

5.

Avaliação do potencial citotóxico de 2-piridiniformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe(III) utilizando *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* tem boa correlação com a atividade citotóxica em alguns tipos de tumores humanos [49]. Desse modo, avaliamos o potencial citotóxico de 2-piridiniformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe(III) utilizando esse ensaio.

[Fe(HAm4Ph)Cl₃] (**4**) não foi testado porque os ensaios são feitos em solução DMSO/H₂O e a medida de condutividade em H₂O desse complexo mostrou que os íons cloreto presentes na esfera de coordenação do ferro são substituídos por moléculas de água. Como o grau de substituição pode variar e o DMSO também pode coordenar-se, seria difícil identificar a estrutura do composto responsável pela toxicidade, caso essa fosse confirmada.

Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração de cada composto. Além disso, cada droga foi testada, no mínimo, três vezes, totalizando um mínimo de 9 ensaios por concentração de composto. As Tabelas 5.1 a 5.6 listam os resultados obtidos em cada ensaio.

Tabela 5.1 - Resultados de toxicidade para a 2-piridiniformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH)

Ensaio	Concentração (μmol L ⁻¹)	Número de organismos	Média de organismos mortos
1	76,92	10	10
	64,61	10	10
	52,31	10	10
	38,46	10	8
	27,69	10	4
2	92,31	10	7
	74,36	10	5
	47,18	10	3
	30,77	10	2
	17,95	10	1
3	76,92	10	9
	58,97	10	9
	42,05	10	3
	30,77	10	3
	12,82	10	0

Tabela 5.2 - Resultados de toxicidade para a N(4)-metil 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4Me)

Ensaio	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Número de organismos	Média de organismos mortos
1	43,06	10	9
	34,4	10	9
	25,8	10	8
	17,2	10	2
	8,6	10	0
2	71,7	10	10
	58,4	10	10
	49,3	10	8
	26,3	10	4
	12	10	0
3	74,2	10	10
	59,8	10	10
	47,8	10	8
	28,7	10	7
	19,1	10	0

Tabela 5.3 - Resultados de toxicidade para a N(4)-etil 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4Et)

Ensaio	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Número de organismos	Média de organismos mortos
1	69,96	10	10
	55,96	10	10
	41,97	10	8
	27,98	10	1
	13,99	10	0
2	44,84	10	9
	35,87	10	7
	26,91	10	2
	17,94	10	0
	8,97	10	0
3	65,47	10	10
	53,81	10	10
	38,11	10	7
	26,91	10	2
	17,94	10	0

Tabela 5.4 - Resultados de toxicidade para o complexo $[\text{Fe}(\text{2Am4DH})_2]\text{Cl}$ (1)

Ensaio	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Número de organismos	Média de organismos mortos
1	40,02	10	9
	33,62	10	4
	27,22	10	3
	20,01	10	0
	13,59	10	0
2	31,26	10	8
	25,01	10	1
	18,76	10	1
	12,51	10	0
	6,25	10	0
3	41,69	10	8
	31,26	10	7
	25,01	10	3
	18,76	10	0
	10,42	10	0

Tabela 5.5 - Resultados de toxicidade para o complexo $[\text{Fe}(\text{2Am4Me})_2]\text{Cl}$ (2)

Ensaio	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Número de organismos	Média de organismos mortos
1	36,6	10	10
	30,5	10	10
	24,4	10	10
	18,3	10	9
	12,2	10	1
2	29,9	10	9
	23,6	10	7
	18,1	10	2
	12,2	10	0
	5,9	10	0
3	18	10	10
	14,9	10	10
	12,02	10	10
	9	10	9
	6	10	2

Tabela 5.6 - Resultados de toxicidade para o complexo $[\text{Fe}(\text{2Am4Et})_2]\text{Cl}$ (3)

Ensaio	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Número de organismos	Média de organismos mortos
1	148,52	10	10
	117,53	10	2
	86,34	10	1
	52,25	10	1
	37,32	10	0

Esses resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o PROBIT [50], que forneceu os valores de DL_{50} (dose letal para 50% da

população). Quanto menor o valor de DL_{50} , mais tóxico é o composto frente a um organismo-teste, e maior é sua atividade citotóxica, sugerindo maior potencial como antitumoral.

A Tabela 5.7 mostra, para as 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de Fe(III), os valores de DL_{50} e os limites de confiança obtidos da média das triplicatas para cada ensaio de toxicidade, assim como, a média dos valores de DL_{50} , o desvio padrão e a covariância (%).

Tabela 5.7 - Valores de DL_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$), limites de confiança e covariância para as 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de Fe(III)

Composto	$DL_{50} \pm DP$	Limite de confiança
H2Am4DH	$34,68 \pm 2,57$ $36,56 \pm 4,40$ $34,01 \pm 2,58$	$28,75 < LD < 39,51$ $26,34 < LD < 45,25$ $28,00 < LD < 38,85$
Média $DL_{50} \pm DP$ CV (%)	$35,08 \pm 3,18$ 9,06	
H2Am4Me	$26,18 \pm 1,61$ $30,02 \pm 2,18$ $29,61 \pm 2,74$	$22,83 < DL < 29,37$ $25,36 < DL < 34,36$ $23,47 < DL < 35,5$
Média $DL_{50} \pm DP$ CV (%)	$28,60 \pm 2,18$ 7,62	
H2Am4Et	$35,58 \pm 2,23$ $33,75 \pm 1,48$ $33,51 \pm 1,22$	$30,39 < DL < 40,81$ $30,56 < DL < 36,88$ $30,94 < DL < 36,04$
Média $DL_{50} \pm DP$ CV (%)	$34,28 \pm 1,64$ 4,78	
[Fe(2Am4DH) ₂]Cl (1)	$32,52 \pm 1,71$ $28,06 \pm 1,84$ $29,80 \pm 1,99$	$28,84 < LD < 37,12$ $24,75 < LD < 35,34$ $25,63 < LD < 34,95$
Média $DL_{50} \pm DP$ CV (%)	$30,13 \pm 1,85$ 6,14	
[Fe(2Am4Me) ₂]Cl (2)	$14,93 \pm 0,89$ $18,18 \pm 0,91$ $11,19 \pm 0,99$	$12,92 < DL < 17,15$ $16,22 < DL < 20,00$ $9,03 < DL < 13,09$
Média $DL_{50} \pm DP$ CV (%)	$14,77 \pm 0,93$ 6,30	
[Fe(2Am4Et) ₂]Cl (3)	> 90	

DL_{50} = dose letal para 50% da população, DP = desvio padrão, CV = covariância.

Observa-se que, em geral, não houve grandes variações nos valores de DL_{50} entre as replicatas de um mesmo composto. Os coeficientes de variação das replicatas variaram entre 4,79 e 9,06 %.

Sabe-se pela literatura que os resultados dos testes de toxicidade variam consideravelmente. Em trabalho desenvolvido com *Lytechinus variegatos* [51] foi encontrado um coeficiente de variação de 40,3% entre testes de toxicidade realizados com embriões. Outros autores relatam índices de variação em torno de 30%. Portanto, os índices de variação obtidos nesse trabalho são considerados aceitáveis, indicando que a metodologia utilizada forneceu dados que podem ser considerados reprodutíveis.

A Tabela 5.8 resume os resultados mostrando o valor médio de DL_{50} para os compostos estudados. Verifica-se que H2Am4DH, H2Am4Me e H2Am4Et mostraram-se tóxicos nas concentrações de $35,08 \mu\text{mol L}^{-1}$; $28,60 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $34,28 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os complexos (1) e (2) apresentaram toxicidade nas concentrações de $30,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $14,77 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O complexo (3) não apresentou toxicidade até a concentração de $90 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabela 5.8 - DL_{50} (valor médio) para as 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de Fe(III)

	$DL_{50} + DP (\mu\text{mol L}^{-1})^*$
H2Am4DH	$35,08 \pm 3,18$
[Fe(2Am4DH) ₂]Cl (1)	$30,13 \pm 1,85$
H2Am4Me	$28,60 \pm 2,18$
[Fe(2Am4Me) ₂]Cl (2)	$14,77 \pm 0,93$
H2Am4Et	$34,28 \pm 1,64$
[Fe(2Am4Et) ₂]Cl (3)	> 90
Lapachol**	281

DL_{50} = dose letal para 50% da população, DP = desvio padrão

*valor médio; ** droga de referência

As tiossemicarbazonas e os complexos (1) e (2) apresentaram toxicidade aguda significativa, em baixas concentrações, frente à *Artemia salina*, quando

comparados ao Lapachol que é a droga de referência ($DL_{50} = 281 \mu\text{mol L}^{-1}$) [49,52].

Observa-se que a toxicidade de H2Am4DH e de H2Am4Me frente à *Artemia salina* aumentou pela complexação ao ferro e, que no segundo caso, a diferença foi bastante significativa, ou seja, DL_{50} para o complexo $[\text{Fe}(\text{2Am4Me})_2]\text{Cl}$ corresponde aproximadamente a metade de seu respectivo ligante, fazendo deste, o composto mais promissor. Vale a pena ressaltar que os complexos têm ainda a vantagem de serem solúveis em água, o que permitirá que essas drogas sejam testadas *in vivo* futuramente.

O complexo (3) não apresentou toxicidade frente à *Artemia salina* até a concentração de $90 \mu\text{mol L}^{-1}$. Provavelmente isso se deve ao fato de que nesse complexo, há aproximadamente 27 % de Fe(II), conforme mostrado por seu espectro Mossbauer (ver Capítulo 4). Nos complexos (1) e (2) a quantidade de Fe(II) corresponde a 4 e 6 %, respectivamente. Desse modo, podemos sugerir que a forma ativa é o complexo de Fe(III) e que seu análogo de Fe(II) não teria toxicidade.

Como mencionado anteriormente, o ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* tem boa correlação com a atividade citotóxica em alguns tipos de tumores humanos [49]. Logo, os baixos valores de DL_{50} obtidos para os complexos estudados nesse ensaio sugerem que eles poderiam apresentar propriedades antineoplásicas. Além disso, os potenciais obtidos para a redução $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ nos complexos (1) – (3) estão na faixa dos redutores celulares [53]. Assim, o mecanismo de ação desses compostos poderia envolver redução $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ por tióis celulares, como ocorre com complexos de ferro de outras tiossemicarbazonas derivadas da piridina [15-18].