

3 Parte experimental

3.1 Reagentes, instrumentação e metodologia

3.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados nas sínteses foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem prévia purificação ou tratamento adicional, sendo eles:

- cloreto de cobre(II) diidratado, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich;
- perclorato de cobre(II) hexaidratado, $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich;
- tetracloroplatinato(II) de potássio, $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$, Sigma Aldrich;
- hidróxido de potássio, KOH, Sigma Aldrich;
- álcool metílico PA, álcool etílico PA, éter dietílico PA, dimetilsulfóxido e dimetilformamida (todos os itens Vetec);
- ácidos sulfúrico (H_2SO_4) e nítrico (HNO_3), Vetec;
- água destilada.

Todas as reações foram conduzidas sob agitação magnética e aquecimento. Para tanto, foram utilizadas placas de agitação com aquecimento da marca Fisatom.

3.1.2 Instrumentação

Temperatura de fusão

Os pontos (faixas) de fusão dos ligantes foram medidos utilizando-se aparelho da Microquímica Equipamentos LTDA, modelo MQAPF-302, no Laboratório de Síntese Orgânica e Química de Coordenação Aplicada a Sistemas Biológicos (LABSO-BIO) – Departamento de Química – PUC-Rio.

Análise elementar (C,H,N)

Os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio dos ligantes e seus respectivos complexos foram determinados em um analisador CHNS, modelo CHNS EA 1110 CE Instrument, no LACQ – Departamento de Química – PUC-Rio.

Determinação dos teores de metal nos complexos

Cobre e platina foram analisados em um Espectrômetro de Absorção Atômica ANALYTIK JENA, modelo Contraa 300 (fonte contínua) com chama ar/acetileno, no laboratório LAATOM – Departamento de Química – PUC-Rio.

As soluções foram preparadas com aproximadamente 3,0 mg de complexo. A abertura dos complexos de cobre foi feita com a adição de 1 mL de ácido nítrico 65% e posterior diluição com água destilada até 50 mL em tubo Falcon. Já os complexos de platina foram previamente calcinados e, só então, feita a abertura com 1 mL de água régia, seguida de diluição até 50 mL com água destilada. Cada amostra foi adicionalmente diluída 100x antes da leitura.

Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho médio (4000 a 450 cm^{-1}) e afastado (700 a 30 cm^{-1}) dos ligantes e seus respectivos complexos foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 400 FT-IR / FT-FIR, no LABIO – Departamento de Química – PUC-Rio.

As amostras sólidas foram analisadas por amostragem em disco prensado de KBr (grau espectroscópico), para a região do infravermelho médio, e em pastilha de polietileno, para a região afastada do espectro.

Análise termogravimétrica (TG/DTG)

As curvas de decomposição térmica de ligantes e complexos (a exceção do complexo **1**) foram medidas em um aparelho Perkin Elmer, modelo Pyris 1 TGA. As análises foram realizadas em atmosfera inerte de nitrogênio, varrendo-se a faixa de 20 a 900 °C de temperatura, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} .

As análises foram realizadas no LACQ – Departamento de Química – PUC-Rio.

Condutividade

As medidas de condutividade elétrica dos complexos foram efetuadas a 25 °C, utilizando-se um Condutivímetro Orion 3 Star da Thermo Electron Corporation, no Laboratório de Síntese Orgânica e Química de Coordenação Aplicada a Sistemas Biológicos (LABSO-BIO) – Departamento de Química – PUC-Rio.

Para tal, foram preparadas soluções dos complexos em DMF, na concentração 10^{-3} mol L⁻¹. Os valores obtidos foram comparados com dados da literatura de modo a determinar o tipo de eletrólito correspondente a cada complexo.

Determinação estrutural por difração de raios X

A determinação estrutural por difração de raios X em monocristal do complexo $[\text{Cu}_2(\mu\text{-L}1)_2(\text{HL}1)(\text{ClO}_4)_2(\text{OH}_2)] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**1**) foi realizada pelo Prof. Dr. Adailton Bortoluzzi na Central de Análises – Departamento de Química – UFSC. A coleta dos dados foi efetuada a 173(2) K num difratômetro Enraf-Nonius CAD-4 equipado com um tubo de molibdênio ($\text{Mo } K\alpha \lambda = 0,71069 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite. A estrutura cristalina foi resolvida por métodos diretos com a utilização do programa SIR97 [103] e refinadas pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa através do programa computacional SHELXL97. [104]

A representação gráfica da estrutura molecular foi gerada pelo programa ORTEP-3 for Windows. [105]

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹⁹⁵Pt

Os espectros de RMN de ¹H (400 MHz) dos ligantes e de ¹⁹⁵Pt, no caso do complexo de platina(II) **3**, foram obtidos em espectrômetro Bruker 400 UltraShield, em sonda de 5 mm, utilizando DMSO-*d*₆ como solvente. As análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Marcelo Hawrylak Herbst, no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – Departamento de Química – UFRRJ.

Os deslocamentos químicos δ são descritos em unidades de partes por milhão (ppm), com calibração baseada no sinal residual do solvente (2,50 ppm) e no padrão interno $[\text{PtCl}_6]^{2-}$ (0 ppm) para os núcleos de hidrogênio e platina, respectivamente. As constantes de acoplamento *J*, por sua vez, são dadas em Hertz (Hz).

Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Medidas de ressonância paramagnética eletrônica foram obtidas a partir de um equipamento Bruker ESP 300E com frequência de modulação de 100 kHz, operando a 9,5 GHz (banda X). A análise foi realizada em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Odivaldo Alves Cambraia (Departamento de Química – UFF), no Laboratório de EPR do CBPF (Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas). Amostras sólidas dos complexos de cobre(II) foram acomodadas em tubos capilares e, em seguida, em tubos de quartzo. Os espectros foram registrados à temperatura ambiente (298 K). A simulação dos espectros foi realizada com o programa computacional Easyspin.

Modelagem computacional

A fim de auxiliar na proposição de estruturas para os complexos (a exceção do complexo **1**) e realizarmos uma atribuição mais acurada dos espectros vibracionais de ligantes e compostos de coordenação, foram realizados cálculos teóricos para a obtenção de parâmetros estruturais, a partir da geometria otimizada em fase gás, e das frequências vibracionais, visando estabelecer um comparativo entre os espectros teórico e experimental.

Os cálculos teóricos foram processados em um computador Intel Core; CPU 2,67 GHz; 3,22 GB RAM, Windows XP. A otimização das geometrias e as frequências vibracionais teóricas dos compostos foram obtidos utilizando-se o programa Gaussian 03 [106], que faz uso de procedimento mecânico-quântico baseado na teoria do funcional de densidade (DFT). Foram usados os conjuntos de bases B3LYP/6-311G(s,p) com fator de correção 0,966 [107] para os ligantes, B3LYP/6-31G com fator de correção 0,962 [107] para o complexo de cobre(II) **2** e B3LYP/LANL2DZ com fator 0,961 [107] para os complexos de platina(II).

Estudos da viabilidade celular de HL1 e dos complexos de cobre(II) por metabolização do MTT

Os ensaios de viabilidade celular dos complexos de cobre(II) foram realizados em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Milton Kanashiro Masahiko (CBB-Centro de Biociências e Biotecnologia – UENF, Campos dos Goytacazes).

As células tumorais das linhagens leucêmicas U937 e THP-1, assim como as células normais de defesa PBMC (do inglês, Peripheral Blood Mononuclear Cell) foram plaqueadas em volume de 100 μ L por poço (10^6 células

mL⁻¹) em placas de 96 poços, e incubadas com os compostos nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 μ M.

Como controle, todas as células foram incubadas com meio DMEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 μ g mL⁻¹ de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As células também foram incubadas com DMSO (Sigma®), na concentração de 400 μ M, visto que todos os compostos foram dissolvidos usando-se este solvente na produção da solução estoque. As células foram mantidas em estufa a 37 °C, com 5% em atmosfera de CO₂ e umidade controlada.

A viabilidade celular foi determinada através de microensaio colorimétrico com MTT. As células foram incubadas por 36 horas com os compostos e, então, foram adicionados 10 μ L de MTT (Sigma, 5 mg mL⁻¹) para cada 100 μ L de cultivo. As placas foram mantidas na estufa por quatro horas. Após esse período, foram retirados 150 μ L do sobrenadante de cada poço e depois adicionados 100 μ L de uma solução de HCl com isopropanol, homogeneizando bem até a completa dissolução dos cristais de sal formados. A placa de 96 poços foi lida em espectrofotômetro de microplaca, modelo MULTISKAN-EX, utilizando o comprimento de onda 570 nm.

Avaliação da externalização de fosfatidilserina (através da marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio)

A fim de se determinar o tipo de processo de morte observado pelo teste de viabilidade celular, as linhagens neoplásicas foram submetidas a uma dupla marcação com Anexina V e PI (Iodeto de Propídio). As duas linhagens celulares foram tratadas apenas com o composto **1** (200 e 400 μ M), por este ter se mostrado mais ativo, e também com cisplatina (50 μ M), para fins comparativos. Após 24 horas de incubação, as células foram marcadas e analisadas por citometria de fluxo. Células em apoptose primária são marcadas apenas com Anexina V. Células em necrose secundária (apoptose-necrose) são marcadas com Anexina V e PI. Células em necrose são marcadas somente com PI e células normais não sofrem nenhum tipo de marcação.

Ensaio de citotoxicidade dos complexos de platina(II) por exclusão com azul de Trypan

Os ensaios de citotoxicidade dos complexos de platina(II) em células tumorais humanas foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Elene Cristina Pereira-Maia (DQ – UFMG, Belo Horizonte).

Células da linhagem K562 foram compradas do Banco de Células do Rio de Janeiro (número CR083 da coleção do BCRJ). Estas foram obtidas por efusão pleural de uma paciente de 53 anos do sexo feminino com leucemia mielóide crônica em crise terminal blástica. A linhagem foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal 10% (CULTLAB, SP) a 37 °C em atmosfera de CO₂ umidificada a 5%. As culturas celulares crescem de forma exponencial de 10⁵ células mL⁻¹ para cerca de 10⁶ células mL⁻¹ em 3 dias. A viabilidade celular foi checada por exclusão com azul de Trypan. Para a avaliação da citotoxicidade, 1 x 10⁵ células mL⁻¹ foram cultivadas por 72 h na ausência e presença de diferentes concentrações dos compostos de platina. A atividade dos compostos **3** e **4** foi avaliada pela concentração que inibe o crescimento celular em 50%, IC₅₀. Soluções estoque dos compostos **3** e **4** foram preparadas em DMSO (dimetilsulfóxido), sendo a concentração final de DMSO nos experimentos com as células inferior a 0,5%, concentração na qual o solvente não exerce nenhum efeito sobre o crescimento celular.

3.1.3 Sínteses

3.1.3.1 Ligantes 1- e 2-fenil-1,2,3-triazol-4-carboxaldeído-oxima (HL1 e HL2)

Os ligantes 1- e 2-fenil-1,2,3-triazol-4-carboxaldeído-oxima, denominados HL1 e HL2, respectivamente, foram cedidos pelo Prof. Dr. Fernando da Silva Carvalho (Instituto de Química – UFF), no âmbito do projeto “Desenvolvimento e Estudo de Novos Complexos Biorredutíveis de Cobalto, Rutênio e Platina como Protótipos de Metalofármacos para o Tratamento do Câncer”, financiado pela FAPERJ. Esses compostos são parte do projeto de doutorado do aluno Daniel Tadeu Gomes Gonzaga, intitulado “Síntese e avaliação biológica de 1H e 2H-1,2,3-triazóis”. Portanto, detalhamentos sobre os procedimentos de preparação desses ligantes não serão reportados no presente trabalho.

3.1.3.2 Síntese do complexo de cobre(II) com HL1 (composto 1)

A reação de obtenção do complexo de Cu(II) com o ligante HL1 encontra-se representada na Figura 16.

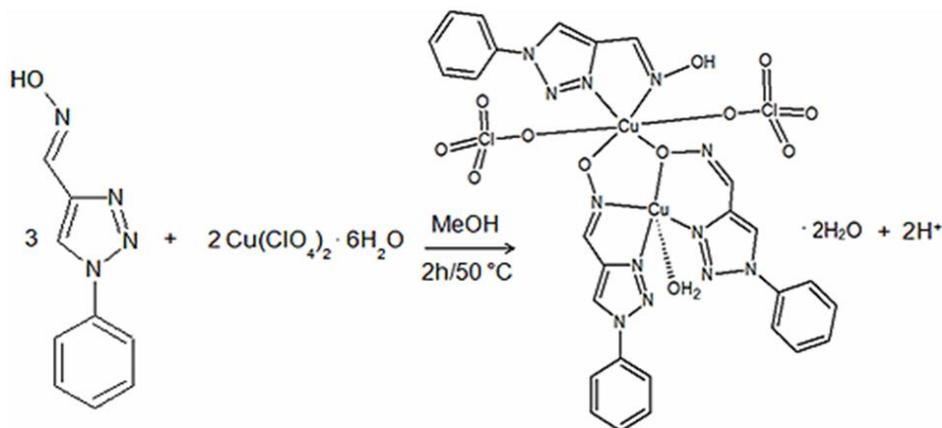


Figura 16. Reação de obtenção do complexo de Cu(II) com o ligante oxima HL1.

Para a síntese do composto 1, sobre 10 mL de uma solução metanólica contendo 1 mmol (0,188 g) de HL1 foram gotejados 10 mL de uma solução contendo 0,5 mmol de perclorato de cobre(II) hexaidratado (0,185 g) no mesmo solvente, havendo imediata formação de uma coloração verde escura (Figura 17, esquerda). A reação permaneceu sob aquecimento a 50 °C e contínua agitação por aproximadamente 2 h, quando o volume foi reduzido a aproximadamente 5 mL. A solução foi então deixada em repouso, sendo possível observar, após aproximadamente 12 h, a formação de cristais verde-escuros (Figura 17, direita), isolados com 38% de rendimento.

Análise elementar, %expt. (teórica): C, 34,8 (34,4); H, 2,4 (3,0); N, 18,0 (17,8). Valores teóricos calculados com base na fórmula $C_{27}H_{28}O_{14}N_{12}Cl_2Cu_2$ (942,67 g mol⁻¹).

IV (KBr, cm⁻¹): 3427 (m), 3123 (m), 3068 (m), 2918 (o), 1616 (o), 1596 (m), 1523 (m), 1498 (m), 1468 (m), 1421 (f), 1345 (f), 1275 (m), 1223 (f), 1196 (m), 1142 (F), 1110 (F), 1090 (F), 992 (m), 919 (f), 880 (m), 845 (m), 764 (m), 730 (f), 688 (m), 627 (m), 557 (m), 508 (f), 465 (f). OBS.: F, banda forte; m, banda média; f, banda fraca; o, ombro.

IV afastado (polietileno, cm^{-1}): 687 (m), 624 (F), 559 (F), 505 (F), 473 (o), 422 (f), 401 (o), 325 (f), 216 (m), 120 (f), 95 (f), 77 (f), 51 (f).

OBSERVAÇÃO: Os espectros de IV deste complexo serão apresentados na seção referente aos resultados.



Figura 17. Composto 1: solução formada após complexação com o metal (esquerda) e cristais observados após 12 h de repouso da solução (direita).

3.1.3.3

Síntese do complexo de cobre(II) com HL2 (composto 2)

A Figura 18 representa a reação de obtenção do complexo de Cu(II) do ligante 2-fenil-1,2,3-triazol-4-carboxaldeído-oxima, HL2.

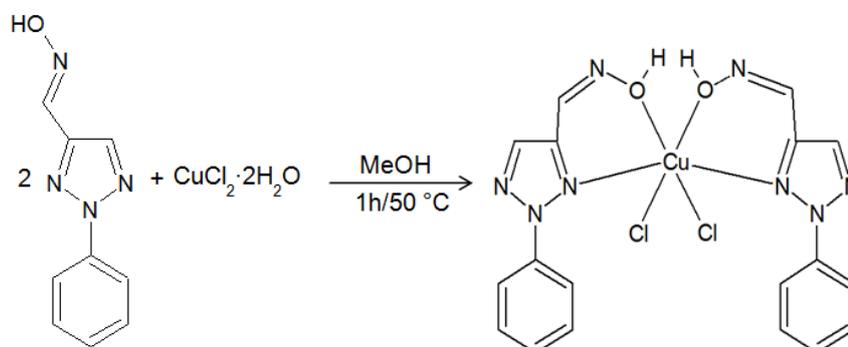


Figura 18. Reação de obtenção do complexo de Cu(II) com o ligante oxima HL2.

Para a obtenção do complexo de cobre(II) de HL2, foram preparados 20 mL de uma solução contendo 1 mmol (0,188 g) do referido ligante em metanol, sobre a qual foram gotejados, lentamente, 10 mL de uma solução contendo 0,5 mmol (0,085 g) de cloreto de cobre(II) diidratado no mesmo solvente. A mistura formada foi mantida sob aquecimento e contínua agitação por aproximadamente 1 h, quando seu volume foi reduzido aproximadamente pela metade. Nesse momento, foi verificada a precipitação do complexo na forma de um sólido de coloração verde-limão. Este foi separado mediante filtração a vácuo, lavado com metanol gelado e seco em estufa a 35 °C. O complexo foi obtido na forma de um fino sólido verde, com 60% de rendimento (Figura 19).

Análise elementar, %expt. (teórica): C, 42,9 (42,3); H, 3,3 (3,2); N, 22,3 (21,9); Cu, 12,6 (12,4). Valores calculados com base em $C_{18}H_{16}O_2N_8Cl_2Cu$ (510,87 g mol⁻¹).

IV (KBr, cm⁻¹): 3206 (F), 3160 (F), 3096 (m), 3051 (m), 2995 (o), 2924 (f), 2849 (m), 2768 (f), 1667 (m), 1595 (m), 1491 (F), 1465 (m), 1436 (F), 1419 (f), 1373 (m), 1339 (m), 1290 (m), 1233 (m), 1203 (f), 1070 (m), 1037 (F), 985 (F), 974 (F), 910 (m), 885 (m), 847 (F), 808 (o), 753 (F), 712 (m), 696 (m), 672 (F), 628 (o), 583 (m), 531 (m), 507 (m), 485 (m), 459 (f), 434 (f), 409 (f). OBS.: F, banda forte; m, média; f, fraca; o, ombro.

IV afastado (polietileno, cm⁻¹): 687 (F), 667 (f), 620 (m), 580 (o), 539 (m), 503 (m), 483 (o), 470 (m), 426 (m), 389 (m), 352 (o), 326 (o), 294 (o), 275 (m), 216 (m), 176 (m), 151 (m), 136 (m), 127 (o), 76 (m), 64 (o), 40 (m).

OBSERVAÇÃO: Os espectros de IV deste complexo serão apresentados na seção referente aos resultados.



Figura 19. Composto 2: suspensão formada após a complexação (esquerda) e sólido de coloração verde-limão isolado por filtração (direita).

3.1.3.4

Síntese do complexo de platina(II) com HL1 (composto 3)

A reação de obtenção do complexo de Pt(II) com o ligante HL1 encontra-se representada na Figura 20.

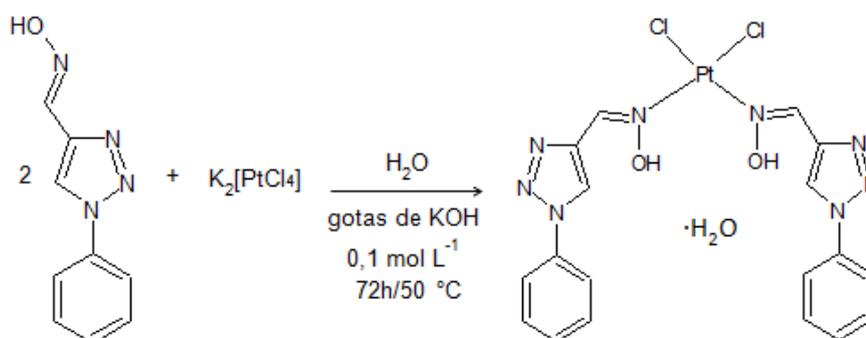


Figura 20. Reação de obtenção do complexo de Pt(II) com o ligante oxima HL1.

Para a síntese deste complexo de platina, foram preparados 20 mL de suspensão aquosa contendo 1 mmol (0,188 g) do ligante, sobre a qual foram gotejados 10 mL de uma solução com 0,5 mmol (0,208 g) de $K_2[PtCl_4]$ no mesmo solvente. De modo a manter o ligante desprotonado, facilitando a coordenação ao metal, foram também adicionadas 4 gotas de KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

A suspensão formada permaneceu a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, sob contínua agitação e ao abrigo da luz, a fim de evitar reações paralelas, por 72 h (Figura 21). Após esse

período, o meio reacional foi filtrado a vácuo e o precipitado obtido, lavado com 2 mL de água destilada, 2 mL de álcool etílico e éter dietílico, nessa ordem. O complexo foi obtido na forma de um sólido amarelo claro com 72% de rendimento (Figura 21).

Análise elementar, %expt. (teórica): C, 33,0 (32,7); H, 2,7 (2,8); N, 16,1 (17,0); Pt, 31,0 (29,5). Os valores teóricos foram calculados a partir da fórmula $C_{18}H_{18}O_3N_8Cl_2Pt$, considerando a presença de 1 H_2O de hidratação ($660,44 \text{ g mol}^{-1}$).

IV (KBr, cm^{-1}): 3448 (F), 3187 (o), 3151 (o), 3122 (o), 2926 (o), 2858 (o), 2786 (o), 1621 (m), 1596 (F), 1500 (F), 1467 (m), 1422 (m), 1426 (m), 1363 (o), 1340 (f), 1320 (f), 1255 (m), 1204 (m), 1158 (f), 1130 (o), 1107 (o), 1097 (o), 1074 (f), 1041 (o), 1030 (m), 990 (m), 933 (f), 917 (o), 888 (f), 853 (m), 842 (m), 761 (F), 688 (f), 663 (f), 514 (o), 557 (f), 509 (f), 464 (f). OBS.: F, banda forte; m, média; f, fraca; o, ombro.

IV afastado (polietileno, cm^{-1}): 689 (F), 662 (f), 626 (o), 616 (o), 560 (m), 510 (m), 477 (o), 462 (o), 341 (F), 280 (f), 252 (f), 221 (f), 190 (f), 152 (m), 130 (m), 109 (m), 89 (o), 82 (m), 66 (f), 54 (f), 42 (f).

OBSERVAÇÃO: Os espectros de IV deste complexo serão apresentados na seção referente aos resultados.



Figura 21. Composto 3: montagem experimental utilizada na preparação do composto (esquerda) e sólido amarelo claro obtido após filtração (direita).

3.1.3.5 Síntese do complexo de platina(II) com HL2 (composto 4)

A Figura 22 representa a reação de obtenção do complexo de Pt(II) do ligante 2-fenil-1,2,3-triazol-4-carboxaldeído-oxima, HL2.

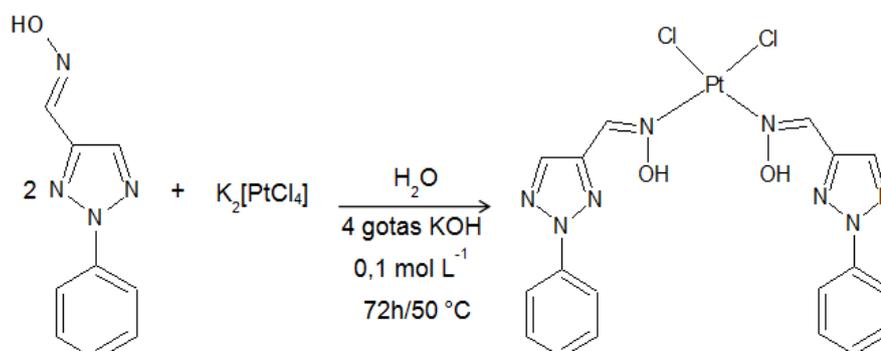


Figura 22. Reação de obtenção do complexo de Pt(II) com o ligante oxima HL2.

Metodologia similar à descrita para a obtenção do complexo de platina(II) com HL1 foi empregada na síntese do complexo com o ligante HL2; na qual, sobre 20 mL de uma suspensão aquosa contendo 1 mmol (0,188 g) de ligante HL2, foram adicionados lentamente 10 mL de uma solução com 0,5 mmol de $K_2[PtCl_4]$ no mesmo solvente e 4 gotas de KOH $0,1\text{ mol L}^{-1}$.

Como no caso anterior, a suspensão resultante (Figura 23) permaneceu a $50\text{ }^\circ\text{C}$, sob contínua agitação e ao abrigo de luz por 72 h. O precipitado obtido foi filtrado a vácuo e lavado com 2 mL de água destilada, 2 mL de álcool etílico e éter dietílico. Um sólido amarelo foi obtido com 57% de rendimento.

Análise elementar, %expt. (teórica): C, 34,6 (33,7); H, 2,5 (2,5); N, 17,9 (17,4); Pt, 30,7 (30,4). Valores calculados com base na fórmula $C_{18}H_{16}O_2N_8Cl_2Pt$ ($642,42\text{ g mol}^{-1}$).

IV (KBr, cm^{-1}): 3437 (m), 3135 (m), 3067 (m), 2918 (f), 2849 (f), 1596 (F), 1567 (m), 1495 (F), 1463 (m), 1434 (o), 1413 (m), 1386 (m), 1334 (F), 1309 (F), 1264 (m), 1228 (m), 1172 (m), 1105 (m), 1072 (m), 990 (F), 966 (F), 919 (m), 850 (F), 760 (F), 721 (m), 690 (F), 672 (F), 631 (f), 561 (f), 507 (m), 463 (f).

OBS.: F, banda forte; m, banda média; f, banda fraca; o, ombro.

IV afastado (polietileno, cm^{-1}): 690 (m), 671 (m), 631 (f), 614 (o), 562 (f), 548 (f), 507 (F), 460 (m), 426 (o), 403 (f), 376 (f), 346 (o), 329 (m), 305 (o), 266 (f), 242 (f), 217 (f), 192 (f), 172 (f), 148 (f), 128 (m), 109 (f), 84 (F), 60 (m), 35 (F).

OBSERVAÇÃO: Os espectros de IV deste complexo serão apresentados na seção referente aos resultados.



Figura 23. Composto 4: suspensão formada após 72 h de reação (esquerda) e sólido amarelo claro obtido após separação por filtração (direita).