respectivas atribuições.....	103
Tabela 31. Principais números de onda observados no espectro de infravermelho do complexo [Zn(HL ₂)(Cl) ₂] (2) , com suas respectivas atribuições.....	104
Tabela 32. Principais números de onda observados no espectro de infravermelho do complexo [Zn(HL ₄)(Cl) ₂] (4) com suas respectivas atribuições.....	105
Tabela 33. Principais números de onda observados no espectro de infravermelho do complexo [Zn(HL ₅)(Cl) ₂] (5) , com suas respectivas atribuições.....	106
Tabela 34. Principais números de onda observados no espectro de infravermelho do complexo [Zn(H ₂ L ₆)(Cl)]Cl.H ₂ O (6) , com suas respectivas atribuições.....	108
Tabela 35. Dados de análise de CHN para o complexo [Zn(L ₁)(Cl) ₂] (1)	108
Tabela 36. Dados de análise de CHN para o complexo [Zn(HL ₂)(Cl) ₂] (2)	108
Tabela 37. Dados de análise de CHN para o complexo [Zn(HL ₃)(Cl)] (3)	109

Tabela 38. Dados de análise de CHN para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (4)	109
Tabela 39. Dados de análise de CHN para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ (5)	109
Tabela 40. Dados de análise de CHN para o complexo $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_6)(\text{Cl})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (6)	110
Tabela 41. Dados da análise de condutivimetria para os complexos sintetizados.....	110
Tabela 42. IC_{50} (μM) para os compostos de zinco e seus respectivos ligantes após o período de 48 h de incubação.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS

β -anel – Deformação angular do anel

δ – Deslocamento químico em ressonância magnética nuclear e deslocamento isomérico em espectroscopia Mössbauer

γ -CHpiridina – Deformação angular fora do plano de C-H de piridina

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

ESI(+)-MS – Espectrometria de massas com ionização por *electrospray*

IC₅₀ – Concentração inibitória de 50% da população celular

IsopOH – Isopropanol

KBr – Brometo de potássio

MeOH – Metanol

MET – Microscopia eletrônica de Transmissão

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

MTT – [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

NaBH₄ – Boroidreto de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono

RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

PA – Paraformaldeído

PBS – Tampão Salina Fosfato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. CÂNCER.....	21
1.2. COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO E NUCLEASES SINTÉTICAS	24
1.3. JUSTIFICATIVA PARA OS ESTUDOS DE NOVOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO NO TRATAMENTO CONTRA O CÂNCER.....	43
2. OBJETIVOS	45
2.1. OBJETIVO GERAL	45
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3. PARTE EXPERIMENTAL	46
3.1. TÉCNICAS EMPREGADAS	46
3.1.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	46
3.1.2. Espectroscopia de infravermelho.....	46
3.1.3. Difração de raios X	47
3.1.4. Análise Elementar (C, H e N).....	47
3.1.5. Condutivimetria	47
3.1.6. Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-(+)-MS)	47
3.1.7. Microscopia de fluorescência.....	48
3.1.8. Microscopia eletrônica de transmissão (M. E. T.)	48
3.2. SÍNTESES ORGÂNICAS	49
3.2.1. Síntese do ligante N-bis-(2-metilpiridil)amina (L ₁).....	49
3.2.2. Síntese do (2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil)amina (HL ₂).....	49
3.2.3. Síntese do N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H ₂ L ₃).....	50
3.2.4. Síntese do 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol(HL ₄).....	50
3.2.5. Síntese do 2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol (HL ₅).....	51
3.2.6. Síntese do N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol(H ₂ L ₆)	51
3.3. SÍNTESES INORGÂNICAS.....	53
3.3.1. Síntese do [Zn(L ₁)(Cl) ₂] (1)	54
3.3.2. Síntese do [Zn(HL ₁)(Cl) ₂] (2).....	55
3.3.3. Síntese do [Zn(H ₂ L ₃)(Cl) ₂] (3).....	55
3.3.4. Síntese do [Zn(HL ₄)(Cl) ₂] (4).....	56
3.3.5. Síntese do [Zn(HL ₅)(Cl) ₂] (5).....	57
3.3.6. Síntese do [Zn(H ₂ L ₆)(Cl)]Cl. H ₂ O (6).....	57

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS SÍNTESES ORGÂNICAS	59
4.1.1.	Infravermelho	59
4.1.2.	Ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C	71
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS SÍNTESES INORGÂNICAS	91
4.2.1.	Difração de raios X	91
4.2.2.	Espectroscopia de infravermelho	101
4.2.3.	Análise Elementar (C, H e N)	107
4.2.4.	Condutivimetria	109
4.2.5.	Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-(+)-MS e ESI-(+)-MS/MS)	110
5.	ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	120
5.1.	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS FRENTE ÀS CÉLULAS EM CULTURA	121
5.1.1.	Descongelamento de células leucêmicas humanas	121
5.1.2.	Cultura de linhagens de células leucêmicas humanas	121
5.1.3.	Congelamento de células leucêmicas humanas	122
5.1.4.	Avaliação da atividade antitumoral dos compostos frente às células leucêmicas humanas em cultura através da microscopia de fluorescência	121
5.1.5.	Avaliação da porcentagem de apoptose e/ou necrose de células leucêmicas humanas em cultura por microscopia de fluorescência	122
5.2.	ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NAS CÉLULAS TUMORAIS PROMOVIDAS PELOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (M. E. T.)	121
6.	RESULTADOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	125
6.1.	RESULTADOS OBTIDOS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	125
6.2.	RESULTADOS OBTIDOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (M. E. T.)	146
7.	CONCLUSÕES	160
8.	PERSPECTIVAS	162
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer, derivado da palavra latina “cancrum” que significa caranguejo, possui como sua principal característica o crescimento desordenado e difuso de células anormais, causados por diversos fatores, sejam eles externos (produtos químicos, tabaco, radiações e infecções) ou internos como, por exemplo, mutações herdadas ou que podem ocorrer durante o metabolismo, pela ação de hormônios e condições imunológicas. Fatores como esses podem atuar juntos ou em sequência, promovendo assim o início da carcinogênese (COTRAN *et al.*, 2000).

Atualmente, considera-se que o câncer é uma doença genética. Independente das suas diferentes causas, todas exercem um efeito comum em uma classe especial de genes contida na sequência de nucleotídeos da molécula de DNA. Esta classe é denominada de gene do câncer ou proto-oncogenes (GRIFFITHS, 2000).

Os proto-oncogenes normalmente efetuam funções celulares básicas, em geral, relacionadas à divisão celular. Entretanto vários tipos de eventos podem transformar um proto-oncogene em um oncogene, isto é um estado em que ele promove as duas principais características do câncer: a divisão celular descontrolada e dispersão das células tumorais pelos organismos acarretando em metástase (GRIFFITHS, 2000). Um dos principais modos pelo qual o proto-oncogene sofre a transformação em um oncogene, causadores do câncer, seria através de mutações causadas de forma espontânea ou por agentes ambientais. Estas mutações ocorrem em um proto-oncogene de uma única célula, que então sofre múltiplas divisões para formar um tumor. Muitas das mutações que podem gerar o câncer são reparadas através dos sistemas de reparo do DNA efetuados pela ação das enzimas nucleases, presentes nos organismos. Porém as mutações que não são reparadas por estes mecanismos podem estar relacionadas com o desenvolvimento de tumores (BISHOP e WEINBERG, 1996).

O câncer é considerado hoje como um dos principais problemas mundiais de saúde e uma das mais importantes causas de enfermidades e mortes em crianças e adultos. Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia,

radioterapia e quimioterapia (MURAD e KATZ, 2000). Outros métodos, também utilizados hoje em dia, é o de fotorradiação com derivados hematoporfíricos (HTP) (MACHADO, 2000) e a imunoterapia (SALMONM, 1998). O objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde se associam mais do que um tipo de tratamento. Um terço dos pacientes alcança a cura total através de medidas locais (cirurgia ou radioterapia), que são eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase, ou seja, atingiu outros tecidos e regiões do organismo por ocasião do tratamento. Todavia, na maioria dos casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, indicando a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70% dos casos com a quimioterapia (CHABNER e LONGO, 1996; SPENCE e JONHSTON, 2001).

A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástase; no caso da leucemia, por exemplo, costuma ser necessário o uso de outros tipos conjuntos de terapia incluindo transplante de medula. A radioterapia é usada comumente em conjunto com a cirurgia, com incremento da eficiência do tratamento. Mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuir a recorrência e a chance de metástase, sendo uma metodologia antineoplásica muito usada. Entretanto, o tratamento por radiação é sujeito a severas limitações (MURAD e KATZ, 2000).

Estas limitações estão relacionadas com a velocidade da regressão tumoral que representa o grau de sensibilidade que o tumor apresenta às radiações. A sensibilidade à radiação depende fundamentalmente da sua origem celular, do seu grau de diferenciação, da oxigenação e da forma clínica de apresentação. A maioria dos tumores radiosensíveis são radiocuráveis. Entretanto, alguns se disseminam independentemente do controle local; outros apresentam sensibilidade tão próxima à dos tecidos normais, que esta impede a aplicação da dose de erradicação. A erradicação de um tumor local só é atingida quando a dose de radiação aplicada é letal para todas as células tumorais, mas não ultrapassa a tolerância dos tecidos normais (<http://www.inca.gov.br/conteudo> acessado em 23/10/2010).

A quimioterapia contra o câncer ou antineoplásica refere-se à administração de drogas citotóxicas, capazes de promover morte celular ou pelo menos inibir o crescimento celular. O tratamento quimioterápico tem como objetivo erradicar o

tumor ou reduzir seu crescimento, diminuindo dessa forma os sintomas relacionados ao câncer, promovendo a cura ou prolongando a vida do paciente (NYGREN, 2001).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções. Porém, o corpo recupera-se destes inconvenientes após o tratamento, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A maior falha da quimioterapia antineoplásica ocorre devida à resistência às drogas. Esta resistência ocorre ou porque as populações celulares desenvolvem nova codificação genética (mutação) ou porque são estimuladas a desenvolver tipos celulares resistentes quando expostas às drogas, o que lhes permite enveredar por vias metabólicas alternativas, através da síntese de novas enzimas. É também observada resistência nos casos em que o tratamento é descontinuado, quando a população tumoral é ainda sensível às drogas, em que a quimioterapia é aplicada a intervalos irregulares e em que doses inadequadas são administradas. A partir da década de setenta, tem se detectado, em laboratório, um tipo de resistência cruzada apresentada por linhagens celulares, entre quimioterápicos diversos, cuja característica comum é serem derivados de produtos naturais. Este tipo de fenômeno passou a ser denominado "resistência à múltiplas drogas" e está relacionado à diminuição da concentração intracelular do quimioterápico e a presença de uma glicoproteína, ligada à membrana plasmática, a glicoproteína 170-P. Existe a possibilidade de reverter o mecanismo de resistência a partir do uso de compostos que inativem a glicoproteína 170-P. Alguns deles já são conhecidos, porém ainda encontram-se na fase de testes (<http://www.inca.gov.br/conteudo> acessado em 23/10/2010).

É necessário enfatizar a vantagem de iniciar-se a quimioterapia quando a população tumoral é pequena, a fração de crescimento é grande e a resistência por parte das células com potencial mutagênico é mínima (SPENCE e JONHSTON, 2001).

1.2. Compostos de coordenação e nucleases sintéticas

Atualmente muitos compostos de coordenação têm sido sintetizados com o objetivo de simularem a ação de nucleases naturais com diferentes aplicações. A mais importante aplicação é em terapias contra o câncer, uma vez que a integridade do material genético é essencial para a sobrevivência da célula, e a instabilidade genética ocasiona mutações que resultam em células malignas. Mas a extraordinária resistência do DNA a hidrólise, que é bioquimicamente essencial para a manutenção da integridade do material genético, torna-se um desafio para a síntese de fosfodiesterases ou nucleases que possam promover a sua hidrólise em uma escala de tempo razoável (SREEDHARA e COWAN, 2001).

A principal dificuldade encontrada para a hidrólise do DNA é a grande quantidade de cargas negativas, provenientes dos grupos fosfatos, que impedem ataques nucleofílicos às cadeias poliméricas do DNA (LEWIS e TOLMAN, 2004).

O desenvolvimento de drogas antitumorais contendo metais foi estimulado pelo sucesso clínico do composto de coordenação *cis*-diaminodicloroplatina(II) (*cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], cisplatina) e seus análogos (Figura 1) (BRABEC e KASPARKOVA, 2002). Este composto de coordenação é conhecido comercialmente por Platinil® ou Platinol® e seu análogo carboplatina por Paraplatin®. O mecanismo de ação está relacionado com a inibição seletiva da síntese do DNA (OLIVEIRA e ALVES, 2002). As propriedades citotóxicas destes compostos, assim como de numerosos análogos, têm sido atribuídas à sua habilidade de formar ligações cruzadas do tipo interfilamentares como também intrafilamentares. O principal sítio de ligação é o N7 da guanosina, embora também ocorra interação covalente com a adenosina e a citosina (HAHN e WEINBERG, 2002).

Estes antineoplásicos formados por compostos de coordenação de platina estão incluídos na classe dos aneoplásicos alquilantes, são compostos capazes de substituir, em outra molécula, um átomo de hidrogênio por um radical alquil. Eles se ligam ao DNA de modo a impedir a separação dos dois filamentos do DNA na dupla hélice espiralar, fenômeno este indispensável para a replicação. Os alquilantes afetam as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico. Além do mais, complexos de platina parecem ter efeito sinérgico com outros agentes antitumorais (SALMONM, 1998).

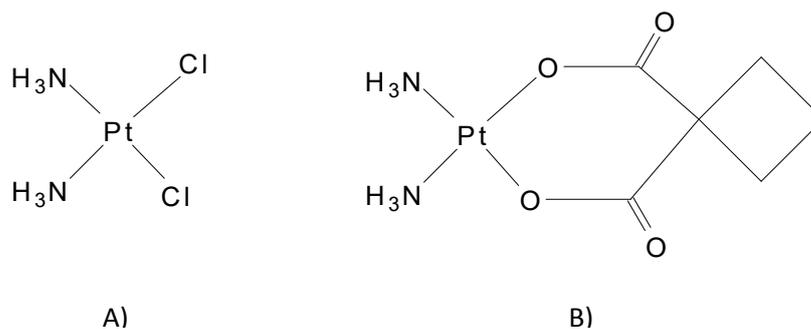


Figura 1. A) Estrutura da cisplatina. B) Estrutura do seu análogo carboplatina (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Com a descoberta de que a cisplatina inibia o crescimento de células cancerígenas por atuarem sobre o DNA, confirmou-se que compostos sintéticos podem interagir com a dupla fita do DNA. Tal interação pode ocorrer de diferentes formas: (a) interações não covalentes (eletrostática); (b) interações covalentes; (c) interação por intercalação; (d) interação por oxidação; (e) interação via hidrólise (HECHT, 1996).

Enquanto o $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ interage com o DNA pela formação de ligações covalentes, um grande número de compostos de metais do primeiro período de transição interage por um mecanismo oxidativo, devido a rica química redox apresentada por tais elementos (BURROWS e MULLER, 1998).

Geralmente estes compostos promovem a clivagem oxidativa a partir da abstração de átomos de hidrogênio do anel da ribose ou das bases nitrogenadas. Após a oxidação ocorre a quebra da cadeia do ácido nucléico (Figura 2). Um bom exemplo é o composto de cobre $[\text{Cu(Phen)}_2]^{2+}$ (Phen= 1,10-fenantrolina), que em solução é reduzido a espécie $[\text{Cu(Phen)}_2]^+$, o qual posteriormente se liga na fenda menor do DNA e combina-se com o oxigênio molecular promovendo a oxidação pela parte contrária ao anel da ribose (BALES *et al.*, 2002). Embora já existam metalo fármacos que atuam sobre o DNA seguindo o mecanismo oxidativo, o mesmo não é apropriado quando se pensa na utilização em biotecnologia, tendo em vista que a clivagem oxidativa do DNA atua de forma diferente daquela apresentada pelas nucleases naturais impossibilitando a religação da sequência nucleotídea das fitas do DNA (COWAN, 2001; BURROWS E MULLER, 1998). Além disso, a utilização de qimioterápicos com atividade oxidativa sobre o DNA pode resultar na

produção descontrolada de espécies radiculares altamente reativas com células saudáveis. (NEVES *et al.*, 2001; HORN *et al.*, 2005).

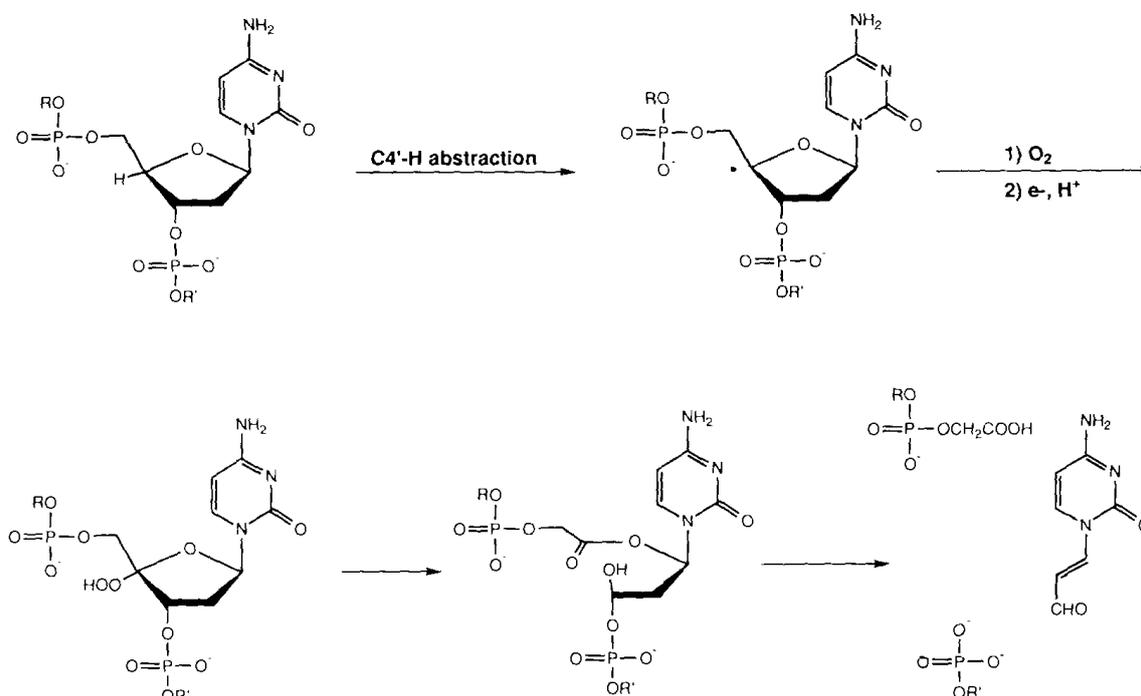


Figura 2. Mecanismo de clivagem oxidativa do DNA (HECHT, 1996).

Compostos contendo metais de transição que promovem a clivagem hidrolítica do DNA geralmente possuem, em solução, moléculas de água coordenadas ao centro metálico que sob condições brandas de pH podem ser transformadas em íons hidróxidos. As moléculas de água podem ser substituídas, pelo grupo fosfato presente na cadeia do DNA. A coordenação do grupo fosfato ao metal reduz a densidade eletrônica sobre o átomo de fósforo. Desta forma o átomo de fósforo pode sofrer um ataque nucleofílico de algumas espécies coordenadas ao metal, como por exemplo íons hidroxila (OH⁻). Este ataque resulta em um intermediário pentacoordenado, o qual sofre posterior clivagem da ligação fósforo e oxigênio (Figura 3) (HECHT, 1996) (NEVES *et al.*, 2009).

As nucleases naturais atuam sobre o DNA promovendo a clivagem hidrolítica, resultando no produto de clivagem 3'OH-5'fosfato ou 5'OH-3'fosfato, pois apenas os resíduos que apresentam estas terminações são passíveis de serem religados pela ação das ligases (HECHT, 1996).

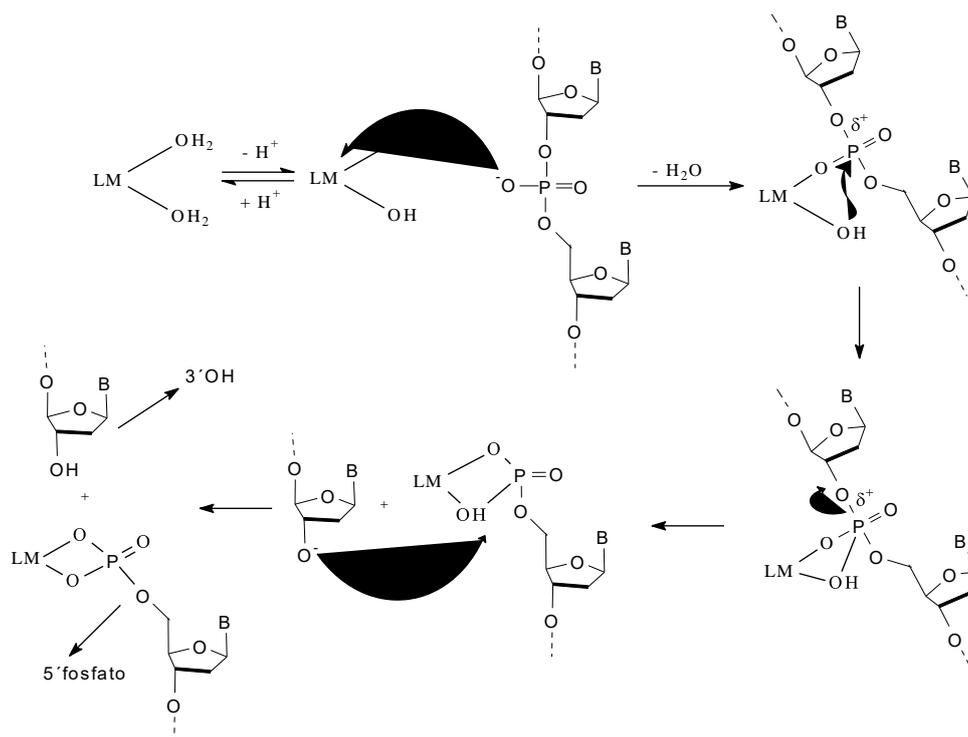


Figura 3. Mecanismo de clivagem hidrolítica do DNA (HECHT, 1996).

Compostos de coordenação que são candidatos a apresentarem atividade hidrolítica sobre o DNA devem apresentar as seguintes características: (a) apresentarem cargas positivas quando em solução, o que facilita a atração de tais compostos pelo DNA, pois o mesmo apresenta cargas residuais negativas; (b) ambiente de coordenação insaturado ou contendo ligantes lábeis, o que facilita a interação com os grupos fosfatos do DNA; (c) possibilidade de formarem espécies nucleofílicas (OH^-) em condições suaves de pH; (d) apresentarem certa solubilidade em água; (e) serem, de preferência, eletroquimicamente inertes em condições biológicas. Com estas características em mente, pode-se promover o planejamento racional de compostos, iniciando-se pela proposição de ligantes que permitam a obtenção de complexos com ambientes de coordenação insaturados (HORN *et al.*, 2005).

Além da formação de ligações covalentes como ocorre com a cisplatina, do mecanismo de clivagem oxidativo e hidrolítica, temos a interação por intercalação no DNA. Neste caso, as moléculas têm como alvo principal a fenda menor do B-DNA, por um mecanismo de ação que se baseia na intercalação nos pares de bases nitrogenadas CG (citosina e guanina). A intercalação apresenta um componente

eletrostático relacionada à interação do tipo π , existente entre os intercalantes e as bases CG, além de complexos de transferência de elétrons. Devido a esta característica, os intercalantes são constituídos por anéis aromáticos fundidos, apresentando alta densidade eletrônica. Os antibióticos naturais do tipo antraciclina, como a doxorubicina e a daunorrubicina, também costumam ser classificados como agentes intercalantes (Figura 4) (ALMEIDA *et al.*, 2005).

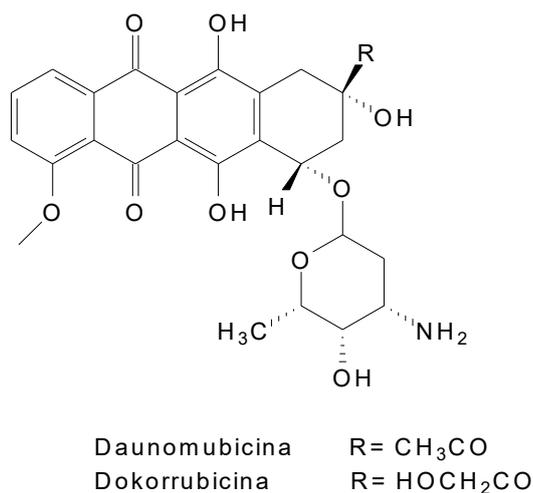


Figura 4. Estruturas das antraciclinas (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A presença de anéis aromáticos fundidos constitui o arcabouço molecular, e esta característica está relacionada ao mecanismo de ação, que se baseia no espaçamento das bases nitrogenadas do DNA. Os intercalantes interagem com as bases nitrogenadas CG provocando um espaçamento devido ao volume molecular, formando um ângulo de aproximadamente 90° em relação ao eixo do DNA. A intercalação geralmente altera a estrutura da forma B-DNA, com o aumento no espaçamento dos pares de base CG de $3,4\text{Å}$ para cerca de 7Å . É descrito que o mecanismo de ação desta classe baseia-se na formação de um trímero constituído pelo intercalante, o DNA e topoisomerase II. Este trímero seria estabilizado e interromperia a separação das bases nitrogenadas do DNA, necessária à transcrição. Dentre as diversas substâncias com propriedade intercalante ao DNA, ressaltam-se algumas, como as antraciclinas, e outros antibióticos como as actinomicinas e as acridinas, como a própria acridina não-substituída e a proflavina (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Alguns agentes antineoplásicos interagem com os pares de bases nitrogenadas reversivelmente (por meio de interação de van der Waals, interações eletrostáticas e, sobretudo, ligações de hidrogênio), geralmente através de conformações tipo iso-hélicas e são classificados como moléculas ligantes na fenda menor da forma B-DNA. A característica iso-hélica pode ser definida pela alteração conformacional destas moléculas, para que haja a interação com os pares de base nitrogenadas que compõem a hélice do B-DNA. As moléculas mais representativas dessa classe são as amidinas aromáticas e as lexitropsinas (NEIDLE *et al.*, 1999; NEIDLE, 2001).

De fato foi observado que em tal conformação iso-hélica, deve ocorrer possível interação com os pares de bases nitrogenadas do DNA, descrita também nas estruturas cristalográficas. Os ligantes da fenda menor interagem preferencialmente com os pares de base AT (adenina e timina), pois a guanina possui um substituinte, que é uma amina aromática, voltada para o interior da fenda menor, causando impedimento estereoquímico. Diversas modificações nas estruturas das amidinas aromáticas, distamicina e netropsina foram elaboradas, visando alterar a seletividade aos pares de base AT (adenina e timina) para CG (citosina e guanina), aumentar o número de bases que irão interagir, além de se tentar aumentar a afinidade das moléculas às seqüências AT do DNA (RODRIGUES *et al.*, 2000).

Após a descoberta da cisplatina em 1965, muitos complexos de platina foram sintetizados e suas aplicações como agentes antineoplásicos foram estabelecidas, enquanto a eficácia clínica impressionante da cisplatina é limitada pelos significativos efeitos colaterais, incluindo, nefrotoxicidade, neurotoxicidade e o surgimento de resistência aos medicamentos. Desde então, complexos de diferentes metais, além da platina foram estudados, incluindo complexos de rutênio, ferro e cobalto com diferentes ligantes (CHEN *et al.*, 2010).

Desta forma, compostos que apresentam as características adequadas para atuar na clivagem do DNA, ou na intercalação do mesmo, são fortes candidatos a apresentarem atividades frente a microorganismos ou células tumorais. O estabelecimento do tipo de interação composto-DNA abre um amplo leque de possibilidades para aplicação destes compostos em diferentes áreas (HORN *et al.*, 2005).

Diferentes complexos metálicos já demonstraram ser capazes de promover a clivagem do DNA, entre eles, $[\text{Fe}_2(\text{BPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (NEVES *et al.*, 2001), $[\text{Cu}(\text{HPCINOL})\text{Cl}]\text{Cl}$ (FERNANDES *et al.*, 2006) e $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})(\text{SO}_4)]_2\text{-}\mu\text{-oxo} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (PARRILHA *et al.*, 2008).

Os estudos de clivagem do DNA são realizados através da incubação do composto diretamente com o DNA plasmidial, posteriormente a interação composto-DNA é avaliada por eletroforese, espectroscopia eletrônica ou fluorescência. Quando é utilizada a técnica de eletroforese, as três formas apresentadas pelo DNA são analisadas em termos das diferenças de migração entre estas formas em um gel de agarose (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2009).

Uma das formas na qual o DNA pode ser encontrado é a forma superenovelada (Forma I), na qual as moléculas de DNA, com alto grau de torção umas sobre as outras, apresentam-se em um menor volume, portanto com maior mobilidade no gel de agarose. Outra forma atribuída ao DNA trata-se da forma circular ou nicada (Forma II), proveniente da clivagem em apenas uma das fitas do DNA. Neste caso, a molécula apresenta formato circular. E é a forma do DNA plasmidial que apresenta maior volume e conseqüentemente menor mobilidade no gel de agarose. Por último encontramos a forma linear (Forma III), obtida através da clivagem nas duas fitas da molécula. O volume apresentado pela forma linear é intermediário entre a forma superenovelada e a circular, por isso a sua migração no gel também é intermediária (GRIFFITHS, 2000).

Um estudo realizado recentemente por Elene Pereira Maia e colaboradores apresenta um composto binuclear de cobre, $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, o qual é capaz de promover eficientemente a clivagem hidrolítica do DNA plasmidial (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2009)(Figura 5).

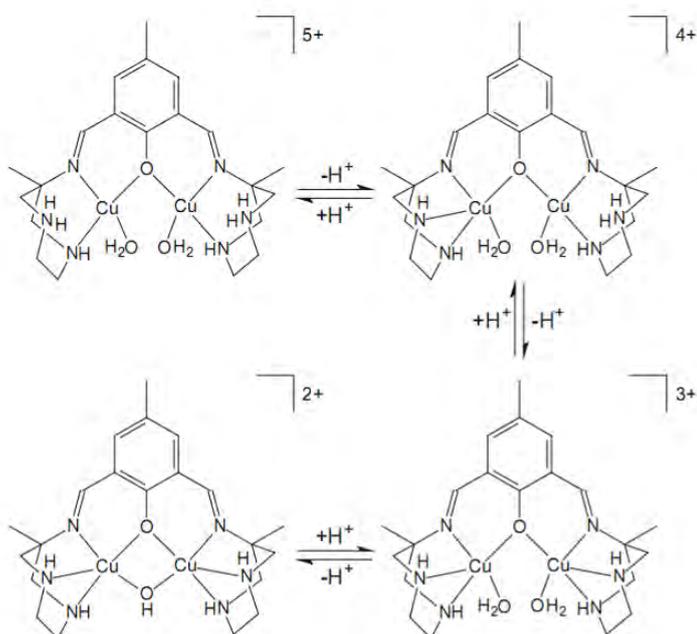


Figura 5. Diferentes estruturas para o composto de cobre, em função do pH, obtidos por titulação potenciométrica (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2009).

A investigação da atividade de nuclease sintética foi realizada em diferentes valores de pH e empregando-se quatro diferentes concentrações do composto de cobre (0,5, 10, 20 e 40 μM). Os resultados obtidos indicam que o valor de pH ótimo para a atividade de nuclease sintética é 7,5 e a concentração ideal do composto de cobre é 40 μM . Nestas condições o DNA se apresenta 90% na forma II (circular) e 10% na forma I (linear) (Figura 6).

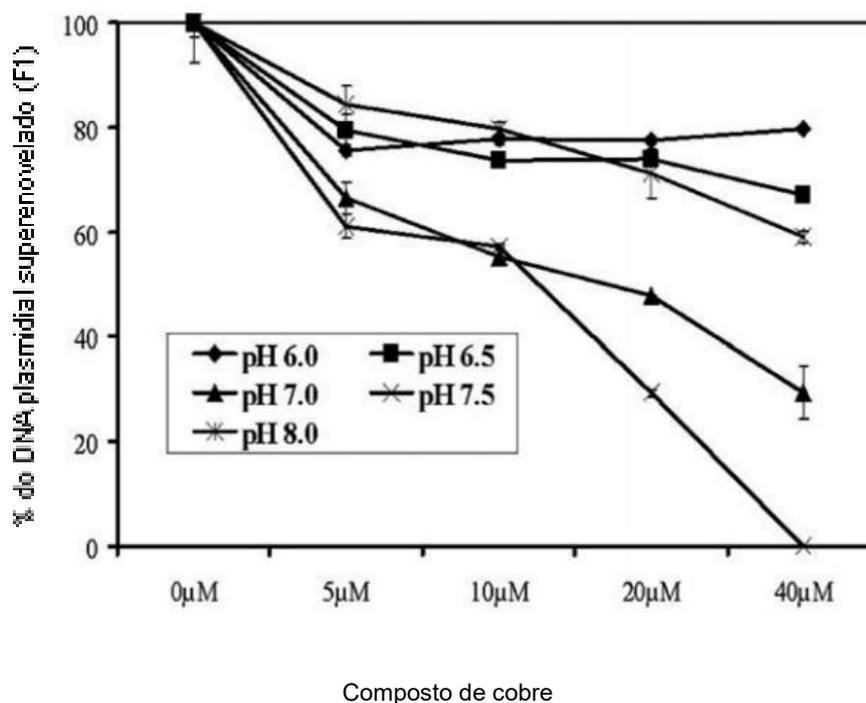


Figura 6. Gráfico da clivagem do DNA plasmidial pelo composto de cobre em diferentes concentrações e em diferentes valores de pH, a 50°C após 16 h de incubação (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2009).

Além dos estudos em diferentes condições de pH, foram realizados experimentos em condições aeróbicas, anaeróbicas e na presença da distamicina para se determinar o mecanismo de ação do composto (Figura 7). A distamicina é uma molécula pequena que interage com as sequências do DNA ricas nas bases adenina e timina, assim protegendo o DNA de uma possível interação do composto de cobre via intercalação na fenda menor. Existem dois tipos de ranhuras no DNA: fenda maior e fenda menor. Estas fendas são muito importantes, pois são as regiões onde ocorrem as interações com os fármacos. Os resultados indicaram uma redução de 50% da clivagem do DNA na presença da distamicina quando comparados com os valores do controle empregado. Isto indica que o composto de cobre interage com o DNA na fenda menor.

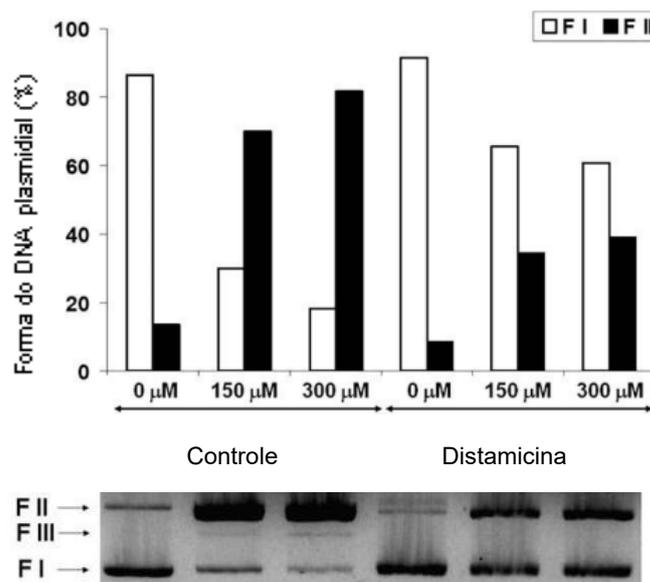


Figura 7. Gráfico da clivagem do DNA plasmidial pelo composto de cobre em diferentes concentrações, na presença da distamicina e do controle. O DNA foi incubado previamente com distamicina (30 µM) por 30 min, em seguida foi incubado por 4h com o composto de cobre a, 50°C e pH 7,5 (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2009).

O composto apresentou atividade hidrolítica em ambas as condições, aeróbicas e anaeróbicas, na presença do padrão interno [Fe(EDTA)] (EDTA= ácido etilenodiamino tetracético), o qual cliva o DNA na presença de oxigênio através do mecanismo oxidativo (Figura 8). Quando os parâmetros cinéticos da reação foram avaliados, encontrou-se um aumento de $2,7 \times 10^7$ na velocidade da clivagem na presença do composto de cobre.

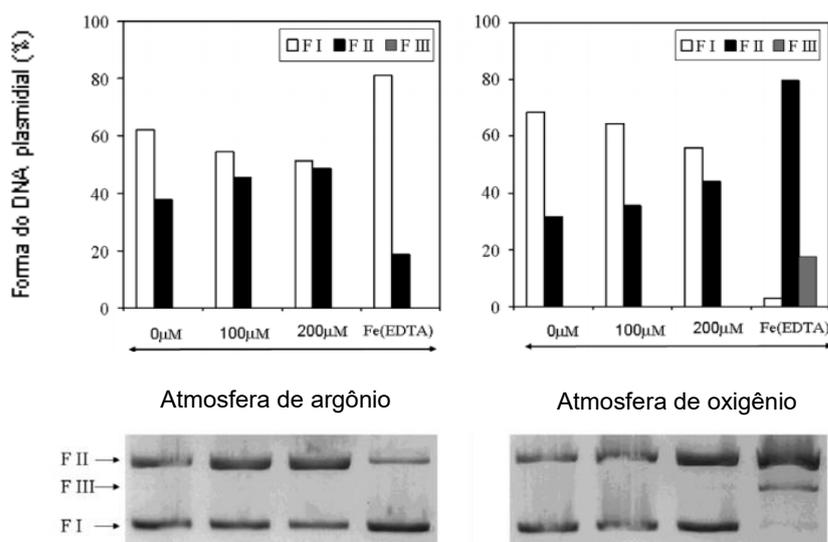


Figura 8. Gráfico da clivagem do DNA plasmidial pelo composto de cobre em diferentes concentrações e em condições anaeróbicas (esquerda) e aeróbicas (direita) após 2h de incubação a 50°C e pH 7,5, onde FI= forma superenovelada, FII= forma circular e FIII= forma linear (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2009).

Com base na titulação potenciométrica, nos dados cinéticos e nos experimentos em diferentes condições de pH foi proposto um mecanismo de ação para este composto. Neste mecanismo, um átomo de oxigênio pertencente ao fosfato se liga ao metal resultando em sua posterior hidrólise causada por um ataque nucleofílico (OH^-) ao mesmo átomo de fósforo.

Além dos estudos relacionados à clivagem do DNA, foram realizadas investigações das atividades inibitórias deste composto frente a duas linhagens de células: GLC4 (carcinoma pulmonar) e K562 (leucemia). A viabilidade celular foi checada através da exclusão pelo corante Trypan Blue. Neste experimento foi utilizada a concentração de 1×10^5 células/ml e o período de incubação entre as células e as diferentes concentrações do composto de cobre foi de 72 h. A atividade do composto foi avaliada através da determinação da concentração que inibe em 50% o crescimento celular, IC_{50} (Concentração inibitória de 50% da população celular). Os resultados obtidos revelaram valores de 14,83 e 34,21 μM respectivamente nas linhagens GLC4 e K562. Estes resultados, quando comparados aos valores de IC_{50} atribuídos a ação da cisplatina (0,4 μM), frente à mesma a linhagem celular (GLC4), são bastante animadores.

Outros compostos de coordenação que ainda não tiveram a confirmação de atuarem como nucleases sintéticas, mas que foram capazes de induzir apoptose em

diversos tipos de células cancerígenas são vistos como promissores agentes antitumorais. Muitos compostos de rutênio com estado de oxidação 2+ ou 3+ mostraram atividade antitumoral, especialmente contra cânceres com metástase (ZHANG, 2003).

Foi realizado recentemente por Jiang e colaboradores um estudo sobre as atividades antitumorais de diversos compostos de coordenação com diferentes centros metálicos (Cu, Co, Ni e Zn) frente a quatro linhagens de células tumorais (A549, Hep G2, K562 e K562/ADM) (JIANG *et al.*, 2010). Neste trabalho foi sintetizado um novo ligante que apresenta em sua estrutura anéis aromáticos conjugados visando à interação por intercalação com a molécula de DNA (Figura 9).

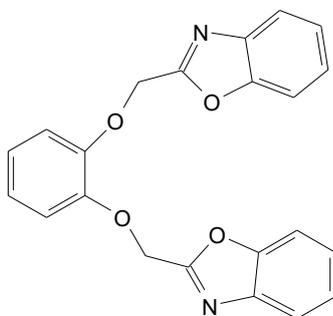


Figura 9. Estrutura do ligante (L) (JIANG *et al.*, 2010).

Foram sintetizados quatro compostos de coordenação com este ligante (L), sendo os mesmos $[\text{Cu}(\text{L})(\text{NO}_3)_2]$, $[\text{Co}(\text{L})(\text{NO}_3)_2]$, $[\text{Ni}(\text{L})(\text{NO}_3)_2]_2$ e $[\text{Zn}(\text{L})(\text{NO}_3)_2]$ (Figura 10).

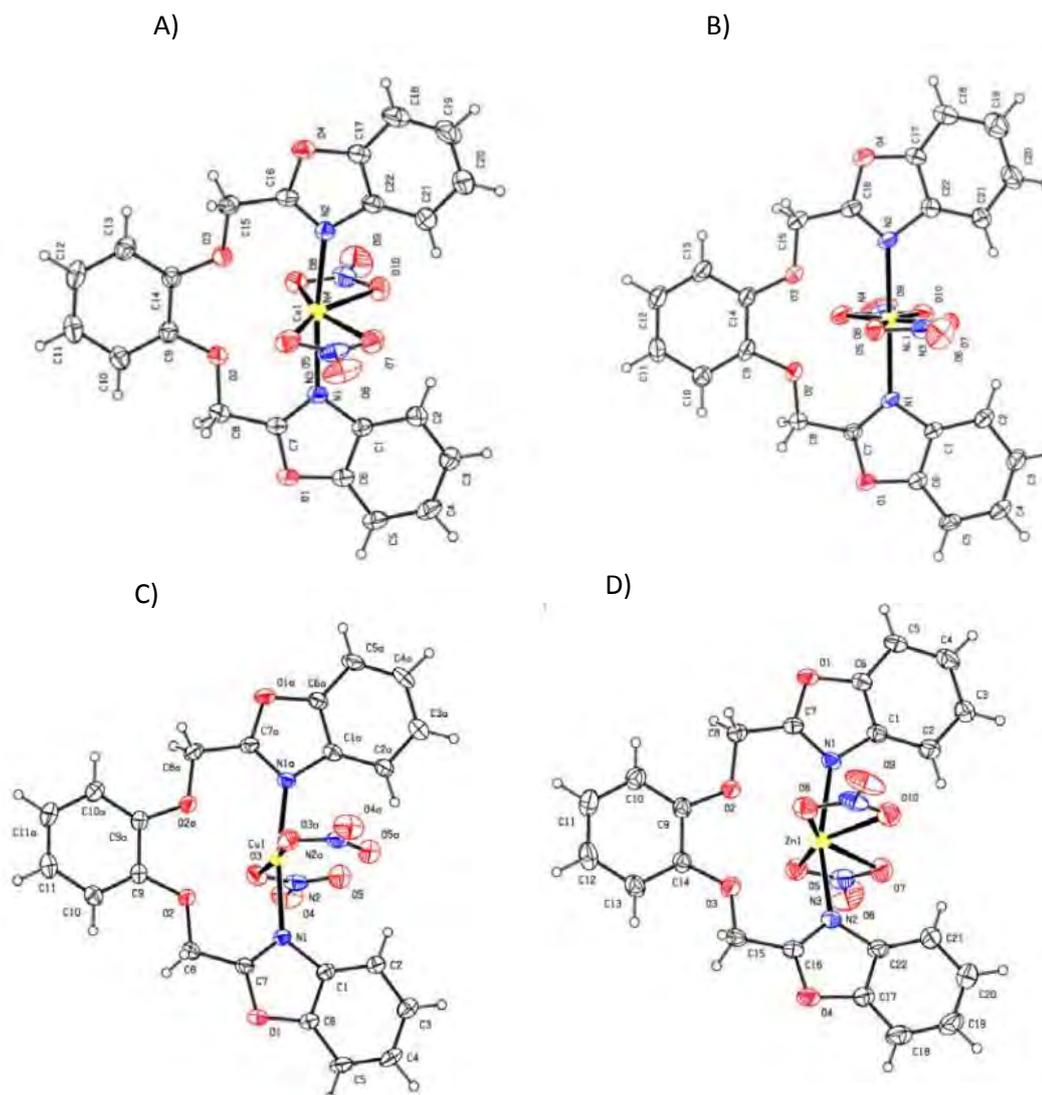


Figura 10. Estruturas dos compostos de coordenação: A) $[\text{Co}(\text{L})(\text{NO}_3)_2]$, B) $[\text{Ni}(\text{L})(\text{NO}_3)_2]$, C) $[\text{Cu}(\text{L})(\text{NO}_3)_2]$, D) $[\text{Zn}(\text{L})(\text{NO}_3)_2]$ (JIANG *et al.*, 2010).

Os compostos tiveram suas atividades antitumorais avaliadas após um período de 72h de incubação e em triplicata. Neste experimento utilizou-se a concentração de 1×10^4 células/poço e para avaliar a viabilidade celular empregou-se o método colorimético com MTT, um corante usado para avaliar a viabilidade celular através da medida da atividade mitocondrial. Este corante forma um precipitado azul (formazan) sobre as células viáveis, quantificado por espectrofotometria (570 nm). As atividades apresentadas pelos compostos indicaram a seguinte ordem $[\text{Cu}(\text{L})(\text{NO}_3)_2] > [\text{Ni}(\text{L})(\text{NO}_3)_2] = [\text{Co}(\text{L})(\text{NO}_3)_2] > [\text{Zn}(\text{L})(\text{NO}_3)_2] > \text{L}$.

Tabela 1. Resultados das atividades antitumorais apresentados pelos compostos de coordenação (JIANG *et al.*, 2010).

Células IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	[Co(L)(NO ₃) ₂]	[Ni(L)(NO ₃) ₂]	[Cu(L)(NO ₃) ₂]	[Zn(L)(NO ₃) ₂]
A549	58,74	99,29	27,86	-
Hep G2	-	139,15	20,05	-
K562	101,65	53,18	21	105,73
K562/ADM	63,80	38,91	15,38	18,04

Estudos recentes vêm relatando as atividades antitumorais de compostos de zinco, pois este metal é o segundo mais importante no corpo humano, depois do ferro. A deficiência de zinco pode causar efeitos no crescimento, ainda que ao contrário de cobre e ferro poucos efeitos nocivos relacionados ao excesso de zinco no organismo são observados. Além disso, o zinco desempenha um papel importante em vários sistemas biológicos e é um elemento essencial, fundamental para numerosos processos celulares e um importante íon de regulação no metabolismo das células (DEMERTZI *et al.*, 2006).

Um estudo publicado em 2006 por Dimitra Kovala Demertzi relata a síntese, caracterização e atividades antitumorais de dois ligantes e quatro compostos de coordenação de zinco (Figura 11). Foram utilizadas duas linhagens de células cancerígenas humanas (MCF-7 e T24) e uma linhagem de rato (L-929). Os compostos tiveram suas atividades antitumorais avaliadas após um período de 72h de incubação e em triplicata. Neste experimento utilizou-se a concentração de 1×10^4 células/poço. A viabilidade celular foi realizada pelo método colorimétrico MTT para a linhagem T24 e o método colorimétrico SRB para as demais linhagens investigadas (DEMERTZI *et al.*, 2006).

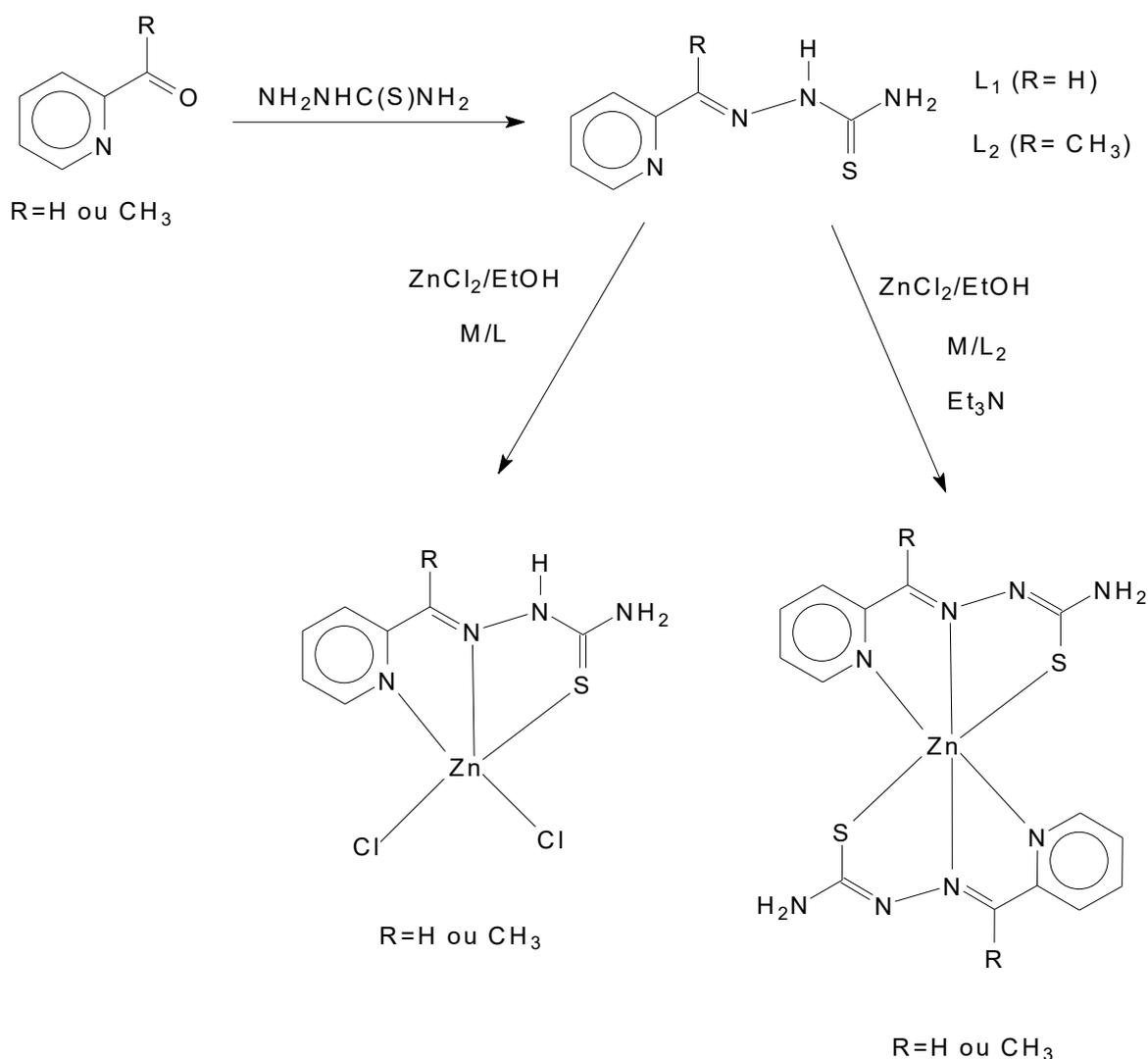


Figura 11. Estruturas dos compostos de coordenação de zinco (DEMERTZI *et al.*, 2006).

Os resultados de IC_{50} obtidos para ambos os ligantes (L_1 e L_2) e seus respectivos complexos de zinco frente à linhagem MCF-7 são melhores do que os resultados observados para a cisplatina. Os complexos de zinco $[\text{Zn}(\text{L}_2)(\text{Cl})_2]$ (**4**), $[\text{Zn}(\text{L}_1)_2]$ (**5**) e $[\text{Zn}(\text{L}_2)_2]$ (**6**) e o ligante L_2 frente à linhagem T24 apresentaram valores de IC_{50} inferiores ao valor observado para cisplatina. Com relação à linhagem L-929 não foi obtido nenhum valor de IC_{50} inferior ao observado para cisplatina, porém os compostos testados apresentaram atividades antitumorais significativas. Estes resultados indicam que os dois ligantes e os quatro complexos de zinco sintetizados possuem atividades antitumorais promissoras (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados das atividades antitumorais apresentados pelos compostos de coordenação de zinco, expresso por IC₅₀ (M) (DEMERTZI *et al.*, 2006).

Compostos	MCF-7	L-929	T-24
L ₁ (R=H) (1)	$<5,5 \cdot 10^{-7}$	$2,55 \cdot 10^{-6}$	$>0,55 \cdot 10^{-3}$
L ₂ (R=CH ₃) (2)	$3,29 \cdot 10^{-6}$	$2,06 \cdot 10^{-6}$	$2,16 \cdot 10^{-6}$
[Zn(L ₁)(Cl) ₂] (3)	$0,36 \cdot 10^{-6}$	$1,73 \cdot 10^{-6}$	$2,30 \cdot 10^{-5}$
[Zn(L ₂)(Cl) ₂] (4)	$1,36 \cdot 10^{-6}$	$1,06 \cdot 10^{-6}$	$1,57 \cdot 10^{-6}$
[Zn(L ₁) ₂] (5)	$1,08 \cdot 10^{-6}$	$6,37 \cdot 10^{-6}$	$0,83 \cdot 10^{-6}$
[Zn(L ₂) ₂] (6)	$0,88 \cdot 10^{-6}$	$4,65 \cdot 10^{-6}$	$1,18 \cdot 10^{-6}$
ZnCl ₂	$>0,13 \cdot 10^{-3}$	$>0,13 \cdot 10^{-3}$	$>0,13 \cdot 10^{-3}$
cisplatina	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$0,70 \cdot 10^{-6}$	$41,66 \cdot 10^{-6}$

Outro estudo recente realizado por Daniela Pucci e colaboradores apresenta a síntese e caracterização de oito compostos de coordenação de zinco (Figura 12), além da avaliação das suas respectivas atividades antitumorais frente a três linhagens de células causadoras de câncer de próstata (DU145, LNCaP e PC-3). Os estudos antitumorais foram realizados através do método colorimétrico de MTT para linhagem PC-3 e através do método colorimétrico MTS para as demais linhagens investigadas. Os compostos tiveram suas atividades antitumorais avaliadas após um período de 72 h de incubação, em triplicata e com a realização de três experimentos independentes (PUCCI *et al.*, 2010).

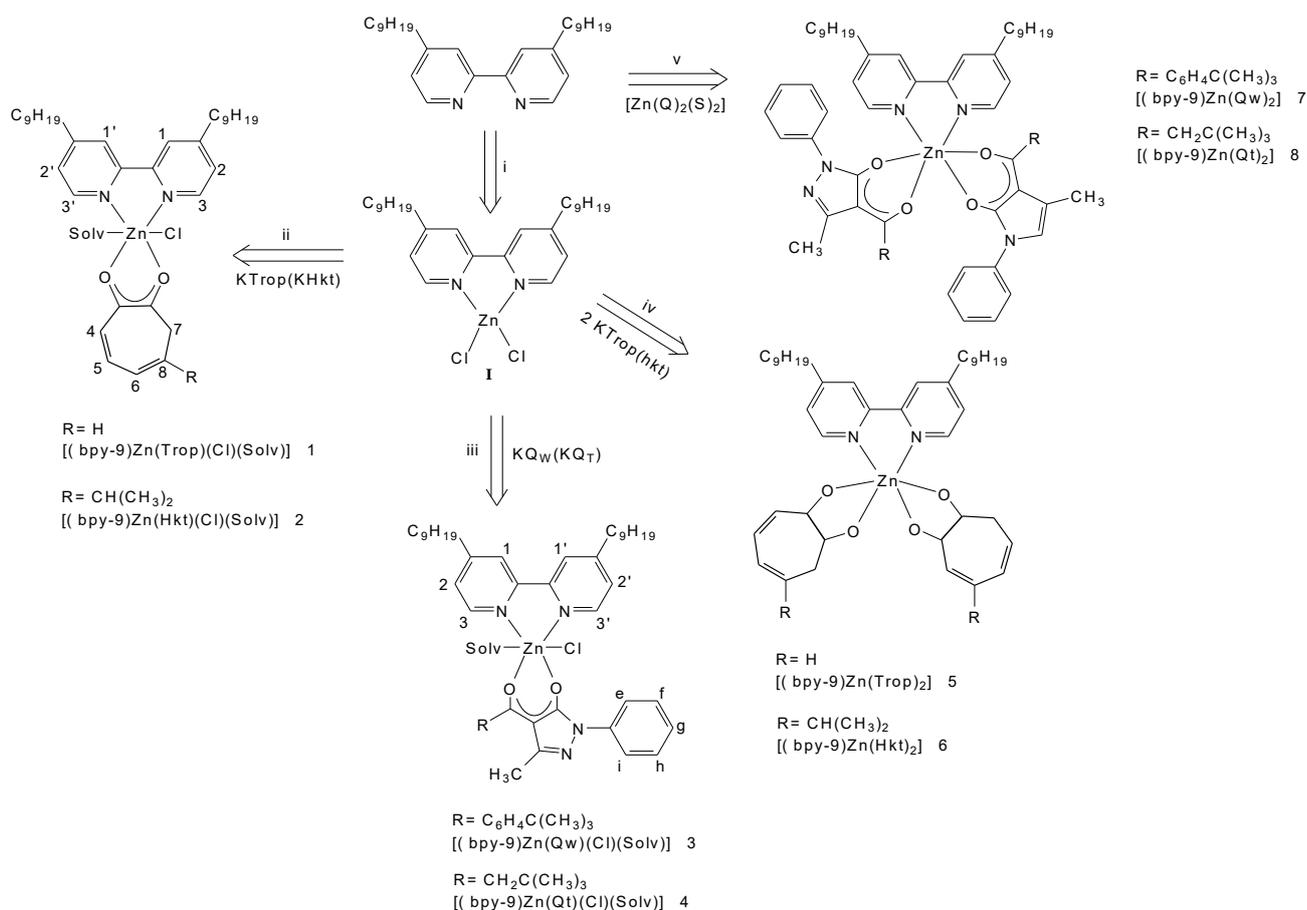


Figura 12. Estruturas dos compostos de coordenação de zinco (PUCCI *et al.*, 2010).

Os ligantes Hkt e HQ_w apresentam atividades antitumorais significativas, com IC_{50} de 20 e 60 μM para as linhagens DUI145 e LNCaP, respectivamente. Os ligantes bpy-9, Trop e HQ_t não apresentaram atividades antitumorais frente à estas duas linhagens. Com relação à terceira linhagem investigada, PC-3, nenhum dos compostos orgânicos apresentou atividades antitumorais significativas.

Para os complexos de zinco $[(\text{bpy-9})\text{Zn}(\text{Trop})(\text{Cl})(\text{Solv})]$ (**1**) e $[(\text{bpy-9})\text{Zn}(\text{Trop})_2]$ (**5**) foram encontrados valores de IC_{50} próximos frente à todas as linhagens testadas, indicando pouca influência do número de moléculas deste ligante (Trop) coordenadas ao metal sobre as atividades antitumorais apresentadas pelos mesmos. Para os complexos $[(\text{bpy-9})\text{Zn}(\text{Hkt})_2]$ (**6**), $[(\text{bpy-9})\text{Zn}(\text{Qw})_2]$ (**7**) e $[(\text{bpy-9})\text{Zn}(\text{Qt})_2]$ (**8**) foram obtidos valores de IC_{50} para as linhagens DUI145 e LNCaP superiores aos valores encontrados para os complexos $[(\text{bpy-9})\text{Zn}(\text{Hkt})(\text{Cl})(\text{Solv})]$ (**2**), $[(\text{bpy-9})\text{Zn}(\text{Qw})(\text{Cl})(\text{Solv})]$ (**3**) e $[(\text{bpy-9})\text{Zn}(\text{Qt})(\text{Cl})(\text{Solv})]$ (**4**), os quais se diferenciam

por apresentarem apenas uma molécula de cada ligante coordenado ao centro de zinco. Este estudo indica que os complexos que possuem apenas uma molécula dos ligantes Hkt, Q_w e Q_t respectivamente, apresentam melhores atividades antitumorais frente às linhagens DUI145 e LNCaP (Tabela 3).

Os estudos de atividades antitumorais realizados frente à linhagem PC-3 não indicam diferenças significativas nos valores de IC₅₀ entre os compostos que possuem duas moléculas do ligante coordenadas ao metal e os compostos que possuem apenas uma molécula do mesmo ligante coordenada ao centro de zinco.

De uma maneira geral as linhagens DUI145 e PC-3 foram mais sensíveis aos compostos de zinco testados, enquanto a linhagem LNCaP mostrou-se mais resistente.

Tabela 3. Resultados das atividades antitumorais apresentados pelos compostos de coordenação de zinco, expresso por IC₅₀ (μM ±s.d.) (PUCCI *et al.*, 2010).

Compostos	DUI145	LNCaP	PC-3
Cisplatina	33 ± 1,0	34 ± 0,4	----
[(bpy-9)Zn(Trop)(Cl)(Solv)] (1)	4,5 ± 0,1	17 ± 1,0	5,0 ± 0,8
[(bpy-9)Zn(Hkt)(Cl)(Solv)] (2)	38 ± 5,0	23 ± 2,0	5,0 ± 0,6
[(bpy-9)Zn(Q _w)(Cl)(Solv)] (3)	20 ± 5,0	25 ± 5,0	4,2 ± 0,4
[(bpy-9)Zn(Q _t)(Cl)(Solv)] (4)	4,8 ± 0,2	20 ± 0,2	3,2 ± 0,1
[(bpy-9)Zn(Trop) ₂] (5)	3,3 ± 0,1	18 ± 0,6	4,5 ± 0,2
[(bpy-9)Zn(Hkt) ₂] (6)	80 ± 100	70 ± 10	4,2 ± 0,3
[(bpy-9)Zn(Q _w) ₂] (7)	>100	> 100	3,9 ± 0,2
[(bpy-9)Zn(Q _t) ₂] (8)	10 ± 0,6	>100	2,8 ± 0,1

Além da avaliação das atividades antitumorais destes complexos de zinco, foi realizado um segundo experimento para determinar os níveis fosfo-AKT (pAkt), uma proteína que desempenha um papel importante na sobrevivência celular e funciona como inibidor da proteína p21, esta última uma proteína sinalizadora da morte celular por apoptose. Este estudo foi realizado para todos os oito complexos de

zinco frente à linhagem PC-3 após o período de incubação de 48 h. Utilizaram como controle, células cancerígenas não tratadas com os complexos de zinco. Foi realizado também a determinação dos níveis de GAPDH, uma proteína constituinte das células, muito utilizada para validar os experimentos através da avaliação dos estados celulares. As células tratadas com os compostos **(1)** e **(6)** não apresentaram níveis significativos da proteína pAkt portanto foram as que apresentaram os maiores níveis da proteína p21, porém todas as células tratadas com os compostos apresentaram diminuição significativa da proteína pAkt (Figura 13). Estes resultados preliminares indicam que as atividades antitumorais destes compostos de zinco estão relacionadas aos processos responsáveis pelo controle da proliferação celular.

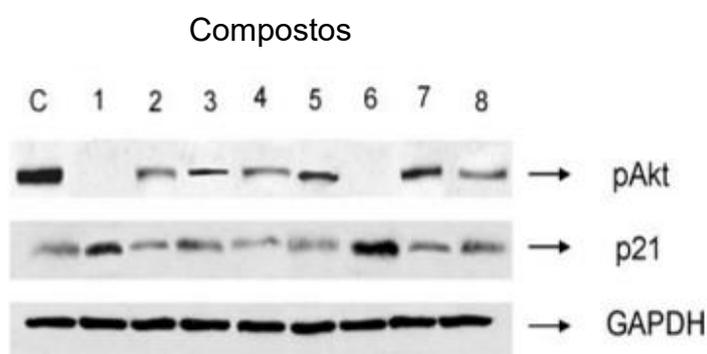


Figura 13. Immunoblots de pAkt e p21 extraídos de células PC-3 tratadas por 48 h com os compostos de zinco (PUCCI *et al.*, 2010).

1.3. Justificativa para os estudos de novos compostos de coordenação no tratamento contra o câncer.

Dentre as várias enfermidades que são infligidas ao homem, o câncer tem mostrado ser uma das doenças de maior incidência e que possui, um dos mais difíceis tratamentos, visto que ainda não estão disponíveis no mercado fármacos ou métodos de controle mais efetivos.

A quimioterapia ainda continua sendo a principal forma de tratamento para a maioria dos casos de câncer, onde aliada a outros tratamentos como a radioterapia alcança boas taxas de cura e regressão do tumor. Em relação à quimioterapia, a grande limitação continua sendo o problema gerado pelos efeitos tóxicos dos fármacos usados durante o tratamento, os quais não são específicos para o tumor e provocam fortes efeitos colaterais no organismo do paciente, como náuseas, perda de cabelo e imunodeficiência.

Outro problema muito comum é a resistência dos tumores às principais drogas, intrínseca a alguns tumores e adquirida por outros durante o tratamento, elevando o número de falhas terapêuticas e mortes. Este tipo de problema pode ocorrer nos tratamentos que empregam a cisplatina como agente antineoplásico.

A cisplatina exerce acentuada atividade antitumoral nos cânceres genitourinários, particularmente o testicular, ovariano e vesical; também é usada no tratamento de carcinomas escamosos, como de cabeça e pescoço, esôfago e cérvix, carcinoma de bexiga, tireóides, endométrio, estômago ou pâncreas, de pulmão de pequenas e não-pequenas células, sarcomas, tumores trofoblásticos e coriocarcinoma. Porém, em alguns casos, os tumores desenvolvem resistência a este medicamento durante o tratamento, além de cada vez mais surgirem cânceres resistentes a este composto (MACHADO, 2000).

Por isso, a identificação de novos agentes antitumorais mais potentes, seletivos, e menos tóxicos, permanecem como uma das mais urgentes metas para o combate ao câncer. Devido a esta necessidade muitos compostos de coordenação contendo diferentes metais estão sendo sintetizados e tendo suas atividades antitumorais investigadas frente a diferentes linhagens de células cancerígenas. Muitos destes compostos de coordenação estão se apresentando como agentes

promissores contra o câncer, porém os seus mecanismos de ação ainda não estão claramente elucidados.

Compostos de coordenação obtidos pelo Grupo de Pesquisa em Química de Coordenação e Bioinorgânica da UENF revelam a obtenção de novos compostos com centros metálicos de ferro e cobre que atuam hidroliticamente sobre o DNA, ou que apresentam as características estruturais necessárias, à atividade de nuclease sintética (FERNANDES *et al.*, 2006; PARRILHA *et al.*, 2008). Além disto, vários compostos mononucleares de cobre foram ativos frente a células tumorais humanas (BULL, 2008).

Estes estudos serviram de grande motivação para a continuação das pesquisas na busca de novos compostos capazes de interagirem com as moléculas de DNA e células tumorais, visando à obtenção de novos compostos de coordenação com atividade antitumoral.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como o principal objetivo a síntese e a caracterização de uma série de compostos de coordenação com o centro metálico de zinco, seguida de posterior avaliação das atividades antitumorais dos mesmos frente a duas linhagens de células humanas, causadoras de leucemia, U937 e THP-1.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver ligantes polidentados e caracteriza-los por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C ;
- Sintetizar os compostos de coordenação obtidos pela complexação entre os respectivos ligantes e o sal cloreto de zinco;
- Caracterizar os compostos de coordenação obtidos pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho, análise elementar (C, H, e N), difração de raios X de monocristal, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS), medidas de condutividade e determinação do ponto de fusão;
- Avaliar a porcentagem de morte celular induzida pelos compostos frente às linhagens humanas de células tumorais (U937 e THP-1) através do uso da técnica de microscopia de fluorescência;
- Verificar alterações morfológicas na estrutura das células tumorais, através da microscopia eletrônica de transmissão (M.E.T.);
- Com base nos resultados obtidos, propor mecanismos de atuação para os compostos frente às duas linhagens de células tumorais.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Técnicas empregadas

As sínteses dos ligantes e dos complexos foram realizadas utilizando-se solventes de grau PA e reagentes de fontes comerciais (Aldrich, Acros, Vetec, Synth e Merck), sem prévia purificação. As reações orgânicas foram acompanhadas por análise cromatográfica em camada delgada (TLC) (sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck), no solvente adequado. 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.

3.1.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os compostos orgânicos foram analisados por ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio, os quais foram registrados em um espectrômetro Jeol modelo Eclipse 400+, operando a 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C, utilizando-se clorofórmio ou metanol deuterado como solventes. As soluções foram preparadas a partir de 10-15 mg de amostra, em 550 µL de solvente em tubos de 2,5 mm com TMS (tetrametilsilano) como referência interna.

3.1.2. Espectroscopia de infravermelho

As análises de infravermelho dos compostos orgânicos e inorgânicos foram realizadas utilizando-se um espectrômetro de infravermelho Shimadzu IRA ffinity-1. As amostras foram analisadas em pastilha de KBr, quando sólidas e em filme sob pastilha de KBr quando líquidas.

3.1.3. Difração de raios X

Os dados foram coletados em um difratômetro *Enraf-Nonius Kappa-CCD* a temperatura ambiente pelo Prof. Lorenzo C. Viscentin (LRX-UFF). As estruturas foram resolvidas por métodos diretos e refinadas usando os programas SIR97 e SHELXL97.

3.1.4. Análise elementar

As porcentagens de C, H e N foram determinadas em um analisador de CHN Thermo Scientific Flash 2000.

3.1.5. Condutimetria

As medidas de condutividade foram obtidas em um condutivímetro Biocristal. Utilizou-se solventes em grau espectroscópico e concentração de 1×10^{-3} mol.dm³ das espécies analisadas. As medidas foram realizadas a 25°C.

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

Os espectros de massas foram obtidos empregando-se um espectrômetro de massas Q-TOF (Micromass, Manchester, UK). A técnica de ionização utilizada foi a de ionização por *electrospray*, em modo positivo (ESI(+)-MS). Condições empregadas: temperatura da fonte: 80°C, temperatura de dessolvação: 80°C, voltagem: 40V, sendo os complexos analisados em metanol/água (1:1).

3.1.7. Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência foi empregada para avaliar a atividade antitumoral dos complexos de zinco frente às células leucêmicas humanas. Foi utilizado um microscópio de fluorescência (Axioplan – Carl Zeiss), sendo as células classificadas em apoptóticas, necróticas e normais.

3.1.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão (M. E. T.)

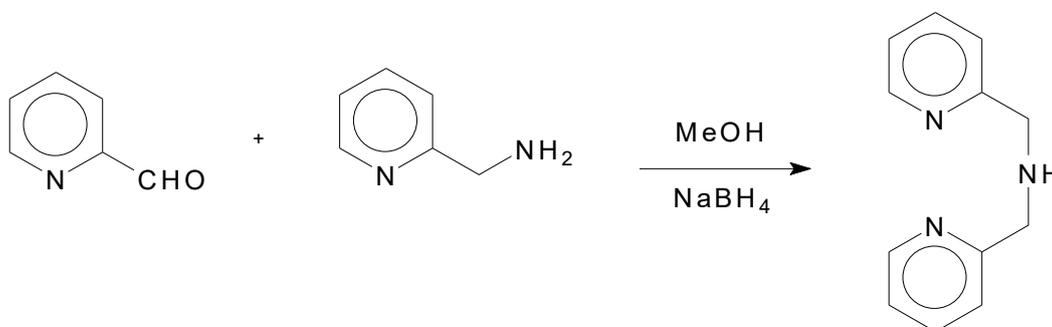
Para verificar alterações morfológicas nas células tumorais tratadas com os compostos, as mesmas foram processadas para análise por M.E.T.. Esta análise foi feita no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB/UENF) com a colaboração do Prof. Milton M. Kanashiro e do Prof. João Carlos de Aquino Almeida. As micrografias das células tumorais foram obtidas empregando-se o microscópio eletrônico de transmissão modelo TEM-900 (Zeiss, Alemanha).

3.2. Sínteses dos compostos orgânicos

Neste item são apresentadas as rotas sintéticas realizadas para obtenção dos ligantes. Com exceção da rota sintética para obtenção do ligante H2L6, todas as demais rotas sintéticas já foram desenvolvidas anteriormente pelo Grupo de Pesquisa de Química de Coordenação e Bioinorgânica. Estes ligantes foram utilizados na obtenção dos complexos de zinco, sendo os esquemas de sínteses dos mesmos apresentados a seguir.

3.2.1. Síntese do ligante N-bis-(2-metilpiridil)amina (L₁)

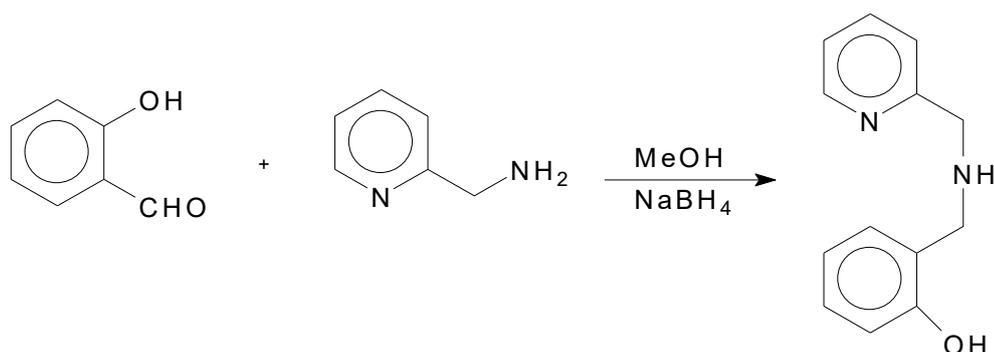
A síntese do ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L₁) foi realizada através da rota sintética já descrita na literatura (NEVES et al., 1995). Rendimento: 8,33 g; 80%.



Esquema 2. Esquema de síntese do ligante L₁ (NEVES et al., 1995).

3.2.2. Síntese do ligante (2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil)amina (HL₂)

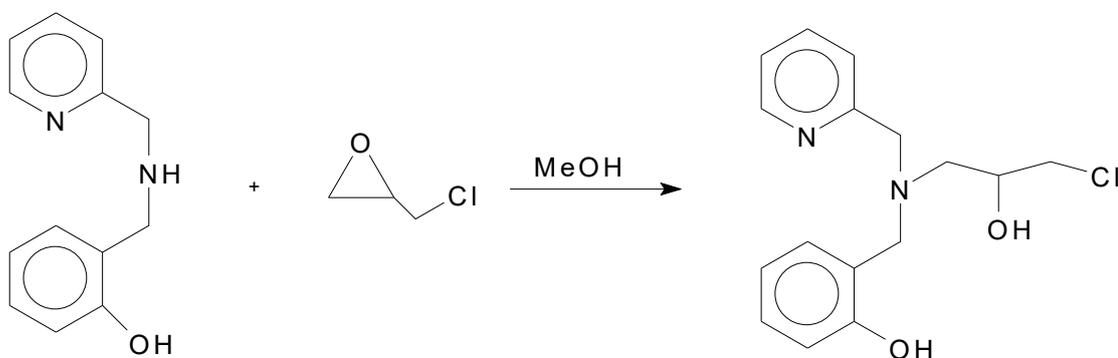
O ligante (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (HL₂) foi sintetizado utilizando-se a metodologia previamente descrita na literatura (NEVES *et al.*, 1993). Rendimento: 4,40g; 72%. Ponto de Fusão: 55 °C.



Esquema 2. Esquema de síntese do ligante HL_2 (NEVES *et al.*, 1993).

3.2.3. Síntese do ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina (H_2L_3)

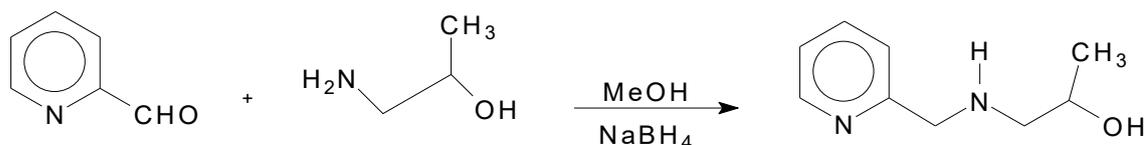
A síntese do ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil) [(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina (H_2L_3) foi realizada conforme descrito na literatura (HORN *et al.*, 2000). Rendimento: 4,42 g; 80 %.



Esquema 3. Esquema de síntese do ligante H_2L_3 (HORN *et al.*, 2000).

3.2.4. Síntese do ligante 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL_4)

A síntese do ligante 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL_4) foi realizada através da adaptação da rota sintética já descrita na literatura (STRIEGLER e DITTEL, 2005).

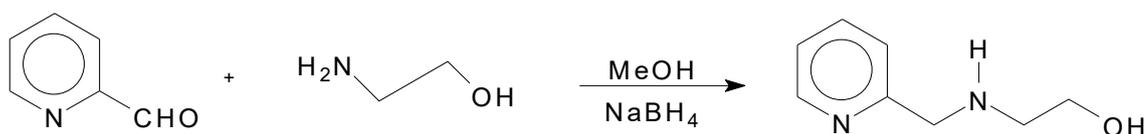


Esquema 4. Esquema de síntese do ligante HL₄ (STRIEGLER e DITTEL, 2005).

Em um balão de fundo redondo contendo 50 cm³ de metanol, sob banho de gelo, foi adicionado o 2-carboxipiridilaldeído (5,0 cm³; 52,3 mmol). Em seguida foi adicionado lentamente, quantidade equimolar de 1-amino-2-propanol (4,1 cm³; 52,3 mmol). A reação permaneceu sob agitação por aproximadamente 2 h. Após este período foi adicionado NaBH₄ (2,0 g; 52,3 mmol) lentamente e a reação permaneceu sob agitação por mais 2 h. Em seguida a solução foi transferida para um balão contendo 50 cm³ de água destilada. A solução foi concentrada no evaporador rotatório até o volume da solução de 20 cm³. A seguir foi realizada extração com diclorometano. À fase orgânica foi adicionado MgSO₄ anidro, a solução foi filtrada e concentrada no evaporador rotatório a 50°C, obtendo-se um óleo com coloração amarela. Rendimento: 6,16 g; 71%.

3.2.5. Síntese do ligante 2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol (HL₅)

A síntese do ligante 2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol (HL₅) foi realizada conforme a metodologia descrita na literatura (STRIEGLER e DITTEL, 2005). Rendimento: 5,17 g; 65%.



Esquema 5. Esquema de síntese do ligante HL₅ (STRIEGLER e DITTEL, 2005).

3.2.6. Síntese do ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H₂L₆)

A) Síntese da Ftalimida Potássica

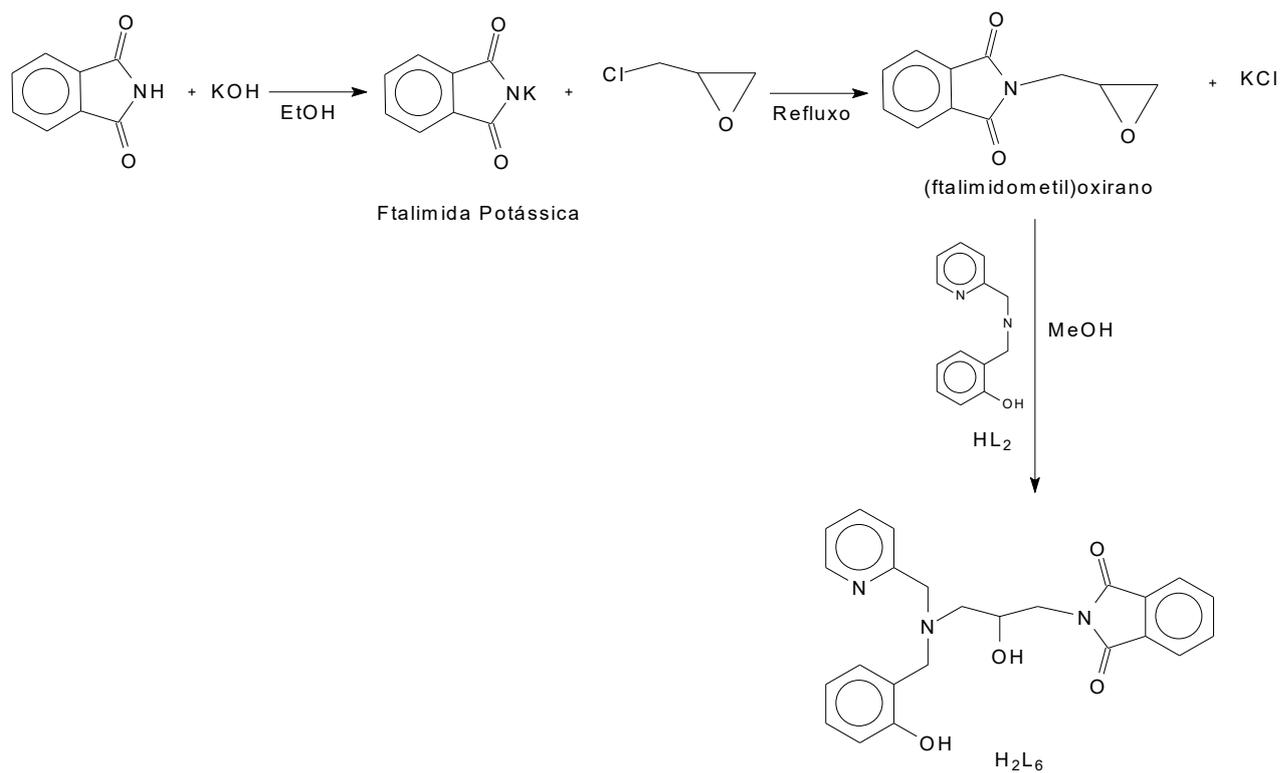
Em um balão de fundo redondo contendo 400 cm³ de etanol absoluto foi adicionado a ftalimida (20 g; 136 mmol). A solução foi refluxada até total dissolução da mesma. Posteriormente, foram transferidos 30 cm³ de uma solução de KOH preparada previamente (15,25 g; 270 mmol de KOH dissolvida em 15 cm³ de água e 45 cm³ de etanol), obtendo-se imediatamente um sólido esverdeado com o aspecto brilhante. Este foi filtrado à vácuo e lavado com etanol, obtendo-se a ftalimida potássica pura (HORN, 2000). Rendimento: 21,74 g; 86%. Ponto de fusão > 300 °C.

B) Síntese do (ftalimidometil)oxirano

A ftalimida potássica (9,26g; 50 mmol) foi transferida para um balão e em seguida foi adicionado epícloridrina (30 cm³; 386 mmol). A reação foi deixada em refluxo intenso durante 5 h. Após este período houve alteração na cor do precipitado, este apresentou cor branca opaca, diferente da cor brilhante inicial. Em seguida a solução foi concentrada no evaporador rotatório a 80°C para a retirada de qualquer resíduo de epícloridrina, obtendo-se o epóxido ou (ftalimidometil)oxirano (HORN, 2000). Rendimento: 8,96 g; 88%. Ponto de fusão: 60 °C.

C) Síntese do ligante H₂L₆

Em um balão de fundo contendo 50 cm³ de metanol, foi adicionado a amina secundária (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (HL₂) (1,49g; 7,0 mmol). Em seguida, foi acrescentado o epóxido ou (ftalimidometil)oxirano (1,42g; 7,0 mmol). A reação foi deixada sob agitação em temperatura ambiente por 72 h. Após este período, foi obtido um precipitado branco. A solução foi filtrada à vácuo e o ligante H₂L₆ foi obtido na forma de um pó branco. Rendimento: 2,55 g; 88%. Ponto de fusão: 116 °C.



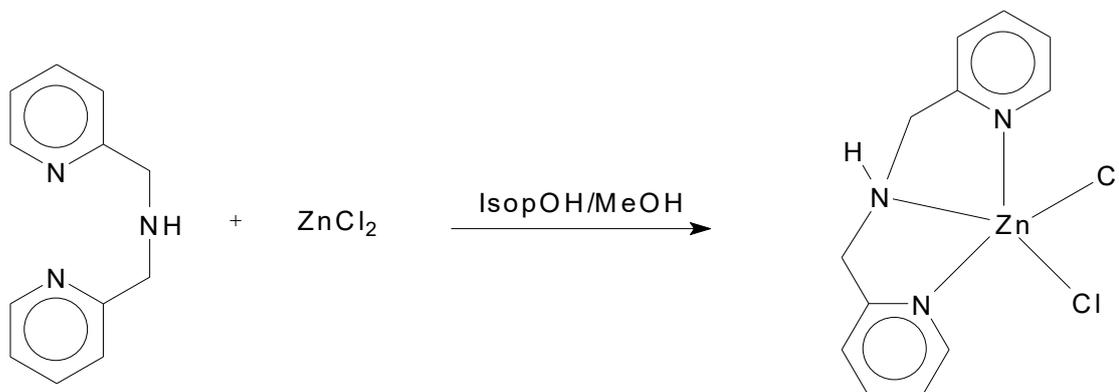
Esquema 6. Esquema de síntese do ligante H_2L_6 (HORN, 2000).

3.3. Sínteses dos compostos inorgânicos

Neste item serão apresentadas as sínteses dos complexos de zinco (II).

3.3.1. Síntese do $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**)

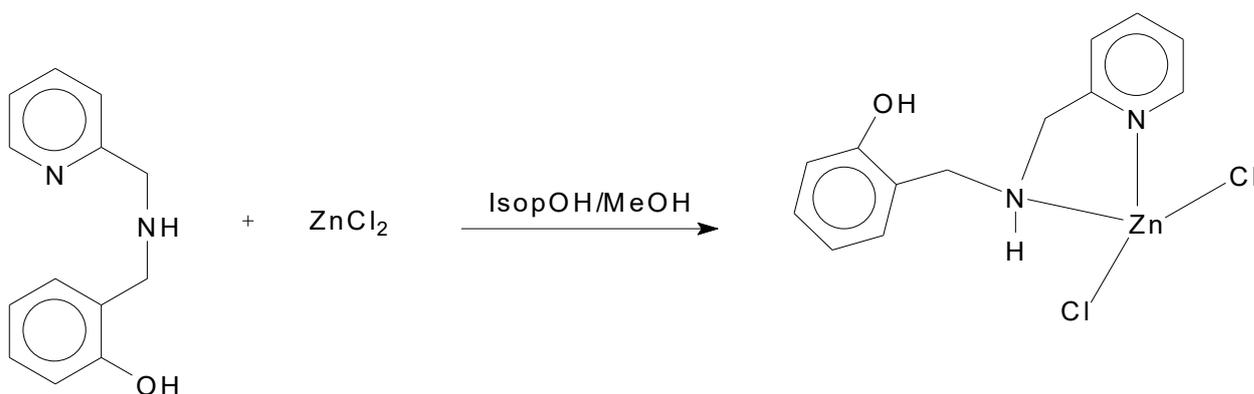
Os complexos (**1**), (**2**) e (**5**) foram sintetizados empregando-se a mesma rota sintética a qual é descrita a seguir. Para obtenção do complexo (**1**) reagiu-se uma solução metanólica (15 mL) contendo o pró-ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L_1) (0,20 g; 1,0 mmol) e uma solução isopropílica (15 mL) contendo $ZnCl_2$ (0,14 g; 1,0 mmol), resultando na formação de um sólido bege floculoso. A solução permaneceu sob agitação e aquecimento por 1 h, até que o todo sólido formado fosse completamente solubilizado. A seguir a solução foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada várias vezes, até que a solução se apresentasse límpida. Após um dia em repouso foram obtidos monocristais incolores e adequados para estudos cristalográficos. Rendimento: 0,26g; 77,6%. Ponto de fusão: 286 °C.



Esquema 7. Síntese do complexo $[Zn(HL_1)(Cl)_2]$ (**1**).

3.3.2. Síntese do $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**)

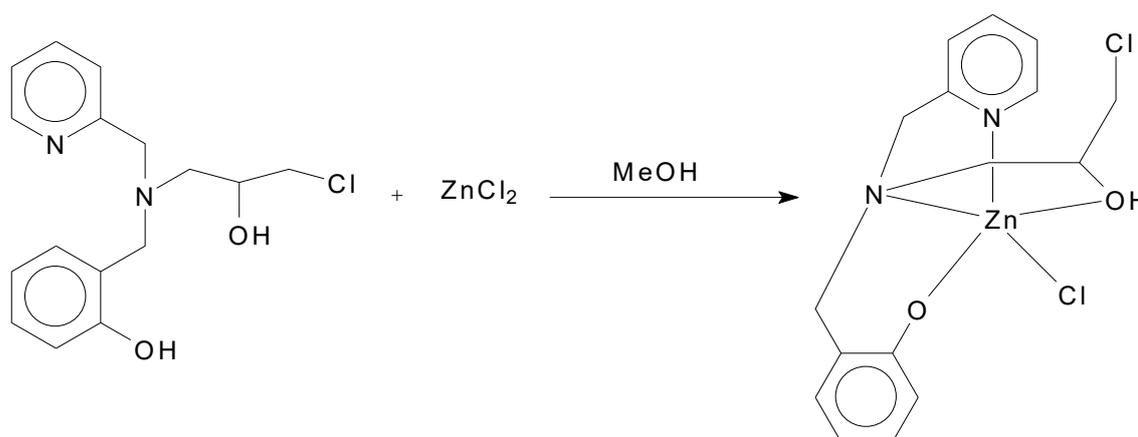
Para obtenção do complexo (**2**) utilizou-se a rota sintética descrita acima na síntese do complexo (**1**). A estrutura para este complexo (Esquema 8) está representada com base nos resultados de difração de Raios X de monocristal apresentados na seção 4.2.1. Rendimento: 0,27g; 78,6%. Ponto de fusão: 193 °C.



Esquema 8. Síntese do complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**).

3.3.3. Síntese do $[Zn(HL_3)(Cl)]$ (**3**)

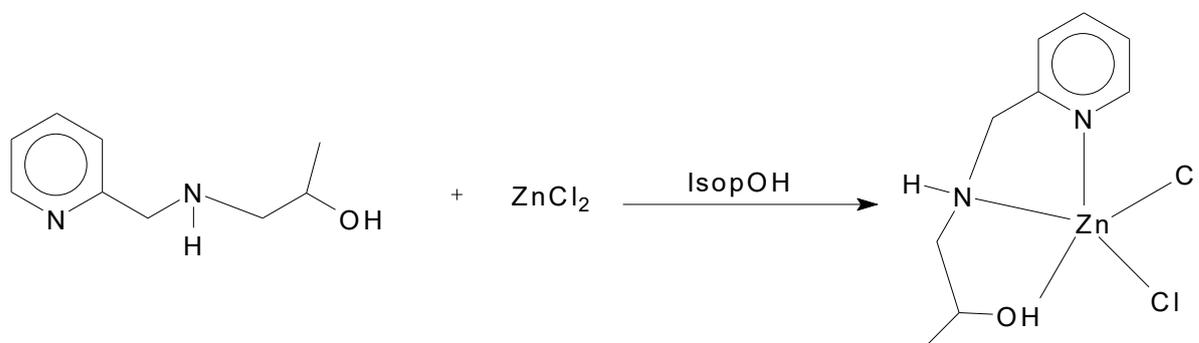
Para obtenção do complexo (**3**) reagiu-se uma solução metanólica (15 mL) contendo o ligante $N-(2\text{-hidroxibenzil})\text{-}N\text{-}(2\text{-piridilmetil})[(3\text{-cloro})(2\text{-hidroxi})]\text{propilamina}$ (H_2L_3) (0,31 g; 1,0 mmol) e uma solução metanólica (15 mL) contendo $ZnCl_2$ (0,14 g; 1,0 mmol), resultando em uma solução branca turva. A mesma foi agitada durante 30 minutos, filtrada e transferida para um béquer de 50 mL e deixada em repouso. Após um dia foram obtidos monocristais incolores, adequados para estudos cristalográficos. Rendimento: 0,03g; 7%. Quando acetato de sódio trihidratado (0,82g; 1,0 mmol) é adicionado, obtém-se o mesmo complexo, porém com rendimento de 70% (0,3g) (Assis, 2008; Fernandes, *et al.*, 2010). Ponto de fusão: 273 °C.



Esquema 9. Síntese do complexo $[Zn(HL_3)(Cl)]$ (**3**).

3.3.4. Síntese do $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ (**4**)

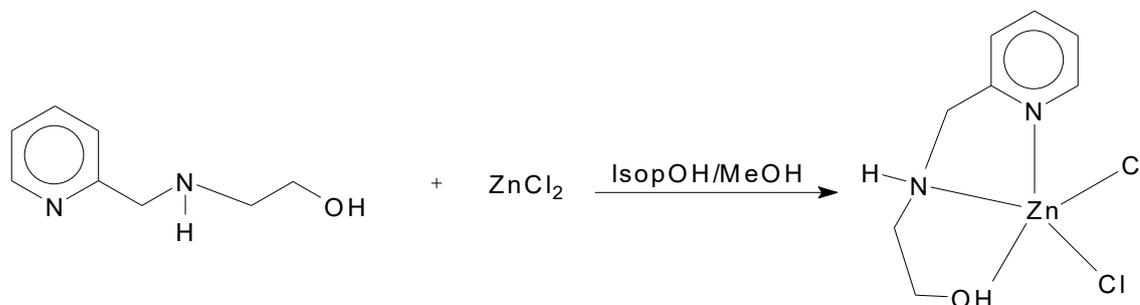
Para obtenção do complexo (**4**) reagiu-se uma solução isopropílica (15 mL) contendo o ligante bis(1-[(piridina-2-il-metil)-amino]-propan-2-ol) (HL_4) (0,17 g; 1,0 mmol) e uma solução isopropílica (15 mL) contendo $ZnCl_2$ (0,14 g; 1,0 mmol), resultando na formação de um sólido bege floculoso. A solução permaneceu sob agitação e aquecimento por 1 h, até que o todo sólido formado fosse completamente solubilizado. A seguir a solução foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada várias vezes, até que a solução se apresentasse límpida. Após um dia em repouso o composto foi obtido na forma de um sólido microcristalino branco. Rendimento: 0,20g; 68%. Ponto de fusão: 175 °C.



Esquema 10. Síntese do complexo $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ (**4**).

3.3.5. Síntese do $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (**5**)

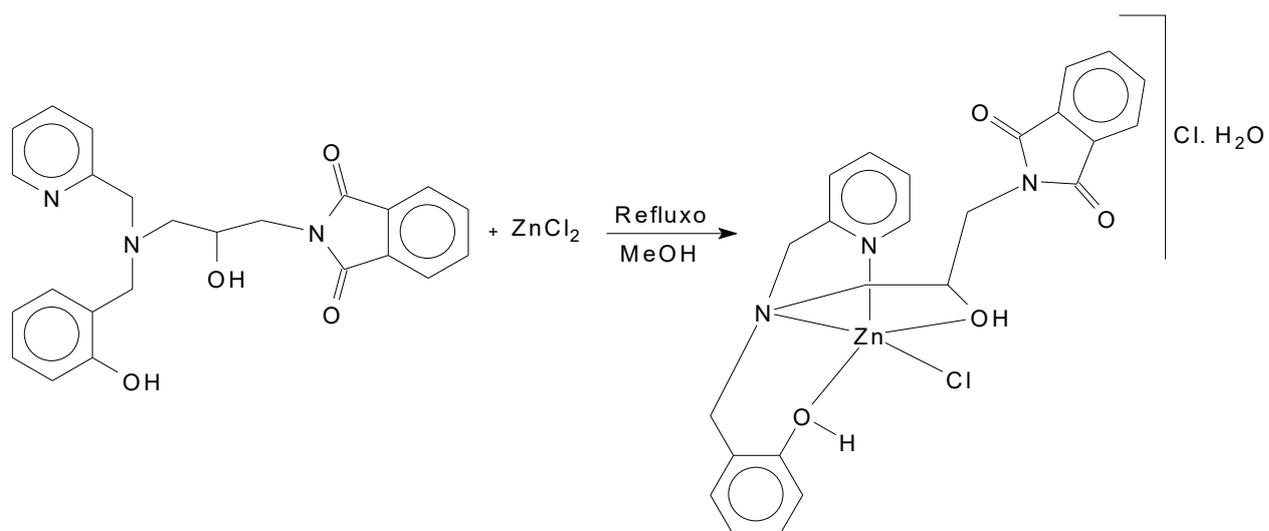
Para obtenção do complexo (**5**) utilizou-se a mesma rota sintética descrita para os complexos (**1**) e (**2**). Rendimento: 0,18g; 63%. Ponto de fusão: 169 °C.



Esquema 11. Síntese do $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (**5**).

3.3.6. Síntese do $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl \cdot H_2O$ (**6**)

Para obtenção do complexo (**6**) reagiu-se uma solução metanólica (15 mL) contendo o ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6) (0,47 g; 1,0 mmol) e uma solução metanólica (15 mL) contendo $ZnCl_2$ (0,14 g; 1,0 mmol). A solução resultante foi refluxada durante 2 h. A seguir a solução foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada, imediatamente obteve-se um pó branco. Rendimento: 0,257g; 45%. Ponto de fusão: 210 °C. A estrutura para este complexo (Esquema 12) esta representada com base nos resultados de análise elementar (C, H e N) apresentados na seção 4.2.3.



Esquema 12. Síntese do $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl \cdot H_2O$ (**6**).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos compostos orgânicos

Neste item são discutidas as caracterizações dos compostos orgânicos, a qual foi realizada por espectroscopia de infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C . Estas caracterizações têm por objetivo confirmar a obtenção de novos ligantes e confirmar a pureza daqueles que foram sintetizados a partir de metodologias já descritas na literatura.

4.1.1. Infravermelho

O espectro de infravermelho para o ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L_1) é apresentado na Figura 14. A presença dos grupos piridínicos na estrutura do ligante pode ser avaliada pelo padrão de absorção da deformação angular fora do plano de C–H ($\gamma\text{-CH}$) e de deformação angular do anel ($\beta\text{-anel}$) dos heteroaromáticos. O padrão de absorção desses tipos de deformações angulares é determinado pelo número de átomos de hidrogênio adjacentes que se deformam em fase. As absorções de deformação angular fora do plano de C–H e do anel para piridinas 1,2-dissubstituídas encontram-se na faixa de $781\text{--}740\text{ cm}^{-1}$ e $752\text{--}746\text{ cm}^{-1}$ respectivamente. Uma única banda elevada nesta região caracteriza a presença de anel benzênico 1,2-dissubstituído pois a inserção de um heteroátomo no anel aromático lhe confere um caráter de anel substituído. Portanto, a presença do nitrogênio e de um metileno ligada em posições orto a este anel aromático resulta em um anel 1,2-dissubstituído, justificando, assim, a presença de apenas um sinal intenso em 758 cm^{-1} e caracterizando que este anel aromático é um anel piridínico (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

O espectro também apresenta as bandas características de deformação axial do anel aromático (C=C e C=N) em 1593 , 1570 , 1475 e 1435 cm^{-1} . A presença dos grupos metilenos é confirmada pelo aparecimento dos estiramentos C-H alifáticos (ν

2920 e 2831 cm^{-1}). Em 3314 cm^{-1} é observado uma banda característica de amina secundária (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

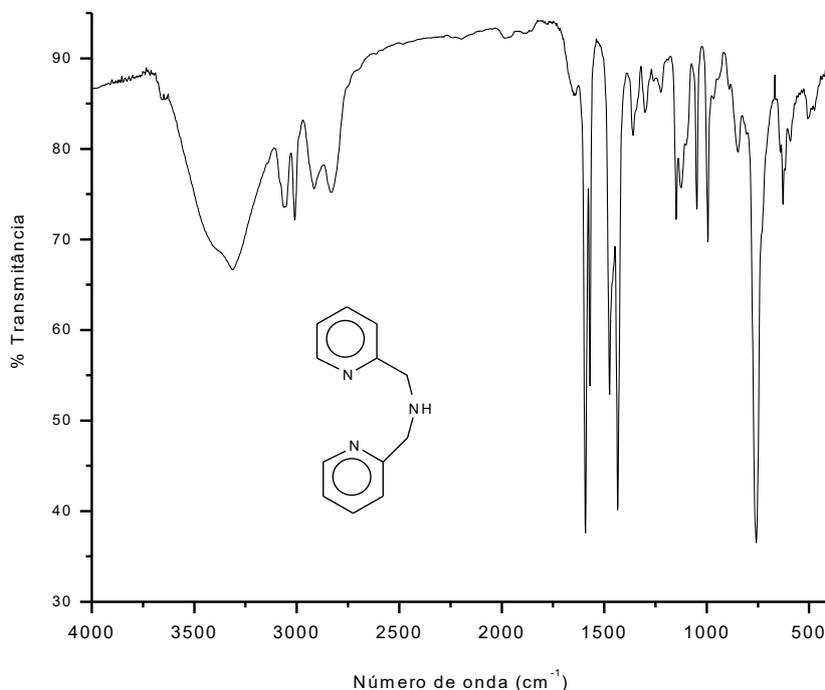


Figura 14. Espectro de infravermelho para o ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L₁) obtido em filme.

Os dados de espectroscopia de infravermelho para o ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L₁) são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L₁), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3314	ν NH	2831	ν_s CH ₂
3062, 3011	ν CH _{aromático}	1593, 1570, 1475, 1435	ν C=C; ν C=N
2920	ν_{as} CH ₂	758	γ -CH ^a ; β -anel ^b

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

O espectro de infravermelho para o ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL_2) (Figura 15) apresenta as bandas características de deformação axial do anel aromático (C=C e C=N) em $1593-1430\text{ cm}^{-1}$ e as bandas em 756 e 748 cm^{-1} , características do anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico. A presença da banda de deformação axial de C–H de aromáticos em 3042 cm^{-1} também indica a presença de anel aromático. A região alargada próxima a 3000 cm^{-1} é atribuída à deformação axial de O–H em ligação de hidrogênio intermolecular ou água de hidratação. As bandas características de deformação axial assimétrica e simétrica de C–H alifáticos, também são observadas em 2947 , 2930 , 2914 e 2860 cm^{-1} . Além disso, é observada uma banda próxima à 3263 cm^{-1} , característica de amina secundária. Em 1280 cm^{-1} observa-se a banda característica de deformação axial de C–O dos fenóis (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

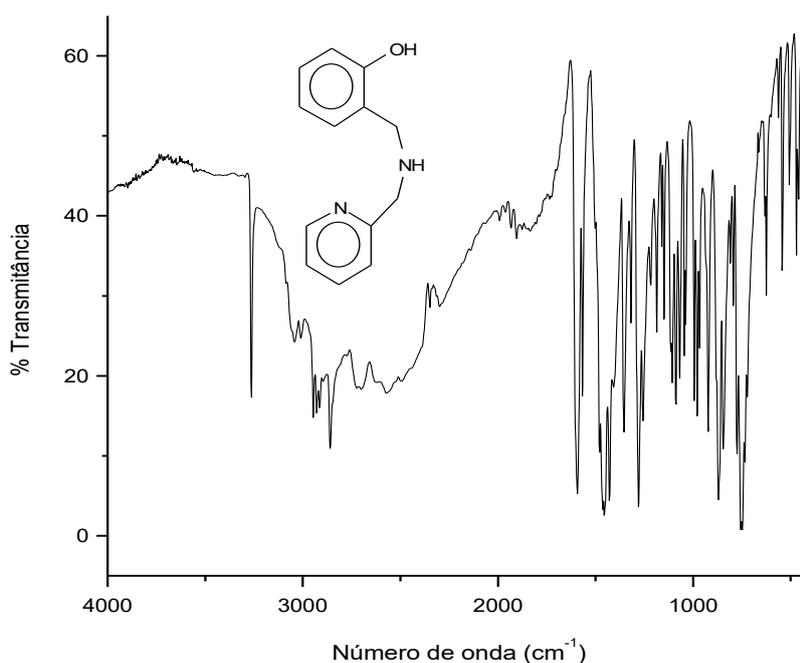


Figura 15. Espectro de infravermelho para o ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL_2), obtido em filme.

Os dados da análise do espectro de infravermelho do ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL_2) são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL₂) com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3263	ν N-H	1593, 1502, 1479, 1454, 1430	ν C=C; ν C=N
3042, 3011	ν CH _{Aromático}	1280	C-O ^a
2947, 2930, 2914	ν_{as} CH ₂ alifático	756, 748	γ -CH ^b ; β -anel ^c
2860	ν_s CH ₂ alifático		

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

O espectro de infravermelho para o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H₂L₃) (Figura 16), foi comparado com o espectro de infravermelho obtido para o seu precursor HL₂. Foi observado que algumas bandas correspondentes ao ligante HL₂ estão presentes no espectro do ligante H₂L₃, indicando que o produto formado apresenta o precursor em sua estrutura. A banda em 3263 cm⁻¹ atribuída ao estiramento N-H observado no espectro de infravermelho para o ligante HL₂ não foi observado no espectro do ligante H₂L₃, pois o mesmo não a possui em virtude da reação com a epícloridrina. As variações do número de onda das bandas observadas no ligante H₂L₃ em comparação ao seu precursor HL₂ ocorrem devido à variação de energia e geometria da molécula, confirmando a formação de um composto orgânico distinto do ligante HL₂. Neste espectro é possível observar as bandas características da hidroxila com ligação de hidrogênio intermolecular, na faixa 3000-3500 cm⁻¹. Em 1250 cm⁻¹ observa-se a banda característica de deformação axial de C-O dos fenóis. Esta mesma banda foi encontrada em 1280 cm⁻¹ no espectro de infravermelho para o ligante HL₂, este deslocamento é um forte indicativo da obtenção do ligante H₂L₃ (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

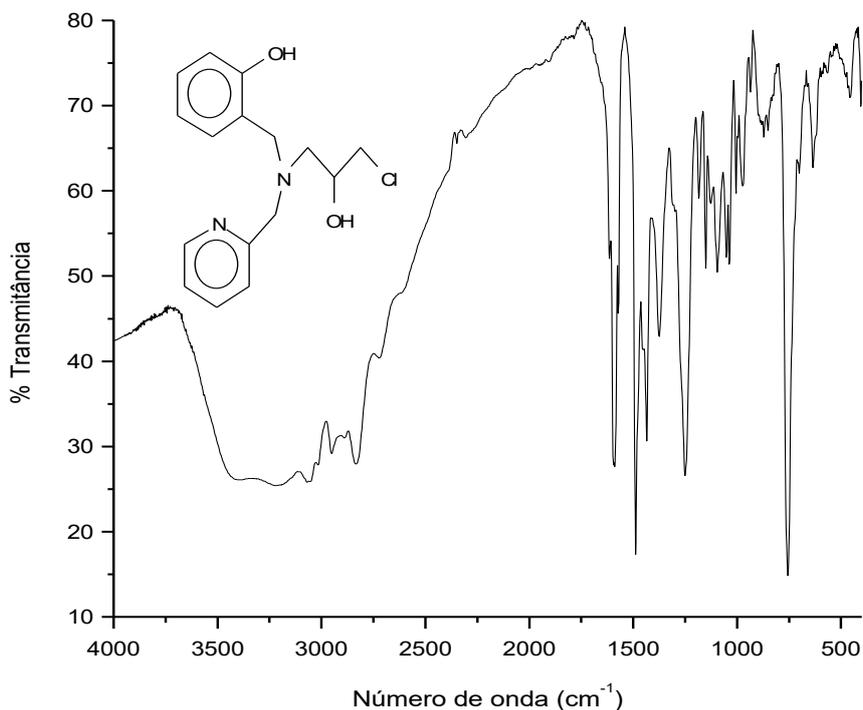


Figura 16. Espectro de infravermelho para o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H_2L_3), obtido em filme.

Os dados da análise do espectro de infravermelho para o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H_2L_3) são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H_2L_3) com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3000-3500	ν OH	1595, 1587, 1572, 1489, 1434	ν C=C; ν C=N
3055; 3018	ν $CH_{Aromático}$	1250	C-O ^a
2951	ν_{as} CH_2	754	γ -CH ^b ; β -anel ^c
2835	ν_s CH_2		

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

O espectro de infravermelho para o ligante 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL₄) (Figura 17), apresenta bandas intensas na região de 1437 a 1595 cm⁻¹ indicando a presença de anel piridínico (C=C e C=N), além da banda em 764 cm⁻¹, característica da deformação angular fora do plano das ligações C-H e da deformação angular do anel dos heteroaromáticos. Estas bandas caracterizam a presença do grupo piridínico. A banda de deformação axial de C-H aromático em 3016 cm⁻¹, também indica a presença de anel aromático. A banda larga na faixa de 3200-3500 cm⁻¹ é atribuído à deformação axial de O-H. Seria esperada a observação da vibração N-H de amina secundária, entretanto provavelmente esta se encontra encoberta pela vibração do grupo hidroxila presente na estrutura do ligante ou em moléculas de água de hidratação. As bandas de deformação axial assimétrica e simétrica de C-H alifáticos são observados em 2970, 2930 e 2847 cm⁻¹, confirmam a presença dos grupos metilenos e metila. Em 1113 cm⁻¹ observa-se a banda característica de deformação axial de C-O dos álcoois secundários (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

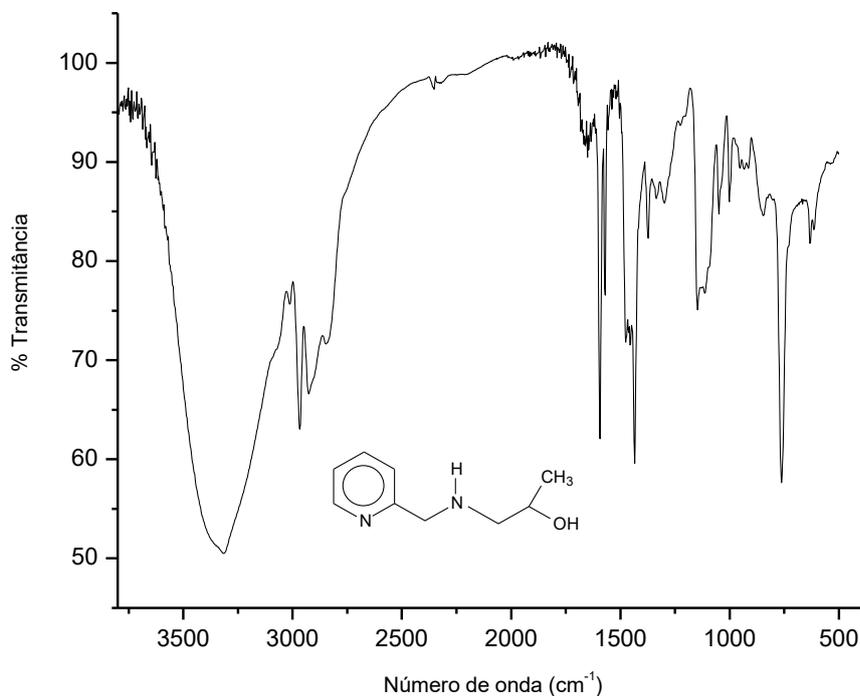


Figura 17. Espectro de infravermelho para o ligante 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL₄), obtido em filme.

Na Tabela 7 estão apresentadas as principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL₄).

Tabela 7. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL₄), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3200-3500	ν OH	1595, 1572, 1458 1437	ν C=C; ν C=N
3016	ν CH _{Aromático}	1113	ν C-O ^a
2970, 2930, 2847	ν CH ₂ ; ν CH ₃	764	γ-CH ^b ; β-anel ^c

a= deformação axial de C-O de álcoois secundários b= deformação C-H fora do plano de heteroaromáticos; c= deformação do anel heteraromático.

O espectro de infravermelho do ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL₅) (Figura 18) apresenta as bandas características dos grupos funcionais presentes na estrutura proposta, tendo um espectro com mesmo perfil do apresentado pelo ligante HL₄. No entanto, diferente de HL₄, HL₅ possui em sua estrutura um álcool primário e, portanto apresenta em seu espectro uma banda em 1053 cm⁻¹ característica da presença deste grupo.

O espectro de infravermelho para este ligante apresenta bandas de deformação axial do anel piridínico em 1595-1435 cm⁻¹ (C=C e C=N) e bandas características do anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico, em 762 cm⁻¹. A presença de bandas de deformação axial de C-H aromático em 3016 cm⁻¹, indica a presença de anel aromático. A banda larga na faixa de 3200-3500 cm⁻¹ é atribuída à deformação axial de O-H. Seria esperada a observação da vibração N-H de amina secundária, entretanto provavelmente esta se encontra encoberta pela vibração do grupo hidroxila presente na estrutura do ligante ou em moléculas de água de hidratação, semelhante ao apresentado no espectro de infravermelho do ligante HL₄. As bandas características de deformação axial assimétrica e simétrica de C-H alifático em 2848 e 2929 cm⁻¹, também foram observadas (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

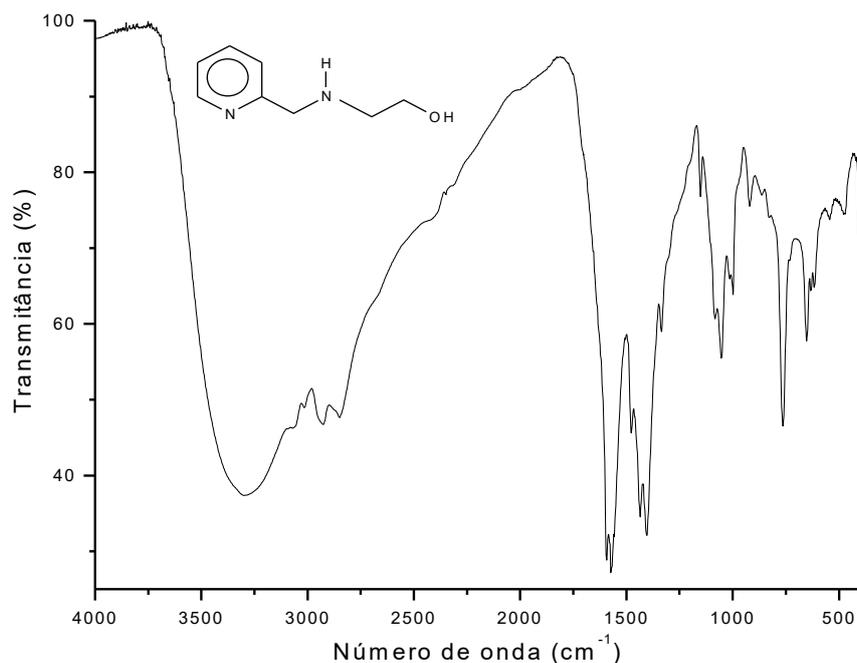


Figura 18. Espectro de infravermelho para o ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL₅) obtido em filme.

Os dados da análise do espectro de infravermelho do ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL₅) são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL₅), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3200-3500	ν OH	1595, 1572, 1477, 1435	ν C=C; ν C=N
3016	ν CH _{Aromático}	1053	ν C-O ^a
2929	ν _{as} CH ₂	762	γ-CH ^b ; β-anel ^c
2848	ν _s CH ₂		

a= deformação axial de C-O de álcoois primários b= deformação C-H fora do plano de heteroaromáticos; c= deformação do anel heteraromático.

O espectro de infravermelho para a ftalimida potássica, precursor do ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H₂L₆) (Figura 19), apresenta bandas de deformação axial do anel aromático em 1585, 1566, 1554,

1504 e 1458 cm^{-1} (C=C) e bandas características do anel benzênico 1,2-dissubstituído em 713 cm^{-1} . A presença de bandas de deformação axial de C–H aromático em 3043 cm^{-1} , também indica a presença de anel aromático. A presença da banda em 1705 cm^{-1} é atribuída a carbonila (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

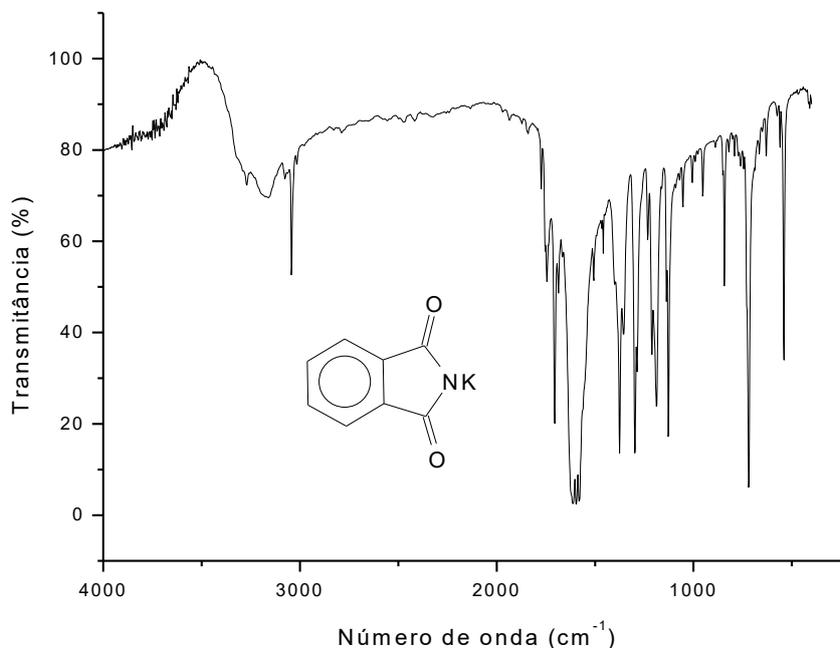


Figura 19. Espectro de infravermelho para o precursor ftalimida potássica, obtido em filme.

Os dados da análise do espectro de infravermelho do precursor ftalimida potássica são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do precursor ftalimida potássica, com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3043	ν CH _{Aromático}	1585, 1566, 1554, 1504, 1458	ν C=C _{aromático}
1705	ν C=O	713	γ -CH ^a ; β -anel ^b

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

O espectro de infravermelho para precursor (Ftalimidometil)oxirano, utilizado na síntese do ligante H₂L₆ (Figura 20), apresenta bandas de deformação axial do anel aromático em 1554, 1535, 1469 e 1431 cm^{-1} (C=C) e banda característica do

anel 1,2-dissubstituído em 725 cm^{-1} . As bandas em 1766 e 1712 cm^{-1} são típicas da carbonila. Os estiramentos, simétrico e assimétrico do anel epóxido, correspondem às bandas em 1257 e 964 cm^{-1} respectivamente (Silverstein e Webster, 2000). As variações na quantidade de bandas atribuídas as carbonilas e seus respectivos números de onda quando comparados ao espectro de infravermelho da ftalimida potássica é um forte indicativo da obtenção do (Ftalimidometil)oxirano (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

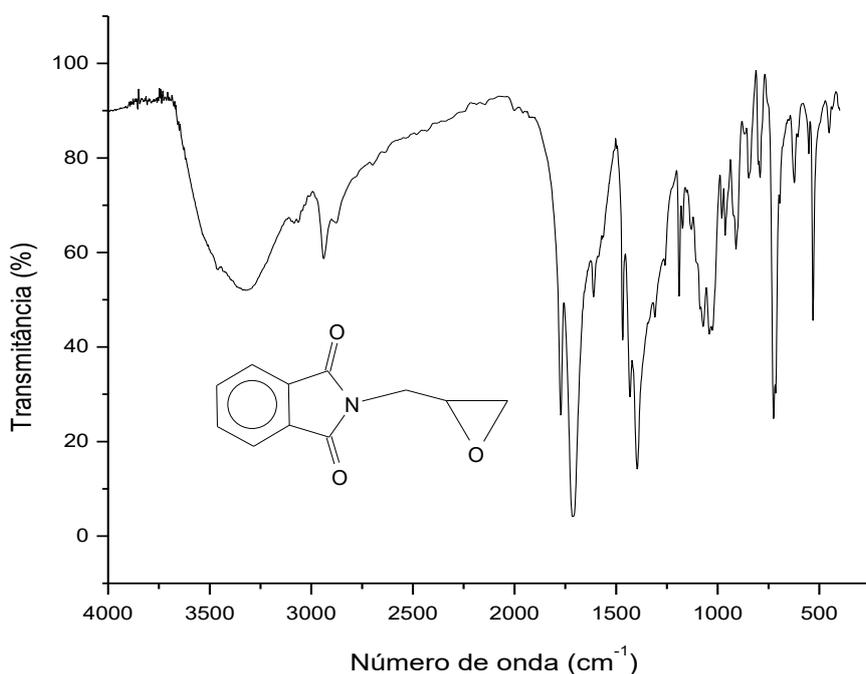


Figura 20. Espectro de infravermelho para o precursor (Ftalimidometil)oxirano, obtido em filme.

Os dados da análise do espectro de infravermelho do precursor (Ftalimidometil)oxirano são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do precursor (Ftalimidometil)oxirano, com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3082	ν CH _{Aromático}	1257	ν_s C-O-C
2939	ν_{as} CH ₂	964	ν_{as} C-O-C
1766, 1712	ν C=O	725	γ -CH ^a ; β -ane ^b
1554, 1535, 1469, 1431	ν C=C		

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

O resultado de espectroscopia de infravermelho obtido para o ligante H₂L₆, foi comparado com o espectro de infravermelho obtido para os seus precursores HL₂ e o epóxido. Foi observado que algumas bandas correspondentes ao ligante HL₂ e do epóxido estão presentes no espectro do ligante H₂L₆, indicando que o produto formado apresenta os precursores em sua estrutura. A variação do número de onda das bandas obtidas como por exemplo, a variação do número de onda das carbonilas e da deformação axial de C-O dos fenóis, ocorre devido à variação de energia e geometria da molécula, confirmando a formação de um composto orgânico distinto dos seus precursores.

O espectro de infravermelho para o ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H₂L₆) (Figura 21) apresenta bandas de deformação axial do anel aromático em 1589, 1485 e 1423 cm⁻¹ (C=C e C=N) e bandas características do anel 1,2-dissubstituído, em 756 cm⁻¹. A presença de bandas de deformação axial de C-H aromático em 3062 cm⁻¹, também indica a presença de anel aromático. A banda larga na faixa de 3000 a 3500 cm⁻¹ é característica de grupos hidroxila com ligação de hidrogênio intermolecular. As bandas características de deformação axial assimétrica e simétrica de C-H alifático são observadas em 2843 e 2939 cm⁻¹. As bandas em 1766 e 1701 cm⁻¹ são atribuídas às carbonilas. Em 1250 cm⁻¹ observa-se a banda característica de deformação axial de C-O dos fenóis (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

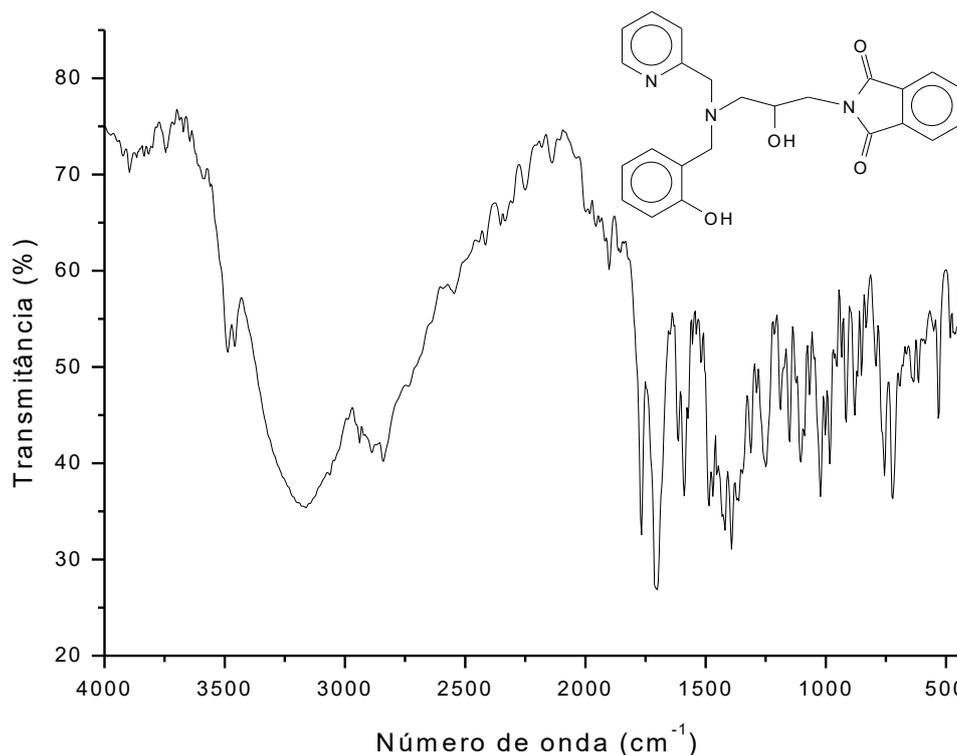


Figura 21. Espectro de infravermelho para o ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6), obtido em filme.

Os dados da análise do espectro de infravermelho do ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6) são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3000-3500	ν OH	1766, 1701	ν C=O
3062	ν CH _{Aromático}	1589, 1485, 1423	ν C=C; ν C=N
2939, 2924	ν_{as} CH ₂	1250	ν C-O ^a
2843	ν_s CH ₂	756	γ -CH ^b ; β -anel ^c

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

4.1.2. Ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

Uma vez que as sínteses de todos os ligantes, com exceção do ligante N-ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6), foram realizadas com base na literatura, as análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono foram realizadas com o objetivo de se confirmar a obtenção destes ligantes, bem como de verificar seus respectivos graus de pureza.

No espectro de RMN ^1H do ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L_1) (Figura 22) são observados seis sinais referentes a este composto. Entre 8,48 e 7,07 ppm encontram-se os picos referentes aos hidrogênios aromáticos (H_1 , H_2 , H_3 e H_4), pois estão na região mais desblindada. Em 3,90 ppm observa-se um simpleto, o qual é atribuído aos átomos de hidrogênio dos grupos metilenos (H_5). Observa-se ainda um simpleto em 2,90 ppm, atribuído ao hidrogênio ligado ao nitrogênio aminico (H_6). Este apresenta um perfil alargado, o que evidencia a baixa velocidade de troca do hidrogênio do grupo N-H com o meio (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

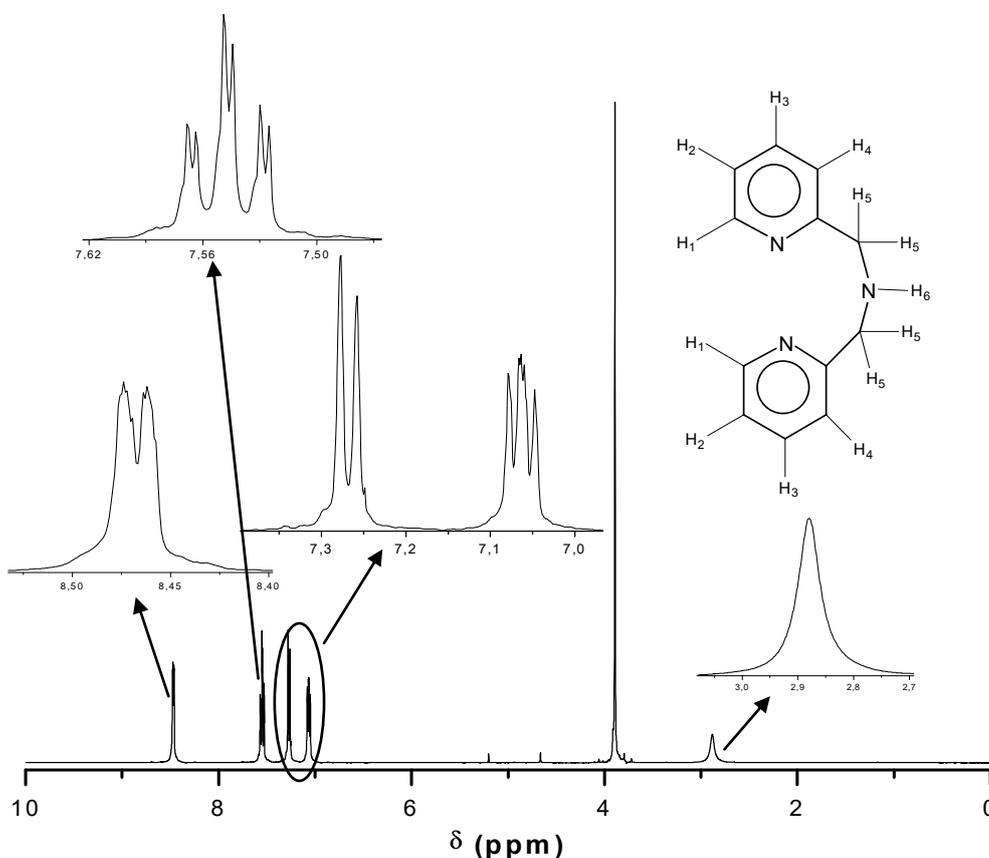


Figura 22. Espectro de RMN ^1H para o ligante N-bis-(2-piridilmetil) amina (L_1), obtido em CDCl_3 .

Tabela 12. Resultados de RMN ^1H para o ligante N-bis-(2-piridilmetil) amina (L_1).

$\delta_{\text{observado}}$ (ppm)	Multiplicidade observada	$J_{\text{observado}}$ (Hz)	Número de prótons	Atribuição
8,48	Duplo duplete	$J_{1-2} = 4,03$ $J_{1-3} = 1,83$	2,1	H_1
7,56	Duplo tripleto	$J_{3-2} = J_{3-4} = 7,69$ $J_{3-1} = 1,83$	2,0	H_3
7,28	Duplete	$J_{4-3} = 7,69$	2,0	H_4
7,07	Multiplete	-	2,0	H_2
3,90	Simpleto	-	4,0	H_5
2,90	Simpleto	-	1,35	H_6

O espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L_1) apresentado na Figura 23 apresenta seis sinais, os quais confirmam a presença dos seis átomos de carbono em ambientes químicos diferentes. O sinal localizado na região desblindada (54,5 ppm) refere-se aos carbonos alifáticos, enquanto que os demais são atribuídos aos carbonos aromáticos. Por sua vez, o sinal de menor intensidade com deslocamento próximo a 159 ppm é atribuído ao átomo de carbono denominado 5, pois intensidades de sinal relativamente baixas estão associadas a átomos de carbono não ligados a átomos de hidrogênio, além do sinal estar posicionado com intensidade negativa, característico de carbonos quaternários e secundários. Os três sinais observados na região próxima a 78 ppm corresponde ao carbono pertencente ao solvente colorofórmio (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

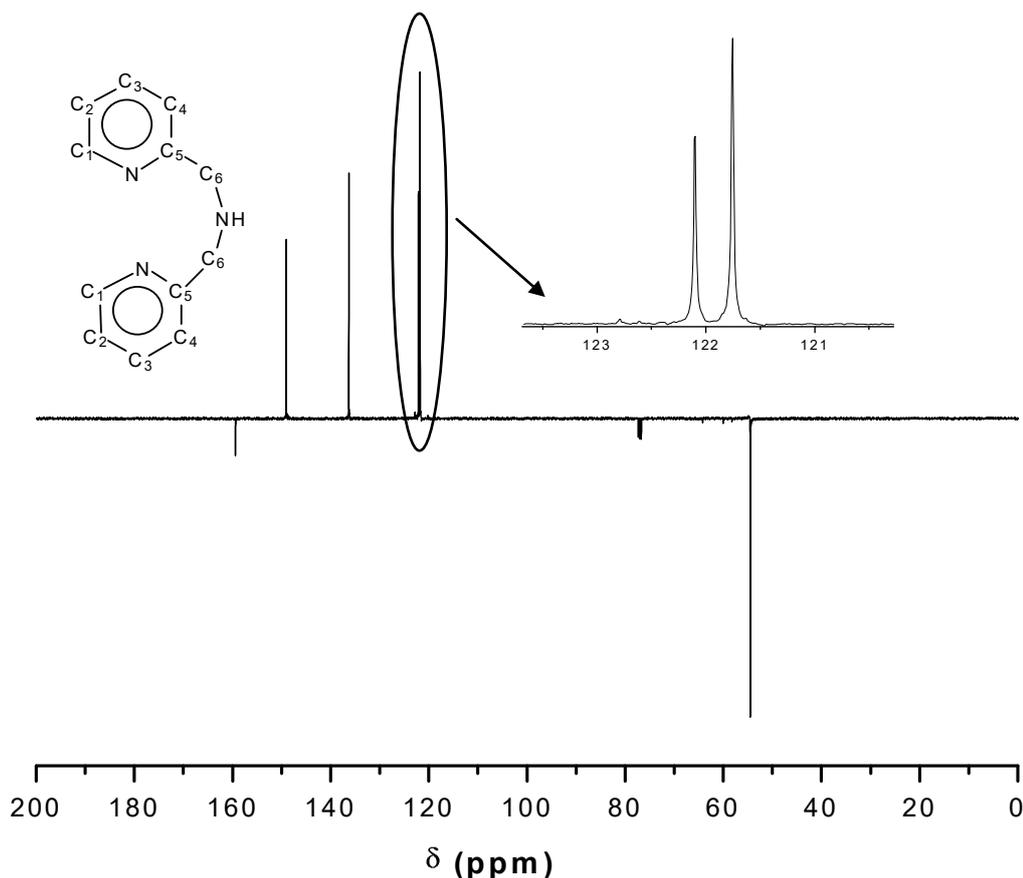


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante N-bis-(2-piridilmetil) amina (L_1), em CDCl_3 .

Os dados do espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L_1) são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Dados para espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante N-bis-(2-piridilmetil)amina (L_1).

$\delta_{\text{observado}}(\text{ppm})$	Atribuição	$\delta_{\text{observado}}(\text{ppm})$	Atribuição
159,38	C_5	122,12	C_4
149,08	C_1	121,77	C_2
136,28	C_3	54,50	C_6

No espectro de RMN ^1H do ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL_2) (Figura 24) são observados nove sinais referentes ao composto. Entre 8,58 e 6,77 ppm encontram-se os picos referentes aos hidrogênios aromáticos. O espectro também apresenta três simpletos, sendo dois referentes aos hidrogênios alifáticos dos metilenos (4 e 3,83 ppm) e outro em 2,6 ppm, o qual refere-se ao hidrogênio

amínico. Este apresenta um perfil alargado, o que evidencia a baixa velocidade de troca do hidrogênio do grupo N-H com o meio (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

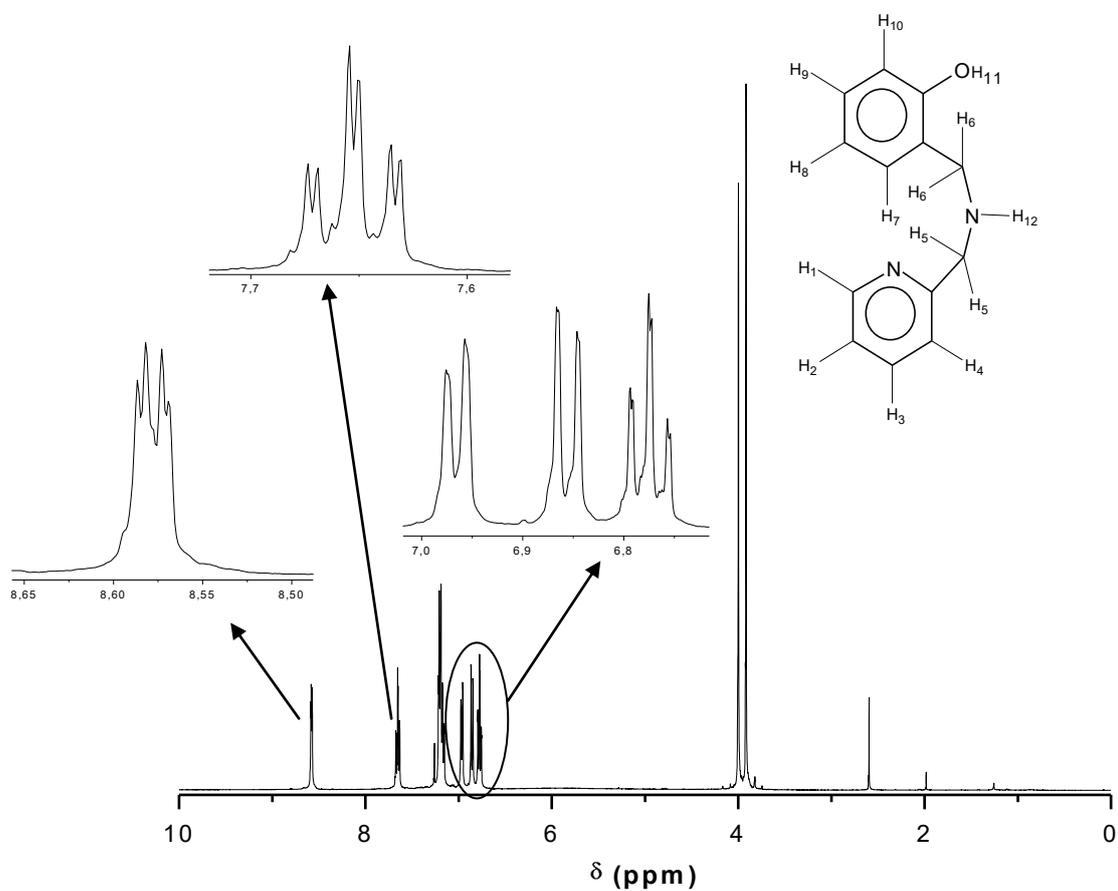


Figura 24. Espectro de RMN ^1H para o ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL_2), obtido em CDCl_3 .

Tabela 14. Resultados de RMN ^1H para o ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL_2).

$\delta_{\text{observado}}(\text{ppm})$	Multiplicidade observada	$J_{\text{observado}}$ (Hz)	Número de prótons	Atribuição
8,58	duplo duplete	$J_{1-2} = 5,31$ $J_{1-3} = 1,65$	1,0	H_1
7,65	duplo tripleto	$J_{3-2} = J_{3-4} = 7,69$ $J_{3-1} = 1,65$	1,0	H_3
7,23-7,15	Multiplete	-	3,1	$\text{H}_2, \text{H}_4, \text{H}_9$
6,97	duplete	$J_{7-8} = 7,32$	1,1	H_7
6,86	multiplete	-	1,0	H_{10}
6,77	duplo tripleto	$J_{8-7} = J_{8-9} = 7,32$ $J_{8-10} = 0,92$	1,1	H_8
4,00	simpleto	-	2,2	H_6
3,83	simpleto	-	2,2	H_5
2,60	simpleto	-	0,2	H_{12}

O espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL_2) apresenta treze sinais, sendo que os carbonos aromáticos encontram-se à esquerda do espectro ($\delta > 100$ ppm), enquanto os alifáticos apresentam-se à direita do mesmo, confirmando a obtenção do composto (Figura 25). Os três sinais observados na região próxima a 78 ppm corresponde ao carbono pertencente ao solvente clorofórmio (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

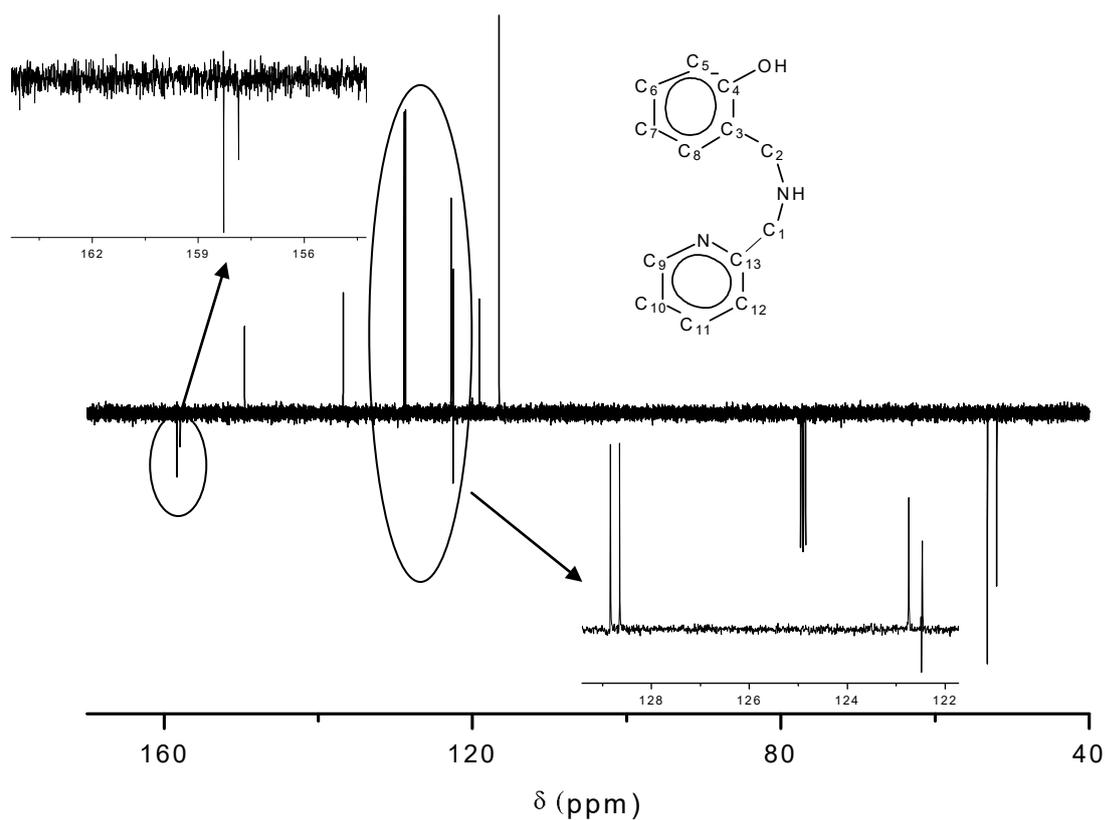


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C (APT) do ligante HL_2 , em CDCl_3 .

Os dados do espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL_2) são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Dados para espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante (2-hidroxilbenzil)(2-piridilmetil)amina (HL_2).

$\delta_{\text{observado}}(\text{ppm})$	Atribuição	$\delta_{\text{observado}}(\text{ppm})$	Atribuição
157,8	C_{13}	122,5	C_3
153,2	C_4	122,4	C_{10}
149,4	C_9	119,0	C_7
136,6	C_{11}	116,4	C_5
128,7	C_8	53,1	C_1
128,5	C_6	51,9	C_2
122,6	C_{12}	-	-

O RMN ^1H para o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H_2L_3) (Figura 26) apresenta entre 8,58 e 6,74 ppm os picos referentes aos hidrogênios aromáticos. Observa-se que os hidrogênios H_2 , H_4 e H_9 apresentam-se na mesma faixa de deslocamento (7,28 a 7,11 ppm), isto ocorre devido à semelhança do ambiente químico em que estes se encontram. O multipletto referente a cinco hidrogênios alifáticos (H_5 , H_6 e H_{13}) é visto na faixa de 4,10 a 3,68 ppm. Um multipletto é observado em 3,48 ppm, sendo atribuídos aos hidrogênios do metileno ligado ao cloro. O simpleto em 5,29 ppm é atribuído a presença de diclorometano residual na amostra do ligante (Silverstein e Webster, 2000)

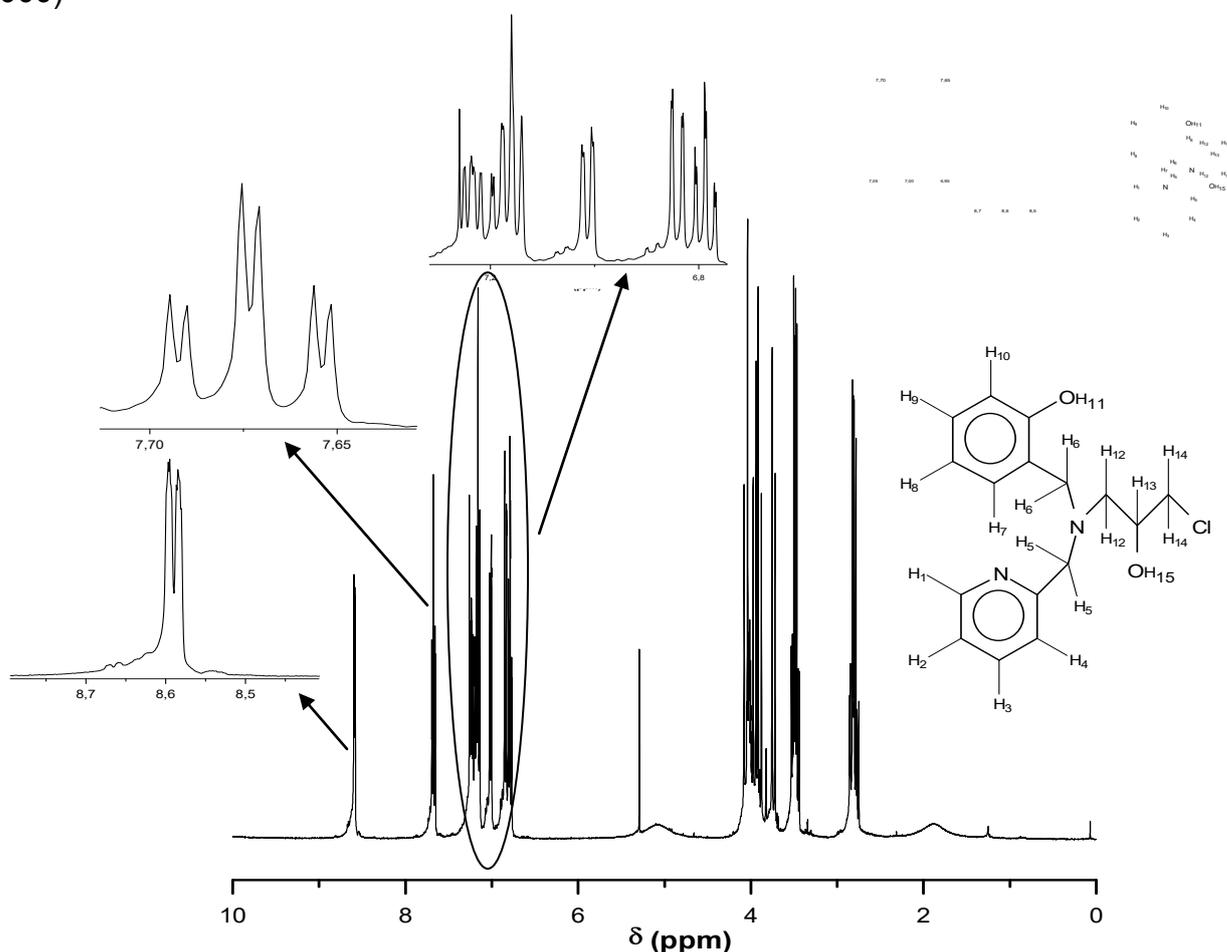


Figura 26. Espectro de RMN ^1H para o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H_2L_3), obtido em CDCl_3 .

Tabela 16. Resultados de RMN ^1H para o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H_2L_3).

$\delta_{\text{observado}}$ (ppm)	Multiplicidade observada	$J_{\text{observado}}$ (Hz)	Número de prótons	Atribuição
8,58	Multipleteo	-	1,0	H_1
7,67	Duplo tripleto	$J_{3-2} = J_{3-4} = 7,69$ $J_{3-1} = 1,83$	1,0	H_3
7,28-7,11	Multipleteo	-	3,0	H_2, H_4 e H_9
7,01	Duplo dupleteo	$J_{7-8} = 7,32$ $J_{7-9} = 1,47$	1,0	H_7
6,90-6,74	Multipleteo	-	2,0	$\text{H}_{10}, \text{H}_8$
4,10-3,68	Multipleteo	-	4,9	H_5, H_6 e H_{13}
3,48	Multipleteo	-	2,1	H_{14}
2,87-2,73	Multipleteo	-	2,2	H_{12}

O espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H_2L_3) apresenta dezesseis sinais, sendo que os carbonos aromáticos estão na faixa de 157,36 a 116,64 ppm, correspondendo aos onze carbonos aromáticos presentes no composto (Figura 27). Os sinais referentes aos cinco carbonos alifáticos estão na faixa de 68,97 a 47,19 ppm. Observa-se que, semelhante ao ligante HL_2 , os carbonos C_6 e C_7 do ligante H_2L_3 , encontram-se em regiões de deslocamento diferentes, já que possuem ambientes diferentes. Os três sinais observados na região próxima a 78 ppm correspondem ao carbono pertencente ao solvente clorofórmio (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

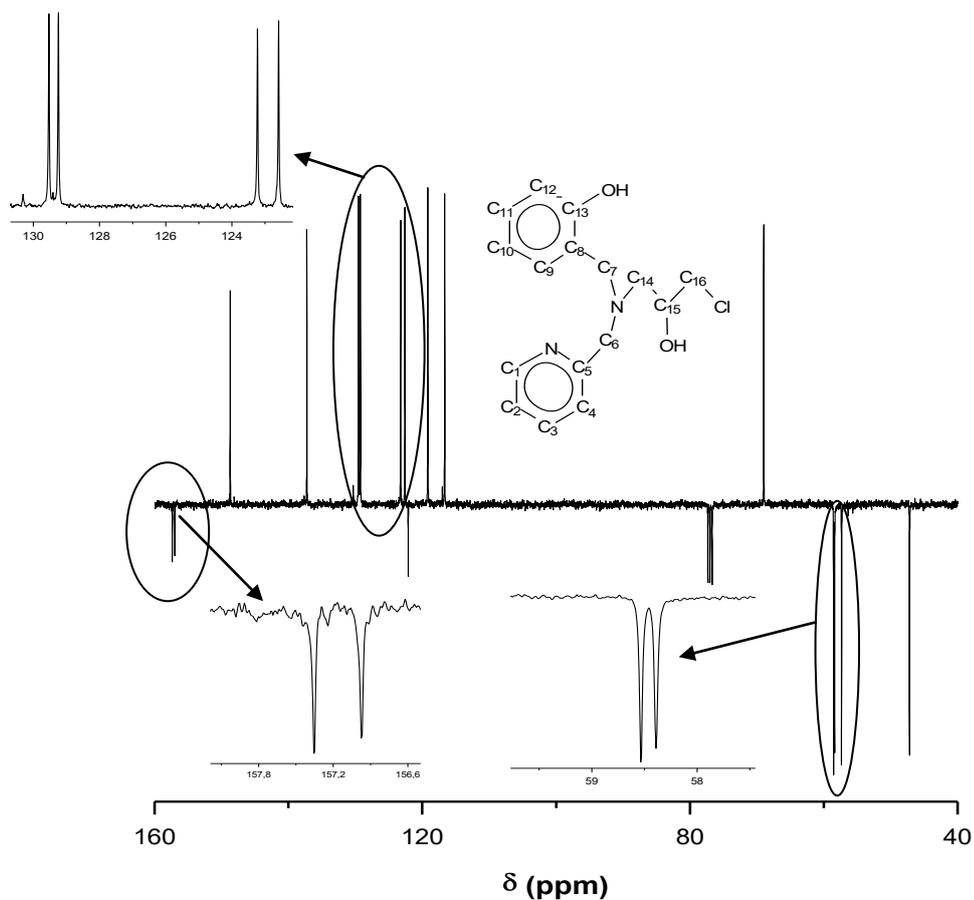


Figura27. Espectro de RMN ^{13}C (APT) do ligante $\text{N}-(2\text{-hidroxibenzil})\text{-N}-(2\text{-piridilmetil})[(3\text{-cloro})(2\text{-hidroxi})]\text{propilamina}$ (H_2L_3), em CDCl_3 .

Os dados do espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante $\text{N}-(2\text{-hidroxibenzil})\text{-N}-(2\text{-piridilmetil})[(3\text{-cloro})(2\text{-hidroxi})]\text{propilamina}$ (H_2L_3) são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. . Dados para espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H_2L_3).

$\delta_{\text{observado}}(\text{ppm})$	Atribuição	$\delta_{\text{observado}}(\text{ppm})$	Atribuição
157,36	C ₅	122,09	C ₈
156,97	C ₁₃	119,17	C ₁₀
148,69	C ₁	116,64	C ₁₂
137,24	C ₃	68,97	C ₁₅
129,53	C ₉	58,54	C ₆
129,24	C ₁₁	58,39	C ₁₄
123,23	C ₄	57,34	C ₇
122,59	C ₂	47,19	C ₁₆

O espectro de RMN ^1H do ligante [(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL_4) (Figura 28) apresenta entre 8,54 e 7,15 ppm os picos referentes aos hidrogênios aromáticos, H_1 , H_2 , H_3 e H_4 , do anel piridínico, observados como um conjunto de multipletos, duplo dupletos, duplo triplo e dupletos, respectivamente. Em 3,91 ppm observa-se um simpleto, o qual é atribuído aos hidrogênios do metileno ligado ao anel piridínico (H_5). O multipletos referente ao hidrogênio ligado ao carbono terciário alifático é visto em 3,80 ppm (H_8). Dois duplo dupletos são observados em 2,74 e 2,41 ppm, sendo atribuídos aos hidrogênios do metileno ligados à amina alifática. Este comportamento pode ser atribuído à uma possível ligação de hidrogênio entre o átomo de nitrogênio da amina alifática e o grupo O-H, o que impede a rotação da molécula, tornando o ambiente químico dos hidrogênios H_7 e H_7' diferentes. Os hidrogênios do grupo metila (H_9) apresentam-se como um dupletos em 1,13 ppm. Em 5,27 ppm observa-se um simpleto, o qual é atribuído a presença de diclorometano residual na amostra do ligante (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

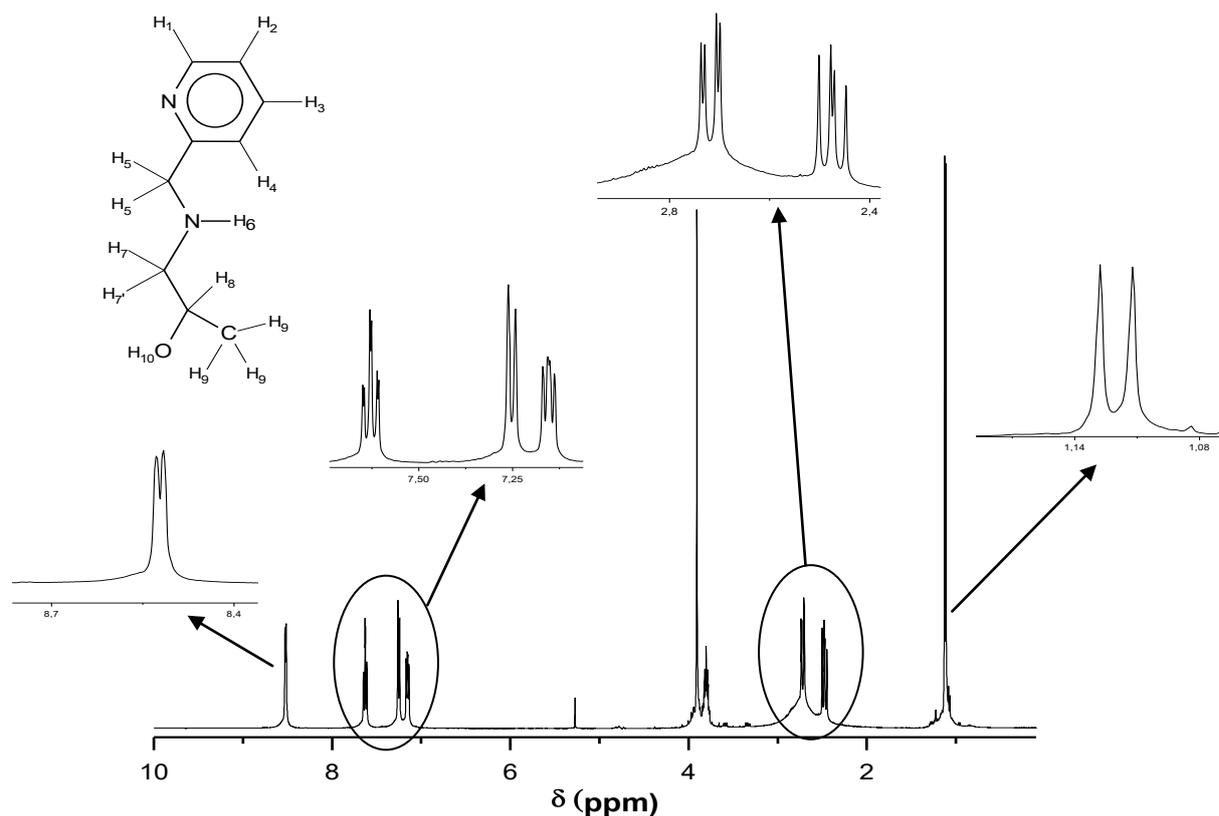


Figura 28. Espectro de RMN ^1H para o ligante [(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL_4), obtido em CDCl_3

Tabela 18. Resultados de RMN ^1H para o ligante [(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL_4).

$\delta_{\text{observado}}$ (ppm)	Multiplicidade observada	$J_{\text{observado}}$ (Hz)	Número de prótons	Atribuição
8,54	Multiplete	-	1,0	H_1
7,63	Duplo triplete	$J_{3-2} = J_{3-4} = 7,69$ $J_{3-1} = 1,83$	0,96	H_3
7,26	Duplete	$J_{4-3} = 7,69$	1,0	H_4
7,15	Duplo duplete	$J_{2-3} = 7,69$ $J_{2-1} = 4,76$	0,8	H_2
3,91	Simpleto	-	1,9	H_5
3,81	Multiplete	-	0,9	H_8
2,74	Duplo duplete	$J_{7-7'} = 12,08$ $J_{7-8} = 2,23$	0,9	H_7
2,41	Duplo duplete	$J_{7-7'} = 12,08$ $J_{7'-8} = 9,52$	0,9	$\text{H}_{7'}$
1,13	Duplete	$J_{9-8} = 6,22$	3,0	H_9

O espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante [(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL_4) apresenta nove sinais, sendo que os cinco carbonos aromáticos encontram-se à esquerda do espectro, entre 159,52 e 122,06 ppm (Figura 29). Os sinais referentes as quatro carbonos alifáticos encontra-se na região de 65 a 20 ppm. Como no APT os carbonos quaternários e secundários encontram-se em intensidades negativas, encontramos os sinais dos carbonos C_5 , C_6 e C_7 nesta situação, enquanto que os demais sinais, referentes aos carbonos terciários e primários encontram-se em intensidades positivas. Os três sinais observados na região próxima a 78 ppm correspondem ao carbono pertencente ao solvente clorofórmio (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

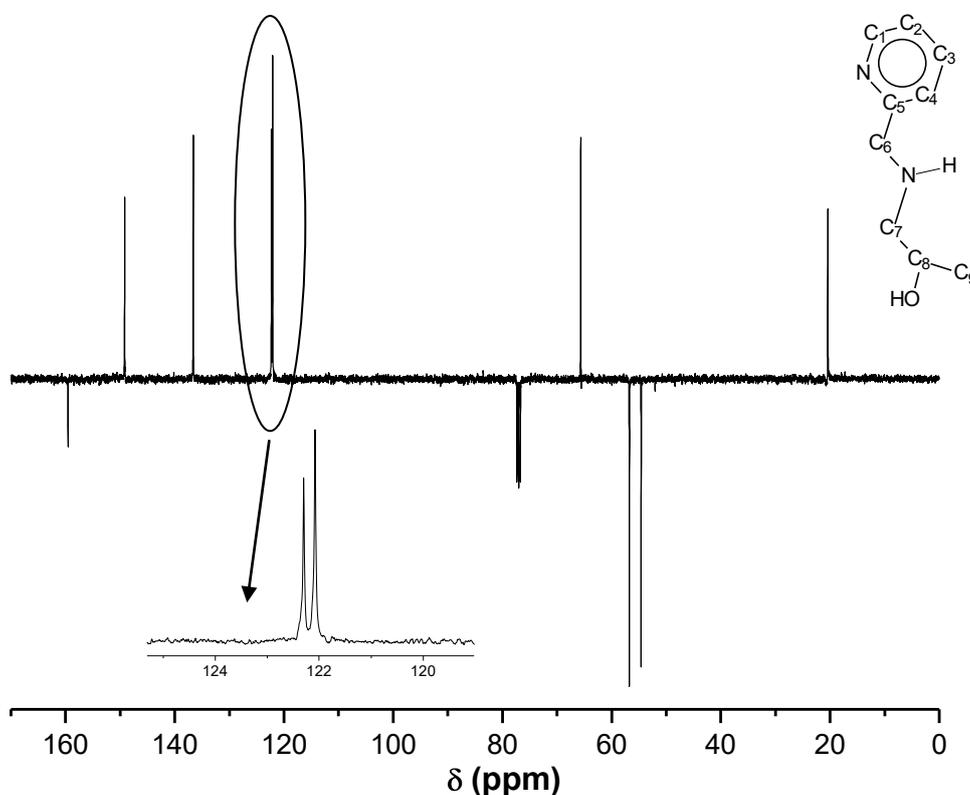


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C (APT) do ligante [(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL_4), em CDCl_3 .

Os dados do espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante [(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (HL_4) são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. . Dados para espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante HL₄.

$\delta_{\text{observado}}(\text{ppm})$	Atribuição	$\delta_{\text{observado}}(\text{ppm})$	Atribuição
159,52	C ₅	65,63	C ₈
149,16	C ₁	56,73	C ₇
136,59	C ₃	54,57	C ₆
122,28	C ₄	20,38	C ₉
122,06	C ₂		

O espectro de RMN ^1H do ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL₅) (Figura 30) apresenta sinais entre 8,47 e 7,11 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos os quais ocupam as posições H₁, H₂, H₃ e H₄, do anel piridínico, observados como um conjunto de multipletos, duplo duplete, duplo tripleto e duplete, respectivamente. Em 3,87 ppm observa-se um simpleto, o qual é atribuído aos hidrogênios do metileno ligado ao anel piridínico (H₅). Dois tripletos referentes aos hidrogênios dos metilenos H₈ e H₇ são observados em 3,61 e 2,76 ppm. Observa-se um simpleto em 3,32 ppm, atribuído ao hidrogênio H₆ ligado ao átomo de nitrogênio amínico. Este apresenta um perfil alargado, o que evidencia a baixa velocidade de troca deste hidrogênio com o meio. Observa-se ainda um sinal em 4,70 ppm referente à presença de diclorometano residual na amostra do ligante (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

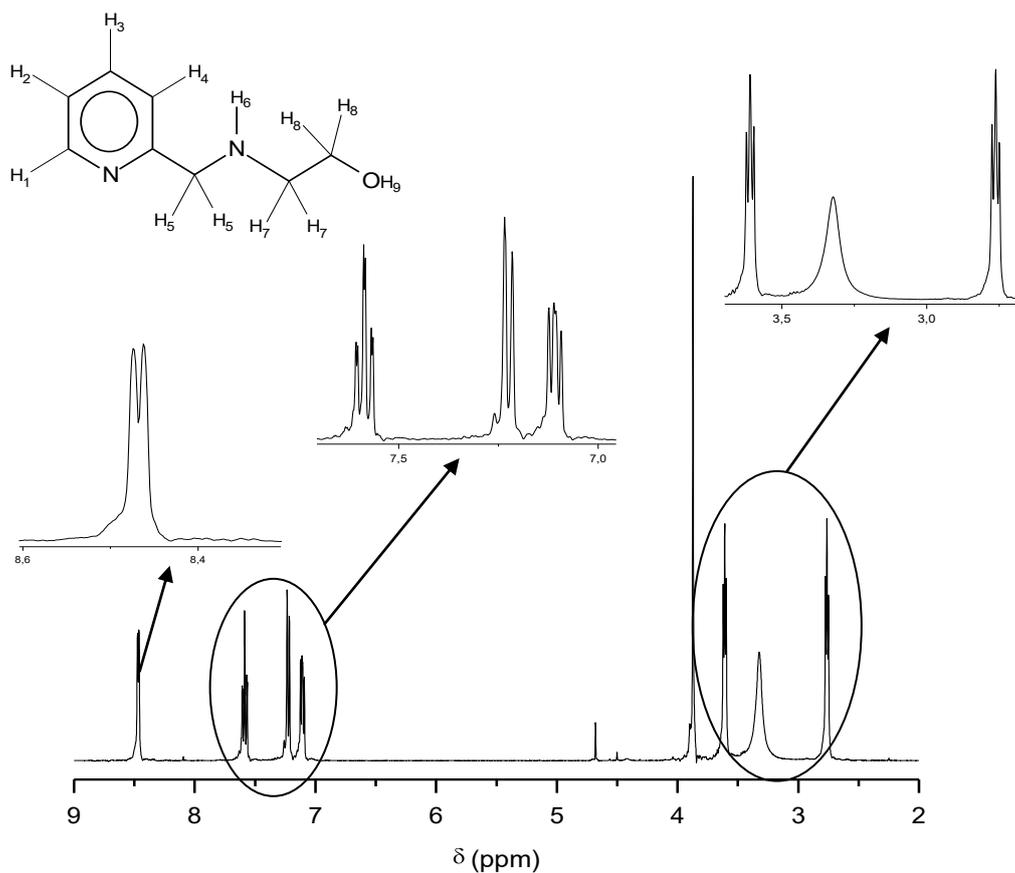


Figura 30. Espectro de RMN ^1H para o ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL_5), obtido em CDCl_3 .

Tabela 20. Resultados de RMN ^1H para o ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL_5).

$\delta_{\text{observado}}$ (ppm)	Multiplicidade observada	$J_{\text{observado}}$ (Hz)	Número de prótons	Atribuição
8,47	Multiplete	-	1,0	H_1
7,59	Duplo triplete	$J_{3-2} = J_{3-4} = 7,69$ $J_{3-1} = 1,46$	1,0	H_3
7,23	Duplete	$J_{4-3} = 7,69$	1,1	H_4
7,11	Duplo duplete	$J_{2-3} = 7,69$ $J_{2-1} = 4,40$	0,9	H_2
3,87	Simpleto	-	1,9	H_5
3,61	Triplete	$J_{8-7} = 5,27$	1,97	H_8
3,32	Simpleto	-	1,6	H_6
2,76	Triplete	$J_{7-8} = 5,27$	2,0	H_7

O espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL_5) (Figura 31) apresenta oito sinais, sendo que os carbonos aromáticos encontram-se à esquerda do espectro na faixa entre 156-122,6 ppm. Os sinais dos carbonos quaternários e secundários (C_5 , C_6 , C_7 e C_8) respectivamente, encontram-se em intensidades negativas no espectro. Os carbonos terciários C_1 , C_2 , C_3 e C_4 encontram-se, em intensidades positivas. Os três sinais observados na região próxima a 78 ppm correspondem ao carbono pertencente ao solvente clorofórmio (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

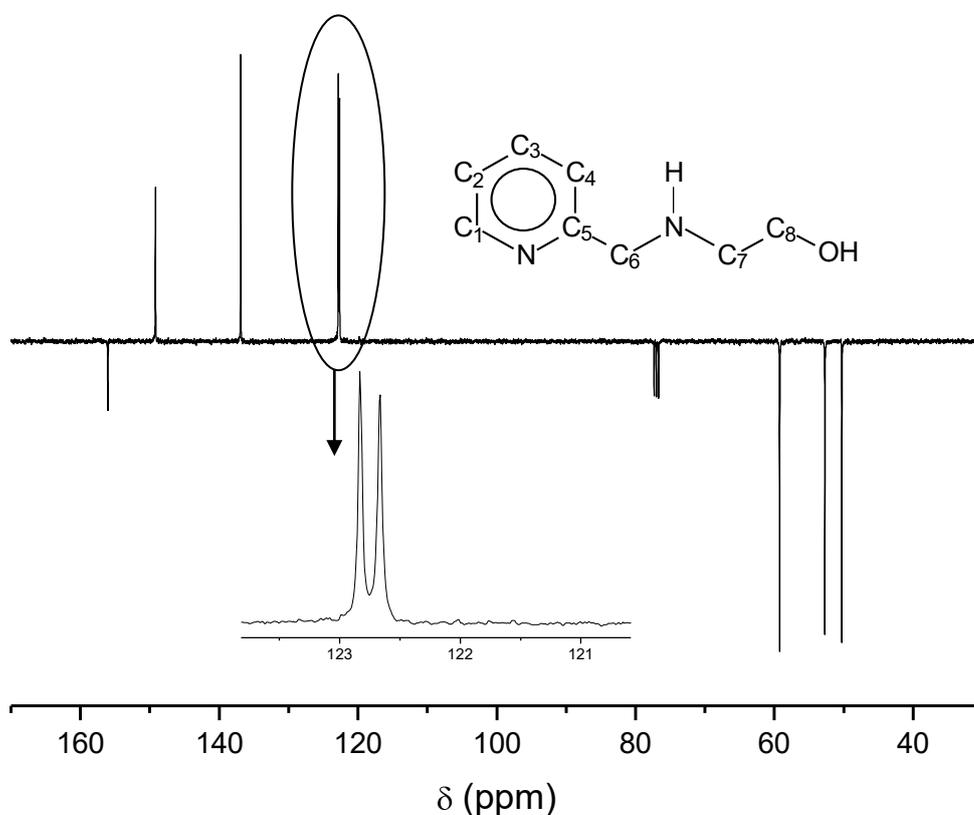


Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL_5), em CDCl_3 .

Os dados do espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL_5) são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Dados para espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante 2-[(piridin-2-ilmetil)amino]etanol (HL_5).

$\delta_{\text{observado}}$ (ppm)	Atribuição	$\delta_{\text{observado}}$ (ppm)	Atribuição
156	C_5	122,6	C_2
149	C_1	59	C_8
137	C_3	53	C_6
122,8	C_4	50	C_7

O RMN ^1H para o ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6) (Figura 32), conforme o esperado, apresenta sinais com deslocamentos semelhantes aos apresentados pelo ligante HL_2 . Este último foi utilizado como precursor na síntese do ligante H_2L_6 . Os sinais referentes aos hidrogênios alifáticos apresentam deslocamentos e multiplicidades semelhantes aos apresentados pelo ligante H_2L_3 , isto ocorre devido à semelhança estrutural entre estes dois ligantes.

Na região entre 8,5 a 6,8 ppm são observados os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos. Em 7,87 e 7,84 ppm são observados dois multipletos, referentes aos sinais dos hidrogênios aromáticos do grupo ftalimida, H_1 e H_2 respectivamente. Estes sinais não foram observados nos espectros de RMN ^1H dos ligantes HL_2 e H_2L_3 indicando a obtenção do ligante H_2L_6 , o qual possui em sua estrutura o grupo ftalimida. O hidrogênio ligado ao carbono terciário (H_4) apresenta-se em 4,2 ppm. Os hidrogênios H_7 e H_8 encontram-se na mesma faixa de deslocamento químico (4 a 3,83 ppm), na forma de um multipletto, devido à semelhança do ambiente químico em que estes se encontram. Os multipletos referentes aos hidrogênios alifáticos H_3 e H_6 são observados respectivamente, em 3,77 e 2,77 ppm. Em 1,7 ppm encontra-se um simpleto atribuído ao hidrogênio H_5 do álcool. Este apresenta um perfil alargado, o que evidencia a baixa velocidade de troca do hidrogênio O-H com o meio. O tripleto em 1,23 ppm é atribuído a presença de etanol como contaminante na amostra do ligante (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

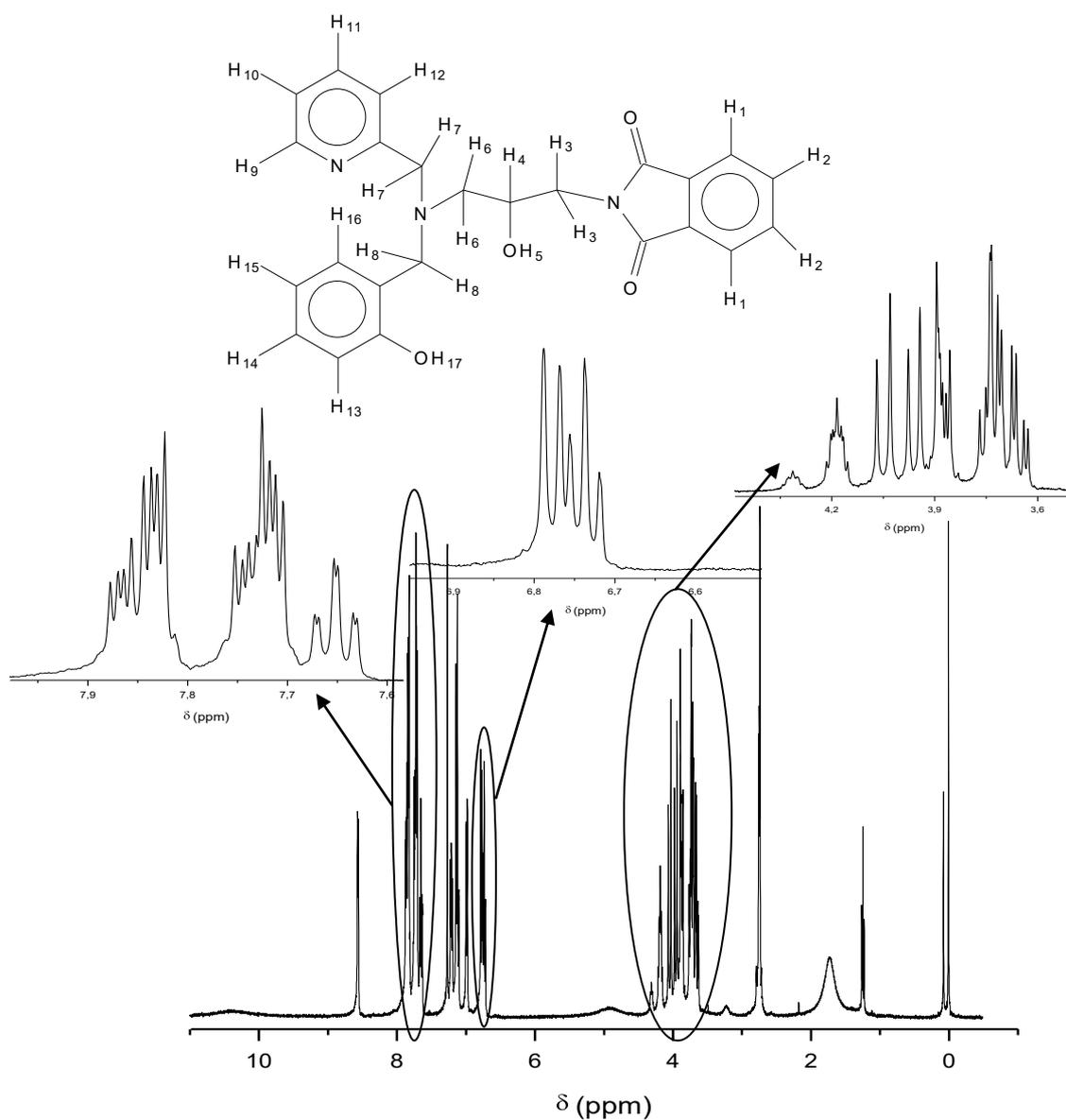


Figura 32. Espectro de RMN 1H para o ligante *N*-Ftalolil-*N*-(2-hidroxi-benzil)-*N*-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6), obtido em $CDCl_3$.

Tabela 22. Resultados de RMN ^1H para o ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6).

$\delta_{\text{observado}}$ (ppm)	Multiplicidade observada	$J_{\text{observado}}$ (Hz)	Número de prótons	Atribuição
8,55	Dupleto	$J_{9-10} = 5,1$	1,0	H_9
7,87-7,8	Mutipleto	----	2,6	H_1
7,74-7,68	Mutipleto	----	2,5	H_2
7,64	Duplo Tripleto	$J_{11-12} = 13,5$ $J_{11-10} = 7,3$ $J_{11-9} = 1,5$	0,9	H_{11}
7,2	Duplo Dupleto	$J_{10-11} = 7,32$	1,0	H_{10}
7,1	Mutipleto	$J_{10-9} = 5,1$ ----	2,1	$\text{H}_{14}, \text{H}_{12}$
6,98	Dupleto	$J_{16-15} = 6,96$	1,0	H_{16}
6,8	Mutipleto	----	2,1	$\text{H}_{13}, \text{H}_{15}$
4,2	Mutipleto	----	1,0	H_4
4,0-3,83	Mutipleto	----	4,3	H_8, H_7
3,77-3,64	Mutipleto	----	2,4	H_3
2,77-2,72	Mutipleto	----	1,8	H_6
1,7	Simpleto	----	1,8	H_5

Não foi possível a obtenção do espectro de RMN ^{13}C (APT) para o ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6) devido a limitações encontradas no equipamento de RMN, contudo foi obtido o espectro de RMN ^{13}C . A diferença entre este último tipo de análise e a RMN ^{13}C (APT), consiste no fato de que nesta análise não é possível separar os carbonos quartenários e secundários em intensidades negativas e os carbonos terciários e primários em intensidades positivas.

O espectro de RMN ^{13}C para o ligante H_2L_6 (Figura 33), conforme o esperado apresenta alguns sinais com deslocamentos semelhantes aos apresentados pelo ligante HL_2 e pelo ligante H_2L_3 . Isto ocorre devido ao fato do ligante HL_2 ser um precursor na síntese do ligante H_2L_6 e o ligante H_2L_3 possuir uma grande semelhança estrutural com este ligante.

O espectro de RMN ^{13}C para o ligante H_2L_6 apresenta dezenove sinais, sendo que os carbonos aromáticos estão na faixa de 168,57 a 116,74 ppm. Em 168,57

encontra-se o sinal referente aos carbonos das carbonilas (C_{17}), confirmando a obtenção do ligante H_2L_6 . Apesar dos carbonos C_{19} do grupo ftalimida e do carbono C_4 do anel piridínico presentes na estrutura do ligante se encontrarem em ambientes químicas diferentes apresentam um único sinal em 123,4 ppm com intensidade elevada. Na faixa de 134 a 132 ppm encontram-se os sinais referentes aos demais carbonos do grupo ftalimida presente no ligante, C_{18} e C_{20} , respectivamente. Os sinais referentes aos cinco carbonos alifáticos estão na faixa de 67,24 a 42,22 ppm. Observa-se que, semelhante ao ligante HL_2 , os carbonos C_6 e C_7 do ligante H_2L_6 , encontram-se em regiões de deslocamento diferentes, já que possuem ambientes químicos diferentes. Os três sinais observados na região próxima a 78 ppm correspondem ao carbono pertencente ao solvente clorofórmio (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

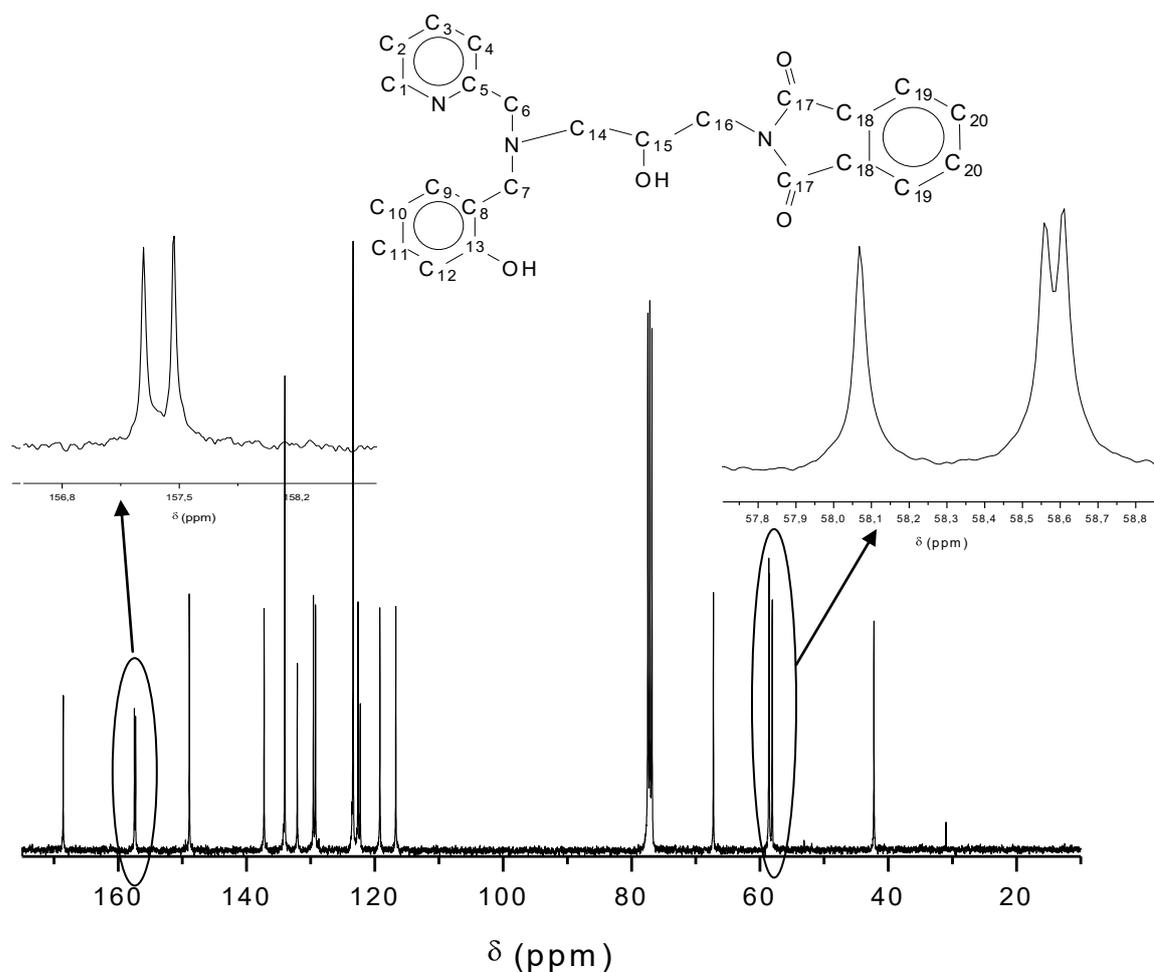


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C do ligante N-Ftaloi-N-(2-hidroxybenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6), em $CDCl_3$.

Os dados do espectro de RMN ^{13}C para o ligante N-Ftaloi-N-(2-hidroxybenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6) são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Dados para espectro de RMN ^{13}C para o ligante N-Ftaloil-N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)-1,3-propanodiamina-2-ol (H_2L_6).

$\delta_{\text{observado}}(\text{ppm})$	Atribuição	$\delta_{\text{observado}}(\text{ppm})$	Atribuição
168,57	C ₁₇	122,63	C ₂
157,46	C ₅	122,27	C ₈
157,28	C ₁₃	119,22	C ₁₀
148,90	C ₁	116,74	C ₁₂
137,26	C ₃	67,24	C ₁₅
134,26	C ₂₀	58,61	C ₆
132,08	C ₁₈	58,55	C ₁₄
129,59	C ₉	58,06	C ₇
129,25	C ₁₁	42,22	C ₁₆
123,40	C ₁₉ ; C ₄		

4.2. Caracterização dos compostos inorgânicos

Os compostos de coordenação obtidos foram caracterizados através do emprego das técnicas: espectroscopia de infravermelho, ponto de fusão, análise elementar (C, H e N) e medidas de condutividade, todas realizadas no LCQUI/Uenf. Estudos de difração de raios X de monocristal foram realizados pelo Professor Lorenzo C. Viscentin (PUC) no LRDRX-UFF; estudos por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* foram realizados na Texas A&M University, Estados Unidos, pela Prof. Christiane Fernandes Horn, durante o seu pós-doutoramento.

Para o complexo $[Zn(HL_3)(Cl)]$ (**3**) já descrito na literatura, foi realizada apenas a caracterização por análise elementar (C, H e N), com o objetivo de confirmar a obtenção e a pureza do complexo sintetizado.

4.2.1 Difração de raios X

Foram obtidos monocristais adequados para a resolução da estrutura cristalina por difração de raios X para os complexos $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**), $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**) e $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (**5**), sendo os resultados apresentados a seguir. Para os complexos $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ (**4**) e $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl \cdot H_2O$ (**6**), apesar das tentativas efetuadas, não foram obtidos monocristais adequados. Os dados cristalográficos para o complexo $[Zn(HL_3)(Cl)]$ (**3**), foram previamente publicados (FERNANDES *et al.*, 2010).

O complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**) apresenta estrutura mononuclear composta por um átomo de zinco pentacoordenado, o qual está coordenado a uma molécula do ligante L_1 e a dois íons cloreto. Os principais comprimentos e ângulos de ligações para o complexo (**1**) são apresentados nas Tabelas 24 e 25, sendo a estrutura apresentada na Figura 34.

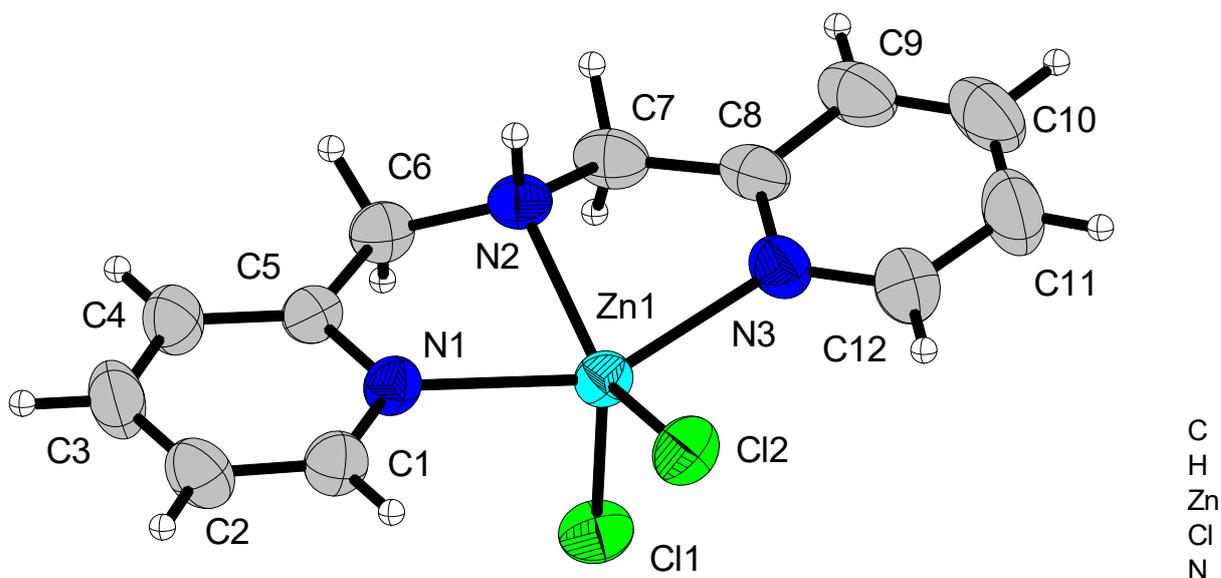


Figura 34. Estrutura de raios X do complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**).

A molécula do ligante L_1 está coordenada ao centro metálico através dos dois átomos dos nitrogênios piridínicos, N1 e N3, e do átomo de nitrogênio amínico N2. No plano equatorial encontram-se os dois nitrogênios piridínicos, o nitrogênio amínico e o íon cloreto Cl2. No plano axial têm-se o íon cloreto Cl1, com comprimento de ligação de 2,2650(7) Å. O ligante tridentado L_1 , após coordenação ao centro metálico de zinco forma dois anéis de cinco membros, com os seguintes ângulos de mordida: 76,00(7)° para N(2)-Zn(1)-N(1) e 76,44(8)° para N(2)-Zn(1)-N(3). O centro metálico de zinco no complexo (**1**) apresenta geometria pirâmide de base quadrada ligeiramente distorcida, sendo $\tau = 0,18$ ($\tau = \alpha - \beta/60$) (FERREIRA *et al.*, 2009). Esta geometria é evidenciada através dos ângulos formados pelos átomos Cl1, Cl2, N1, N2, e N3, os quais constituem a esfera de coordenação do complexo. A base da pirâmide apresenta os seguintes ângulos: $\alpha = 150,22(8)^\circ$ para N(1)-Zn(1)-N(3) e $\beta = 139,63(6)^\circ$ para N(2)-Zn(1)-Cl(2), sendo α o primeiro maior ângulo e β o segundo maior ângulo, assim confirmando a geometria pirâmide base quadrada distorcida.

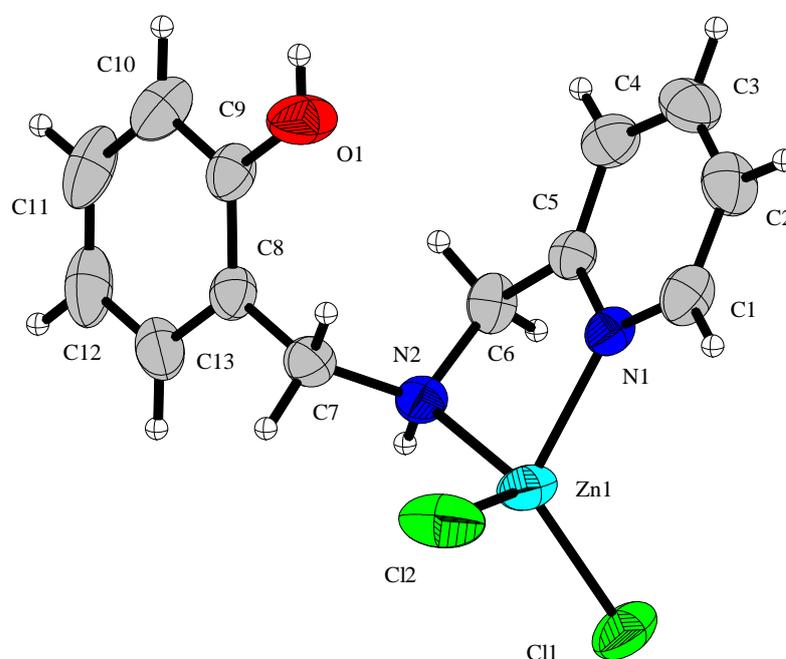
Tabela 24. Parâmetros cristalográficos para o complexo [Zn(L₁)(Cl)₂] (**1**).

Fórmula empírica	C ₁₂ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ Zn
Peso molecular	335,52
Temperatura	295(2) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n
Parâmetros de cela	a = 8,4981(17) Å; α = 90° b = 11,914(2) Å; β = 105,74(3)°. c = 14,405(3) Å; γ = 90°
Volume da cela	1403,8(5) Å ³
Z	4
Densidade calculada	1,588 Mg/m ³
Coeficiente de absorção	2,114 mm ⁻¹
F(000)	680
Dimensões do cristal	0,17 x 0,12 x 0,10 mm ³
Intervalo de θ na coleta	3,05 para 25,49°.
Intervalo hkl na coleta	-10 ≤ h ≤ 10, -14 ≤ k ≤ 13, -17 ≤ l ≤ 17
Reflexões coletadas	29432
Reflexões independentes	2614 [R(int) = 0,0726]
Teta = 25.49°	99,8 %
Fatores de transmissão máx. e mín.	0,8164 e 0,7151
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Dados/parâmetros	2614 /167
GOF	1,043
Índices finais R [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0272, wR ₂ = 0,0489
Índices R (todos os dados)	R ₁ = 0,0478, wR ₂ = 0,0530
Picos máx. e mín.	0,232 e -0,220 e.Å ⁻³

Tabela 25. Principais comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) para o complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**).

N(1)-Zn(1)	2,1548(19)	N(1)-Zn(1)-Cl(1)	97,76(6)
N(2)-Zn(1)	2,1460(2)	N(2)-Zn(1)-Cl(1)	103,56(6)
N(3)-Zn(1)	2,1580(2)	N(3)-Zn(1)-Cl(1)	99,43(6)
Cl(1)-Zn(1)	2,2650(7)	N(1)-Zn(1)-Cl(2)	96,53(5)
Cl(2)-Zn(1)	2,2598(7)	N(2)-Zn(1)-Cl(2)	139,63(6)
N(1)-Zn(1)-N(3)	150,22(8)	N(3)-Zn(1)-Cl(2)	97,16(6)
N(1)-Zn(1)-N(2)	76,00(7)	Cl(2)-Zn(1)-Cl(1)	116,80(4)
N(3)-Zn(1)-N(2)	76,44(8)		

O complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**) apresenta estrutura mononuclear composta por um átomo de zinco tetracoordenado, o qual está ligado a uma molécula do ligante HL_2 e dois íons cloreto (Cl1 e Cl2). Os principais comprimentos e ângulos de ligações para o complexo (**2**) são apresentados nas Tabelas 26 e 27, sendo a estrutura apresentada na Figura 35.

**Figura 35.** Estrutura de raios X do complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**).

A molécula do ligante HL₂ está coordenada ao centro metálico através do átomo de nitrogênio piridínico N1 e do átomo de nitrogênio amínico N2. O centro metálico de zinco no complexo **(2)** apresenta geometria tetraédrica distorcida conforme evidenciado pelos ângulos formados pelos átomos Cl1, Cl2, N1 e N2, os quais constituem a esfera de coordenação do complexo. Os ângulos em torno do centro de zinco são 81,7(1)° para N(1)-Zn(1)-N(2) e 118,25(4)° para Cl(1)-Zn1-Cl(2). O íons cloreto Cl(1) e Cl(2) apresentam comprimentos de ligação de 2,1988(10) Å e 2,2214(13) Å, respectivamente, típicos de ligações mais fracas devido a maior labilidade destes ligantes.

O átomo de oxigênio O1 presente no ligante HL₂ não coordenou ao centro metálico de zinco devido a presença de quatro ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares. Duas ligações intramoleculares são formadas a partir da interação entre o átomo de oxigênio O1 e os átomos de hidrogênio H6B (C6) e H7B (C7), conforme apresentado na Figura 36. As duas ligações intermoleculares correspondem as interações existentes entre o átomo de oxigênio O1 e o hidrogênio do átomo de carbono C2 da piridina e entre o átomo de hidrogênio ligado ao átomo de oxigênio O1 e o átomo Cl2 (Figura 36). Além das principais interações que envolvem o átomo de oxigênio O1 do fenol, estão representados na Figura 37 as interações intermoleculares entre o átomo Cl1 e os átomos de hidrogênios pertencentes ao nitrogênio amínico N2 e ao carbono C4 da piridina. Todas estas interações contribuem para a conformação estereoquímica do ligante HL₂, afastando o átomo de oxigênio presente no fenol (O1) do centro de zinco e impedindo a sua coordenação.

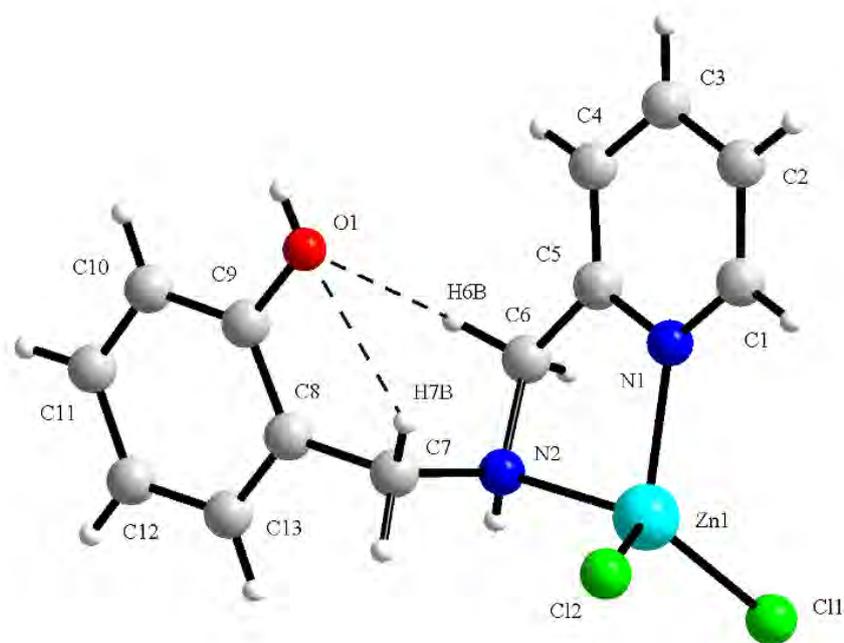


Figura 36. Estrutura de raios X do complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**) com as interações intramoleculares representadas.

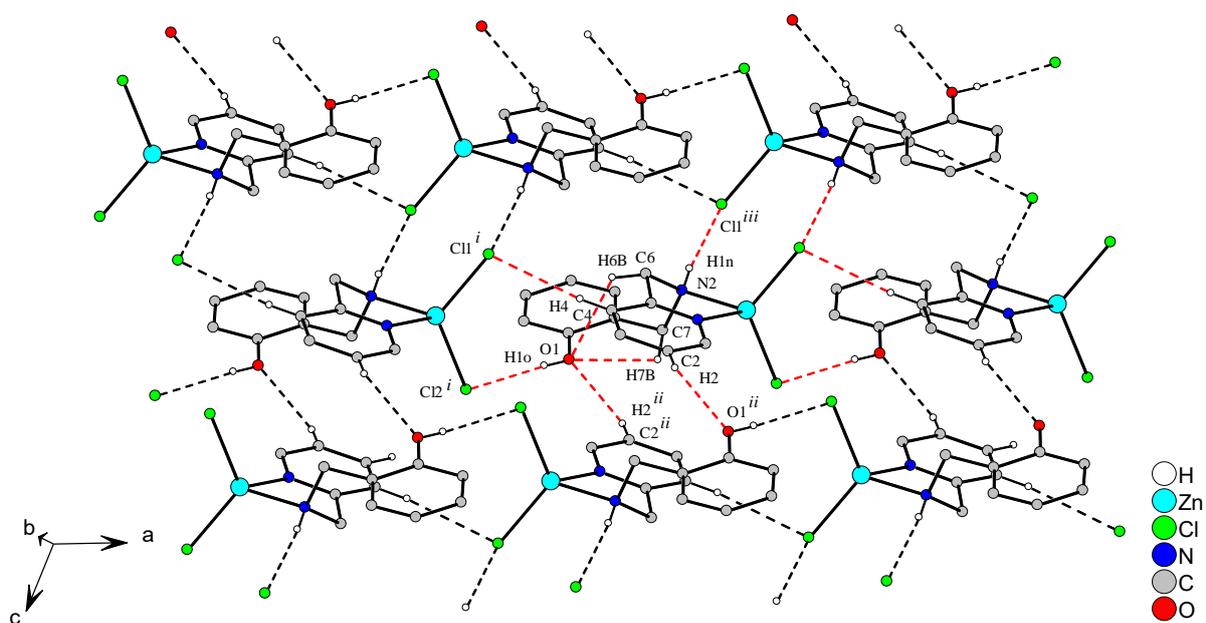


Figura 37. Estrutura de raios X do complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**) com as interações intramoleculares e intermoleculares representadas.

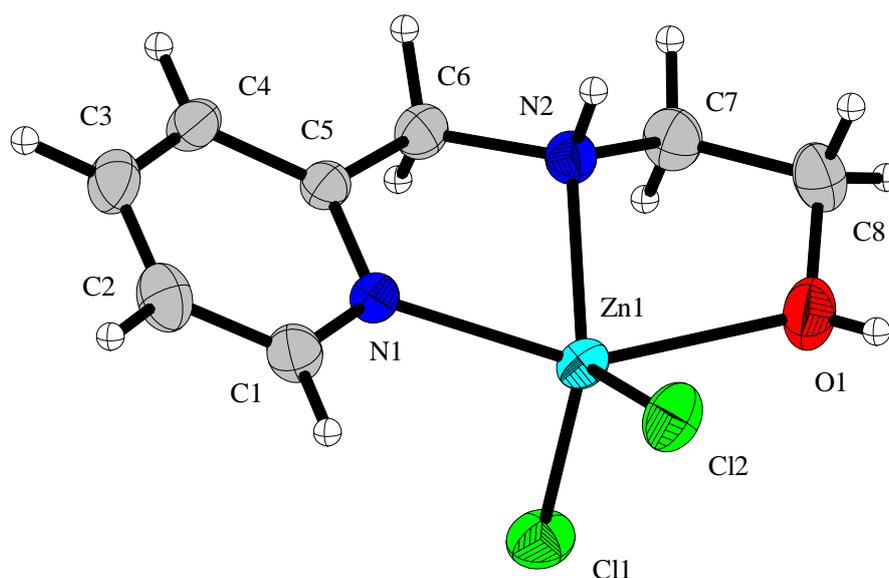
Tabela 26. Parâmetros cristalográficos para o complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**).

Fórmula empírica	$C_{13}H_{14}Cl_2N_2OZn$
Peso molecular	350.56
Temperatura	295(2) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/n$
Parâmetros de cela	$a = 8,3502(17)$ Å; $\alpha = 99,79(3)^\circ$ $b = 9,4156(19)$ Å; $\beta = 111,48(3)^\circ$ $c = 11,005(2)$ Å; $\gamma = 108,24(3)^\circ$
Volume da cela	723,9(3) Å ³
Z	2
Densidade calculada	1,608 Mg/m ³
Coeficiente de absorção	2,057 mm ⁻¹
F(000)	356
Dimensões do cristal	0,76 x 0,47 x 0,27 mm
Intervalo de θ na coleta	2,10 para 25,50°
Intervalo hkl na coleta	-10 ≤ h ≤ 10, -11 ≤ k ≤ 11, -13 ≤ l ≤ 13
Reflexões coletadas	20491
Reflexões independentes	2667 [R(int) = 0,0520]
Teta = 25.49°	99,1 %
Fatores de transmissão máx. e mín.	0,6066 e 0,3039
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Dados/parâmetros	2667 / 181
GOF	1,123
Índices finais R [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0326$, $wR_2 = 0,0681$
Índices R (todos os dados)	$R_1 = 0,0550$, $wR_2 = 0,0809$
Picos máx. e mín.	0,487 e -0,628 e.Å ⁻³

Tabela 27. Principais comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) para o complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**).

N(1)-Zn(1)	2,031(2)	N(1)-Zn(1)-Cl(1)	116,170(8)
N(2)-Zn(1)	2,057(3)	N(2)-Zn(1)-Cl(1)	112,38(8)
Cl(1)-Zn(1)	2,1988(10)	N(1)-Zn(1)-Cl(2)	109,13(8)
Cl(2)-Zn(1)	2,2214(13)	N(2)-Zn(1)-Cl(2)	113,74(9)
N(1)-Zn(1)-N(2)	81,66(10)	Cl(1)-Zn(1)-Cl(2)	118,25(4)

O complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (**5**) apresenta estrutura mononuclear composta por um átomo de zinco pentacoordenado, o qual está coordenado a uma molécula do ligante HL_5 e a dois íons cloreto. Os principais comprimentos e ângulos de ligações para o complexo (**5**) são apresentados nas Tabelas 28 e 29, sendo a estrutura apresentada na Figura 38.

**Figura 38.** Estrutura de raios X do complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (**5**).

A molécula do ligante HL_5 está coordenada ao centro metálico através do átomo de nitrogênio piridínico N1, do átomo de nitrogênio amínico N2 e do átomo de oxigênio O1 do grupo álcool. No plano equatorial encontram-se os dois átomos de nitrogênios N1 e N2, o átomo de oxigênio O1 que se mantém protonado após a coordenação ao centro metálico e o íon cloreto Cl2; já no plano axial têm-se o íon cloreto Cl1.

No complexo **(5)**, diferentemente do complexo **(2)**, não foram observado fortes ligações de hidrogênio intramoleculares entre o átomo de oxigênio O1 e os átomos de hidrogênios vizinhos, por isso foi possível a coordenação deste átomo de oxigênio ao centro de zinco. Foram observadas apenas duas interações intermoleculares entre os hidrogênios do álcool e o átomo de nitrogênio amínico N2 e o átomo Cl2 (Figura 39). A presença de ligações de hidrogênio são claramente o principal motivo para as diferenças de geometria apresentadas pelos complexos **(2)** e **(5)**.

O ligante tridentado HL₅, após coordenação ao centro metálico de zinco forma dois anéis de cinco membros, os quais mostram os seguintes ângulos de mordida: 77,95(6)° para N(2)-Zn(1)-N(1) e 74,00(6)° para N(2)-Zn(1)-O(1). O centro metálico de zinco no complexo **(5)** apresenta geometria pirâmide de base quadrada distorcida com parâmetro $\tau = 0,44$ (FERREIRA *et al.*, 2009). Este valor indica uma geometria pirâmide de base quadrada fortemente distorcida, evidenciada através dos ângulos formados pelos átomos Cl1, Cl2, N1, N2, e O1 os quais constituem a esfera de coordenação do complexo. A base da pirâmide apresenta os seguintes ângulos: $\alpha = 151,08(6)^\circ$ para N(1)-Zn(1)-O(1) e $\beta = 124,64(5)^\circ$ para N(2)-Zn(1)-Cl(2), confirmando a geometria pirâmide base quadrada distorcida. O íon cloreto Cl2 que se encontra *trans* ao nitrogênio amínico N2 apresenta comprimento de ligação de 2,2679(7) Å, típicamente mais fraca devido a maior labilidade deste ligante

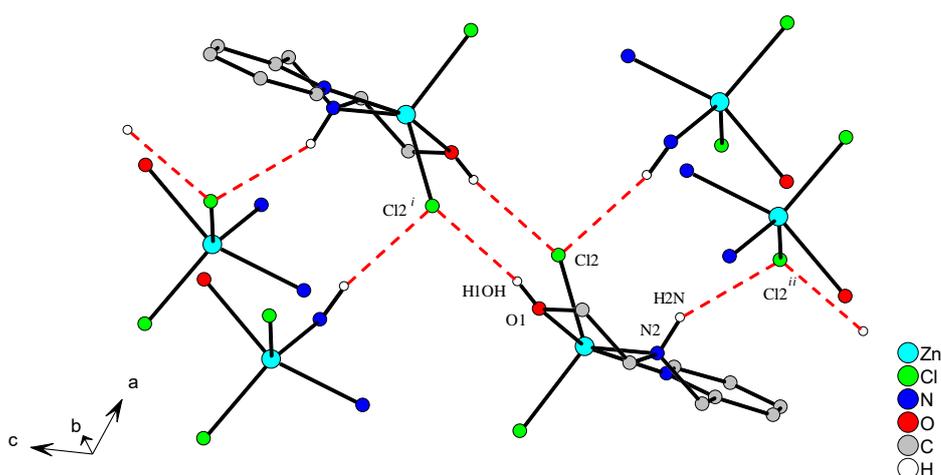


Figura 39. Estrutura de raios X do complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ **(5)** com as interações intermoleculares representadas.

Tabela 28. Parâmetros cristalográficos para o complexo [Zn(HL₅)(Cl)₂] (**5**).

Fórmula empírica	C ₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O Zn
Peso molecular	288,47
Temperatura	295(2) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n
Parâmetros de cela	a = 10,131 Å; α = 90° b = 8,0967(16) Å; β = 108,99(3)° c = 14,367(3) Å; γ = 90°
Volume da cela	1114,3(4) Å ³
Z	4
Densidade calculada	1,720Mg/m ³
Coeficiente de absorção	2,652 mm ⁻¹
F(000)	584
Dimensões do cristal	0,22 x 0,21 x 0,15 mm ³
Intervalo de θ na coleta	3,29 para 25,50°
Intervalo hkl na coleta	-12 ≤ h ≤ 12, -9 ≤ k ≤ 9, -17 ≤ l ≤ 17
Reflexões coletadas	19363
Reflexões independentes	1954 [R(int) = 0,0406]
Teta = 25.49°	99,6 %
Fatores de transmissão máx. e mín.	0,6981 and 0,5931
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Dados/parâmetros	1954 /136
GOF	1,044
Índices finais R [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0199, wR ₂ = 0,0427
Índices R (todos os dados)	R ₁ = 0,0258, wR ₂ = 0,0442
Picos máx. e mín.	0,271 e -0,238 e.Å ⁻³

Tabela 29. Principais comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) para o complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (**5**).

N(1)-Zn(1)	2,1244(16)	N(2)-Zn(1)-O(1)	74,00(6)
N(2)-Zn(1)	2,0971(17)	N(1)-Zn(1)-Cl(2)	98,30(5)
Cl(1)-Zn(1)	2,2180(7)	N(2)-Zn(1)-Cl(2)	124,64(5)
Cl(2)-Zn(1)	2,2679(7)	N(1)-Zn(1)-Cl(1)	103,69(5)
O(1)-Zn(1)	2,3150(17)	N(2)-Zn(1)-Cl(1)	98,30(5)
N(1)-Zn(1)-N(2)	77,950(6)	Cl(2)-Zn(1)-Cl(1)	119,26(2)
N(1)-Zn(1)-O(1)	151,08 (6)	Cl(1)-Zn(1)-O(1)	94,51(5)
		Cl(2)-Zn(1)-O(1)	91,94(5)

4.2.2 Espectroscopia de infravermelho

O espectro de infravermelho para o complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**) (Figura 40) apresenta as bandas típicas do anel aromático (C=C e C=N) em 1570, 1477 e 1442 cm^{-1} e bandas características do anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico em 760 e 732 cm^{-1} , confirmando a presença do ligante L_1 em sua estrutura. A presença dos grupos metilenos é confirmada pelo aparecimento dos estiramentos C-H alifáticos em 2916 e 2866 cm^{-1} . Em 3244 cm^{-1} foi observado uma banda característica de amina secundária. A presença de bandas em regiões de diferentes números de onda em relação ao espectro de infravermelho do ligante L_1 mostra que houve mudança na geometria da molécula, confirmando a formação de um composto distinto do anterior (ver Tabela 30).

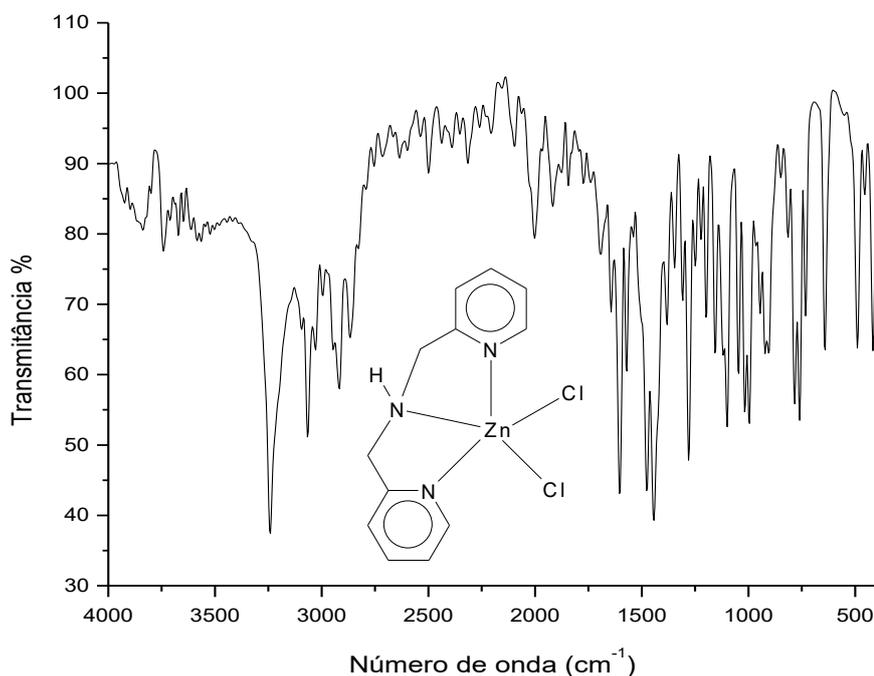


Figura 40. Espectro de infravermelho para o complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**), obtido em pastilha de KBr.

Tabela 30. Principais números de onda observados no espectro de infravermelho do complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3244	ν NH	2866	ν_s CH ₂
3066, 3028	ν CH _{Aromático}	1570, 1477, 1442	ν C=C; ν C=N
2916	ν_{as} CH ₂	760, 732	γ -CH ^a ; β -anel ^b

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

O espectro de infravermelho para o complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**), (Figura 41) apresenta bandas típicas do ligante HL₂. Em 1593, 1573, 1504, 1454 e 1435 cm⁻¹ são observadas as bandas características de deformação axial do anel aromático (C=C e C=N) e uma banda característica do anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico foi observada em 760 e 732 cm⁻¹. A região alargada próxima a 3300 cm⁻¹ atribui-se à deformação axial de O-H. As bandas características de deformação axial assimétrica e simétrica de C-H de alifáticos, também são observadas. Além disso, é observada uma banda em 3226 cm⁻¹, característica de amina secundária. Em 1273 cm⁻¹ observa-se a banda característica de deformação axial de C-O dos

fenóis. A presença de bandas em regiões de diferentes números de onda em relação ao espectro de infravermelho do ligante HL₂ mostra que houve mudança na geometria da molécula, confirmando a formação de um composto distinto do mesmo (ver Tabela 31).

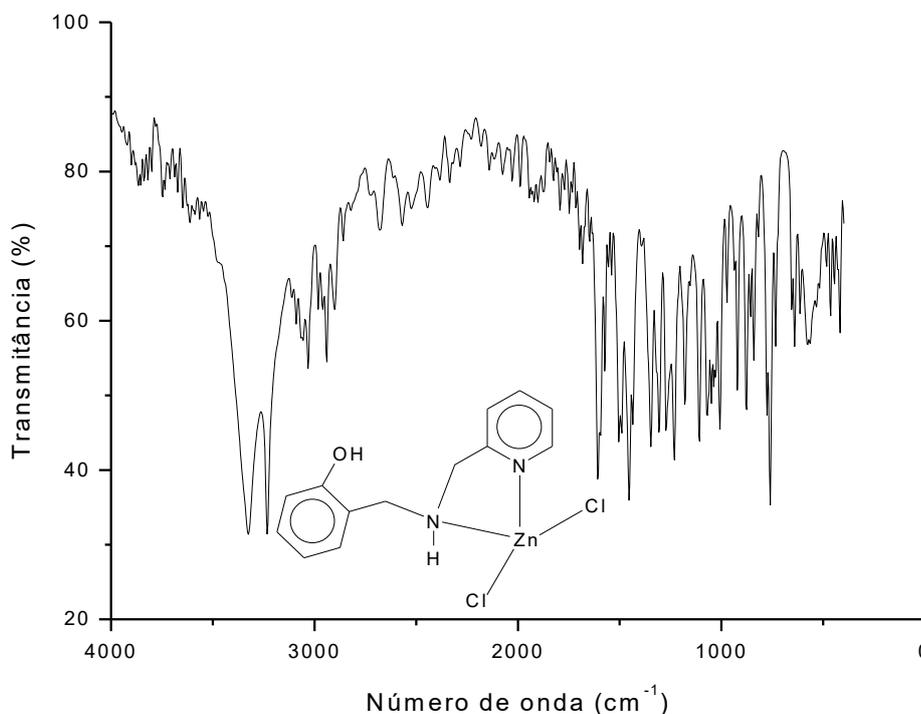


Figura 41. Espectro de infravermelho para o complexo [Zn(HL₂)(Cl)₂] (**2**), obtido em pastilha de KBr.

Tabela 31. Principais números de onda observados no espectro de infravermelho do complexo [Zn(HL₂)(Cl)₂] (**2**), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3332	ν OH	2858	ν _s CH ₂
3226	ν NH	1593, 1573, 1504, 1454, 1435	ν C=C; ν C=N
3032	ν CH _{Aromático}	1273	C-O ^a
2958, 2939, 2901	ν _{as} CH ₂	760, 732	γ-CH ^b ; β-anel ^c

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

O espectro de infravermelho para o complexo [Zn(HL₄)(Cl)₂] (**4**) (Figura 42) apresenta as bandas características do ligante HL₄. Em 1573, 1489 e 1442 cm⁻¹ são

observadas bandas características de deformação axial do anel aromático (C=C, C=N e C-H). Uma banda característica do anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico foi observada em 767 cm^{-1} . A região alargada próxima a faixa $3250\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ atribui-se à deformação axial de O-H presente em moléculas de hidratação e/ou solvatação. Além disso, é observada uma banda próxima à 3178 cm^{-1} , característica da amina secundária, em que o hidrogênio ligado ao nitrogênio amínico apresenta fracas interações por ligação de hidrogênio com átomos vizinhos. Esta banda não foi observada no espectro do ligante HL₄, provavelmente devido a moléculas de hidratação presentes neste último (ver Tabela 32).

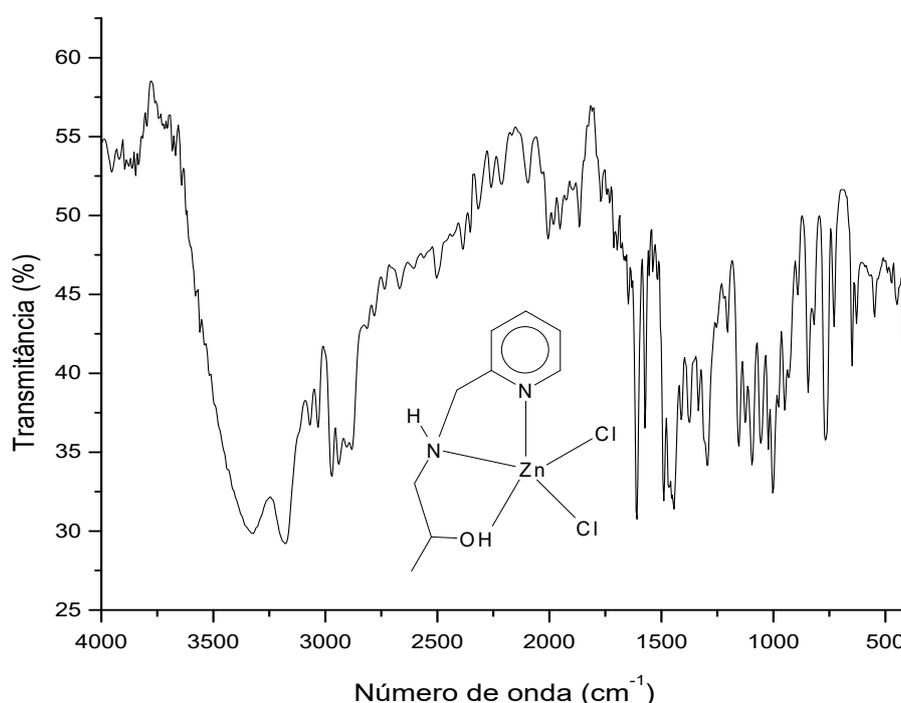


Figura 42. Espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl})_2]$ (**4**), obtido em pastilha de KBr.

Tabela 32. Principais números de onda observados no espectro de infravermelho do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl})_2]$ (**4**) com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3250-3500	ν OH	1573, 1489, 1442	ν C=C; ν C=N
3178	ν NH	767	γ -CH ^a ; β -anel ^b
2970, 2939, 2904, 2881	ν CH ₂ ; ν CH ₃ alifático		

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

O espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ (**5**) (Figura 43) apresenta as bandas características do ligante HL_5 . Em 1570, 1485, 1462 e 1446 cm^{-1} são observadas bandas características de deformação axial do anel aromático (C=C e C=N), as bandas características do anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico são observadas em 779 e 737 cm^{-1} . Uma banda larga atribuída à deformação axial de O–H é observada em 3410 cm^{-1} . Foi observado também uma banda próxima em 3228 cm^{-1} , característica da amina secundária. Esta, como no caso anterior, não foi observada no espectro do ligante HL_5 , provavelmente devido a moléculas de hidratação presentes neste último (ver Tabela 33).

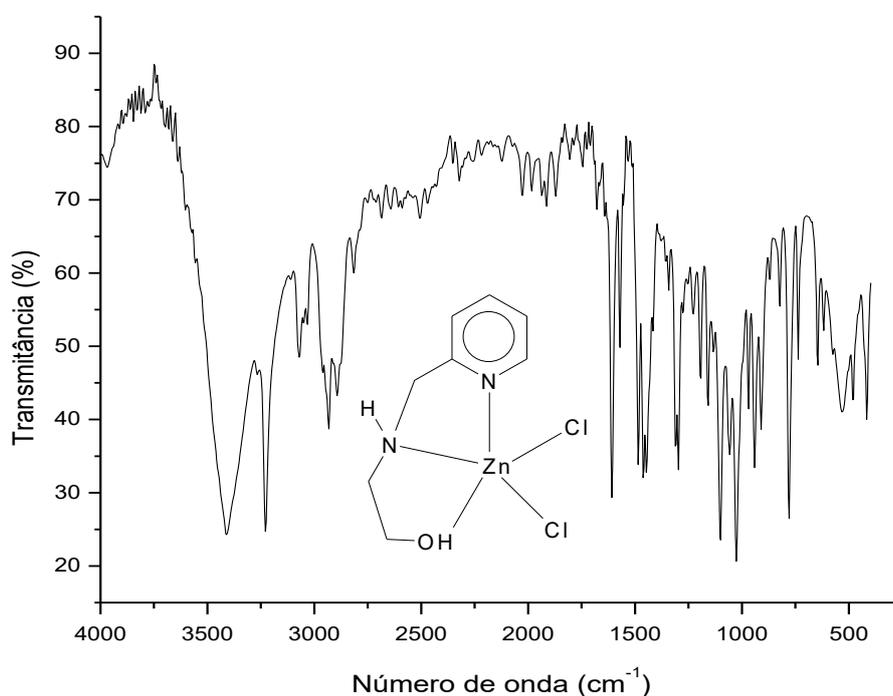


Figura 43. Espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ (**5**), obtido em pastilha de KBr.

Tabela 33. Principais números de onda observados no espectro de infravermelho do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ (**5**), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3410	ν OH	2893	ν_s CH ₂
3228	ν NH	1570, 1485, 1462, 1446	ν C=C; ν C=N
3070	ν CH _{Aromático}	779, 737	γ -CH ^a ; β -anel ^b
2931	ν_{as} CH ₂		

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

O espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_6)(\text{Cl})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**6**) (Figura 44) apresenta as bandas características do ligante H_2L_6 . Em 1500 , 1458 e 1423 cm^{-1} são observadas bandas características de deformação axial do anel aromático (C=C e C=N). As bandas características do anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico são observadas em 759 e 725 cm^{-1} e uma banda larga atribuída à deformação axial de O–H na faixa de 3250 a 3500 cm^{-1} . Foram observados também duas bandas, em 1770 e 1701 cm^{-1} , características do grupo carbonila indicando a presença do ligante H_2L_6 na estrutura deste complexo. O deslocamento das bandas referente as carbonila em relação ao espectro de infravermelho do ligante H_2L_6 mostra que houve mudança na geometria da molécula, confirmando a formação de um composto distinto do mesmo (ver Tabela 34).

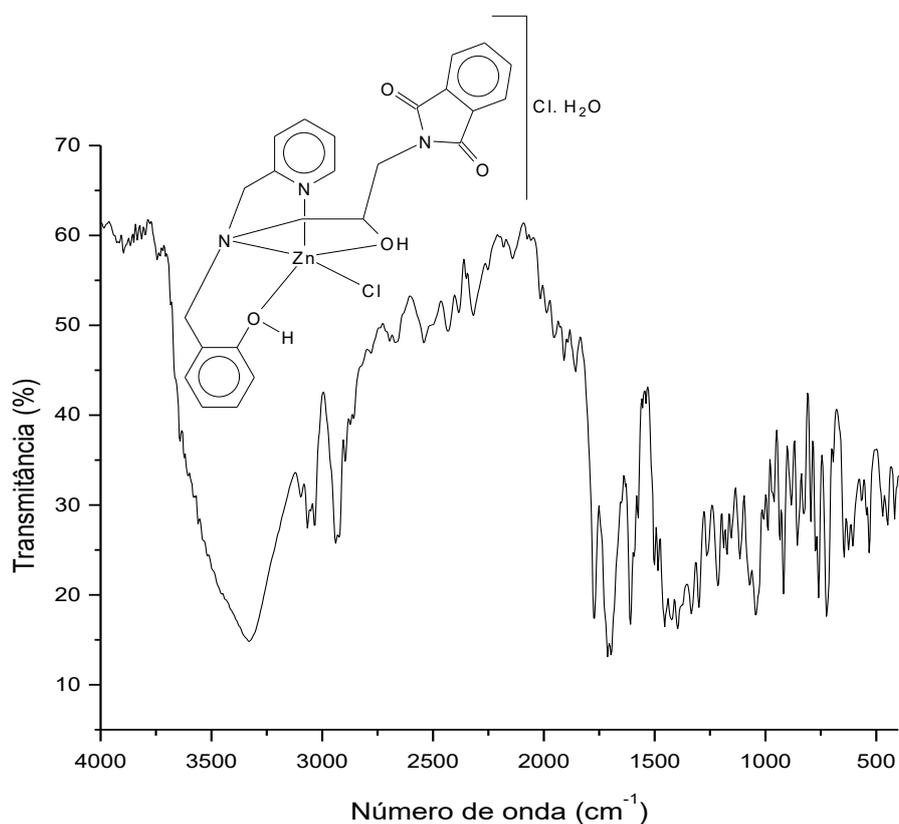


Figura 44. Espectro de infravermelho para o complexo $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_6)(\text{Cl})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**6**), obtido em pastilha de KBr.

Tabela 34. Principais números de onda observados no espectro de infravermelho do complexo $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_6)(\text{Cl})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**6**), com suas respectivas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3250-3500	ν OH	1770, 1701	ν C=O
3066; 3035	ν CH _{Aromático}	1500, 1458, 1423	ν C=C; ν C=N
2939; 2924	ν CH ₂	759, 725	γ -CH ^a ; β -anel ^b

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

4.2.3 Análise elementar

A análise elementar (C, H e N) revela que o complexo $[\text{Zn}(\text{L}_1)(\text{Cl})_2]$ (**1**) apresenta em sua constituição um átomo de zinco, uma molécula do ligante L_1 e dois íons cloreto coordenados, resultando em um peso molecular de $335,54 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e em um composto neutro.

Tabela 35. Dados de análise de CHN para o complexo $[\text{Zn}(\text{L}_1)(\text{Cl})_2]$ (**1**).

$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{Zn}$	%C	%H	%N
Experimental	42,86	3,95	12,56
Calculado	42,96	3,91	12,52

O complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (**2**) apresentou dados de análise elementar (C, H e N), que concordam com a presença de um átomo de zinco, uma molécula do ligante HL_2 e dois íons cloreto, resultando em um peso molecular de $350,55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e em um complexo neutro.

Tabela 36. Dados de análise de CHN para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (**2**).

$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OZn}$	%C	%H	%N
Experimental	44,57	4,03	8,24
Calculado	44,54	4,03	7,99

A análise elementar (C, H e N), revela que o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_3)(\text{Cl})]$ (**3**) apresenta em sua constituição um átomo de zinco, uma molécula do ligante H_2L_3 , com o fenol desprotonado, e um íon cloreto coordenados ao centro metálico. O complexo é neutro com peso molecular de $406,61 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabela 37. Dados de análise de CHN para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_3)(\text{Cl})]$ (**3**).

$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{Zn}$	%C	%H	%N
Experimental	47,29	4,21	7,02
Calculado	47,26	4,46	6,89

A análise elementar (C, H e N), para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl})_2]$ (**4**) indica a presença em sua composição de um átomo de zinco, uma molécula do ligante HL_4 e dois íons cloreto, resultando em um complexo neutro com peso molecular de $302,55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabela 38. Dados de análise de CHN para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (**4**).

$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OZn}$	%C	%H	%N
Experimental	35,40	4,89	9,16
Calculado	35,73	4,66	9,26

A análise elementar (C, H e N), revela que o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ (**5**) apresenta em sua constituição um átomo de zinco, uma molécula do ligante HL_5 e dois íons cloreto, resultando em um complexo neutro com peso molecular de $288,48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabela 39. Dados de análise de CHN para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ (**5**).

$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OZn}$	%C	%H	%N
Experimental	33,47	4,21	9,98
Calculado	33,31	4,19	9,71

O complexo $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_6)(\text{Cl})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**6**) apresentou dados de análise elementar (C, H e N), que concordam com a presença de um átomo de zinco, uma molécula do ligante H_2L_6 e um íon cloreto coordenados ao centro metálico, além de um íon cloreto como contra-íon e uma molécula de água como solvente de cristalização, resultando em um complexo que em solução apresenta-se como eletrólito 1:1 com peso molecular de $571,77 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabela 40. Dados de análise de CHN para o complexo $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_6)(\text{Cl})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**6**).

$\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{Zn}$	%C	%H	%N
Experimental	50,56	4,10	7,72
Calculado	50,42	4,41	7,35

4.2.4. Condutivimetria

As medidas de condutividade foram realizadas em soluções de acetonitrila para todos os complexos sintetizados, com exceção do complexo (**6**), para o qual a medida de condutividade foi realizada em metanol devido a solubilidade do mesmo. Empregou-se para todas as medidas a concentração de $1,0\cdot 10^{-3} \text{ M}$ para os complexos sob investigação. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 41.

Tabela 41. Dados da análise de condutivimetria para os complexos sintetizados.

Complexo	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Espécie de eletrólito ^a	Solventes
$[\text{Zn}(\text{L}_1)(\text{Cl})_2]$ (1)	5,57	não-eletrólito	acetonitrila
$[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (2)	17,31	não-eletrólito	acetonitrila
$[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl})_2]$ (4)	16,86	não-eletrólito	acetonitrila
$[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ (5)	3,85	não-eletrólito	acetonitrila
$[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_6)(\text{Cl})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (6)	111,1	1:1	metanol

^a Atribuição conforme Geary (1971).

De acordo com a literatura, em acetonitrila, para eletrólitos 2:1 a condutividade varia de $220\text{-}300 \mu\text{S}/\text{cm}$, para eletrólitos 1:1 a faixa é de $120\text{-}160$

$\mu\text{S}/\text{cm}$ e para os não eletrólitos a condutividade encontrada deve estar abaixo de $120 \mu\text{S}/\text{cm}$. Em metanol é possível verificar as seguintes variações nos valores de condutividade molar: os valores entre 80 e $115 \mu\text{S}/\text{cm}$ correspondem a eletrólitos 1:1, valores entre $160\text{-}220 \mu\text{S}/\text{cm}$ correspondem a eletrólitos 2:1 e valores entre 290 e $350 \mu\text{S}/\text{cm}$ correspondem a eletrólitos 3:1 (Geary, 1971).

Com base nos valores obtidos de condutividade para os complexos sintetizados, conclui-se que em solução de acetonitrila, os complexos $[\text{Zn}(\text{L}_1)(\text{Cl})_2]$ **(1)**, $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ **(2)**, $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl})_2]$ **(4)** e $[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ **(5)** apresentam-se como não eletrólito, ou seja originam um composto neutro em solução. Estes resultados confirmam as estruturas propostas para os complexos com base nos dados de raios X e análise elementar (C, H e N), as quais apresentam dois íons cloretos coordenados ao centro metálico de zinco. O resultado de condutividade para o complexo $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_6)(\text{Cl})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ **(6)** também confirmou a estrutura proposta. Este complexo apresenta-se como eletrólito 1:1, pois possui um íon cloreto como contra-íon em sua estrutura.

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

Foram obtidos espectro de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS em solução água:metanol (1:1) para todos os complexos sintetizados. Os dados de ESI(+)-MS para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_3)(\text{Cl})]$ **(3)**, foram previamente publicados (FERNANDES *et al.*, 2010).

O espectro de ESI-(+)-MS para o complexo $[\text{Zn}(\text{L}_1)(\text{Cl})_2]$ **(1)** (Figura 45) apresenta três espécies catiônicas com m/z 200, 322 e 635. O sinal de m/z 200 corresponde ao cátion do ligante L_1 após protonação do nitrogênio amínico, resultando em $[\text{H}_2\text{L}_1]^+$, no qual os dois átomos de hidrogênio representados correspondem aos hidrogênios ligados ao átomo de nitrogênio amínico do ligante; o sinal de m/z 322 corresponde a uma molécula do ligante L_1 após desprotonação do nitrogênio amínico e coordenação de um íon cloreto ao centro metálico de zinco, além de um cátion de sódio interagindo com a molécula do ligante resultando em $[\text{Zn}(\text{NaL}_1)(\text{Cl})]^+$; o sinal de m/z 635 corresponde a uma espécie binuclear, na qual cada centro metálico de zinco encontra-se coordenado a uma molécula do ligante L_1 ,

uma molécula de água e um íon hidróxido, estes centros estão ligados por uma ponte cloreto resultando em $[(HL_1)(OH_2)(OH)Zn-(\mu-Cl)-Zn(HL_1)(OH)(H_2O)]^+$. O espectro de ESI(+)-MS/MS para o íon referente ao sinal de m/z 635 sugeri que a perda de um molécula neutra $[Zn(HL_1)(Cl)(OH)(OH_2)]$, resulta na formação de um cátion mononuclear com m/z 300. Este cátion corresponde a um átomo de zinco coordenado a uma molécula do ligante L_1 , uma molécula de água e um íon hidróxido resultando em $[Zn(HL_1)(OH)(OH_2)]^+$.

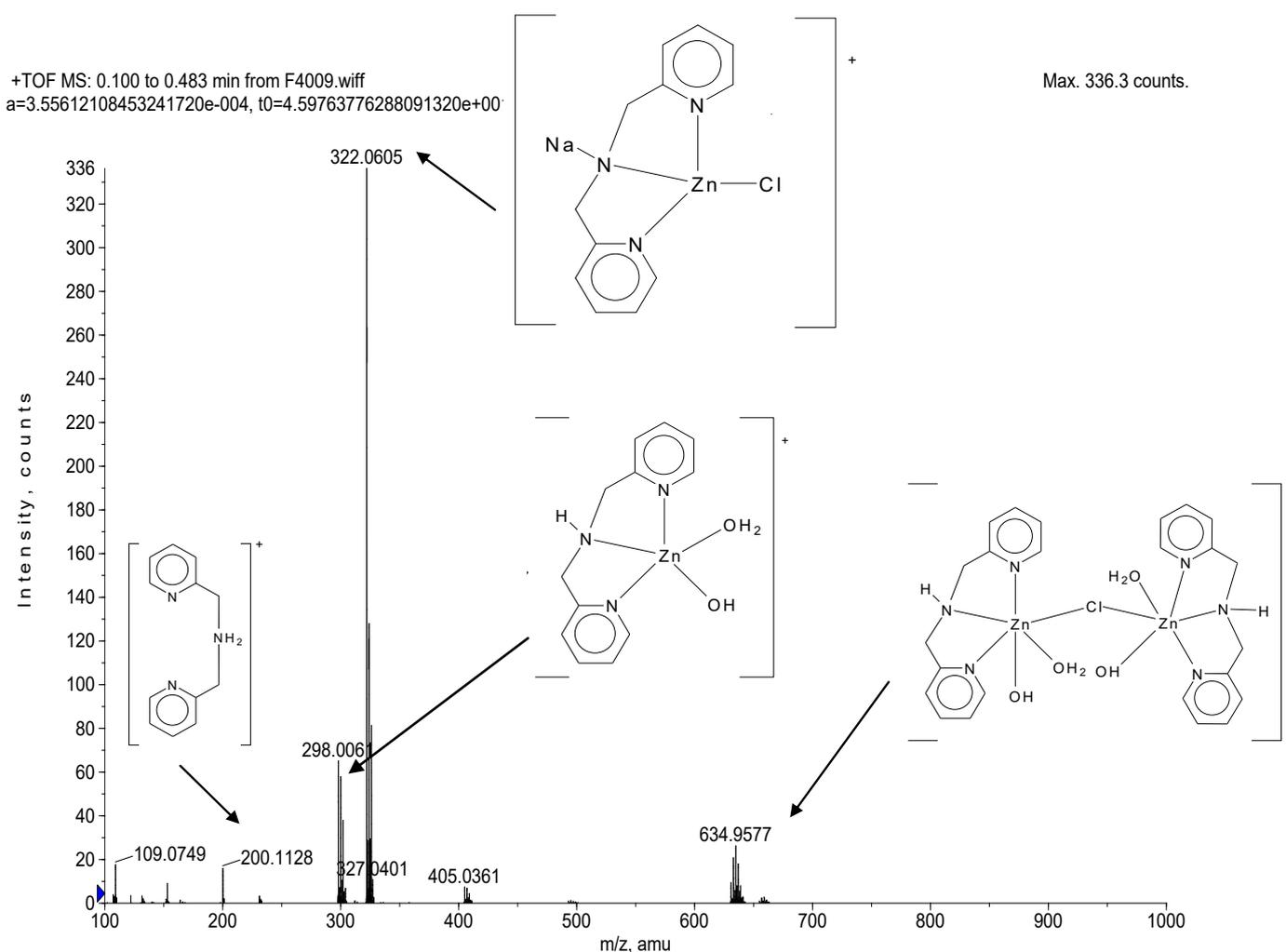


Figura 45. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**).

O espectro de ESI(+)-MS em solução água:metanol (1:1) para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (**2**) (Figura 46) apresenta doze espécies catiônicas. Todas estas espécies foram caracterizadas através da análise dos seus perfis isotópicos. O complexo (**2**) no estado sólido encontra-se neutro, por isso a sua estrutura não foi observada em solução, porém a presença de Zn e Cl foram claramente detectadas. Foram observadas onze espécies contendo Zn e apenas uma espécie referente ao ligante HL_2 (m/z 215).

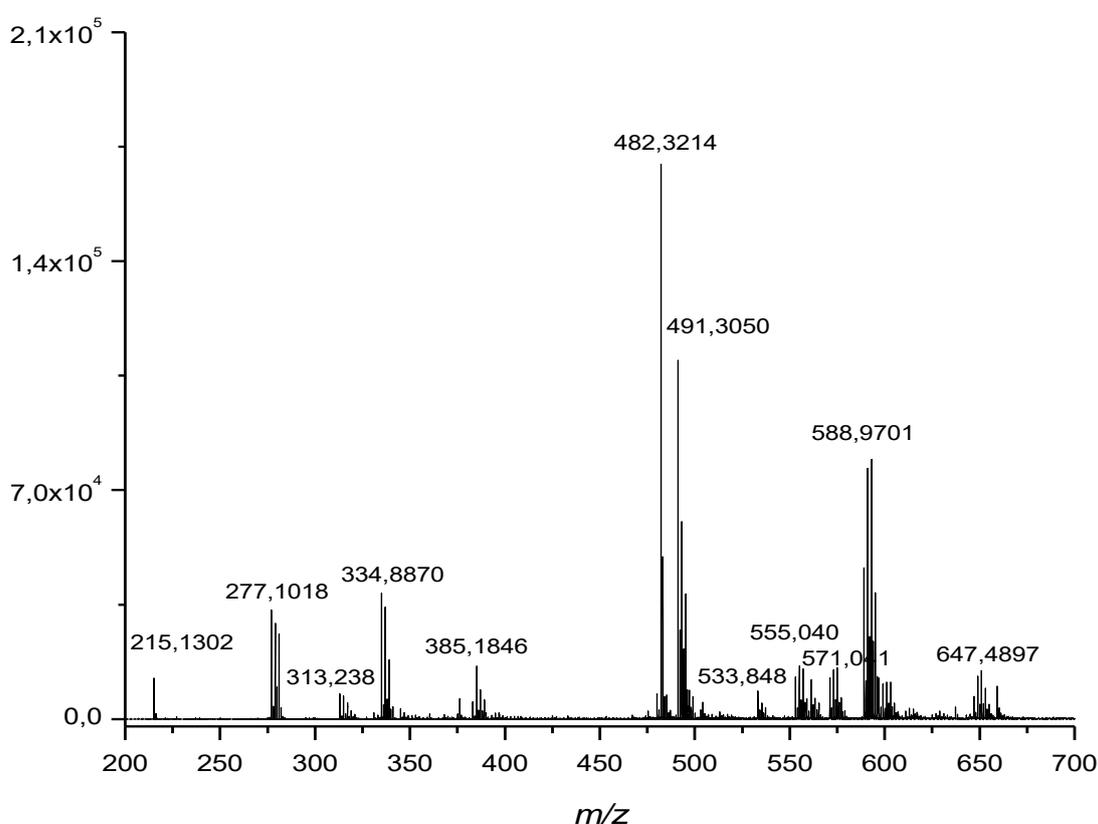


Figura 46. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (**2**).

O sinal de m/z 215 corresponde ao cátion do ligante HL_2 após protonação do nitrogênio amínico, resultando em $[\text{H}_3\text{L}_2]^+$, no qual os três átomos de hidrogênio representados correspondem aos dois hidrogênios ligados ao átomo de nitrogênio amínico e ao hidrogênio ligado ao átomo de oxigênio do ligante; o sinal de m/z 277 corresponde a uma molécula do ligante HL_2 após desprotonação do nitrogênio amínico e coordenação ao centro metálico de zinco resultando em $[\text{Zn}(\text{HL}_2)]^+$; o sinal de m/z 313 corresponde a uma molécula do ligante HL_2 , com o nitrogênio amínico

protonado e um íon cloreto coordenados ao centro metálico de zinco resultando em $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_2)\text{Cl}]^+$; o sinal de m/z 335 corresponde a uma molécula do ligante HL_2 , após desprotonação do oxigênio fenólico e um íon cloreto coordenados ao centro metálico de zinco, além de um cátion de sódio interagindo com a molécula do ligante resultando em $[\text{Zn}(\text{NaHL}_2)\text{Cl}]^+$; o sinal de m/z 385 corresponde a uma molécula do ligante HL_2 , um íon cloreto, uma hidroxila e uma molécula de metanol coordenados ao centro metálico de zinco, além de um cátion de sódio interagindo com a molécula do ligante, resultando em $[\text{Zn}(\text{NaH}_2\text{L}_2)(\text{OH})(\text{Cl})(\text{CH}_3\text{OH})]^+$ (ver Figura 47).

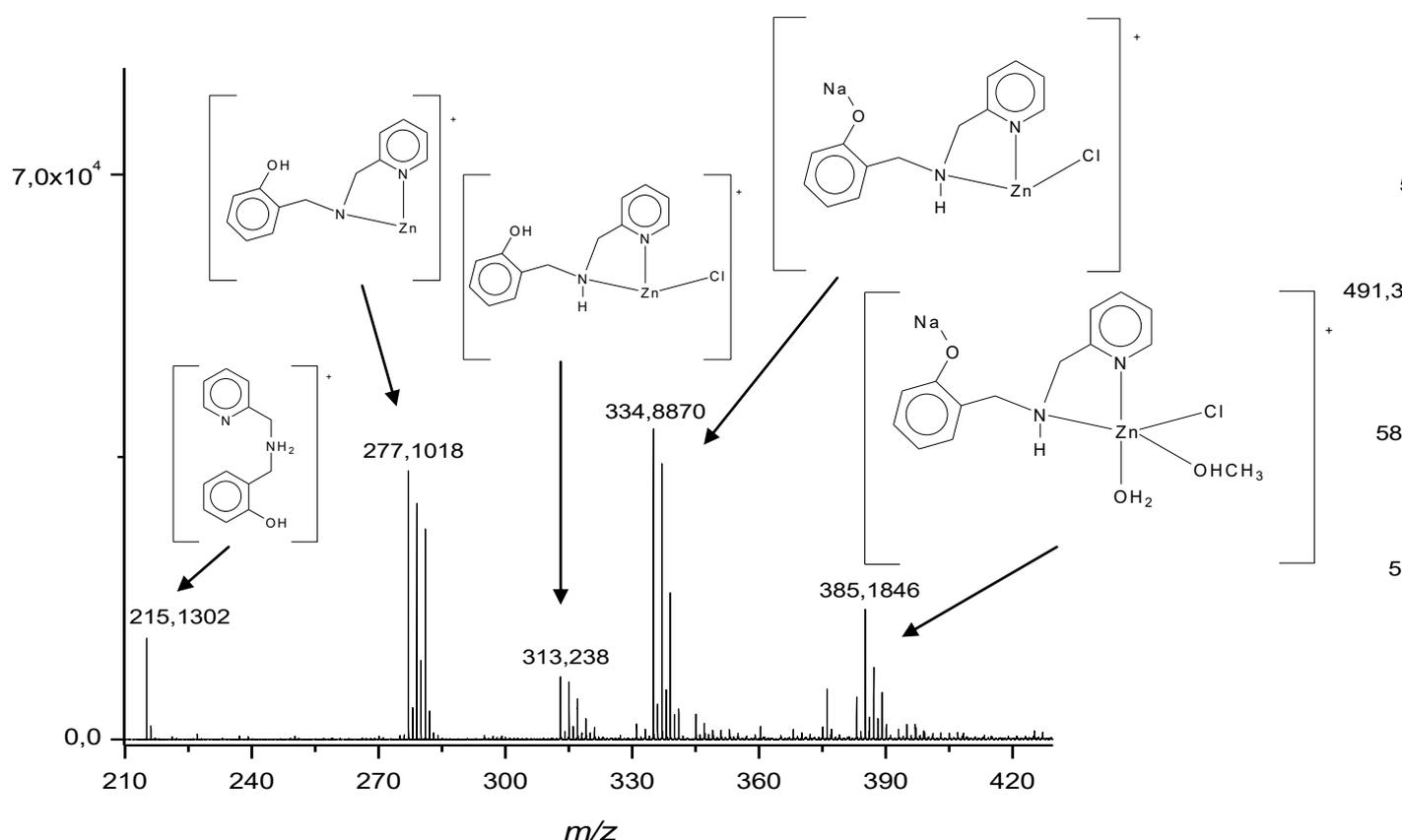


Figura 47. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (**2**), na região de m/z 210 a 420.

O sinal de m/z 482 não apresenta distribuição isotópica de zinco, infelizmente não foi possível realizar nenhuma proposta de estrutura para este sinal. O sinal de m/z 491 corresponde a uma molécula do ligante HL_2 com o nitrogênio amínico protonado e uma molécula do ligante após desprotonação do nitrogênio amínico ambas coordenadas a um mesmo centro metálico de zinco, $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_2)(\text{HL}_2)]^+$; o sinal

de m/z 533 apresenta distribuição isotópica típica de zinco, infelizmente não foi possível realizar nenhuma proposta de estrutura para este sinal; o sinal de m/z 555 corresponde a uma molécula do ligante HL_2 com o nitrogênio amínico protonado e uma molécula do ligante após desprotonação do nitrogênio amínico e duas moléculas de metanol coordenados a um centro metálico de zinco resultando em $[Zn(H_2L_2)(HL_2)(CH_3OH)_2]^+$; o sinal de m/z 571 corresponde a uma espécie binuclear, na qual cada centro metálico de zinco encontra-se coordenado a uma molécula do ligante HL_2 , após desprotonação dos nitrogênios amínicos e um íon hidróxido como ponte entre os dois centros de zinco, resultando em $[(HL_2)Zn-(\mu-OH)-Zn(HL_2)]^+$ (Figura 48).

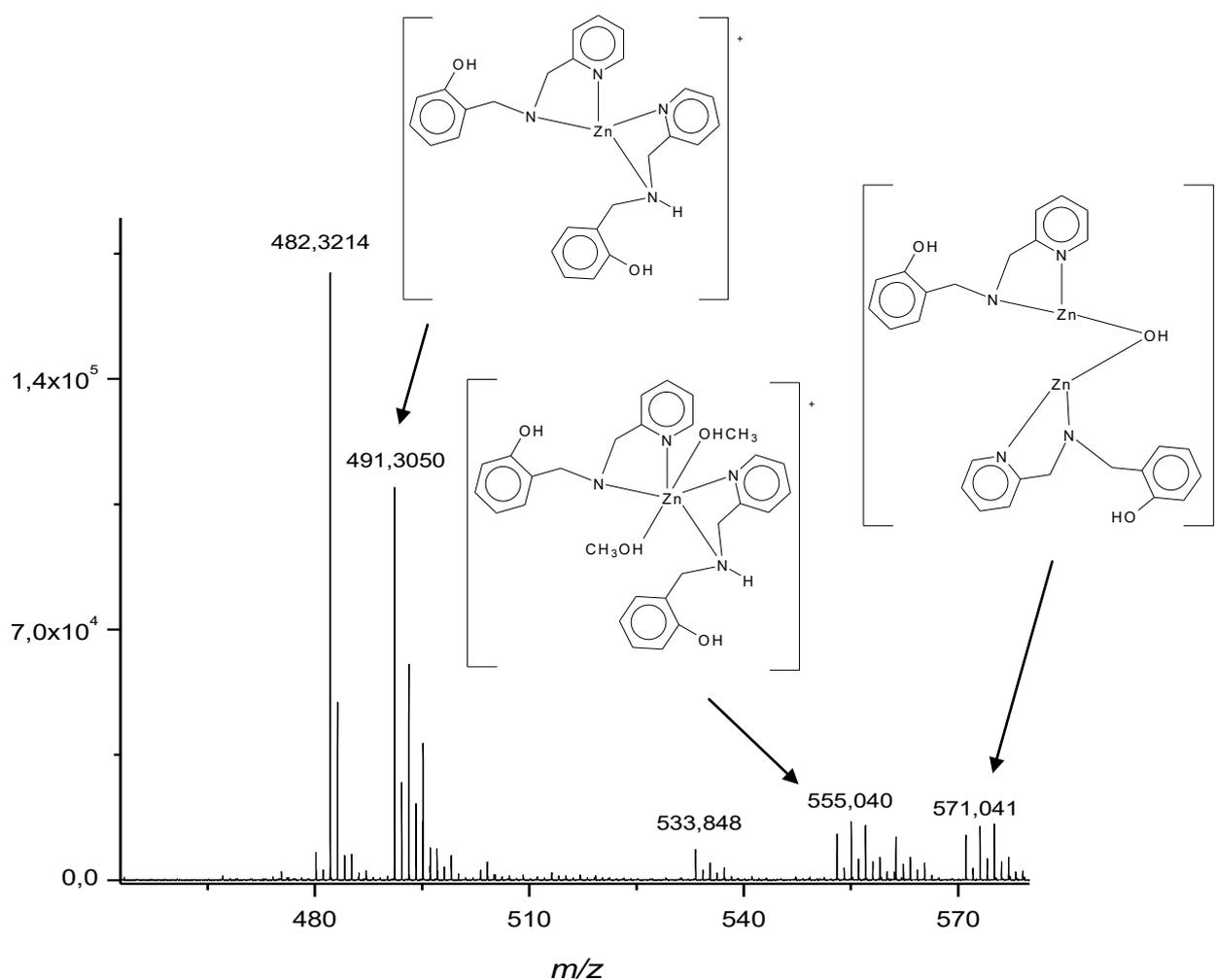


Figura 48. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**), na região de m/z 450 a 580.

O sinal de m/z 589 corresponde a uma espécie binuclear, na qual cada centro metálico de zinco encontra-se coordenado a uma molécula do ligante HL₂, após desprotonação dos nitrogênios amínicos e um íon cloreto atua como ponte entre os dois centros de zinco resultando em $[(HL_2)Zn-(\mu-Cl)-Zn(HL_2)]^+$; o sinal de m/z 647 corresponde a uma espécie binuclear, na qual cada centro metálico de zinco encontra-se coordenado a uma molécula do ligante HL₂, após desprotonação do oxigênio fenólico. Um íon cloreto está coordenado a apenas um dos centros metálicos de zinco e um segundo íon cloreto atua como ponte entre os dois átomos de zinco, além de um cátion de sódio interagindo com uma molécula do ligante, resultando na estrutura $[(NaHL_2)Zn-(\mu-Cl)-Zn(HL_2)Cl]^+$ (Figura 49).

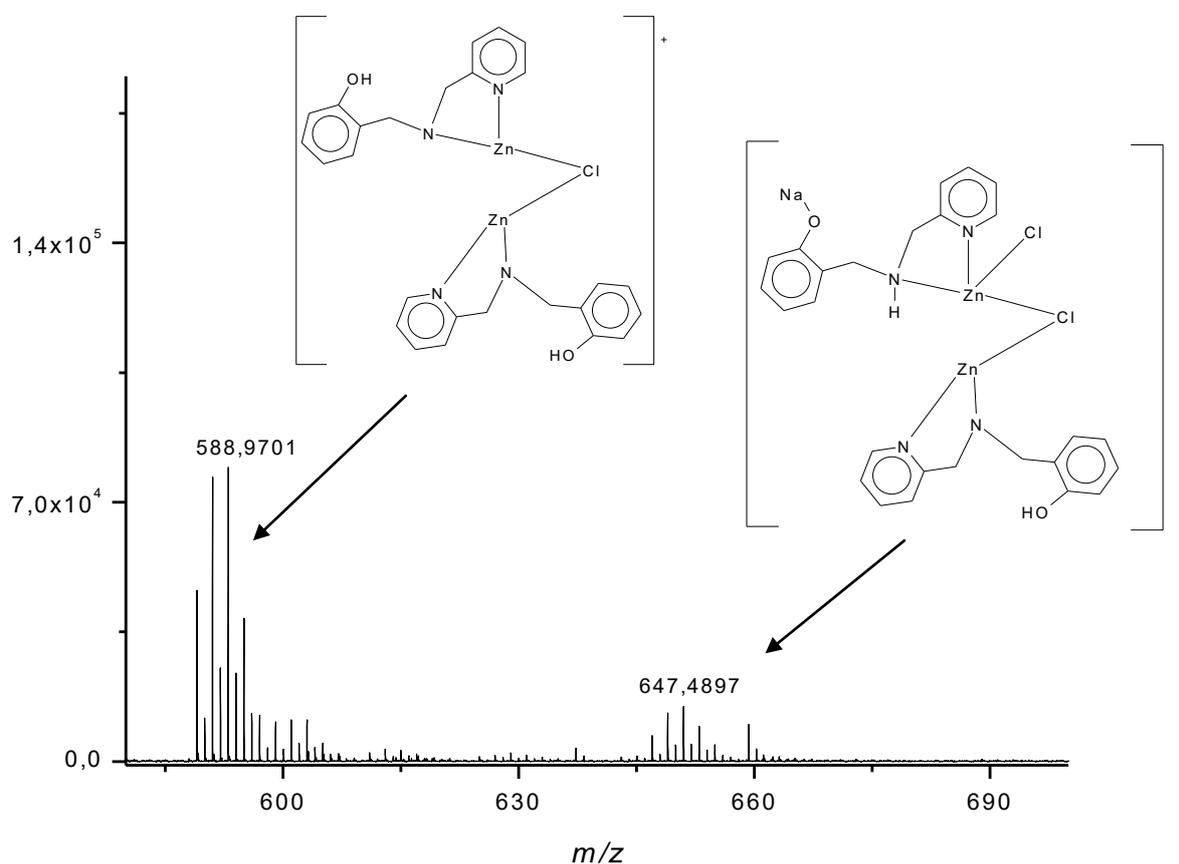


Figura 49. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**), na região de m/z 580 a 700.

Em solução são observadas interessantes processos entre as espécies $[(HL_2)Zn-(\mu-OH)-Zn(HL_2)]^+$ (m/z 571); $[(HL_2)Zn-(\mu-Cl)-Zn(HL_2)]^+$ (m/z 589) e $[(NaHL_2)Zn-(\mu-Cl)-Zn(HL_2)Cl]^+$ (m/z 647). Estas espécies são resultados da interação

entre duas espécies mononucleares, $[\text{Zn}(\text{HL}_2)]^+$ (m/z 277). Estudos de ESI(+)-MS/MS para o íon referente ao sinal de m/z 571 sugere que este íon foi formado através da interação de duas espécies de m/z 277 por uma ponte hidroxó. O íon que corresponde a m/z 589 foi formado de maneira semelhante, ou seja, através da interação entre duas espécies de m/z 277 por uma ponte cloreto; o íon com m/z 647 foi formado através da interação entre duas espécies de m/z 277 através de uma ponte cloreto e um íon cloreto coordenado a um dos centros metálicos de zinco.

Espectros de ESI(+)-MS/MS não foram obtidos com sucesso para as demais espécies, em virtude da baixa intensidade dos sinais obtidos. Espectros de ESI(+)-MS/MS para as espécies com m/z 277, 482 e 491 indicam somente a presença do ligante HL_2 em seus fragmentos.

O espectro de ESI(+)-MS em solução água:metanol (1:1) para o complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl})_2]$ (**4**) (Figura 50) apresenta cinco espécies catiônicas (m/z 189, 287 e 395, m/z 480 e 495). O sinal de m/z 189 corresponde a uma molécula do ligante HL_4 a qual apresenta um cátion de sódio interagindo com o átomo de oxigênio do ligante, $[(\text{NaH}_2\text{L}_4)]^+$, no qual os dois átomos de hidrogênios representados correspondem aos átomos de hidrogênio ligados ao átomo de nitrogênio amínico oxigênio do ligante; o sinal de m/z 287 corresponde a uma molécula do ligante HL_4 , após desprotonação do álcool e com um átomo de sódio ligado ao oxigênio do mesmo e um íon cloreto coordenados ao centro metálico de zinco, $[\text{Zn}(\text{NaHL}_4)\text{Cl}]^+$; o sinal de m/z 395 corresponde a uma molécula do ligante HL_4 , com o nitrogênio amínico e o álcool protonados, uma molécula do ligante com o álcool desprotonado coordenados a um único átomo de zinco, resultando em $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_4)(\text{HL}_4)]^+$; o sinal de m/z 480 corresponde a uma espécie binuclear na qual um centro metálico de zinco encontra-se coordenado a uma molécula do ligante HL_4 com o nitrogênio amínico e o oxigênio do álcool desprotonados, além de um átomo de sódio interagindo com a molécula do ligante, o segundo centro metálico de zinco encontra-se coordenado apenas a uma molécula do ligante HL_4 após desprotonação do nitrogênio amínico e do álcool, os centros de zinco estão unidos através de um das moléculas do ligante, resultando em $[\text{Zn}-(\mu\text{-NaL}_4)\text{-Zn}(\text{L}_4)]^+$; o sinal de m/z 495 corresponde a uma espécie binuclear na qual cada centro metálico de zinco encontra-se coordenado a uma molécula do ligante HL_4 , após desprotonação do álcool, e estão unidos por uma ponte cloreto, resultando em $[(\text{HL}_4)\text{Zn}-(\mu\text{-Cl})\text{-Zn}(\text{HL}_4)]^+$. Infelizmente estudos de ESI(+)-MS/MS para estas espécies indicam somente a presença do ligante HL_4 nos fragmentos.

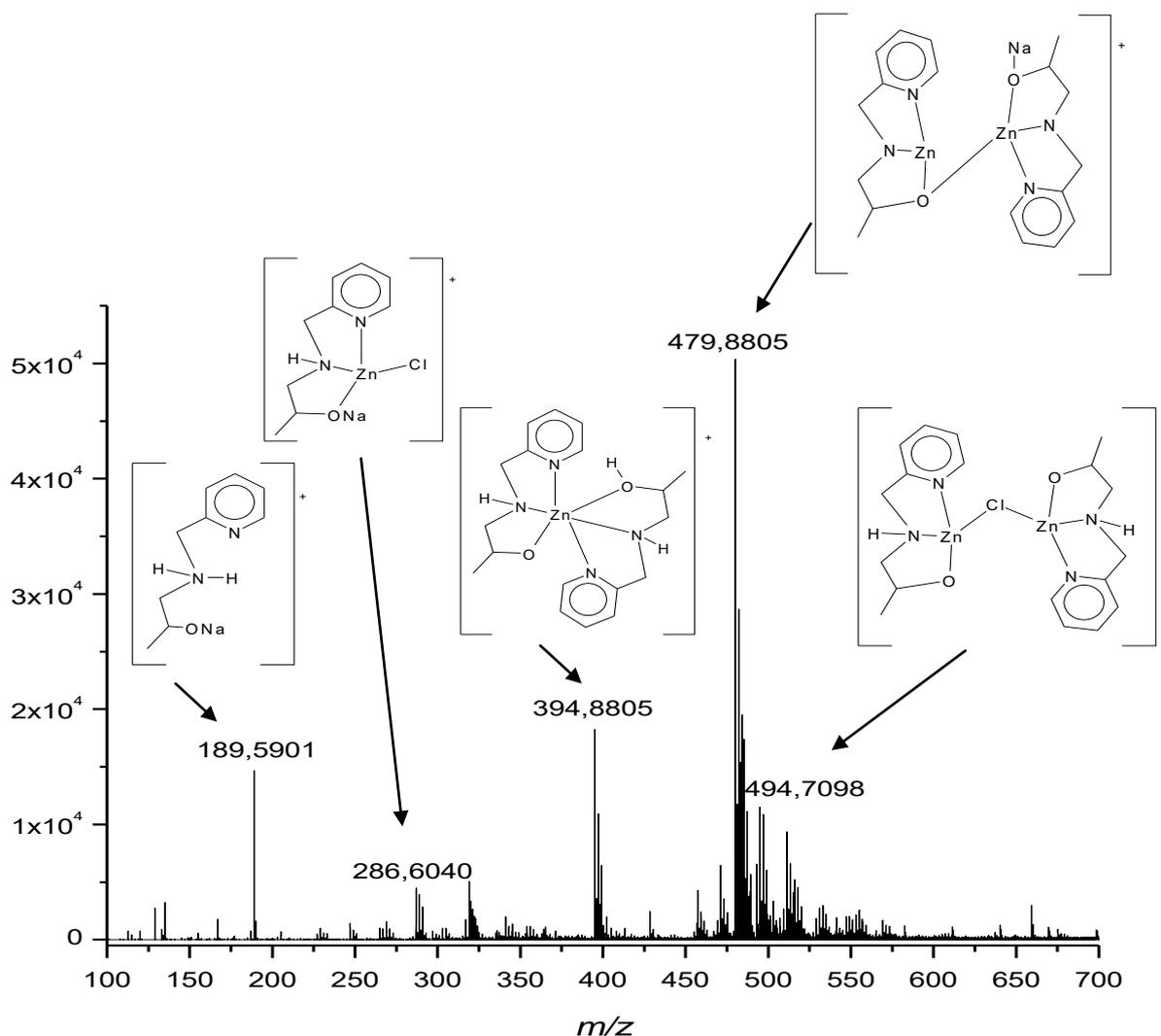


Figura 50. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ (**4**).

O espectro de ESI(+)-MS para o complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (**5**) (Figura 51) apresenta seis espécies catiônicas com m/z 153, 215, 403, 505 e 541. O sinal de m/z 153 corresponde ao cátion do ligante HL_5 após protonação do nitrogênio amínico, $[H_3L_5]^+$, no qual os três átomos de hidrogênios representados correspondem aos átomos de hidrogênio ligados ao átomo de nitrogênio amínico e ao átomo de oxigênio da função álcool do ligante; o sinal de m/z 215 corresponde ao cátion contendo o ligante HL_5 após desprotonação do nitrogênio amínico coordenado ao centro metálico de zinco, resultando em $[Zn(HL_5)]^+$; o sinal de m/z 403 corresponde a duas moléculas do ligante HL_5 , com os seus nitrogênios amínicos protonados e um íon cloreto, coordenados a um único centro metálico de zinco, resultando em $[Zn(H_2L_5)_2(Cl)]^+$; o sinal m/z 541 corresponde ao cátion binuclear de

zinco, no qual cada centro metálico encontra-se coordenado a uma molécula do ligante HL₅, no qual o nitrogênio amínico e a hidroxilas estão protonados e um íon cloreto, além de um terceiro íon cloreto estar presente na forma de ponte entre os dois centros de zinco, resultando em [(H₂L₅)(Cl)Zn-(μ-Cl)-Zn(H₂L₅)(Cl)]⁺.

O ESI(+)-MS/MS para o íon com *m/z* 541, discutido acima, indica que a perda de um molécula de HCl resulta na formação da espécie binuclear [(HL₅)Zn-(μ-Cl)-Zn(H₂L₅)Cl]⁺ com *m/z* 505; a perda de duas moléculas de HCl resulta na formação do cátion binuclear [(HL₅)Zn-(μ-Cl)-Zn(HL₅)]⁺ de *m/z* 469 ; a perda de uma molécula neutra [Zn(H₂L₅)(Cl)₂] (*m/z* 288) forma a espécie mononuclear [Zn(H₂L₅)Cl]⁺ com *m/z* 253, a qual corresponde a uma molécula do ligante HL₅, com o nitrogênio amínico e o átomo de oxigênio protonados e um íon cloreto coordenados ao centro metálico de zinco.

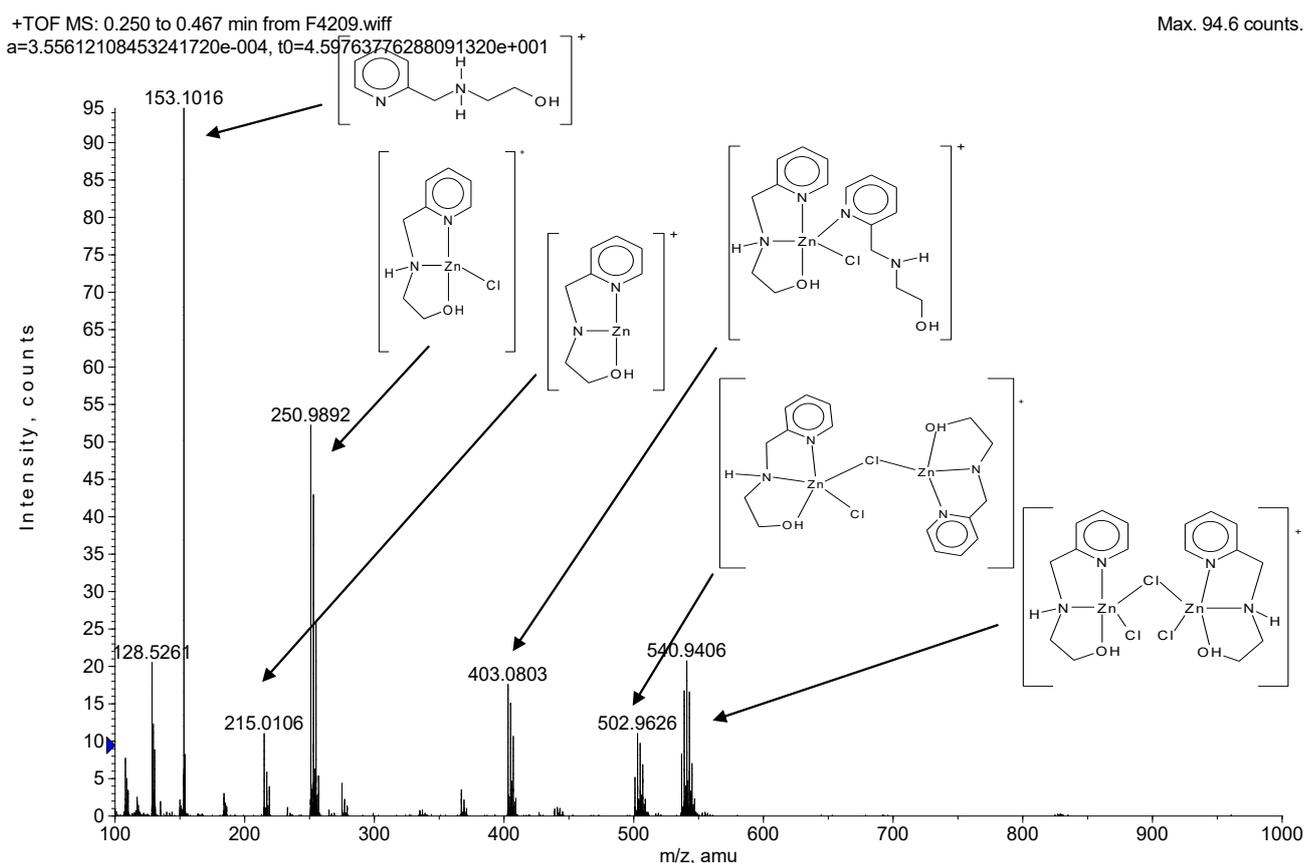


Figura 51. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo [Zn(HL₅)(Cl)₂] (**5**).

O espectro de ESI(+)-MS para o complexo [Zn(H₂L₆)(Cl)]Cl·H₂O (**6**) (Figura 52) apresenta duas espécies catiônicas (*m/z* 418 e 516). O sinal de *m/z* 418 corresponde ao cátion do ligante H₂L₆ após a protonação do nitrogênio amínico,

$[H_3L_6]^+$, no qual os três átomos de hidrogênio representados correspondem ao hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio amínico e aos hidrogênios ligados aos dois átomos de oxigênio do ligante; o sinal de m/z 516 corresponde ao cátion do complexo, $[Zn(H_2L_6)Cl]^+$. O espectro de ESI(+)-MS/MS para o íon referente ao sinal de m/z 418 indica que a fragmentação da molécula do ligante H_2L_6 resulta na formação do íon com m/z 312. O espectro de ESI(+)-MS/MS para o íon com m/z 516 indica que a perda de uma molécula de HCl gera o íon com sinal de m/z 480, o qual corresponde a uma molécula do ligante H_2L_6 após desprotonação do fenol coordenado a um centro metálico de zinco, resultando em $[Zn(HL_6)]^+$.

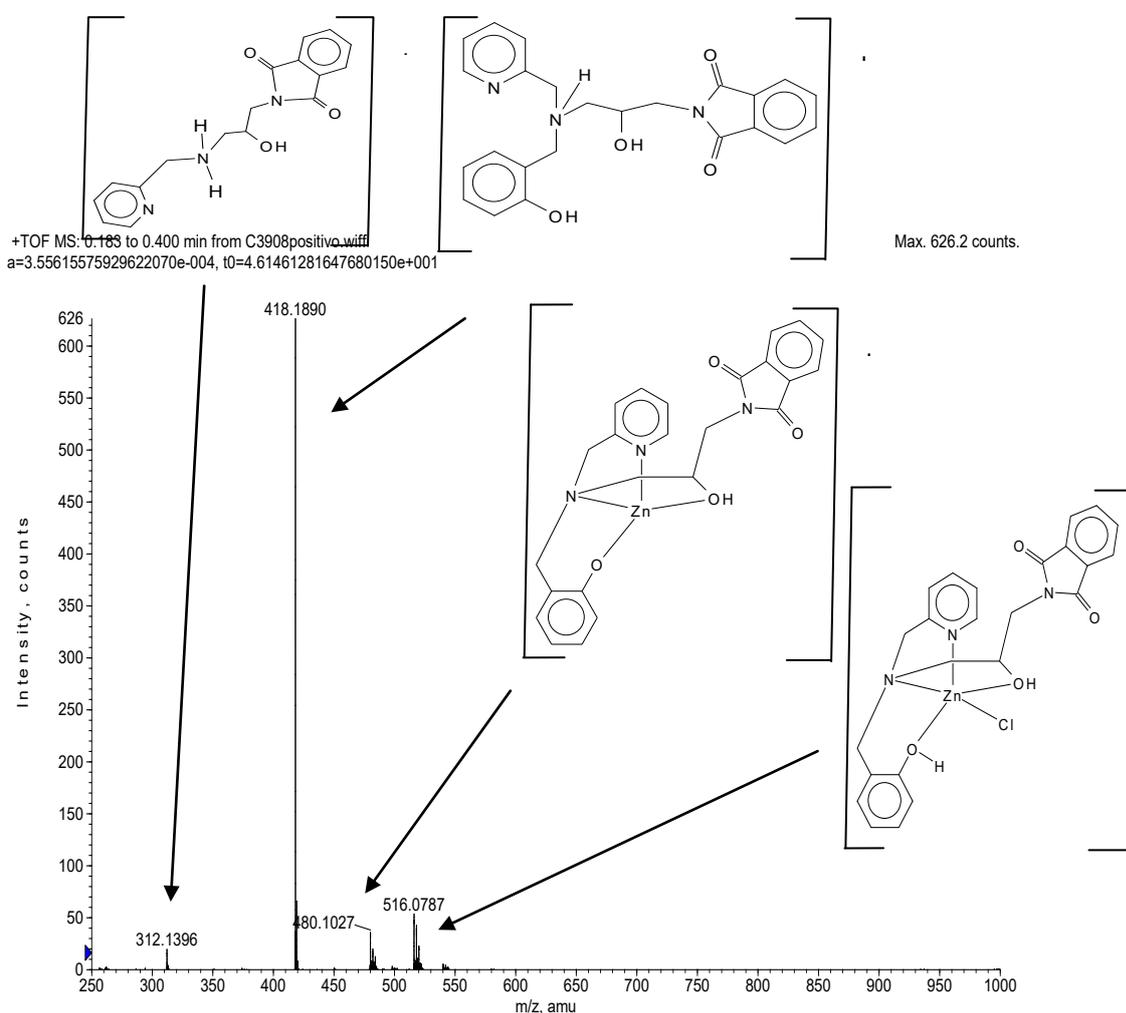


Figura 52. ESI(+)-MS/MS em solução de água:metanol (1:1) para complexo $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl \cdot H_2O$ (6).

5. ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Após a síntese e completa caracterização dos complexos e dos ligantes, descritos anteriormente, foram realizados os estudos das atividades antitumorais destes frente a células leucêmicas humanas. Foram estudadas duas linhagens: THP-1 de linhagem mielóide e U937 de linhagem linfóide. Estes estudos foram realizados no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB/UENF) com a colaboração do Prof. Milton M. Kanashiro. Para a realização destes estudos, as seguintes etapas foram seguidas:

5.1. Avaliação das atividades biológicas dos compostos frente às células em cultura

5.1.1. Descongelamento de células leucêmicas humanas

Colocou-se 5 mL de meio D-MEM/F12 (Gibco BRL, EUA) suplementado com 0,1% de gentamicina (Gibco BRL, EUA) e 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, EUA) em 1 tubo de 15 mL. Retirou-se a célula desejada do nitrogênio líquido. As células foram descongeladas de maneira rápida (banho-maria à 45°C), colocando-se o criotubo que contém as células em contato com a água, sob agitação. No fluxo laminar, transferiu-se as células do criotubo para o tubo com 5 mL de meio D-MEM/F12. Centrifugou-se por 3 minutos na velocidade de 1200 rpm. Ressuspendeu-se em 3 mL de meio, passando este para uma garrafa de cultura.

5.1.2. Cultura de linhagens de células leucêmicas humanas

Células de origem leucêmicas humanas THP-1 (linhagem mielóide) e U937 (linhagem linfóide) foram cultivadas em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 0,1% de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino

(Gibco, BRL). As culturas foram replicadas a cada dois dias e mantidas em estufa a 37°C (Forma Scientific Inc., modelo 3159), com 5% de CO₂ e umidade controlada.

5.1.3. Congelamento de células leucêmicas humanas

Quando as células cultivadas atingem um crescimento superior a 25 ml, separa-se o conteúdo de 4 garrafas, e as células passam pelo processo de congelamento para reposição das células descongeladas.

Inicialmente, desprende-se os 20 ml de células contidos nas garrafas de cultura, transferiu-se para um tubo de 15 mL. Centrifugou-se por aproximadamente 4 minutos na velocidade de 1200 rpm e descartou-se o sobrenadante. Em seguida o “pellet” foi ressuspensionado, com 900 µL de SFB (Soro Fetal Bovino), preferencialmente, ou com 900 µL de meio complementado e 10 µL de DMSO. As células foram então transferidas para um criotubo devidamente identificado. Revestiu-se o criotubo com “plástico de bolhas” e colocou-o a -70°C, no freezer. Após 24 h, transferiu-se o criotubo contendo as células para o nitrogênio líquido.

5.1.4. Avaliação da atividade antitumoral dos compostos frente às células leucêmicas humanas em cultura através da microscopia de fluorescência.

Foram utilizadas cerca de 4 garrafas de cultura de um tipo celular. Foram transferidos 4 mL do meio de cultura de cada garrafa para um tubo de 15 mL e homogeneizou-se. Misturou-se 50 µL das células e 50 µL de corante Tripán Blue, homogeneizou-se e, a seguir, as células foram contadas numa câmara de Neubauer (4 quadrantes). Foi necessário ajustar o número de células para a concentração de 1×10^6 para posterior uso no experimento, diluindo ou concentrando as células conforme o necessário.

Os complexos de zinco e os respectivos ligantes foram solubilizados em pequenas quantidades de solvente (100-200 µL), de acordo com a solubilidade dos mesmos. A seguir as soluções foram completadas com água ultra-pura estéril adicionada até volume final de 1,5 mL conferindo a todas as soluções a

concentração de $2 \cdot 10^{-2}$ mol/L. A partir desta solução inicial foi feita diluição seriada com os compostos em meio de cultura, D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 0,1% de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL), para atingir as respectivas concentrações finais dos compostos, 400, 200, 100 e 50 μ M.

As células leucêmicas foram plaqueadas em um volume de 100 μ L/poço (1×10^6 células/mL) em placas de 96 poços, tratadas com os complexos de zinco nas concentrações finais de 50, 100, 200 e 400 μ M. O volume total de cada poço foi de 200 μ L e os mesmos foram mantidos na estufa a 37°C, com 5% de CO₂ e umidade controlada. As atividades antitumorais dos ligantes, frente ambas as linhagens celulares também foram investigadas na maior concentração testada (400 μ M). Nos experimentos também foram avaliadas as porcentagem de morte celular induzidas pelo solvente utilizado no preparo das soluções dos complexos, de acordo com as concentrações usadas do mesmo. Além dos tratamentos com os ligantes e os complexos de zinco foram realizados em todos os experimentos um controle nos quais as células leucêmicas foram investigadas na ausência de ligantes ou complexos, com o intuito de avaliar a porcentagem de morte celular que ocorre de maneira natural e permitir posterior comparação.

Os experimentos foram avaliados nos intervalos de 12, 24, 36 e 48 h, nos quais foram avaliadas a proliferação celular e indução de morte celular (apoptose e/ou necrose), pelos compostos testados. Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo utilizados dois poços para cada concentração.

5.1.5. Avaliação da porcentagem de apoptose e/ou necrose de células leucêmicas humanas em cultura por microscopia de fluorescência

As células cultivadas na presença dos compostos foram coradas com uma solução de 1 μ g/mL de laranja de acridina e 1 μ g/mL de brometo de etídio. Após a montagem em lâmina e lamínulas, as células foram levadas ao microscópio de fluorescência, sendo contadas aproximadamente 300 células em vários campos escolhidos aleatoriamente, sendo contabilizadas as células apoptóticas, necróticas e normais.

A viabilidade celular foi analisada utilizando-se o método de coloração de células com corantes de DNA, laranja de acridina e brometo de etídio. Laranja de acridina, um corante vital, entra nas células através da membrana intacta e intercala no DNA, resultando em uma coloração verde. Ao contrário, o brometo de etídio é capaz de penetrar apenas em células com membrana rompida, corando o núcleo de vermelho (COLIGAN *et al.*, 1992).

Foram adotados padrões convencionais com relação à morfologia e coloração das células:

- Células normais: possuem morfologia do núcleo intacta e apresentam coloração verde;
- Células apoptóticas: apresentam redução do volume celular, condensação da cromatina nuclear, fragmentação do núcleo e formação de corpos apoptóticos. Caracterizam-se pela coloração verde;
- Células necróticas: As células necróticas primárias apresentam aumento do volume citoplasmático e perda rápida da integridade da membrana celular, enquanto que as necróticas secundárias apresentam condensação da cromatina e fragmentação do núcleo. Apresentam na coloração vermelha (Pulido e Parrish, 2003);

Foi calculada a porcentagem de cada população celular – células normais, apoptóticas e necróticas – em relação ao total. Foram consideradas neste cálculo de porcentagem, as células apoptóticas bem como as células que apresentavam necrose secundária.

5.2. Estudo das alterações morfológicas nas células tumorais promovidas pelos compostos de coordenação através da microscopia eletrônica de transmissão (M. E. T.)

Para verificar alterações morfológicas nas células tumorais tratadas com os complexos de zinco, as mesmas foram processadas para análise por M.E.T. (Microscopia eletrônica de transmissão). Este estudo foi realizado no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB/UENF) com a colaboração do Prof. João Carlos de Aquino Almeida do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos/ UENF.

Foram preparadas amostras para M.E.T. das células U937 e THP-1 após incubação com o complexo $[Zn(HL_4)(Cl_2)]$ (**4**), devido aos resultados das atividades antitumorais apresentados pelos compostos de coordenação.

As linhagens celulares U937 e THP-1 foram replicadas e deixadas em repouso para que ocorra o crescimento das mesmas, por 24 h. Em seguida foi realizado o cálculo da concentração celular nas garrafas, resultando em uma concentração aproximada de $1,5 \times 10^6$ células por garrafa. Os complexos foram diretamente adicionados às garrafas contendo 5 mL de células, obtendo as concentrações de 50, 100 e 200 μM . As células foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO_2 e umidade controlada por 6 e 12 h. Após o período de incubação com os complexos, as células foram centrifugadas por 10 min a 1200 rpm e lavadas 3 vezes com Tampão Salino Fosfato (PBS, pH 7,2).

Nesta etapa do preparo das amostras as células U937 e THP-1 que foram tratadas com o complexo $[Zn(HL_4)(Cl_2)]$ (**4**), tiveram o “pellet” fixado por 90 minutos com apenas Glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M. Após a etapa de fixação todas as células passaram pelo mesmo procedimento.

As células após fixação foram lavadas 3 vezes em uma solução de 5% sacarose e 0,1M de tampão cacodilato e pós-fixadas por 20 min protegido da luz em solução 1:1 de ósmio e ferrocianeto de potássio. Após o período de pós-fixação as células foram lavadas três vezes com solução de 5% sacarose e 0,1M de tampão cacodilato, desidratadas sequencialmente em soluções de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e deixadas por uma noite em uma solução 1:1 de acetona e resina epóxi (EPON). A solução foi então trocada por resina epóxi pura e os tubos colocados em estufa para polimerização da resina durante 48 h. Os blocos polimerizados foram seccionados em ultramicrótomo e as seções ultrafinas colocadas em grades de cobre. As micrografias das células foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo TEM-900 (Zeiss, Alemanha).

6. RESULTADOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

6.1. Resultados obtidos por microscopia de fluorescência

As atividades antitumorais dos complexos, dos respectivos ligantes e dos solventes foram avaliadas frente às duas linhagens de células leucêmicas humanas, U937 e THP-1. Em todos os experimentos foi realizado um controle negativo, no qual as células não receberam nenhuma espécie de tratamento com nenhum composto. Este controle é de extrema utilidade, pois serve para certificar a confiabilidade do experimento e também para se comparar os valores de porcentagem de morte celular obtidos após o tratamento das células com os compostos.

O complexo $[\text{Zn}(\text{L}_1)(\text{Cl})_2]$ (**1**) foi solubilizado apenas em água ultra-pura estéril, por isso não houve necessidade de testar nenhum solvente frente as linhagens de células leucêmicas. A Figura 53 apresenta o resultado de porcentagem de morte celular obtido para este complexo frente a linhagem celular U937, para o qual não foi observado nenhuma atividade antitumoral em nenhuma das concentrações testadas. Porém o ligante L_1 (Figura 53) foi capaz de induzir uma alta taxa de morte celular por apoptose na concentração de 400 μM . Após o período de 36 h de incubação foi observado aproximadamente 80% de morte celular por apoptose e após 48 h observou-se morte de 100% das células por apoptose. Assim, verificou-se neste experimento, que a taxa de apoptose induzida pelo ligante L_1 é dependente do tempo de incubação do mesmo. Não foram observadas taxas significativas de morte por necrose para o complexo de zinco e para o seu respectivo ligante. Através do resultado deste experimento é possível verificar que não houve potencialização da atividade antitumoral do ligante frente a linhagem U937, após complexação com sal metálico de zinco.

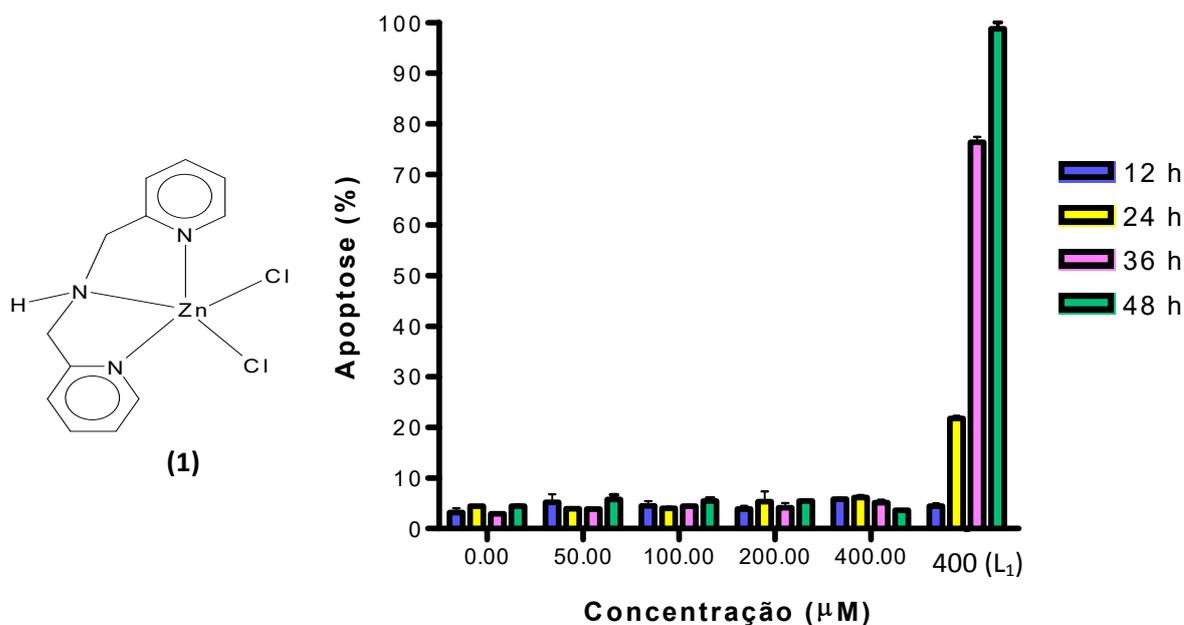


Figura 53. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**) e do ligante L_1 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

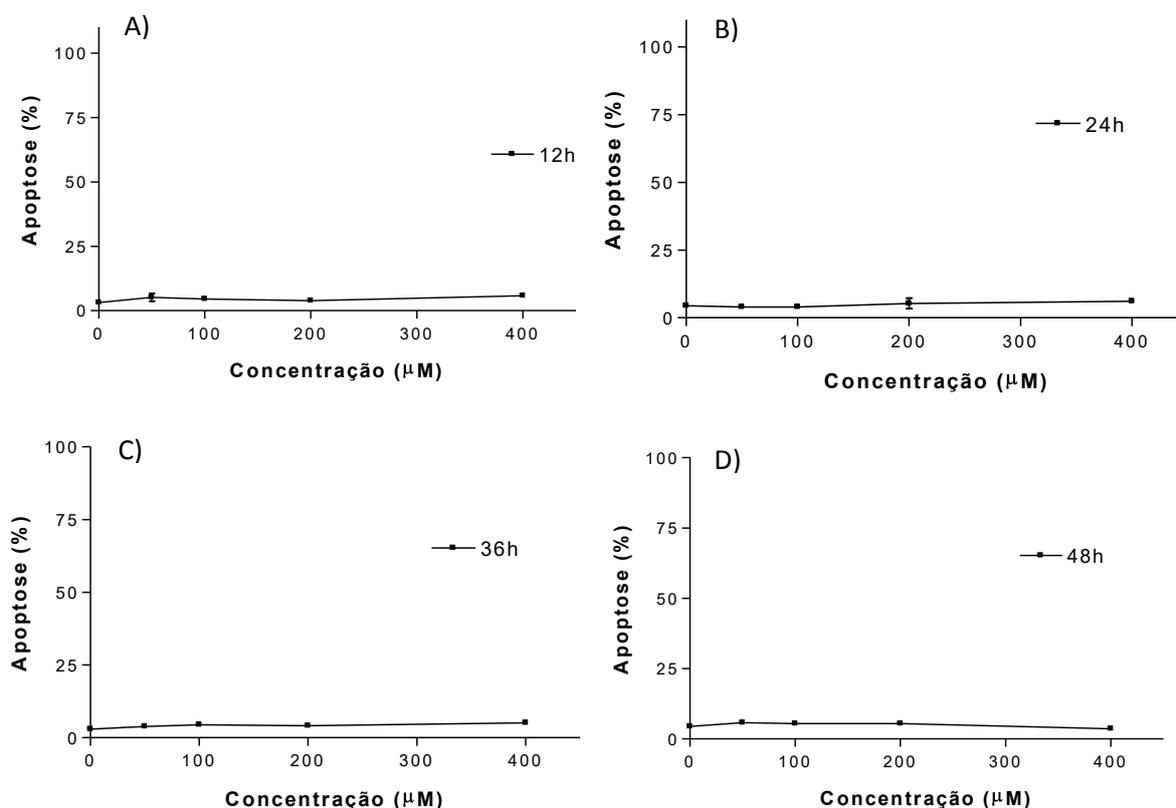


Figura 54. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

Na Figura 55 são apresentados os resultados de porcentagem de morte celular obtido para o complexo $[\text{Zn}(\text{L}_1)(\text{Cl})_2]$ (**1**) frente a linhagem celular THP-1. Foi observado baixa atividade antitumoral. Após 24 h de incubação foi observado aproximadamente 40% de morte celular por apoptose na concentração de 200 μM e 50% na concentração de 400 μM . Após este período de tempo não houve mudança significativa na atividade antitumoral. Nas concentrações inferiores a 200 μM não foi observado atividade antitumoral significativa para este complexo. O ligante L_1 (Figura 55) foi capaz de induzir taxa de morte celular por apoptose de cerca de 50% na concentração de 400 μM , após 48 h de incubação. No intervalo de 36 h de incubação foi observado aproximadamente 20% de morte celular por apoptose e nos períodos de 12 e 24 h de incubação observou-se 10% de morte celular por apoptose após a incubação com o ligante L_1 . Assim verificou-se que a taxa de apoptose induzida pelo ligante L_1 , frente a linhagem THP-1, é dependente do tempo de incubação do mesmo. Não foram observadas taxas significativas de morte por necrose para o complexo de zinco e para o ligante L_1 . Apesar da baixa atividade apresentada pelo complexo $[\text{Zn}(\text{L}_1)(\text{Cl})_2]$ (**1**), o resultado indica potencialização da atividade antitumoral do ligante após complexação com sal metálico de zinco.

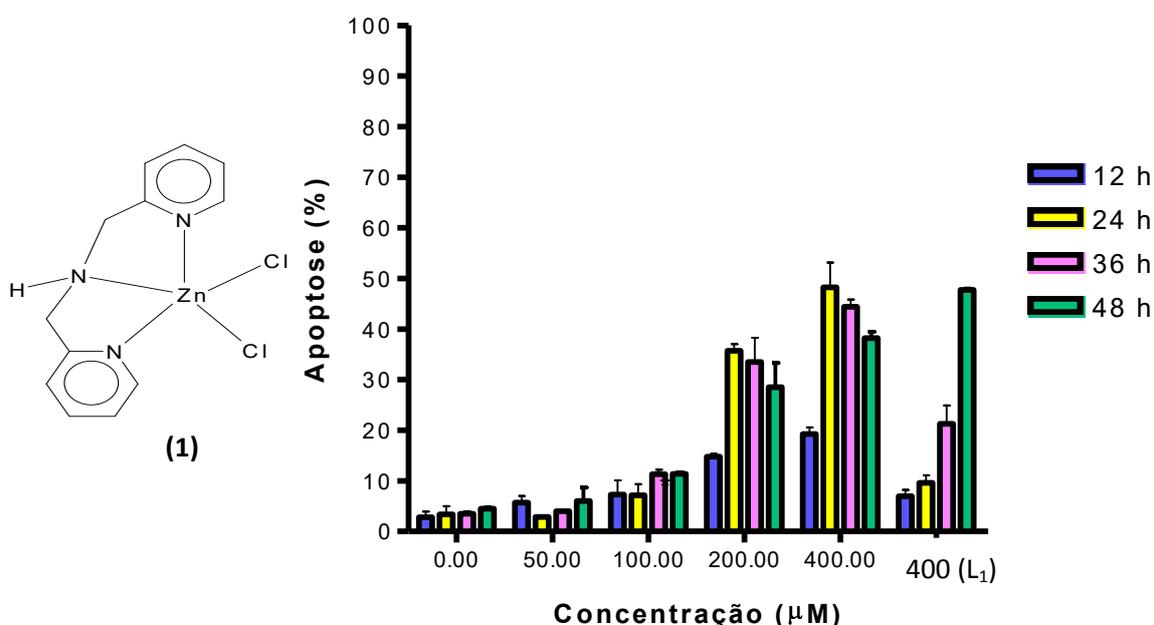


Figura 55. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[\text{Zn}(\text{L}_1)(\text{Cl})_2]$ (**1**) e do ligante L_1 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

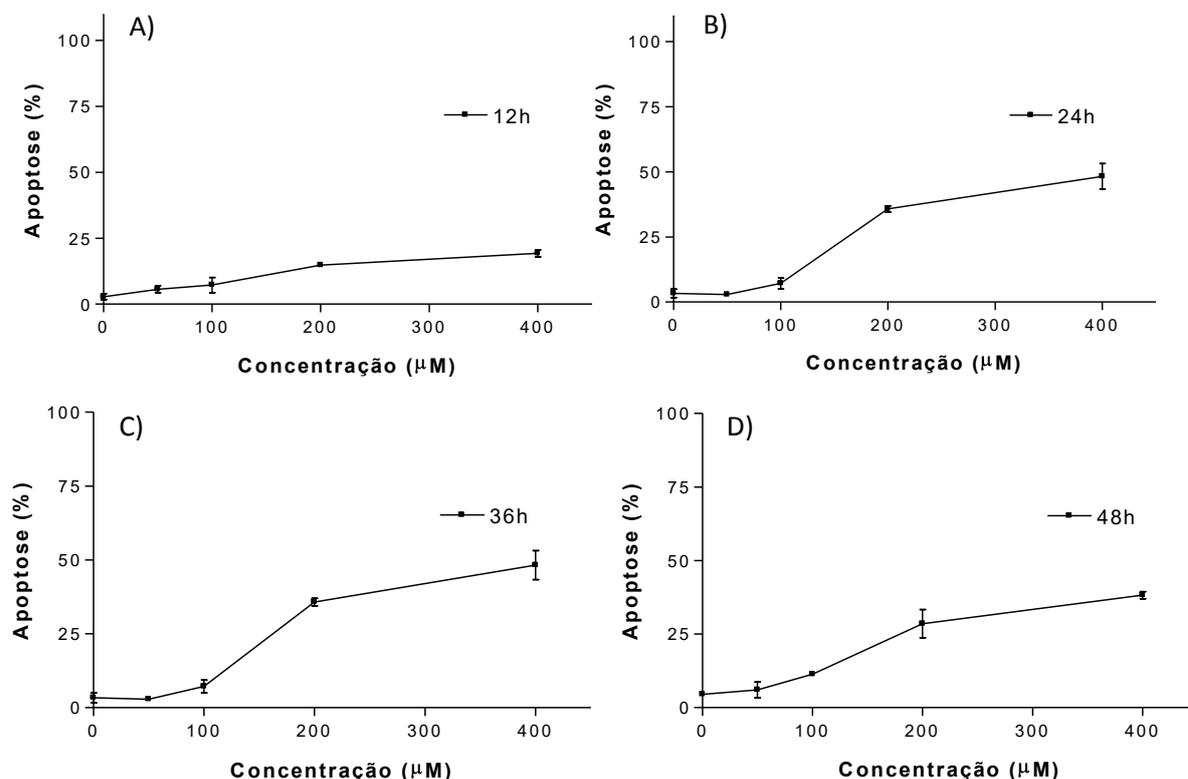


Figura 56. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(L_1)(Cl)_2]$ (**1**), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

O complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (**2**) foi solubilizado em 100 μL de dimetilformamida e água ultra-pura estéril, por isso o solvente dimetilformamida foi testado frente as duas linhagens, THP-1 e U937, entretanto não apresentou atividade antitumoral mensurável. A Figura 57 apresenta a morte celular promovida pelo complexo (**2**) e pelo ligante HL_2 frente a linhagem celular U937. Não foram observadas atividades antitumorais mensuráveis em nenhuma das concentrações testadas para ambos. Também não foram observadas taxas significativas de morte por necrose para o complexo de zinco e para o seu respectivo ligante. O resultado indica que não houve potencialização da atividade antitumoral do ligante após complexação com sal metálico de zinco.

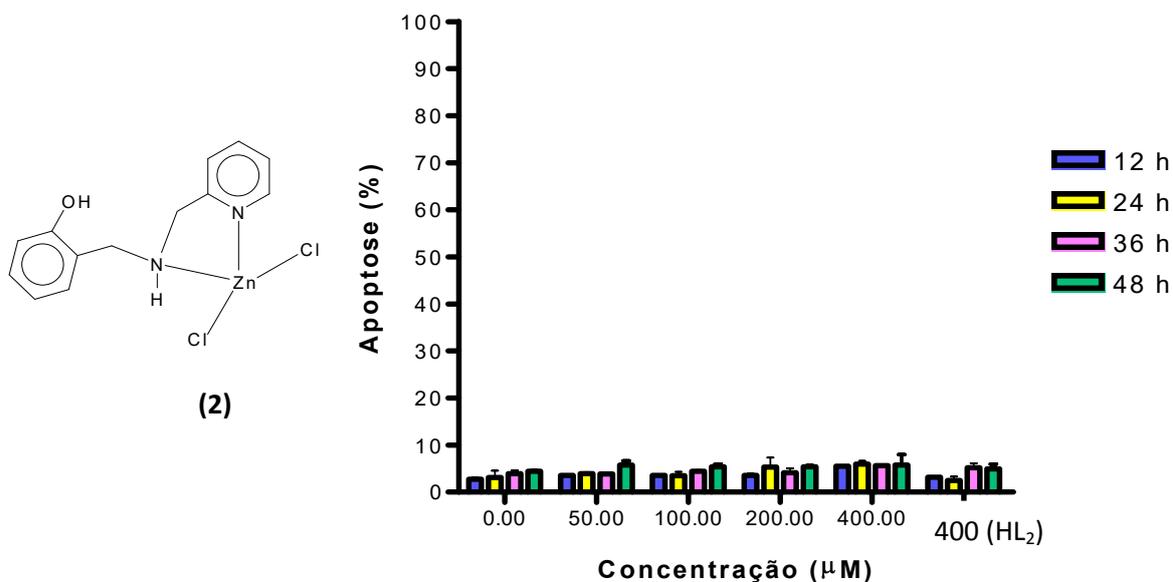


Figura 57. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (2) e do ligante HL₂, nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

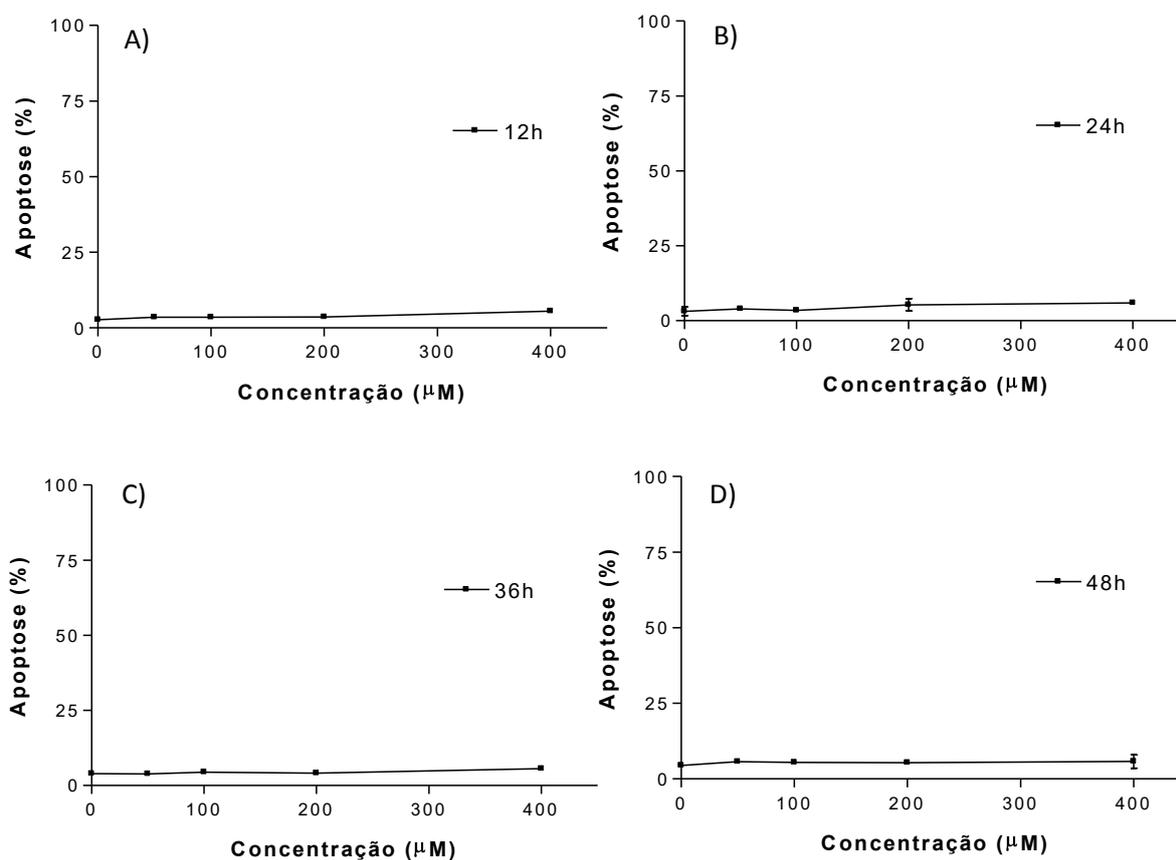


Figura 58. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (2), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

A Figura 59 apresenta os resultados de porcentagem de morte celular promovidos pelo complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (**2**), frente a linhagem celular THP-1. Foi observado baixa atividade antitumoral. Nas concentrações inferiores a 200 μM não foi observado nenhuma atividade antitumoral significativa. Após 48 h de incubação foi observado aproximadamente 35% de morte celular por apoptose na concentração de 200 μM e 40% na concentração de 400 μM . Nos intervalos de tempo inferiores a 48 h foi verificada porcentagem de morte celular de cerca de 30% para ambas as concentrações, indicando uma baixa variação das atividades com relação ao tempo e as concentrações de 200 e 400 μM . O ligante HL_2 não apresentou atividade antitumoral frente à linhagem THP-1, empregando-se a concentração de 400 μM . Neste experimento não foram evidenciadas taxas significativas de morte por necrose para ambos os tratamentos (ligante HL_2 e complexo (**2**)). Apesar da baixa atividade apresentada pelo complexo (**2**), o resultado indica potencialização da atividade antitumoral do ligante após complexação com sal metálico de zinco.

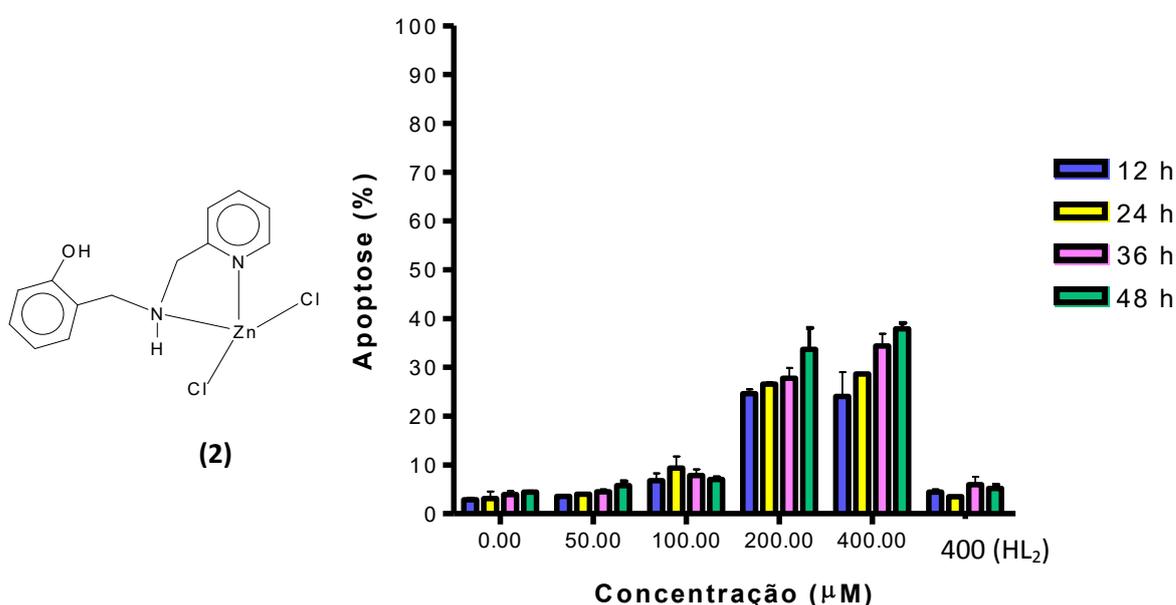


Figura 59. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_2)(\text{Cl})_2]$ (**2**) e do ligante HL_2 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

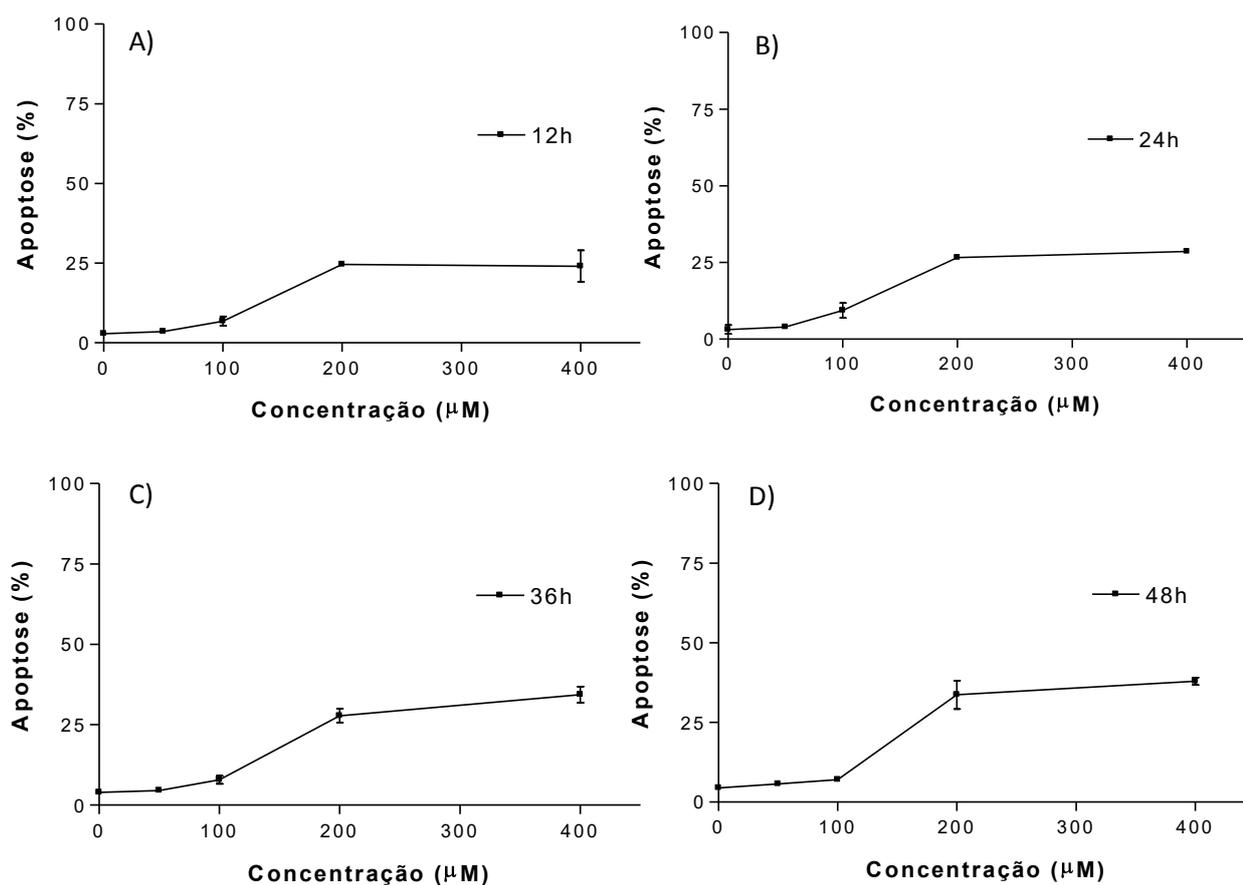


Figura 60. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_2)(Cl)_2]$ (2), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

O complexo $[Zn(HL_3)(Cl)]$ (3) foi solubilizado em 200 μL de dimetilsulfóxido e água ultra-pura estéril, por isso o solvente dimetilsulfóxido foi testado frente as duas linhagens, THP-1 e U937, mas não apresentou atividade antitumoral significativa. O complexo (3) foi capaz de induzir alta porcentagem de morte celular nas concentrações de 200 e 400 μM (Figura 61). Nas concentrações inferiores a estas não foram observadas atividades antitumorais. Após 12 h de incubação foi observado 100% de morte celular por apoptose, nas concentrações de 200 e 400 μM para o complexo de zinco (3). O ligante H_2L_3 não apresentou atividade antitumoral considerável, após 48 h de incubação foi verificada 25% de morte celular por apoptose na concentração de 400 μM . Não foram observadas taxas significativas de morte por necrose para o complexo de zinco e para o seu respectivo ligante. Este resultado indica a potencialização da atividade antitumoral do ligante após complexação com sal metálico de zinco.

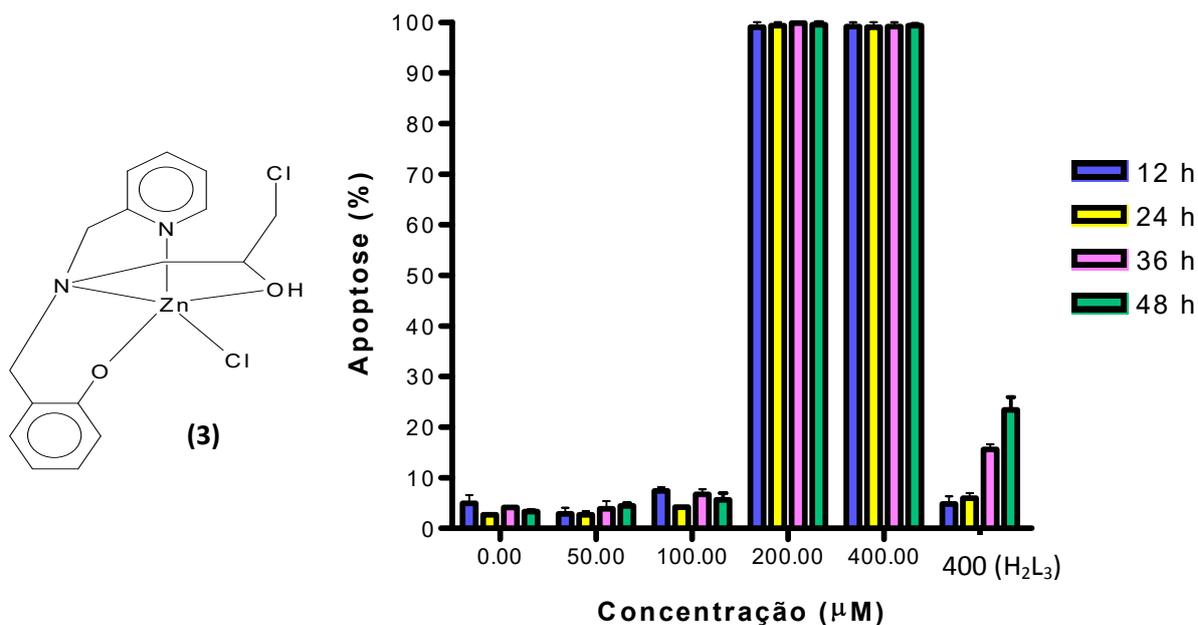


Figura 61. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_3)(\text{Cl})]$ (3) e do ligante H_2L_3 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

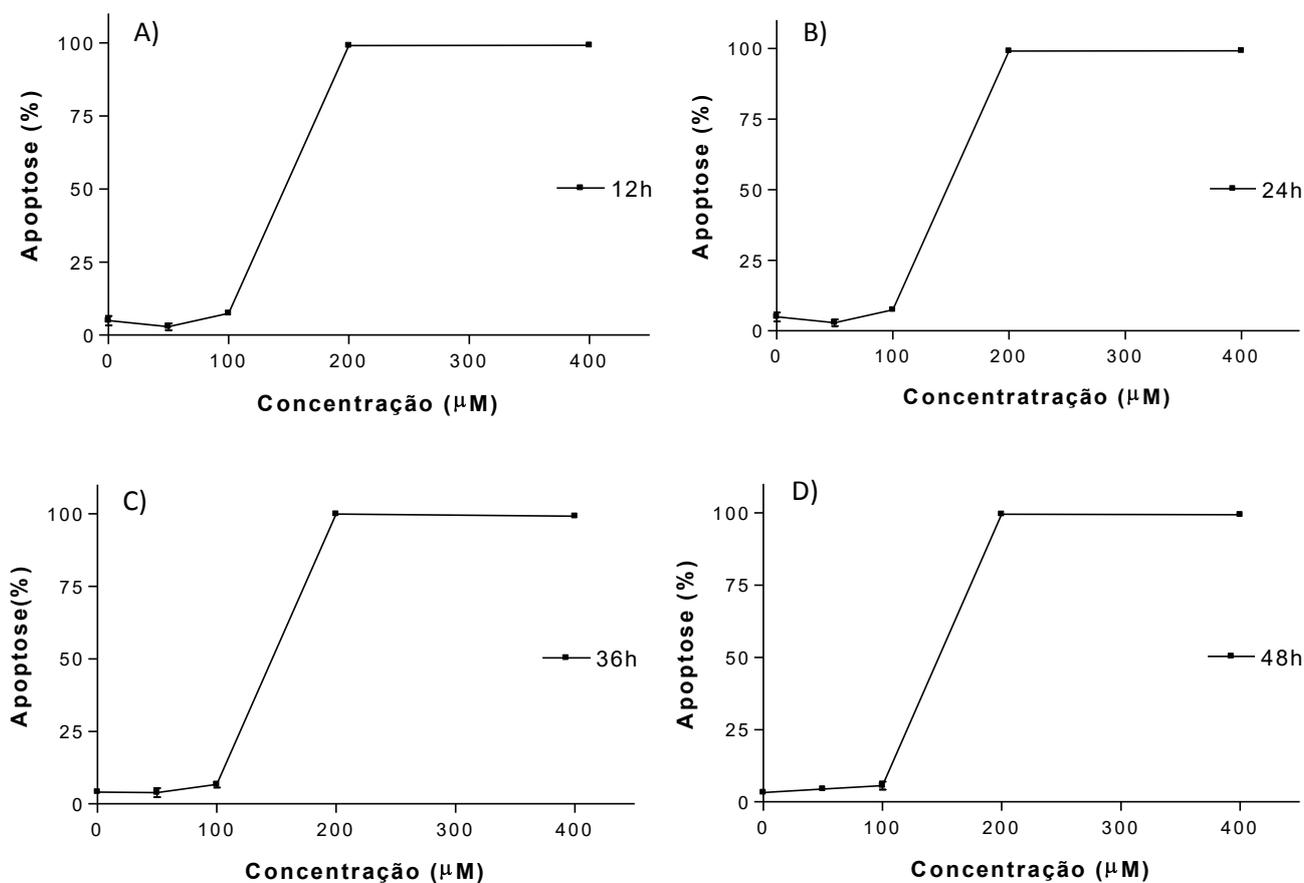


Figura 62. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_3)(\text{Cl})]$ (3), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

O complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_3)(\text{Cl})]$ (**3**) apresentou considerável taxa de morte celular por apoptose frente a linhagem celular THP-1, na concentração de $400\ \mu\text{M}$ (Figura 63). Na concentração de $400\ \mu\text{M}$ foi verificada cerca de 40% de morte celular por apoptose após 12 h de incubação. Houve aumento na atividade antitumoral para os demais períodos de incubação; após 24 h, foi observado 100% de morte celular por apoptose. Para o complexo (**3**), na concentração de $200\ \mu\text{M}$, foi observada baixa atividade antitumoral, 15 e 30% de morte celular nos períodos de 12 e 24 h de incubação respectivamente, e 40% nos intervalos de 36 e 48 h de incubação. As concentrações de 50 e $100\ \mu\text{M}$ do complexo (**3**) não foram eficientes frente esta linhagem celular. O ligante H_2L_3 não apresentou atividade antitumoral frente à linhagem THP-1, na concentração testada ($400\ \mu\text{M}$). Neste experimento não foram evidenciadas taxas significativas de morte por necrose para ambos os tratamentos (complexo (**3**) e ligante H_2L_3). Estes resultados apresentados nas Figuras 63 e 64 indicam potencialização da atividade antitumoral do ligante após complexação com sal metálico de zinco.

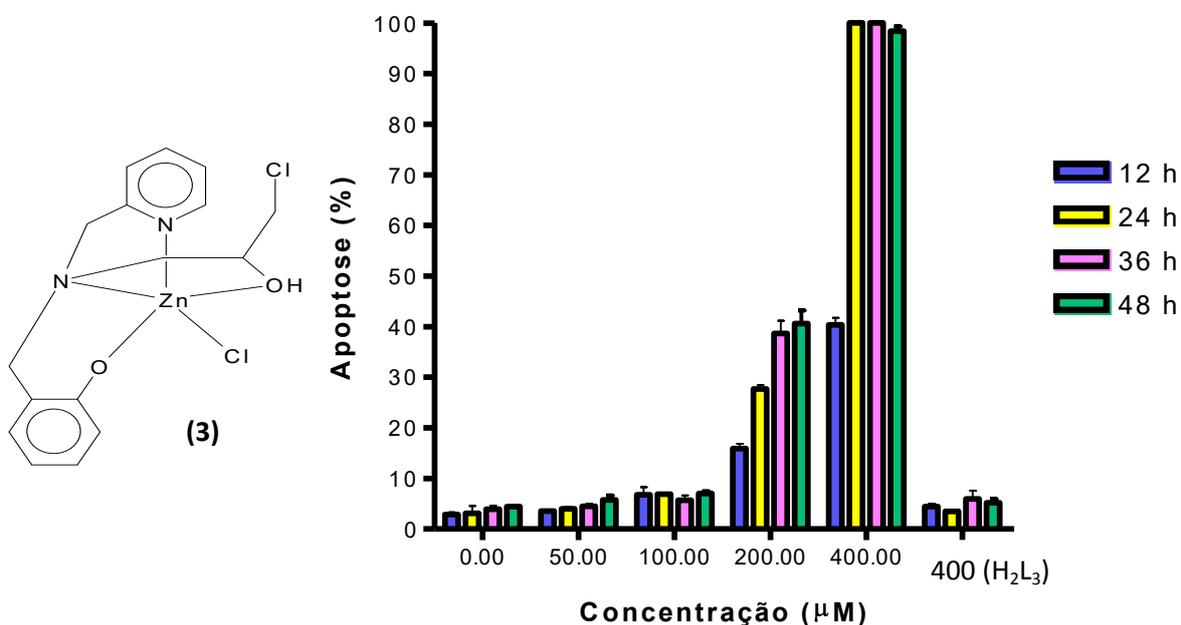


Figura 63. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_3)(\text{Cl})]$ (**3**) e do ligante H_2L_3 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

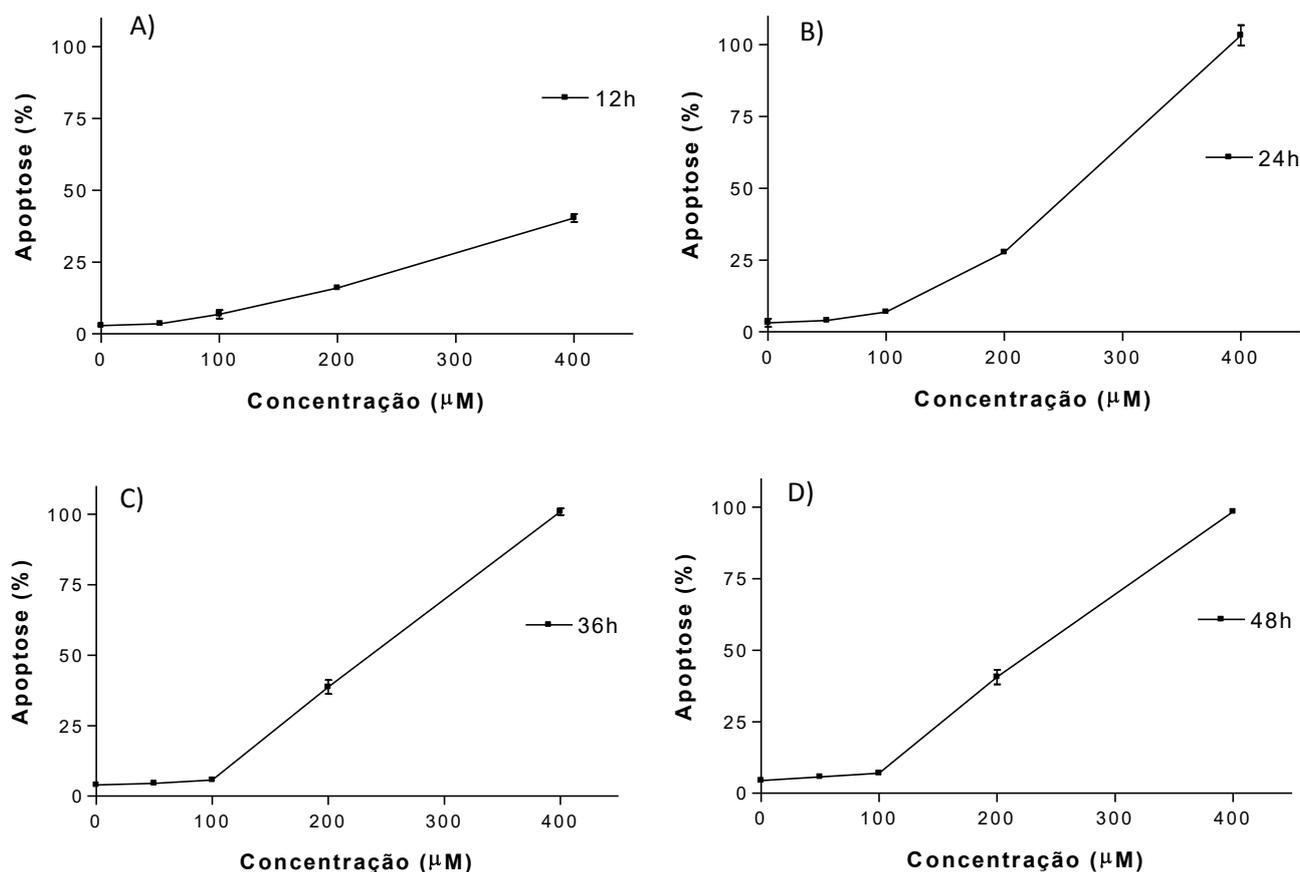


Figura 64. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_3)(\text{Cl})]$ (**3**), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

O complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl})_2]$ (**4**) foi solubilizado apenas em água ultra-pura estéril, por isso não houve necessidade de testar nenhum solvente frente às linhagens de células leucêmicas para este experimento. Na concentração de 400 µM o complexo apresentou alta atividade antitumoral frente à linhagem U937 (Figura 65), sendo observado 100% de morte celular por apoptose, já após 12 h de incubação. Para este composto, na concentração de 200 µM, foi observado crescimento gradativo da porcentagem de morte celular com os períodos de incubação: 30% para 12 h, 50% para 24 h, 80% para 36 h e 100 para 48 h. As concentrações de 50 e 100 µM não foram eficientes frente esta linhagem celular. O ligante HL_4 não apresentou atividade antitumoral frente à linhagem U937. Neste experimento não foram evidenciadas taxas significativas de morte por necrose para ambos os tratamentos (ligante HL_4 e complexo (**4**)). Estes resultados indicam potencialização das atividades antitumorais do ligante após complexação com sal metálico de zinco.

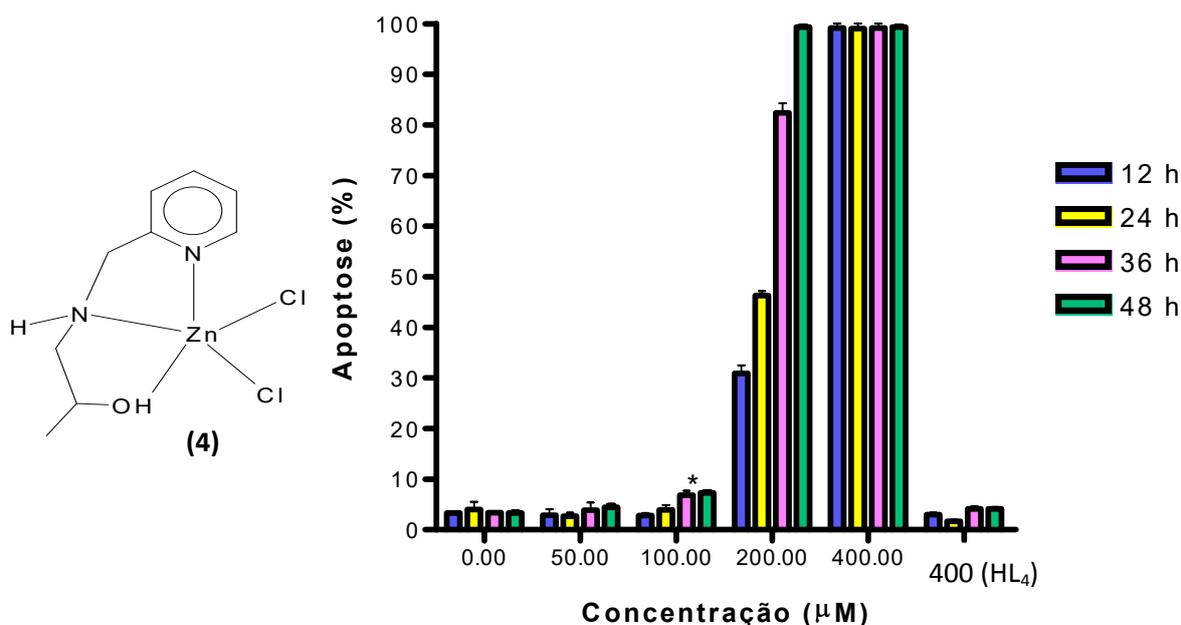


Figura 65. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl})_2]$ (4) e do ligante HL₄, nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

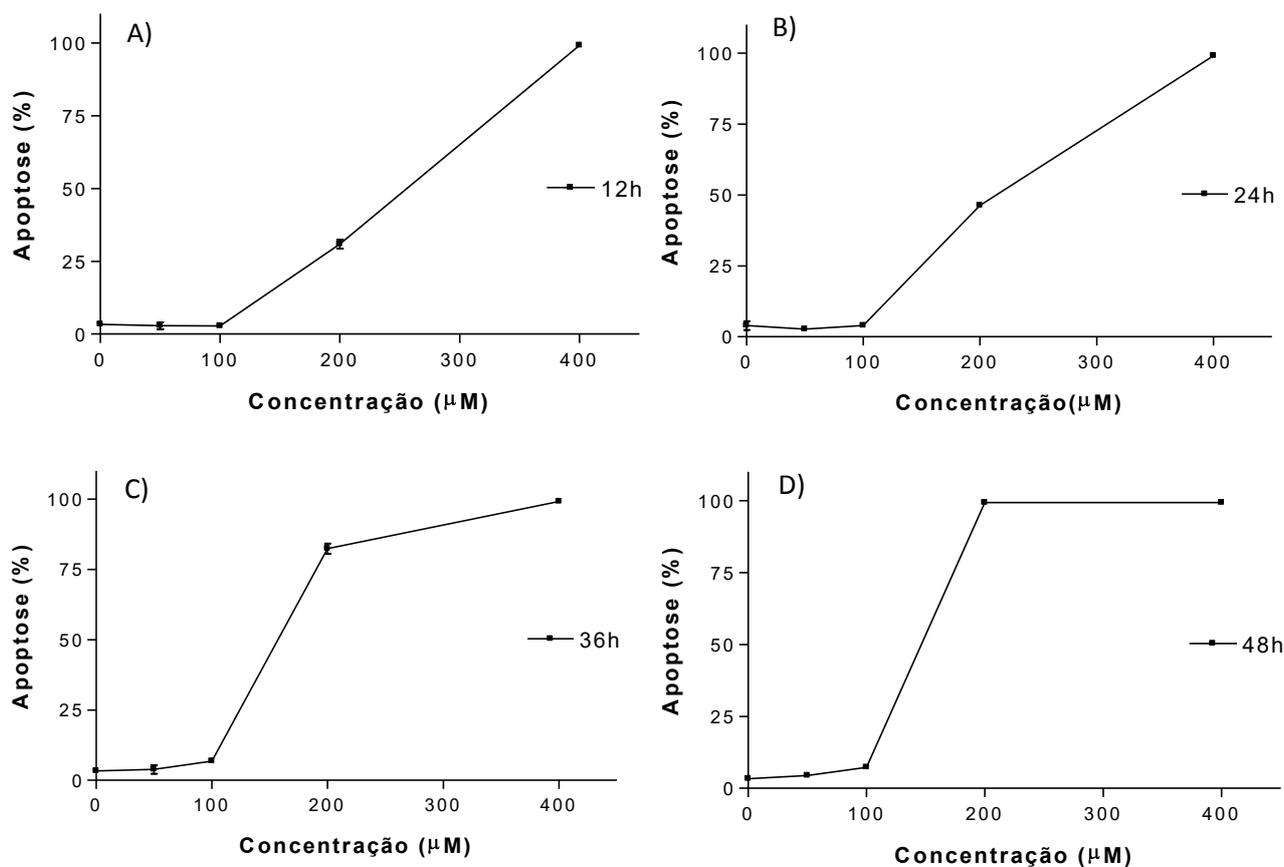


Figura 66. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl})_2]$ (4), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

O complexo $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ (**4**) apresentou alta taxa de morte celular por apoptose nas concentrações de 200 e 400 μM , frente a linhagem THP-1 (Figura 67). Na concentração de 200 μM , após 12 h de incubação o complexo promoveu 70% de morte celular por apoptose, nos demais intervalos de tempo verificou-se 100% de morte celular. Este complexo na concentração de 400 μM , promoveu 100% de morte celular por apoptose, já após 12 h de incubação. As concentrações de 50 e 100 μM para este complexo não foram eficientes e o ligante HL_4 não apresentou atividade antitumoral frente esta linhagem. Neste experimento não foram evidenciadas taxas significativas de morte por necrose para ambos os tratamentos testados (ligante HL_4 e complexo **4**). Estes resultados indicam potencialização da atividade antitumoral do ligante após complexação com sal metálico de zinco.

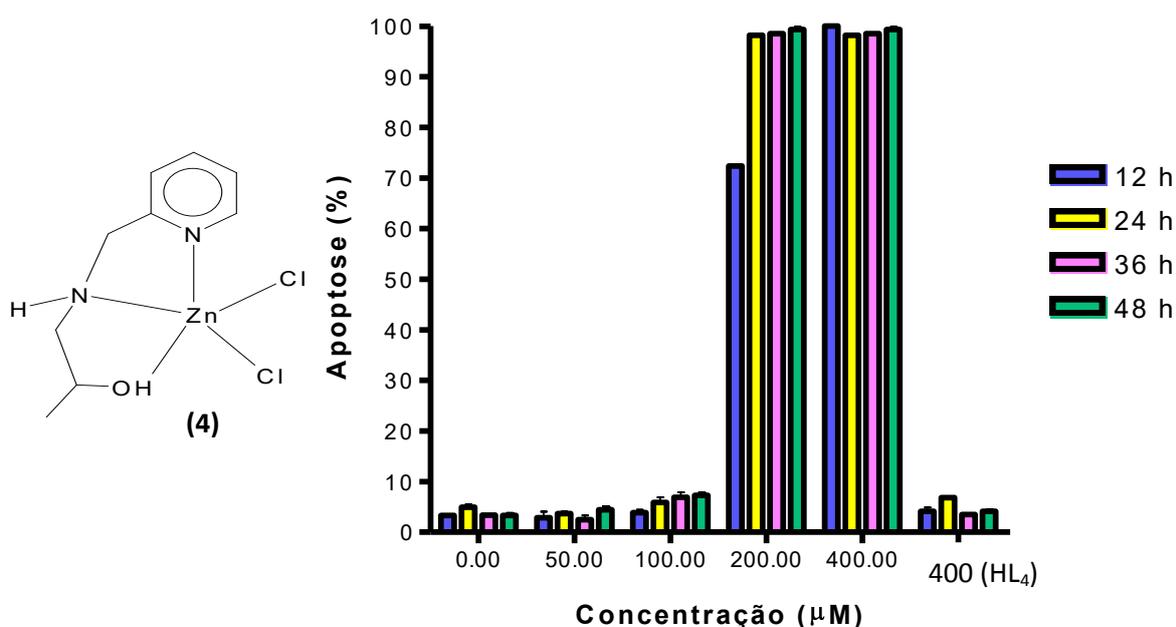


Figura 67. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_4)(Cl)_2]$ (**4**) e do ligante HL_4 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

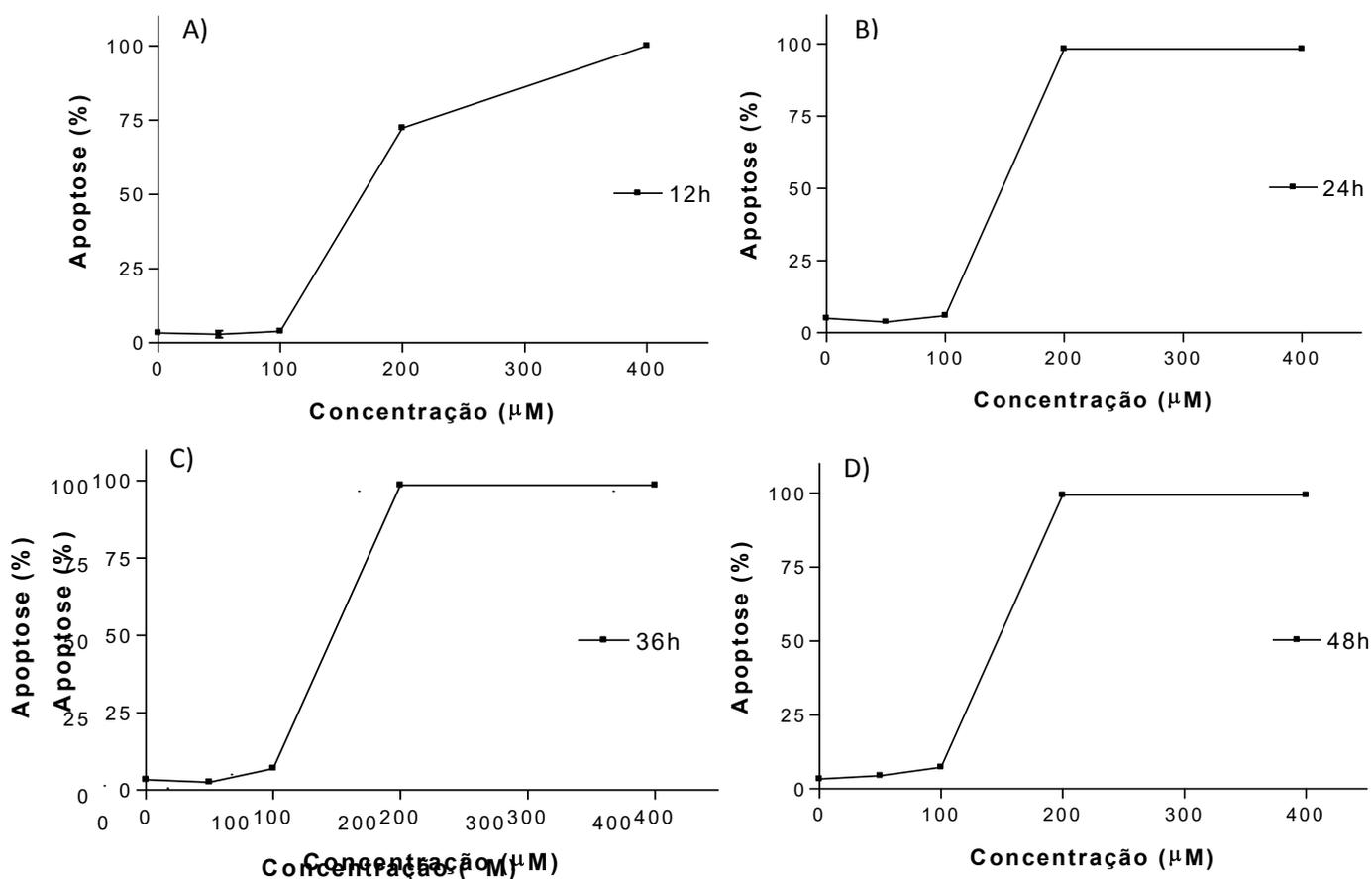


Figura 68. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl})_2]$ (**4**), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

O complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ (**5**) apresentou alta taxa de morte celular por apoptose nas concentrações de 200 e 400 µM, frente a linhagem U937 (Figura 69). Na concentração de 200 µM, o complexo promoveu 70% de morte celular por apoptose, após um período de 12 h de incubação. Nos demais intervalos de tempo (24, 36 e 48 h) verificou-se morte de 100% das células tumorais. Na concentração de 400 µM, verificou-se a morte de 100% das células por apoptose após o período de 12 h de incubação. As concentrações de 50 e 100 µM para o complexo (**5**) não foram eficientes e o ligante HL_5 não apresentou atividade antitumoral, frente esta linhagem celular na concentração testada (400 µM). Neste experimento não foram evidenciadas taxas significativas de morte por necrose para ambos os tratamentos (ligante HL_5 e complexo (**5**)). Este resultado indica potencialização da atividade antitumoral do ligante após complexação com sal metálico de zinco.

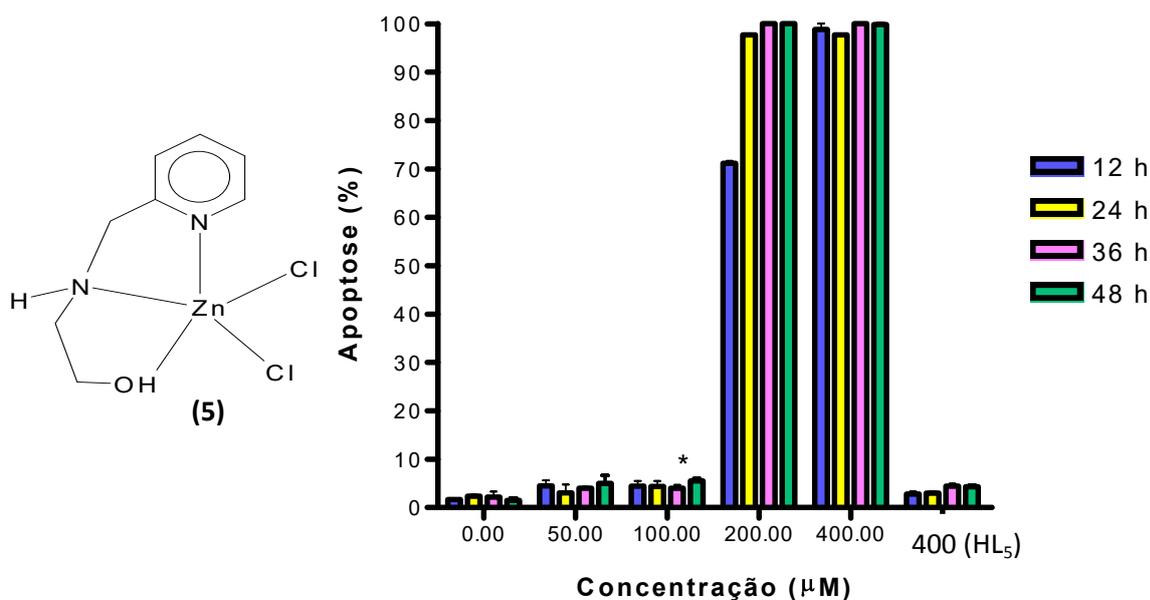


Figura 69. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (**5**) e do ligante HL₅, nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

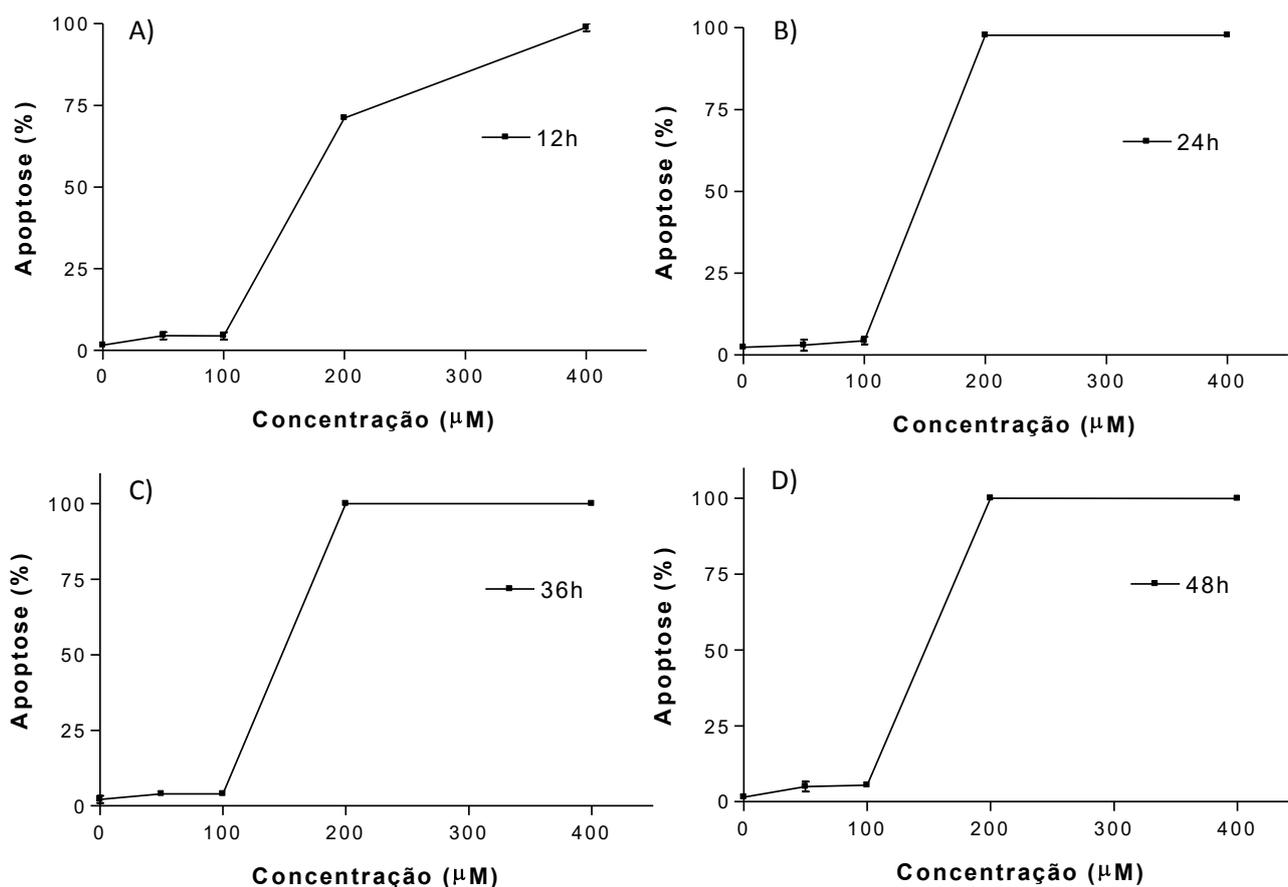


Figura 70. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (**5**), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

O complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (**5**) promoveu elevada taxa de morte celular por apoptose, frente a linhagem celular THP-1, na concentração de 400 μM (Figura 71). Nesta concentração de 400 μM promoveu 90% de morte celular por apoptose após o período de 12 h de incubação. Nos demais períodos de incubação (24, 36 e 48 h) foram observados 100% de morte celular por apoptose. Na concentração de 200 μM , foi observado uma baixa atividade antitumoral, aproximadamente de 20 a 30% de morte celular por apoptose após os períodos de 12 a 48 h de incubação. As concentrações de 50 e 100 μM para este complexo não foram eficientes para promover efeito frente esta linhagem de células leucêmicas. O ligante HL_5 não apresentou atividade antitumoral significativa. Neste experimento não foram evidenciadas taxas significativas de morte por necrose para ambos os tratamentos (ligante HL_5 e complexo **(5)**). Este resultado indica potencialização da atividade antitumoral do ligante após complexação com sal metálico de zinco.

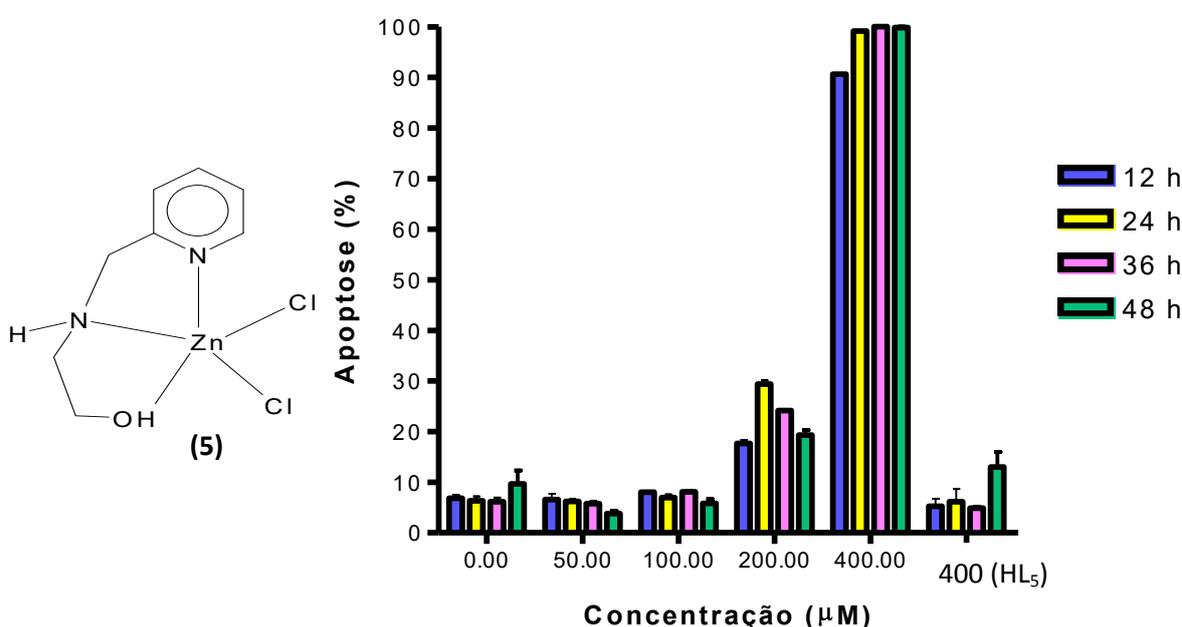


Figura 71. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(HL_5)(Cl)_2]$ (**5**) e do ligante HL_5 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

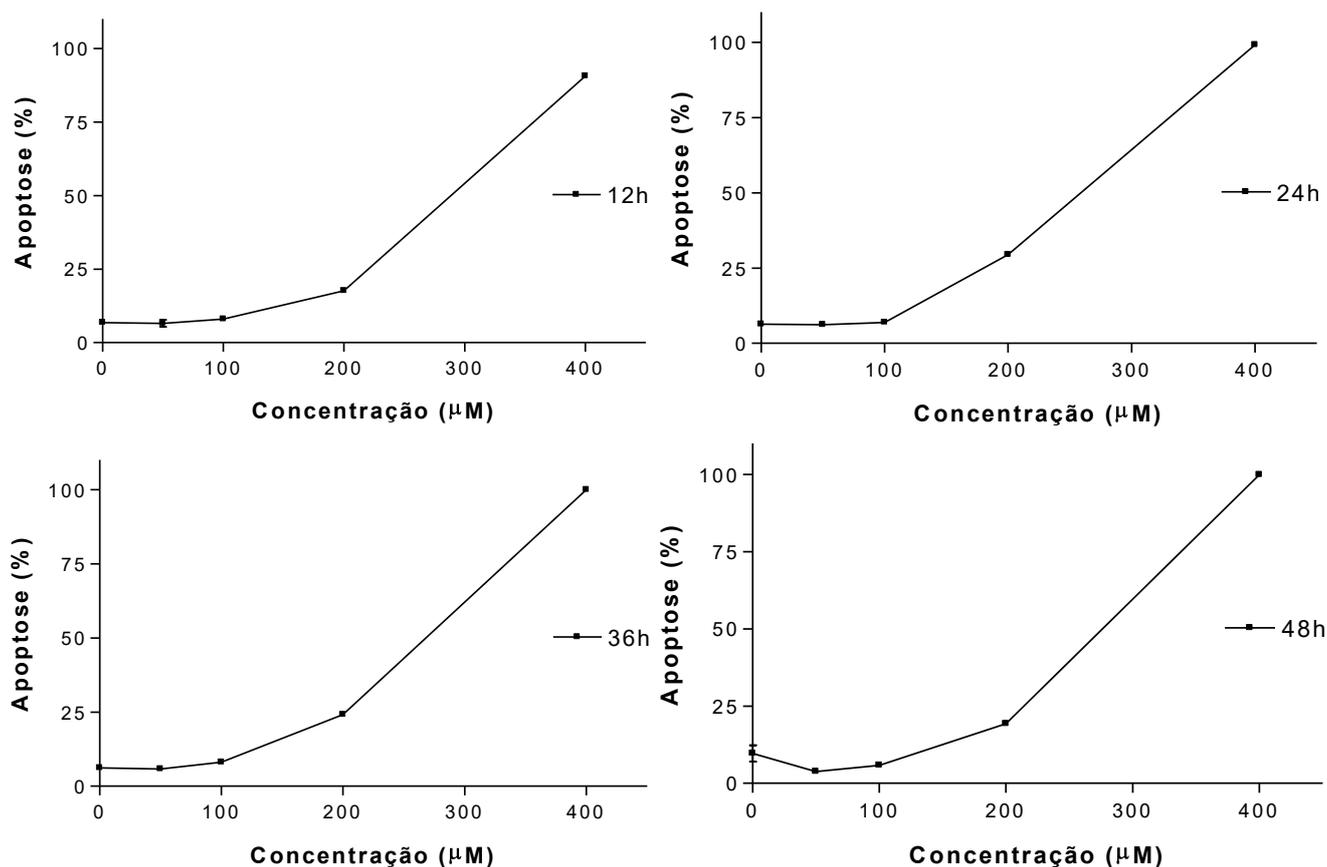


Figura 72. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[\text{Zn}(\text{HL}_5)(\text{Cl})_2]$ (**5**), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

O complexo $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}_6)(\text{Cl})]\text{Cl}$ (**6**) foi solubilizado em 100 µL de dimetilsulfóxido e água ultra-pura estéril, por isso o solvente dimetilsulfóxido foi testado frente as duas linhagens, THP-1 e U937, entretanto não apresentou atividade antitumoral. A Figura 73 apresenta o resultado de porcentagem de morte celular promovido pelo complexo (**6**) frente a linhagem celular U937. Não foram observadas atividades antitumorais significativas em nenhuma das concentrações testadas. O ligante H_2L_6 na concentração de 400 µM promoveu baixa atividade antitumoral, 27% de morte celular por apoptose após o período de 36 e 48 h de incubação. Não foram observadas taxas significativas de morte por necrose para o complexo de zinco e para o seu respectivo ligante. Este experimento indicou que não houve potencialização da atividade antitumoral do ligante após complexação com o sal de zinco.

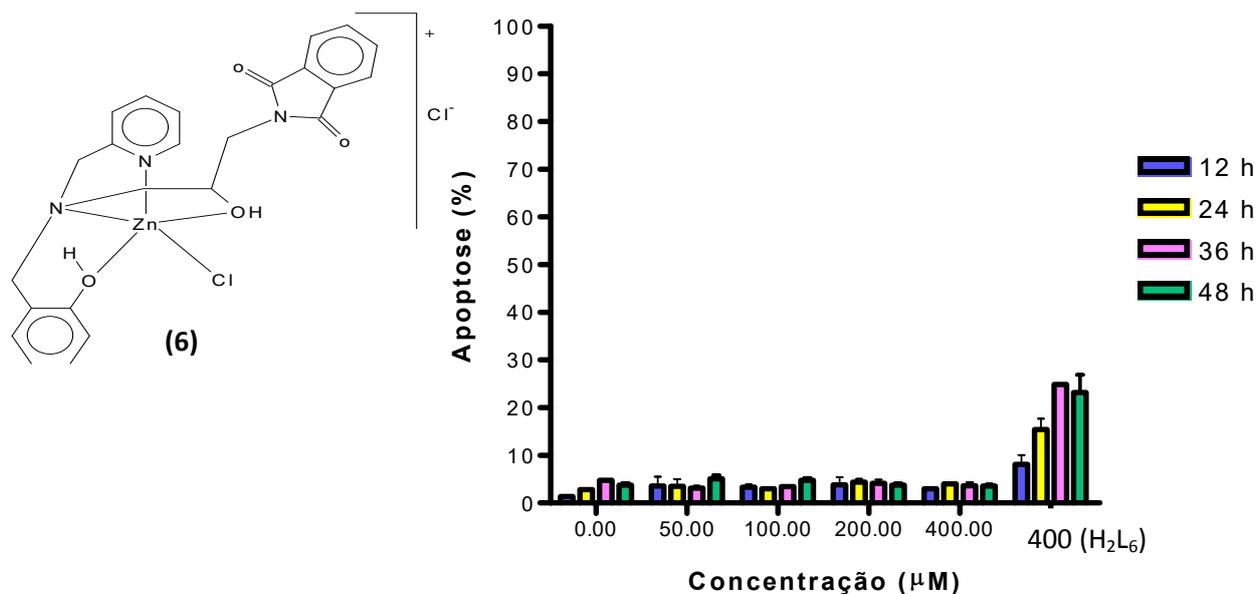


Figura 73. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl$ (6) e do ligante H_2L_6 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

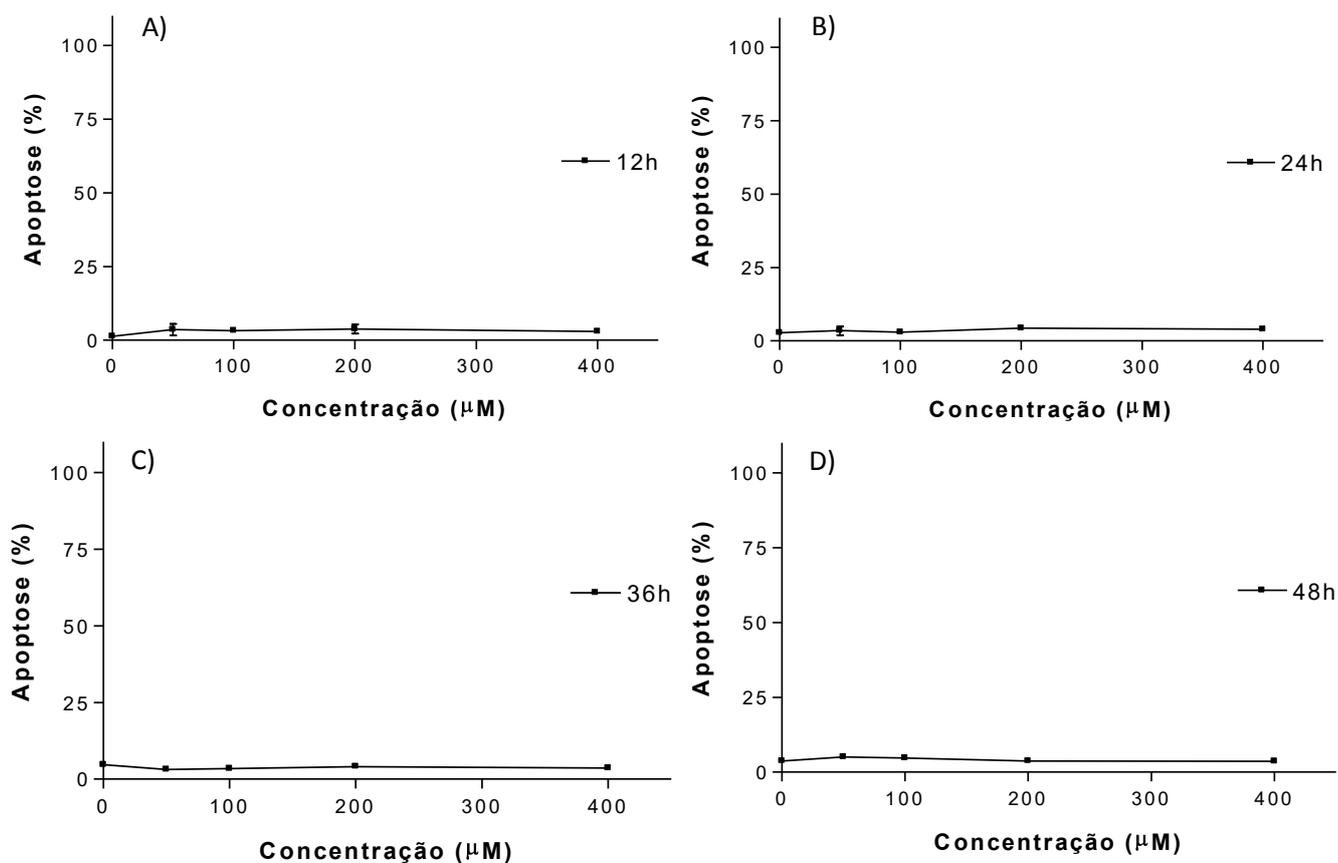


Figura 74. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células U937 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl$ (6), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

O complexo $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl$ (**6**) apresentou baixa atividade antitumoral frente a linhagem THP-1. A Figura 75 apresenta o resultado de porcentagem de morte celular promovida por este composto. Para as maiores concentrações (200 e 400 μM), foram observadas em torno de 35% de morte celular, após 24 h de incubação. Para os demais períodos de incubação não houve variação da porcentagem de morte celular por apoptose, sendo verificado cerca de 40% de morte celular. Para as concentrações de 50 e 100 μM o complexo induziu menos de 25% de apoptose para todos os períodos de incubação. O ligante H_2L_6 apresentou baixa atividade antitumoral, aproximadamente 18% de morte celular por apoptose após os períodos de 36 e 48 h de incubação. Não foram observadas taxas significativas de morte por necrose para o complexo de zinco e para o seu respectivo ligante. Apesar da baixa atividade apresentada pelo composto (**6**), os resultados indicam potencialização da atividade antitumoral do ligante após complexação com sal metálico de zinco.

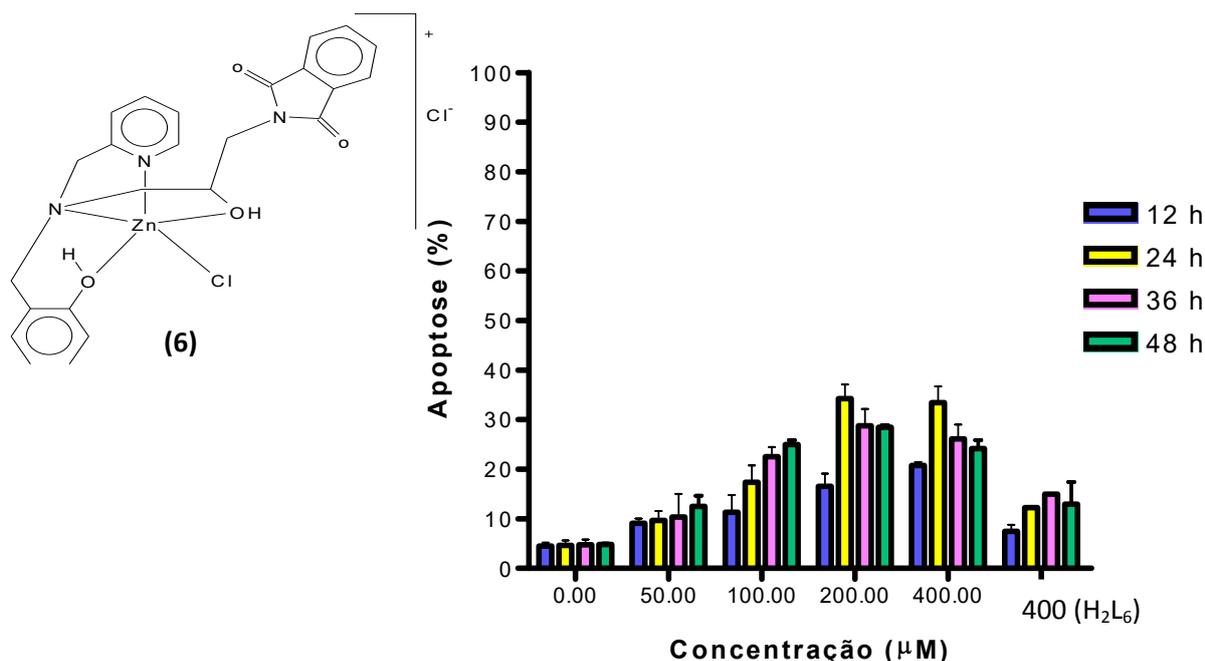


Figura 75. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl$ (**6**) e do ligante H_2L_6 , nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

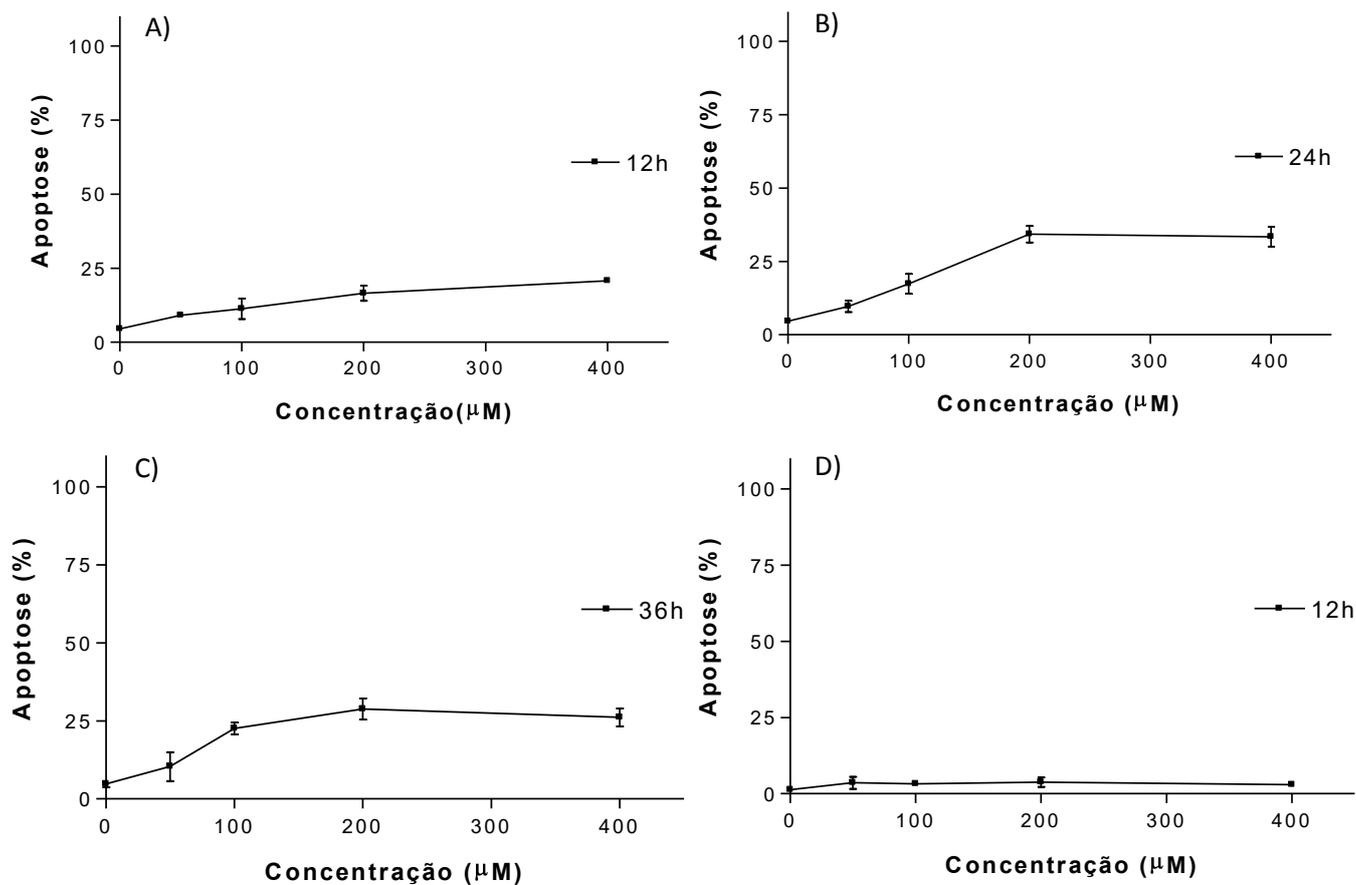


Figura 76. Avaliação da porcentagem de morte celular por apoptose. Culturas de células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações do complexo $[Zn(H_2L_6)(Cl)]Cl$ (**6**), nos tempos de: A) 12, B) 24, C) 36 e D) 48 h, sendo dois poços para cada intervalo de incubação.

Para efeito de melhor comparação entre as atividades exibidas pelos complexos e os seus respectivos ligantes frente às duas linhagens de células investigadas, foi realizado o cálculo de IC_{50} , ou seja, a concentração dos compostos que induzem a morte em 50% das células tratadas (Tabela 42).

Tabela 42. IC₅₀ (μM) para os compostos de zinco e seus respectivos ligantes após o período de 48 h de incubação.

Compostos Testados	Linhagens Leucêmicas	
	U937 (μM ±s.d.)	THP-1 (μM ±s.d.)
[Zn(L ₁)(Cl) ₂] (1)	> 400	> 400
L ₁	297,2 ± 1,0	> 400
[Zn(HL ₂)(Cl) ₂] (2)	> 400	> 400
HL ₂	> 400	> 400
[Zn(HL ₃)(Cl)] (3)	127,3 ± 1,1	214,3 ± 1,1
H ₂ L ₃	> 400	> 400
[Zn(HL ₄)(Cl) ₂] (4)	126,4 ± 1,1	126,4 ± 1,1
HL ₄	> 400	> 400
[Zn(HL ₅)(Cl) ₂] (5)	118,7 ± 6,1	231,8 ± 1,1
HL ₅	> 400	> 400
[Zn(H ₂ L ₆)(Cl)]Cl (6)	> 400	> 400
H ₂ L ₆	> 400	> 400

Analisando os valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 45, observou-se que os complexos **(1)**, **(2)** e **(6)** foram pouco ativos frente a ambas as linhagens celulares testadas, THP-1 e U937. Estes complexos apresentaram valores de IC₅₀ superiores à maior concentração testada, 400 μM. Os seus respectivos ligantes também não foram muito ativos, com exceção do ligante L₁ que apresentou atividade antitumoral frente à linhagem U937 (IC₅₀= 297,2 μM).

Os complexos **(3)**, **(4)** e **(5)** foram os mais ativos. O complexo **(3)** apesar da semelhança com os complexos **(2)** e **(6)**, apresentou moderada atividade frente a linhagem U937 (IC₅₀= 127,3 μM) porém foi menos ativo para a linhagem THP-1 (IC₅₀= 214,3 μM). Uma das diferenças estruturais entre os complexos **(2)**, **(3)** e **(6)**, se deve ao substituinte ligado ao nitrogênio amínico presente nos seus respectivos ligantes. Outra diferença encontra-se no número de íons cloretos observados nas esferas de coordenação destes complexos de zinco (Figura 77).

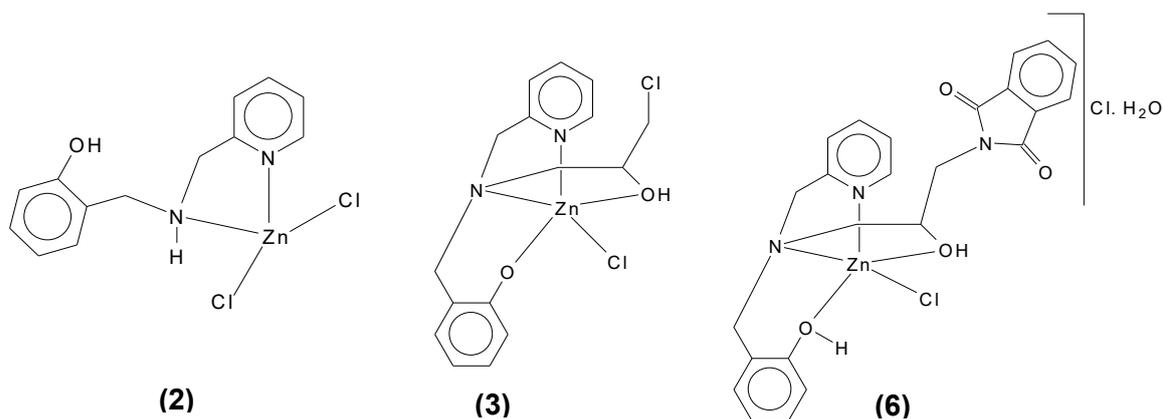


Figura 77. Estrutura dos complexos **(2)**, **(3)** e **(6)**.

Para o complexo **(4)** observou-se moderada atividade antitumoral frente às duas linhagens celulares testadas, sendo encontrados valores de IC_{50} de 126,4 μM para ambas após o período de 48 h de incubação. Este resultado indica que o melhor complexo de zinco desta série é o composto **(4)**, pois mostrou-se capaz de induzir uma considerável taxa de morte celular por apoptose nas duas linhagens investigadas, U937 e THP-1.

O complexo **(5)** apresentou considerável atividade antitumoral frente à linhagem U937 ($IC_{50} = 118,7 \mu M$), porém mostrou-se pouco ativo frente a linhagem THP-1 ($IC_{50} = 231,8 \mu M$). As diferenças nas atividades antitumorais promovidas pelos complexos **(4)** e **(5)** podem estar relacionadas à pequena diferença estrutural observada entre estes. A diferença entre eles consiste apenas na presença de um metil a mais no ligante do complexo **(4)** (Figura 78). Os ligantes H_2L_3 , HL_4 e HL_5 não apresentaram atividades antitumorais mensuráveis frente as duas linhagens celulares investigadas.

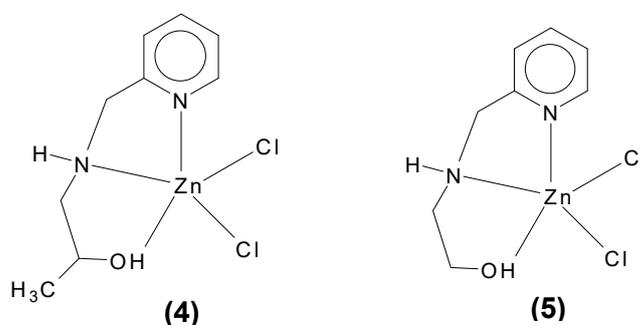


Figura 78. Estrutura dos complexos **(4)** e **(5)**.

Por meio da microscopia de fluorescência foi possível observar que os complexos de zinco e os ligantes mencionados induzem a morte de células leucêmicas humanas (THP-1 e U937) majoritariamente por apoptose, sendo o complexo **(4)** o mais promissor, com IC_{50} de 126,4 μ M para ambas as linhagens investigadas.

6.2. Resultado da microscopia eletrônica de transmissão (M. E. T.)

Foram preparadas amostras para a microscopia eletrônica de transmissão (M. E. T.) das células U937 e THP-1 após incubação com o complexo $[Zn(HL_4)(Cl_2)]$ **(4)** devido aos resultados das atividades antitumorais apresentados por este composto de coordenação. As células leucêmicas U937 foram tratadas previamente com o composto $[Zn(HL_4)(Cl_2)]$ **(4)** nas concentrações de 50, 100 e 200 μ M e foram incubadas durante os intervalos de 6 h e 12 h. Após estes períodos de incubação as células U937 foram preparadas, conforme descrito no item 5.2, para realização da avaliação da morfologia celular através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

As micrografias obtidas das células U937 utilizadas como controle, as quais não receberam nenhum tipo de tratamento, após 6 h de incubação revelaram um núcleo grande e disforme, com cromatina difusa e não condensada. As mitocôndrias e o retículo endoplasmático aparecem normais e em grande número, indicando um bom estado celular (Figura 79).

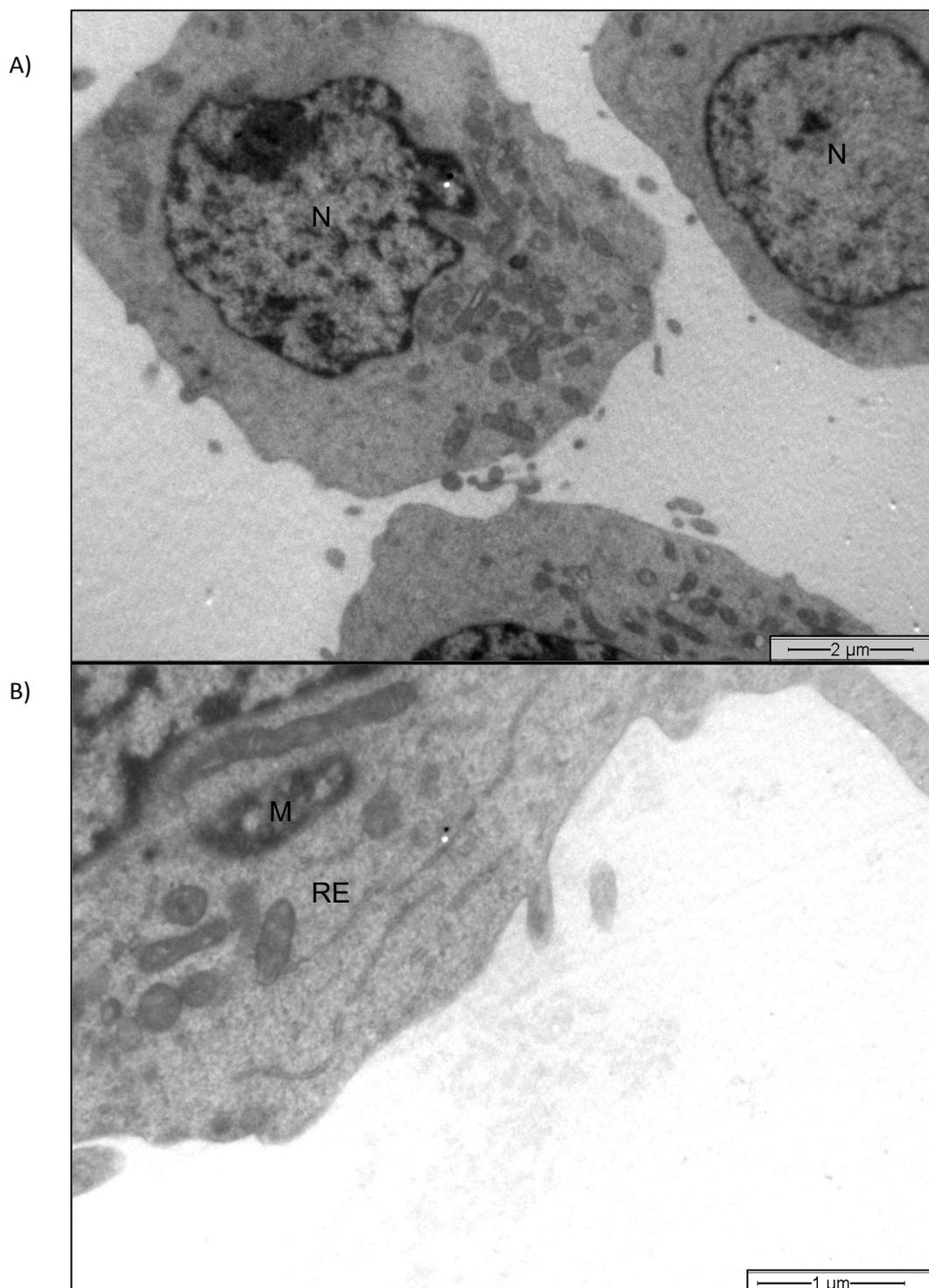


Figura 79. Células U937 visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão após 6 h de incubação. A) e B) Grupo controle. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático.

As células U937 tratadas com o composto $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl}_2)]$ (**4**) na concentração de 50 μM e após 6 h de incubação não apresentaram alterações significativas

(Figura 80). As organelas, mitocôndrias e retículo endoplasmático, continuam com aspecto normal e presentes em grande quantidade.

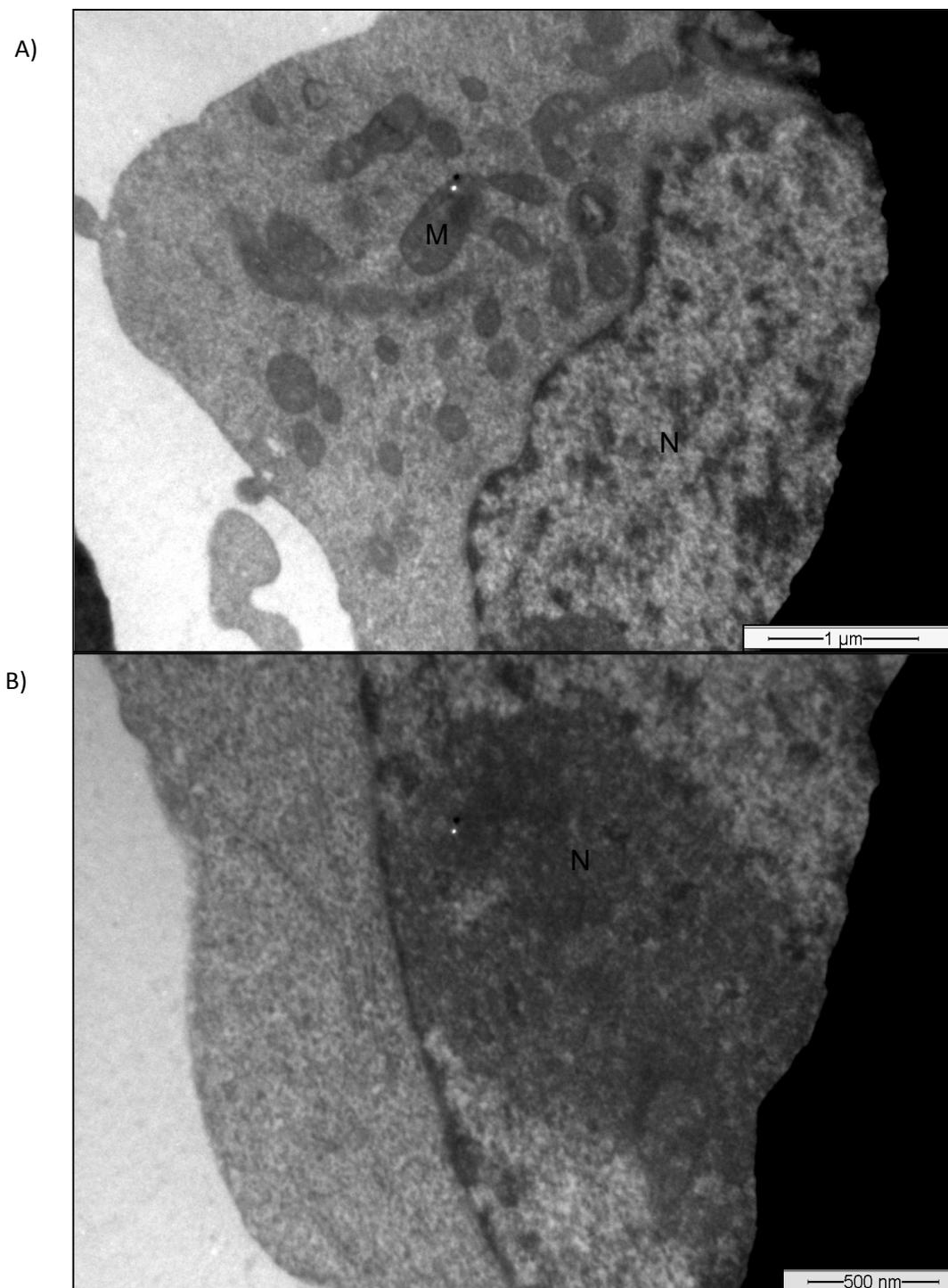


Figura 80. A) e B) Células U937, tratadas com o composto $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl}_2)]$ (**4**) na concentração de 50 μM e após 6 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático.

As micrografias obtidas das células U937, tratadas com o composto $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl}_2)]$ (**4**) na concentração de 100 μM e após 6 h de incubação, apresentaram uma possível associação entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria devido à aproximação destas duas organelas (Figura 81). Esta aproximação não foi observada nas micrografias obtidas do controle, indicando uma possível alteração celular. As mitocôndrias e o retículo endoplasmático continuam com aspecto normal e presentes em grande quantidade.

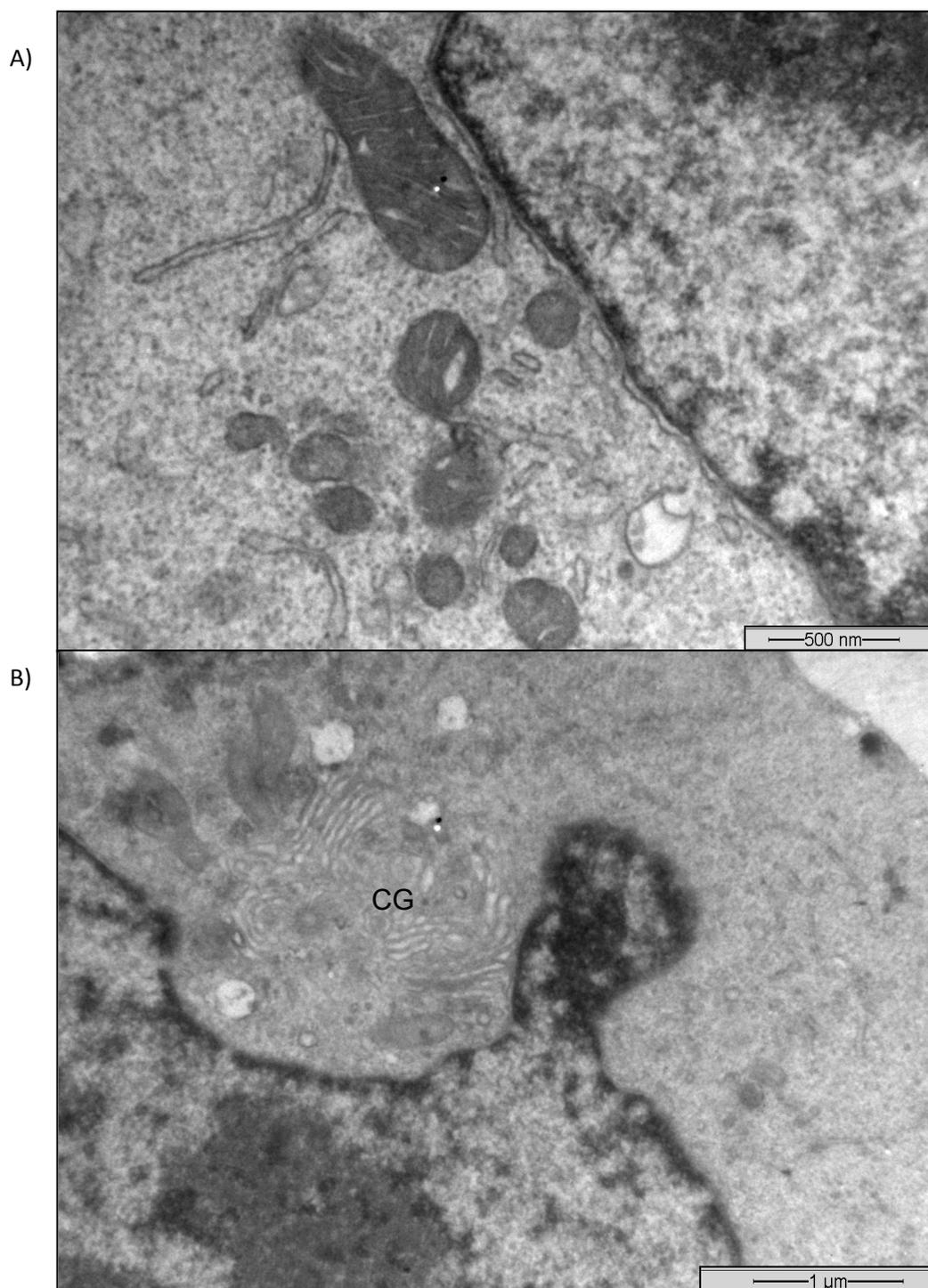


Figura 81. Células U937, tratadas com o composto $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl}_2)]$ (**4**) na concentração de $100 \mu\text{M}$ e após 6 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. A) Associação M e RE. B) CG. CG – complexo de Golgi, M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático.

As células U937, tratadas com o composto $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl}_2)]$ (**4**) na concentração de $200 \mu\text{M}$ e após 6 h de incubação, apresentaram alterações razoáveis (Figura 82). Foi possível observar a fragmentação do núcleo em algumas células, além das

organelas não estarem claramente visíveis, indicando uma menor preservação das mesmas.

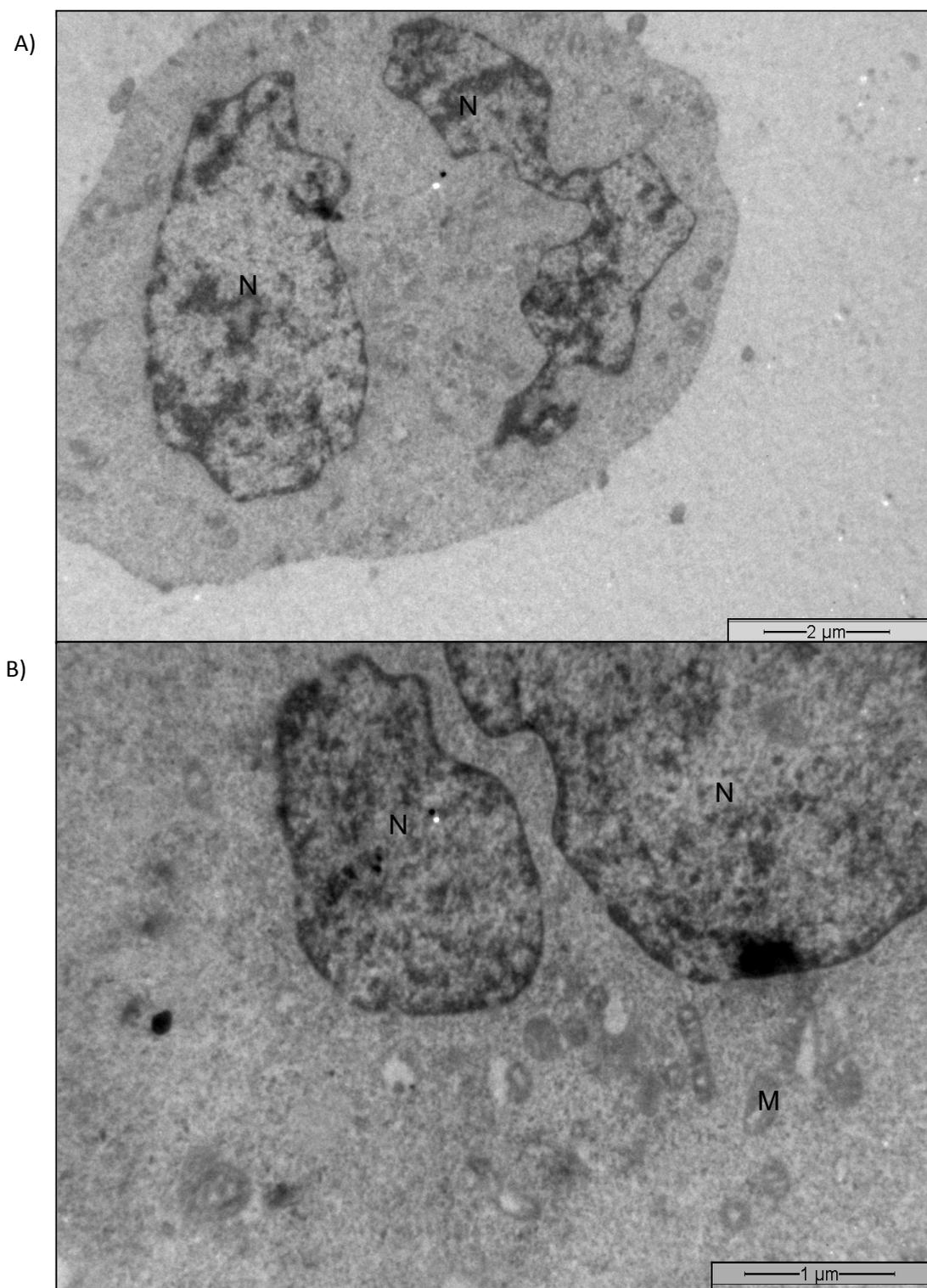


Figura 82. Células U937, tratadas com o composto $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl}_2)]$ (**4**) na concentração de $200 \mu\text{M}$ e após 6 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. A) Núcleo fragmentado. B) Ausência de RE. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático.

As micrografias obtidas das células U937 utilizadas como controle após 12 h de incubação revelaram um núcleo grande e disforme, com cromatina difusa e não condensada, similar ao observado anteriormente nas células U937 do grupo controle após 6 h de incubação. As mitocôndrias e o retículo endoplasmático aparecem normais e em grande número, indicando um bom estado celular (Figura 83).

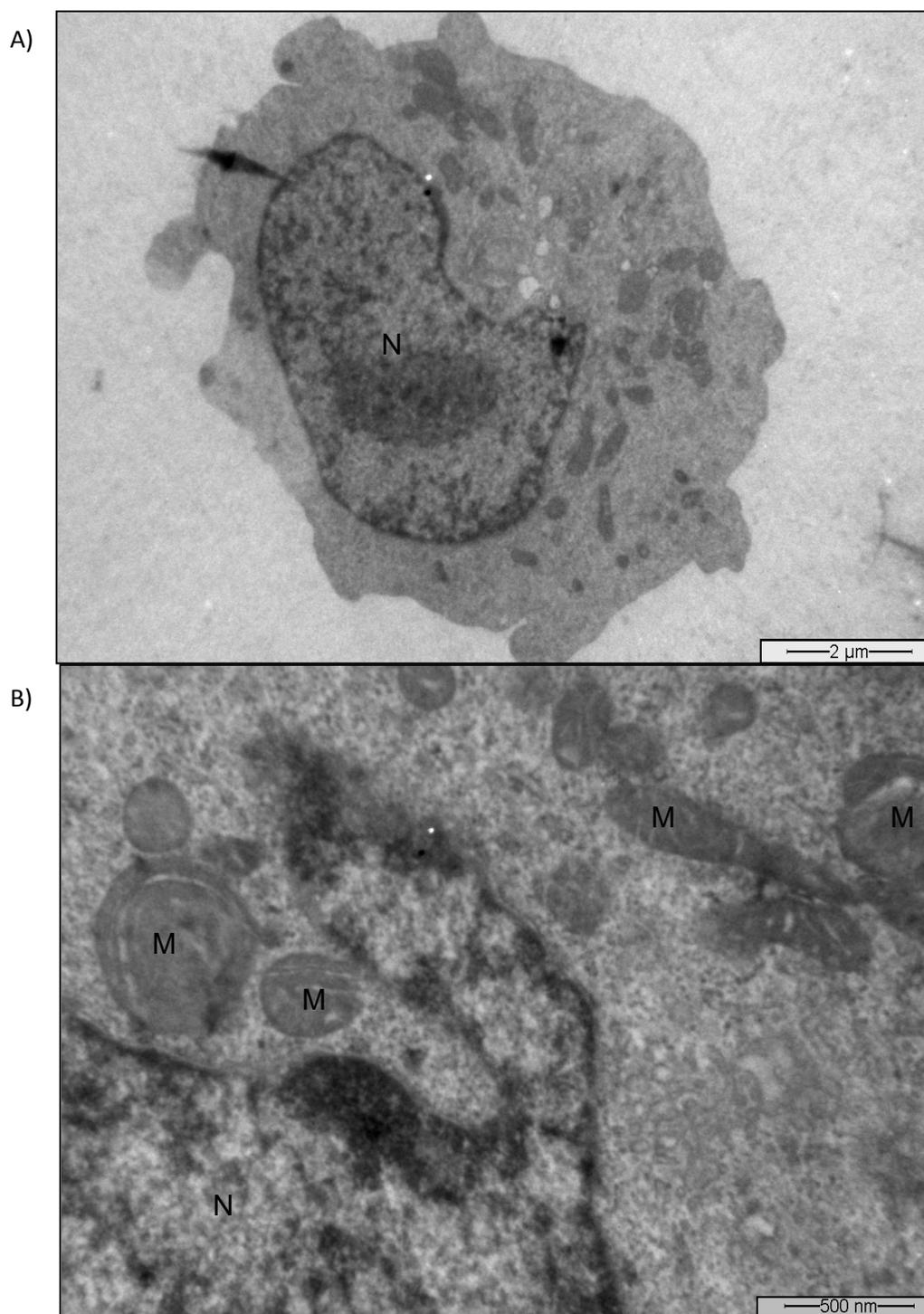


Figura 83. Células U937 visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão após 12 h de incubação. A) e B) Grupo controle. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Reticulo endoplasmático.

As células U937, tratadas com o composto $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl}_2)]$ (**4**) na concentração de $50 \mu\text{M}$ e após 12 h de incubação, não apresentaram alterações significativas (Figura 84). As mitocôndrias e o retículo endoplasmático são claramente observados, continuam com aspecto normal e presentes em grande quantidade.

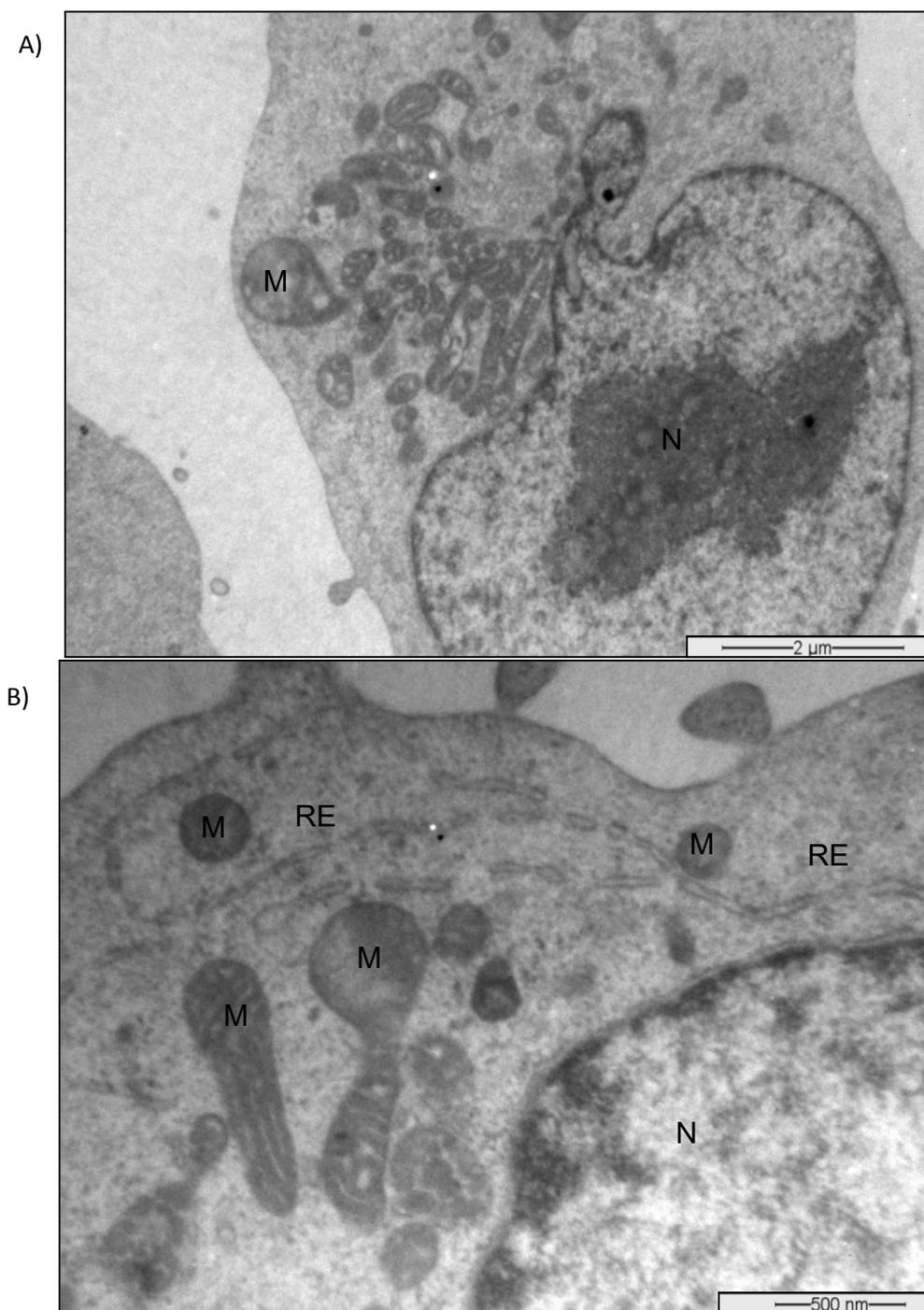


Figura 84. A) e B) Células U937, tratadas com o composto $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl}_2)]$ (**4**) na concentração de $50 \mu\text{M}$ e após 12 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático.

As micrografias obtidas das células U937, tratadas com o composto $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl}_2)]$ (**4**) na concentração de $100 \mu\text{M}$ e após 12 h de incubação, apresentaram uma maior aproximação entre as mitocôndrias e o retículo endoplasmático. Esta aproximação entre as organelas pode indicar uma associação entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria (Figura 85). As mitocôndrias e o retículo endoplasmático continuam com aspecto normal e presentes em grandes quantidades.

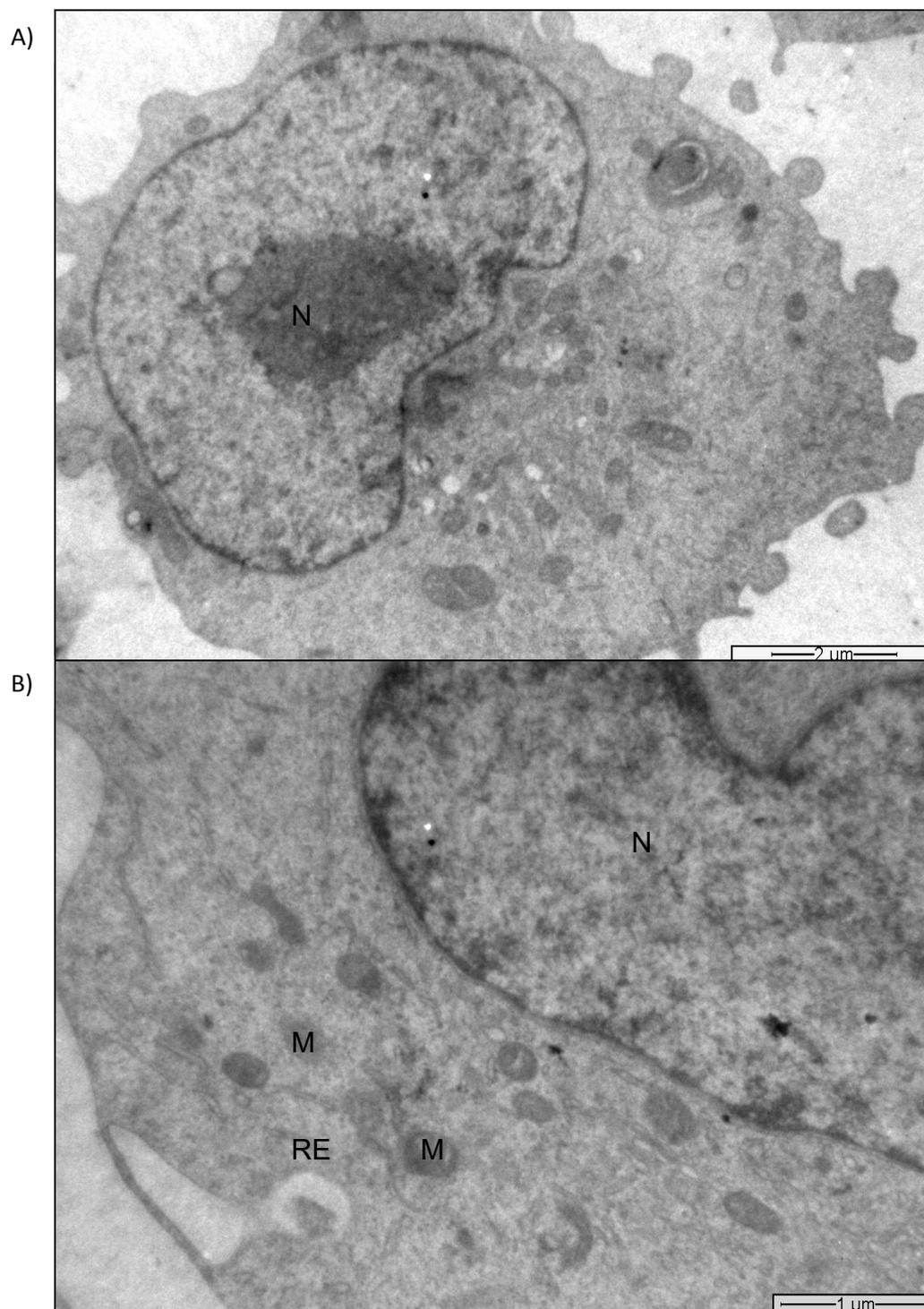


Figura 85. A) e B) Células U937, tratadas com o composto $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl}_2)]$ (**4**) na concentração de $100 \mu\text{M}$ e após 12 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático.

As células U937, tratadas com o composto $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl}_2)]$ (**4**) na concentração de $200 \mu\text{M}$ e após 12 h de incubação, apresentaram alterações significativas (Figura

86 e 87). Foi possível observar a fragmentação do núcleo, a condensação da cromatina e a presença de grande quantidade de vacúolos (Figura 86).

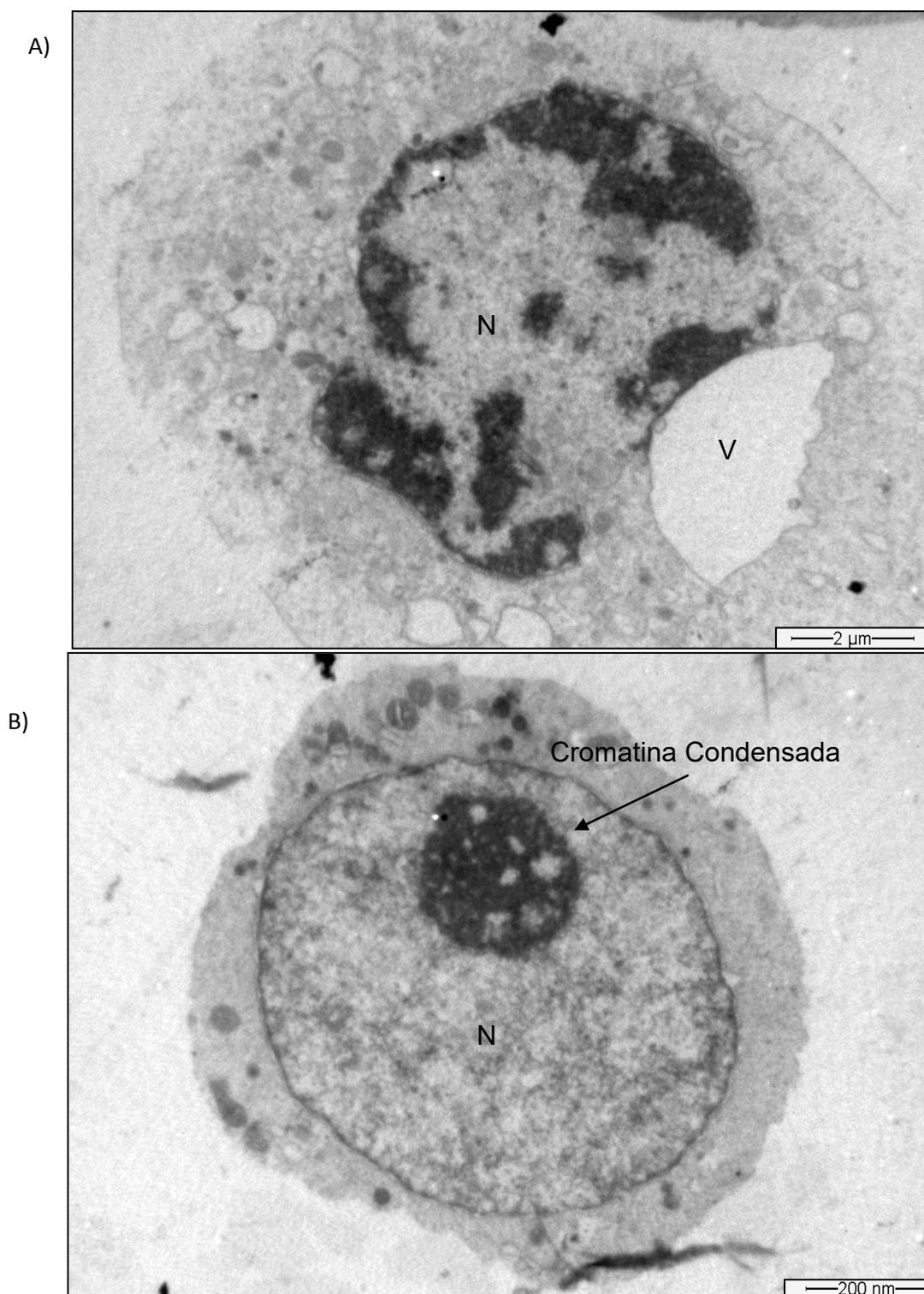


Figura 86. A) e B) Células U937, tratadas com o composto $[\text{Zn}(\text{HL}_4)(\text{Cl}_2)]$ (**4**) na concentração de $200 \mu\text{M}$ e após 12 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático, V – vacúolos.

Na Figura 87, foi observado uma possível dilatação do retículo endoplasmático além da fragmentação do núcleo, da condensação da cromatina e dos vacúolos. Isto pode estar relacionado a uma possível associação entre mitocôndria e retículo.

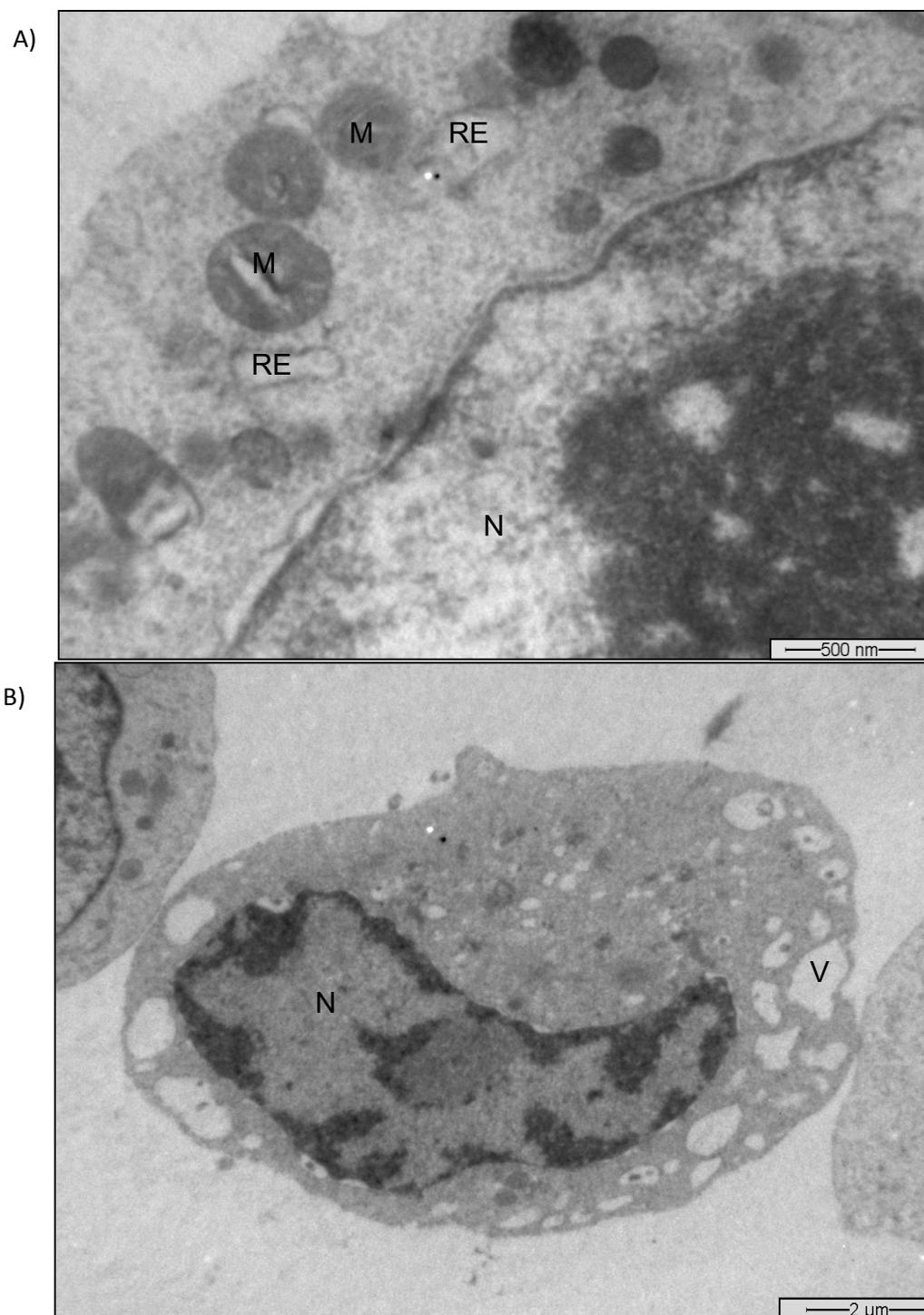


Figura 87. Células U937, tratadas com o composto $[Zn(HL_4)(Cl_2)]$ (**4**) na concentração de $200 \mu M$ e após 12 h de incubação, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. A) dilatação do RE. B) Condensação de cromatina e presença de vacúolos. M – mitocôndria, N – núcleo, RE – Retículo endoplasmático, V – vacúolos.

7. CONCLUSÕES

Conclui-se que os objetivos deste trabalho foram alcançados, uma vez que foram realizadas as sínteses, caracterizações e estudos das atividades biológicas frente à linhagens de células leucêmicas humanas (THP-1 e U937) induzida por seis complexos mononucleares de zinco, sendo cinco destes inéditos na literatura.

Todos os seis ligantes foram previamente sintetizados e caracterizados por espectroscopia de infravermelho e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono, permitindo confirmar suas obtenções e seu alto grau de pureza. As propostas de estrutura para os seis complexos de zinco puderam ser confirmadas através das técnicas de espectroscopia de infravermelho, análise elementar (C, H, e N), condutivimetria, ponto de fusão, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) e difração de raios X. Esta última análise foi utilizada para a caracterização dos complexos **(1)**, **(2)**, **(3)** e **(5)**, sendo que os dados cristalográficos para o complexo **(3)** não foram apresentados nesta dissertação, pois foram previamente publicados. Os estudos de caracterização indicaram a formação de complexos mononucleares de zinco tetracordenados e pentacoordenados, com geometria tetraédrica distorcida e piramidal de base quadrada distorcida, respectivamente.

A técnica de espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e os dados de condutivimetria, confirmaram a saída de íons cloreto das esferas de coordenação dos complexos quando em solução. Assim é possível concluir que os complexos estudados apresentam como característica a presença de posições de coordenação livres e ligantes lábeis. Dessa forma é possível que suas atividades biológicas não se relacionem diretamente as estruturas encontradas no estado sólido, sendo essa uma informação relevante na investigação destes complexos frente a outros sistemas biológicos.

Os resultados das atividades antitumorais indicaram que os complexos **(3)**, **(4)** e **(5)** induziram taxas de morte celular por apoptose significativas frente às células THP-1 e U937. Por outro lado, os complexos **(1)**, **(2)** e **(6)** não foram ativos na indução de morte celular, frente a ambas as linhagens celulares testadas. Todos os seis ligantes tiveram suas atividades estudadas frente às duas linhagens celulares na maior concentração testada (400 μ M) e não apresentaram taxas significativas de

morte celular por apoptose, com exceção do ligante L1, o qual apresentou baixa atividade antitumoral frente à linhagem U937 ($IC_{50} = 297,2 \mu M$).

Os resultados obtidos pela microscopia eletrônica de transmissão (M. E. T.) indicam alterações morfológicas nas células U937 após tratamento com o complexo **(4)** na concentração de $200 \mu M$ e 12 h de incubação. Estes estudos possuem um caráter inicial na busca de novos fármacos capazes de serem empregados no tratamento contra o câncer.

8. PERSPECTIVAS

Este trabalho apresentou a síntese, caracterização e investigação das atividades antitumorais de seis complexos de zinco frente às linhagens leucêmicas humanas, U937 e THP-1. Os complexos **(3)**, **(4)** e **(5)** apresentaram atividades antitumorais razoáveis frente a ambas linhagens cancerígenas testadas. No futuro estes complexos talvez sejam agentes promissores no combate contra o câncer. Para isto muitos outros estudos deverão ser realizados para melhor investigação do potencial das atividades antitumorais e dos mecanismos de ação destes complexos de zinco.

Este estudo foi restrito a duas linhagens de células leucêmicas, por isso é fundamental a ampliação desta investigação frente a um número cada vez maior de linhagens de células tumorais, causadoras de diferentes tipos de câncer.

Outras alternativas para o desdobramento deste trabalho seriam estudos de clivagem de DNA plasmidial em diferentes condições, avaliação da toxicidade destes complexos de zinco em células normais do sangue periférico humano, estudos envolvendo caspases e citocromo C, além dos testes in vivo. Todos estes estudos serão imprescindíveis para a elucidação do mecanismo de ação destes complexos em células cancerígenas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BALES, C. B.; PITIÉ, M.; MEUNEIR, B.; GREENBERG, M. M. J. A Minor Groove Binding Copper-Phenanthroline Conjugate Produces Direct Strand Breaks via β -Elimination of 2-Deoxyribonolactone, **Am. Chem. Soc.**, v. 124, p. 9062–9063, 2002.

BISHOP, J. M.; WEINBERG, R. A. **Molecular Oncology**. Scientific American: Nova York, 1996.

BRABEC, V.; KASPARKOVA, J. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs, **Drug Resistance Updates**, v. 5, p. 147-161, 2002.

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

BURROWS, C. J.; MULLER, J. G. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission, **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1109-1151, 1998.

CHABNER, B.A.; LONGO, D.L. **Cancer chemotherapy and biotherapy**. 2^a ed., Lippincott-Raven: Filadélfia, 1996

CHEN, X.; TANG, L.; SUN, Y.; QIU, P., LIANG, G. Synthesis, characterization and antitumor activities of transition metal complexes with isoflavone, **J. Inorg. Biochem.**, v. 104, p. 379-384, 2010.

COLIGAN, J.E., KRVISBEEK, A.M., MARGULIES, D.H., SHEVACH, E.M. E STROBER, W. **Current Protocols in Immunology**. New York: Green Publishing e Wiley-Interscience, 1992.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6^a ed., Guanabara: Rio de Janeiro, p.1251, 2000.

COWAN, J. A. Chemical nucleases, **Curr. Opinion in Chem. Biol.**, v.5, p. 637-642, 2001.

DEMERTZI-KOVALA, D.; YADAV, N.P.; WIECEK, J.; SKOULIA, S.; VARADINOVA, T.; DEMERTZIS, M. A. Zinc(II) complexes derived from pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazone and (1E)-1-pyridin-2-ylethan-1-one thiosemicarbazone. Synthesis, crystal structures and antiproliferative activity of zinc(II) complexes, **J. Inorg. Biochem**, v. 100, p. 1558-1567, 2006.

FERNANDES, C.; PARRILHA, G. L.; LESSA, J. A.; SANTIAGO, L. J. M.; KANASHIRO, M. M.; BONIOLO, F. S.; BORTOLUZZI, A.J.; VUGMAN, N. V.; HERBST, M. H., HORN JR., A. Synthesis, crystal structure, nuclease and in vitro antitumor activities of a new mononuclear copper(II) complex containing a tripodal N3O ligand, **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, p. 3167-3176, 2006.

FERNANDES C., HORN A. Jr, 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, **J. Inorg. Biochem.**, v. 104(11), p. 1214-23, 2010.

FERREIRA, L. C.; FILGUEIRAS, C. A. L.; VISENTIN, L. C.; BORDINHÃO, J.; HORNER, M.; Synthesis and Structural Characterization of Zn(II) alpha-diimine Complexes with Chloride and Thiocyanate Co-Ligands. Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie (1950), **Z. Anorg. Allg.**, v. 635, p. 1225-1230, 2009.

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

GRIFFITHS, A.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à Genética**. 7^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer, **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 331, 2002.

HECHT, S. M. **Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids**. New York: Oxford University Press, 1996.

HORN, A. Jr. **Síntese e Caracterização de Novos Complexos de Ferro com Ligantes não Simétricos N,O-Doadores como Modelos para o Sítio Ativo das Fosfatases Ácidas Púrpuras**. Tese (Doutor em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

HORN JR., A.; NEVES, A.; VENCANTO, I.; DRAGO, V.; ZUCCO, C.; WERNER, R.; HAASE, W. A. New Dinucleating N,O Donor Ligand (H₂BPCINOL) and the Structural and Magnetic Properties of two Diiron Complexes with the di- μ -Alkoxo Motif, **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 11, p. 7-10, 2000.

HORN JR., A.; VENCANTO, I.; BORTOLUZZI, A. J.; HORNER, R.; SILVA, R. A. N.; SZPOGANICZ, B.; DRAGO, V.; TEREZI, H.; OLIVEIRA, M. C. B.; WERNER, R.; HAASE, W.; NEVES, A. Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H₂O/OH⁻ groups as models for purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage, **Inorg. Chim. Acta.**, v. 358, p. 339-351, 2005.

JIANG, J.; TANG, X.; DOU, W.; ZHANG, H.; LIU, W.; WANG, C.; ZHENG, J. Synthesis and characterization of the ligand based on benzoxazole and its transition metal complexes: DNA-binding and antitumor activity, **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 583-591, 2010.

LEWIS, E. A.; TOLMAN, W. B. Reactivity of Dioxygen-Copper Systems, **Chem. Rev.**, v. 104, p. 1047, 2004.

MACHADO, A. E. D. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas, **Química. Nova**, v. 23, p. 237, 2000.

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

NEIDLE, S. DNA minor-groove recognition by small molecules, **Nat. Prod. Rep.**, v. 36, p. 291, 2001.

NEIDLE, S.; KELLAND, L. R.; TRENT, J. O.; SIMPSON, I. J.; BOYKIN, D. W.; KUMAR, A.; WILSON, W. D. Cytotoxicity of bis(phenylamidinium)furan Alkyl derivatives in human tumour cell lines: Relation to dna minor groove binding, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 7, p. 1403, 1999

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.

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

NEVES, A.; TERENCEZI, H.; HORNER, R.; HORN JR., A.; SZPOGANICZ, B.; SUGAI, J. Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a Dinuclear Iron (II) Complex, **Inorg. Chem. Com.**, v. 4, p. 338-391, 2001.

NEVES A.; XAVIER, R. F.; CASELLATO, A.; PERALTA, A. R., BORTOLUZZI, J. A.; SZPOGANICZ, B.; SEVERINO, S. P.; TERENCEZI, H.; TOMKOWICZ, Z.; OSTROVSKY, S.; HAASE, W.; OZAROWSKI, A.; KRZYSTEK, J.; TELSER, J.; SCHENK, G. Unsymmetrical Fe^{III}Co^{II} and Ga^{III}Co^{II} Complexes as Chemical Hydrolases: Biomimetic Models for Purple Acid Phosphatases (PAPs), **Inorg. Chem.**, v. 48, p. 7905-7921, 2009.

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

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: Uma Nova Alternativa para o Tratamento de Tumores Sólidos, **Química Nova**, v. 25, p. 976, 2002.

PARRILHA, G. L; FERNANDES, C.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B.; PICH, C. T.; TERENCEZI, H.; HORN Jr., A. A new m-oxo di-iron complex with suitable features to mimic metallohydrolase activity: X-ray molecular structure, aqua solution

behavior and nuclease activity of the complex [Fe(HPCINOL)(SO₄)]-m-oxo, **Inorganic Chemistry Communications**, v. 11, p. 643-647, 2008.

PEREIRA-MAIA, E. C.; TERENZI, H.; PICH, C. T.; VIEIRA, L. Q.; BOTELHO, F. V.; SILVEIRA, J. N.; PAULA, F. C. S.; SILVA, P. P.; NEVES, A.; REY, N. A. A synthetic dinuclear copper(II) hydrolase and its potential as antitumoral: Cytotoxicity, cellular uptake and DNA cleavage, **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 1323-1330, 2009.

PUCCI, D.; CRISPINI, A.; MARCHETTI, F.; PETTINARI, C.; PANNO, M. L.; GHEDINI, M.; BERNARDINI, S.; BELLUSCI, A.; PALMA, M.; VALENTINI, A.; LIGUORI, P. Non-classical anticancer agents; synthesis and biological evaluation of zinc(II) heteroleptic complexes, **Dalton Transactions**, v. 39, p. 4205-4212, 2010.

RODRIGUES, R. F.; LOPES, J. C. D.; MONTANARI, C. A. A. Study on Pneumocystis carinii Topoisomerases bis-Benzimidazoles, **Quant. Struct.-Act.Relat**, v. 19, p. 173, 2000.

SALMONM, S.E. **Farmacologia Básica & Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 629-655, 1998.

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

SPENCE, R. A. J.; Jonhston, P.G. **Oncology**. Oxford: University Press, 2001.

SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes, **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, p. 337-347, 2001.

STRIEGLER, S., DITTEL, M. A Sugar's Choice: Coordination to a Mononuclear or a Dinuclear Copper(II) Complex?, **Inorganic Chemistry**, v. 44, p. 2728-2733, 2005.

ZHANG, Q.; ZHANG, F.; WANG, W.; WANG, X. Synthesis, crystal structure and DNA binding studies of a binuclear copper(II) complex with phenanthroline, **J. Inorg. Biochem.**, v. 100, p. 1344-1352, 2006.