

Resultados e discussão III

Aplicações dos compostos sintetizados

6.1

Atividade citotóxica dos compostos: sobrevivência celular nas linhagens tumorais humanas de câncer de pulmão, A549, e de próstata, PC3

A sobrevivência celular nas linhagens celulares humanas A549 de câncer de pulmão e PC3 de câncer de próstata foram avaliadas através do ensaio de redução do MTT. Estes testes foram realizados em colaboração com o professor Marcos Dias Pereira da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A linhagem tumoral humana A549 foi escolhida por tratar-se de um tipo de câncer de pulmão de células não pequenas, NSCLC, a forma mais comum de câncer de pulmão. Esta linhagem foi iniciada em 1972 por explante de pulmão de um homem caucasiano de 58 anos [92]. Por outro lado, a maioria das pesquisas de novos agentes terapêuticos e/ou de diagnóstico no combate ao câncer de próstata utiliza três tipos de linhagens celulares humanas principais: linhagens PC3, DU145 e LNCaP. No presente estudo, a linhagem utilizada foi a PC3, a qual é oriunda de metástase óssea [93]. As linhagens celulares utilizadas nos referidos testes de sobrevivência celular são formadas por células aderentes, e por isso foi necessário fazer o procedimento de tripsinização para desprendê-las da placa. As Figuras 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5 e 6.6 apresentam as estruturas de todos os compostos testados, com exceção das estruturas dos sais usados nas sínteses dos complexos.

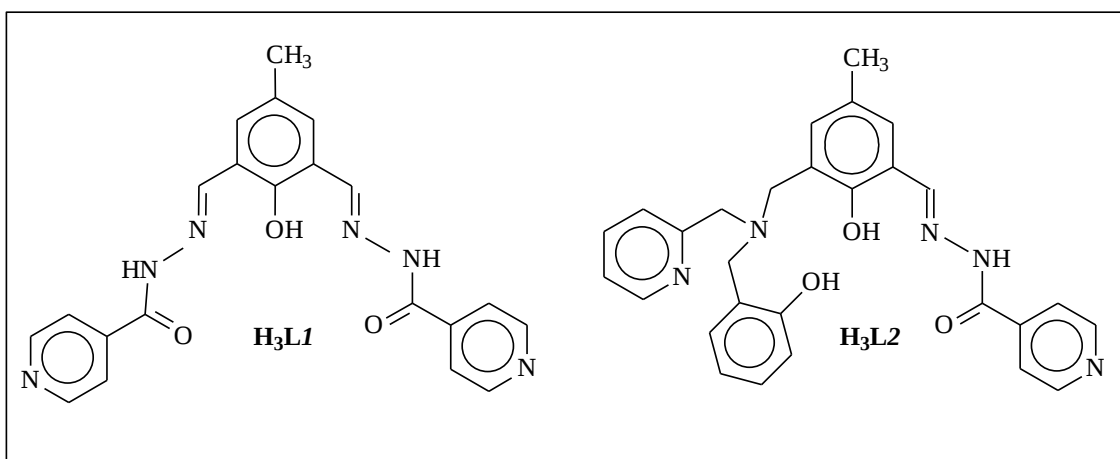


Figura 6.1 - Estruturas dos ligantes H₃L1 e H₃L2.

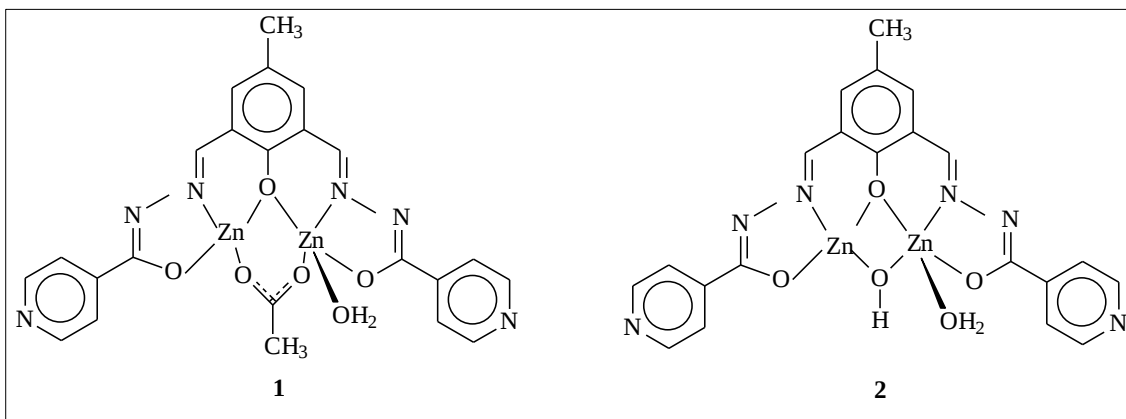


Figura 6.2 - Estruturas dos complexos **1** e **2**.

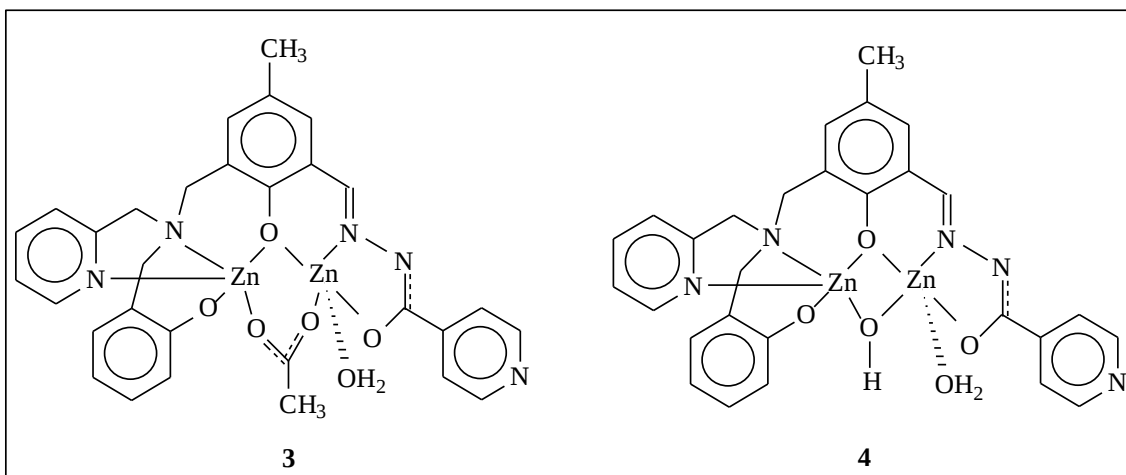


Figura 6.3 - Estruturas dos complexos **3** e **4**.

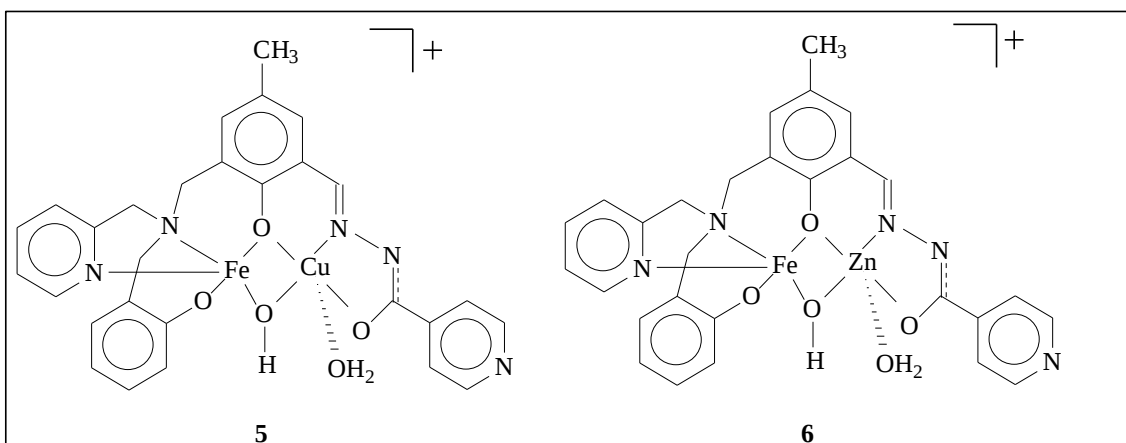


Figura 6.4 - Estruturas dos complexos **5** e **6**.

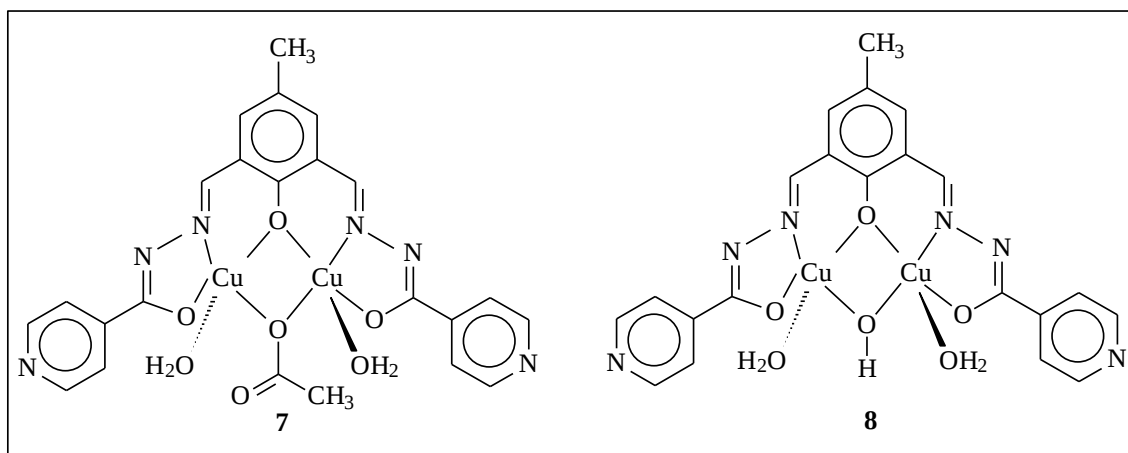


Figura 6.5 - Estruturas dos complexos **7** e **8** [80].

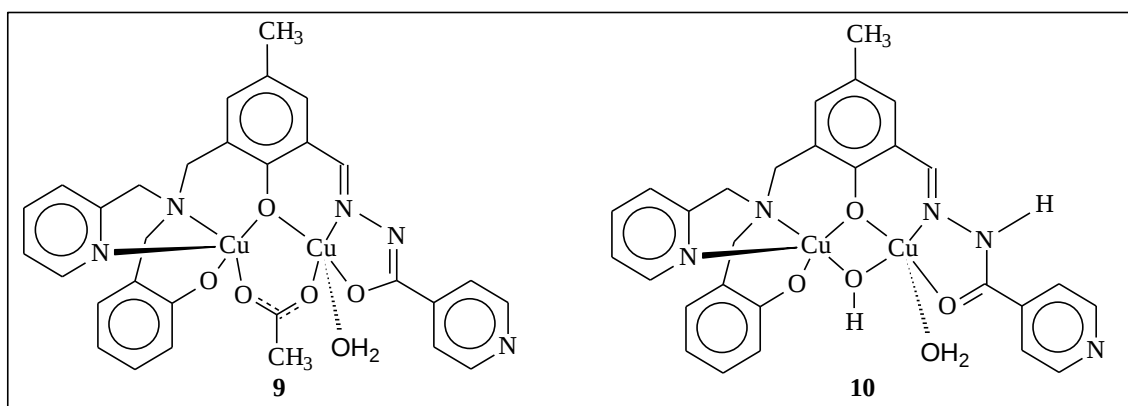


Figura 6.6 - Estruturas dos complexos **9** e **10** [80].

Inicialmente, para selecionar os compostos de coordenação mais citotóxicos, foi realizado um *screening* com os dois ligantes, dez complexos, incluindo aqui os quatro complexos homobinucleares de cobre(II) desses ligantes sintetizados durante o trabalho de mestrado, e cinco sais utilizados na síntese dos diversos compostos de coordenação. Neste teste, as células foram submetidas, durante 24 h, a um único tratamento com cada um dos compostos na concentração final de 100 μM . Deste ensaio, foram selecionados aqueles compostos que apresentaram sobrevivência menor que 50% na concentração de composto testada. Neste contexto, os compostos $\text{H}_3\text{L2}$, **4**, **5**, **6**, **8**, **9** e **10** foram escolhidos para a próxima fase de testes, em que o valor de IC_{50} foi determinado.

Para determinar os valores de IC_{50} , as células foram submetidas ao tratamento com os compostos selecionados nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 μM . O IC_{50} foi calculado a partir das curvas dose-resposta, as quais são apresentadas nas Figuras 6.7 e 6.8 para as linhagens A549 e PC3, respectivamente. Estas curvas foram feitas utilizando-se o programa *GraphPadPrism versão 5.0*. O fármaco antitumoral cisplatina,

um protótipo de metalodrogas anticâncer, foi incluído para efeitos de comparação. Os valores obtidos de IC_{50} são mostrados na Tabela 6.1.

Um fato interessante com relação à atividade dos compostos testados é que esta se concentrou principalmente naqueles contendo uma ponte do tipo μ -hidroxo entre os metais (o único dentre os complexos ativos que não possui esta característica é **9**) e naqueles do ligante assimétrico H_3L2 (o único complexo ativo de H_3L1 é **8**), com o próprio ligante H_3L2 apresentando uma interessante atividade contra a linhagem A549.

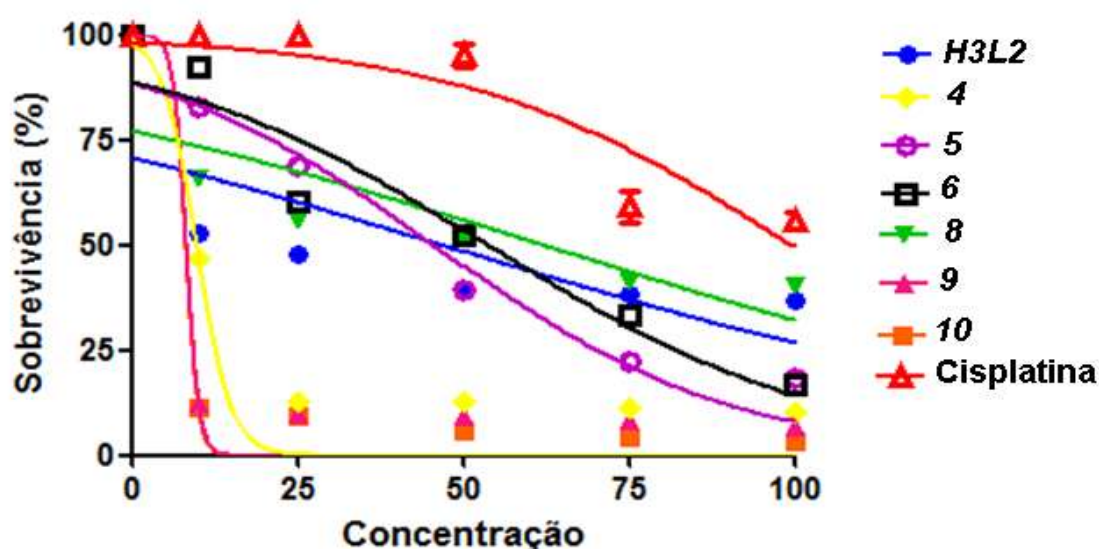


Figura 6.7 - Sobrevivência celular da linhagem de câncer de pulmão A549 nos compostos H_3L2 , **4**, **5**, **6**, **8**, **9**, **10** e cisplatina. Cada ponto da curva de sobrevivência celular representa a média $\pm$ desvio padrão de um experimento realizado em duplicata, nas concentrações de composto ativo 10, 25, 50, 75 e 100 μM .

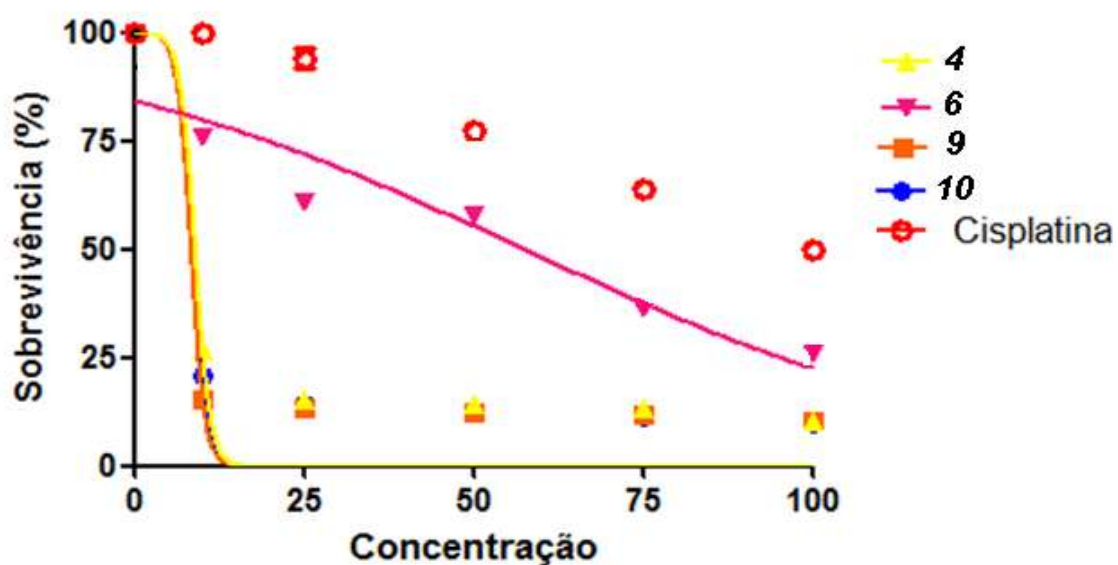


Figura 6.8 - Sobrevivência celular da linhagem de câncer de próstata PC3 nos compostos **4**, **6**, **9**, **10** e cisplatina. Cada ponto da curva de sobrevivência celular representa a média $\pm$ desvio padrão de um experimento realizado em duplicata, nas concentrações de composto ativo 10, 25, 50, 75 e 100 μ M.

Tabela 6.1 - IC_{50} (μ M) dos compostos nas linhagens de câncer de pulmão A549 e câncer de próstata PC3, baseado no ensaio de redução de MTT. Estes valores foram calculados a partir das curvas dose-resposta (Figuras 6.7 e 6.8), utilizando o programa GraphPadPrism 5.

Composto	$IC_{50} \pm$ desvio padrão (μ M)	
	A549	PC3
H ₃ L2	15,59 $\pm$ 0,71	>100
4	<10	<10
5	36,96 $\pm$ 0,21	>100
6	42,87 $\pm$ 2,73	43,69 $\pm$ 0,40
8	43,00 $\pm$ 2,95	>100
9	<10	<10
10	<10	<10
cisplatina	100,87 $\pm$ 6,92	99,99 $\pm$ 1,25

Na Figura 6.7, são apresentadas as curvas de sobrevivência celular após o tratamento com os compostos H_3L2 , **4**, **5**, **6**, **8**, **9**, **10** e cisplatina na linhagem celular de câncer de pulmão A549. Em todos os compostos testados nesta linhagem, observamos uma redução dose-dependente na sobrevivência celular bastante significativa. Os compostos que apresentaram maior eficácia quanto à citotoxicidade foram os complexos homobinucleares de cobre(II) **9** e **10**, derivados do ligante assimétrico H_3L2 , o qual também apresentou um valor de IC_{50} bastante reduzido por si só. Podemos observar um perfil de citotoxicidade muito mais interessante para **9**, que, neste primeiro experimento, se mostrou aproximadamente setenta vezes mais ativo que **10**, sendo os valores de IC_{50} obtidos para estes compostos inferiores a $10\ \mu M$. O composto menos citotóxico na linhagem A549 foi o composto **8**, derivado do ligante simétrico H_3L1 , o qual também não se mostrou eficiente em matar as células tumorais de próstata, apresentando, neste último caso, um valor de IC_{50} superior a $100\ \mu M$.

A Figura 6.8, por sua vez, apresenta as curvas de sobrevivência celular após o tratamento com os compostos **4**, **6**, **9**, **10** e cisplatina na linhagem celular de câncer de próstata PC3. Somente os compostos **4**, **9** e **10** testados nesta linhagem apresentaram uma redução na sobrevivência celular de maneira dose-dependente significativa. Assim como observado nos testes com a linhagem de câncer de pulmão, os compostos que apresentaram maior eficácia quanto à citotoxicidade também foram os complexos homobinucleares de cobre(II) derivados do ligante assimétrico H_3L2 , isto é, **9** e **10**. Contudo, o complexo homobimetálico de zinco deste ligante, **4**, também mostrou-se bastante ativo contra a linhagem PC-3. Já o próprio H_3L2 , isto é, o ligante livre, não se mostrou eficiente em matar células de câncer de próstata, apresentando um valor de IC_{50} superior a $100\ \mu M$.

Diante dos resultados obtidos nos testes de sobrevivência celular nas linhagens de câncer de pulmão (A549) e de próstata (PC3), é importante se destacar a eficiência dos compostos **9** e **10** frente a ambos os tipos celulares. Há exemplos na literatura em que potenciais atividades antitumorais de alguns complexos binucleares de cobre(II) foram investigadas, devido à capacidade destes de promoverem a clivagem da ligação fosfodiéster presente no DNA por mecanismos hidrolíticos. Estudos realizados por Rey e colaboradores demonstraram a habilidade do complexo homobinuclear de cobre(II) contendo uma ponte μ -hidroxo entre os metais, $[Cu_2(\mu-OH)(C_{21}H_{33}ON_6)](ClO_4)_2 \cdot H_2O$

(**R1**) de hidrolisar diésteres de fosfato tais como 2,4-bis(dinitrofenil)fosfato (BDNPP) e DNA [94]. Na Figura 6.9 está representada a estrutura do substrato ativado BDNPP.

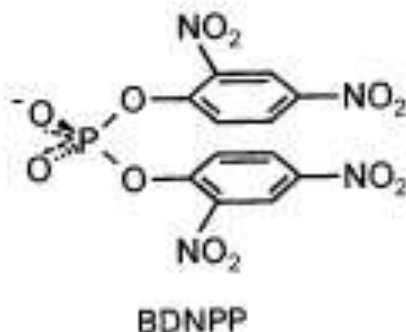


Figura 6.9 - Estrutura do diéster ativado 2,4-bis(dinitrofenil)fosfato (BDNPP) [95].

Diversos complexos de cobre tem demonstrado atividade na clivagem do DNA, no entanto, na maioria dos casos um mecanismo oxidativo tem sido proposto [94, 96]. A Figura 6.10 apresenta a estrutura do cátion complexo presente em **R1**.

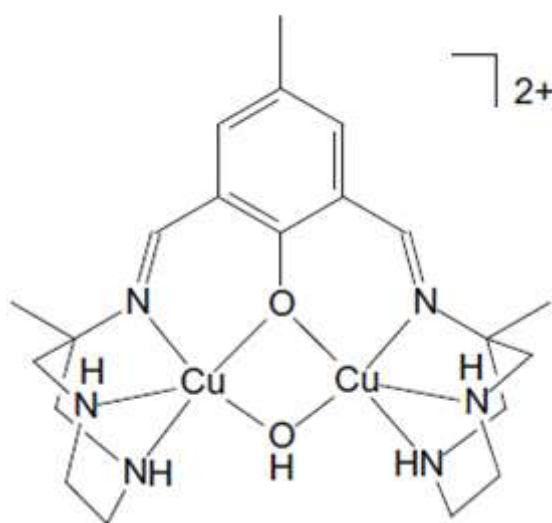


Figura 6.10 - Estrutura do cátion complexo $[Cu_2(\mu-OH)(C_{21}H_{33}ON_6)]^{2+}$.

Os testes de hidrólise foram realizados utilizando DNA plasmidial pBSKII. Já os estudos de atividade citotóxica do complexo **R1** foram realizados em células tumorais, tais como células de leucemia mielóide crônica humana pertencentes à linhagem K562 e células GLC4, derivadas da efusão pleural de um paciente com câncer de pulmão. As pesquisas relativas à viabilidade celular, por sua vez, foram realizadas com macrófagos peritoneais inflamatórios. O resultado dos testes mostrou que o composto **R1** apresenta

eficiência significativa quanto à clivagem hidrolítica do DNA, sendo capaz de entrar na célula tumoral e hidrolisar parcialmente o material genético desta, inibindo o crescimento celular. Além disso, nas concentrações em que **R1** é tóxico para as células leucêmicas, ele não afeta de forma significativa a viabilidade dos macrófagos, indicando assim que **R1** apresenta uma promissora atividade antitumoral [94, 96, 97]. Esta atividade foi associada à presença da ponte do tipo μ -hidroxo, que atuaria como um nucleófilo intramolecular após a ativação dos grupos fosfato do DNA via coordenação aos sítios do cobre(II) presentes no complexo **R1**. De fato, dentre todos os complexos testados no presente trabalho, apenas um dos que mostraram atividade não possuía esta característica estrutural (complexo **9**, curiosamente, o mais ativo de todos), embora neste último caso, muito provavelmente, a ponte μ -hidroxo possa ser gerada em solução aquosa após hidrólise do grupo acetato coordenado aos metais.

Diante dos interessantes resultados obtidos para os compostos **9** e **10**, novos testes estão sendo realizados afim de se investigar com mais profundidade a atividade antitumoral dos mesmos. Resultados preliminares realizados com o complexo **10**, em concentrações menores que 10 μ M, permitiram determinar o IC₅₀ deste composto com maior exatidão. Nesta etapa de testes foi possível incluir a linhagem celular MCF-7 relacionada ao câncer de mama. As Figuras 6.11 e 6.12 apresentam os cálculos preliminares para as linhagens de câncer de pulmão (A549) e câncer de mama (MCF-7), a partir das curvas dose-resposta construídas através do programa *GraphPadPrism*. Os valores de IC₅₀ obtidos para o composto **10** em diferentes linhas celulares (A549, PC3 e MCF-7) são apresentados na Tabela 6.2.

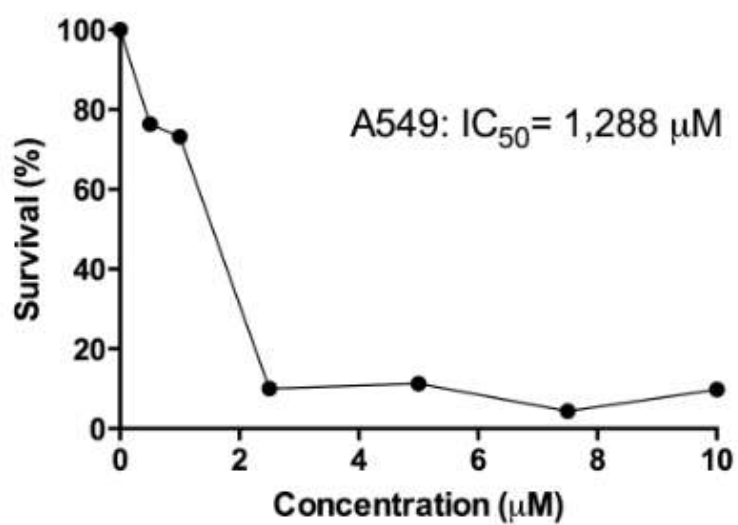


Figura 6.11 - Sobrevivência celular da linhagem de câncer de pulmão A549 ao composto **10**.

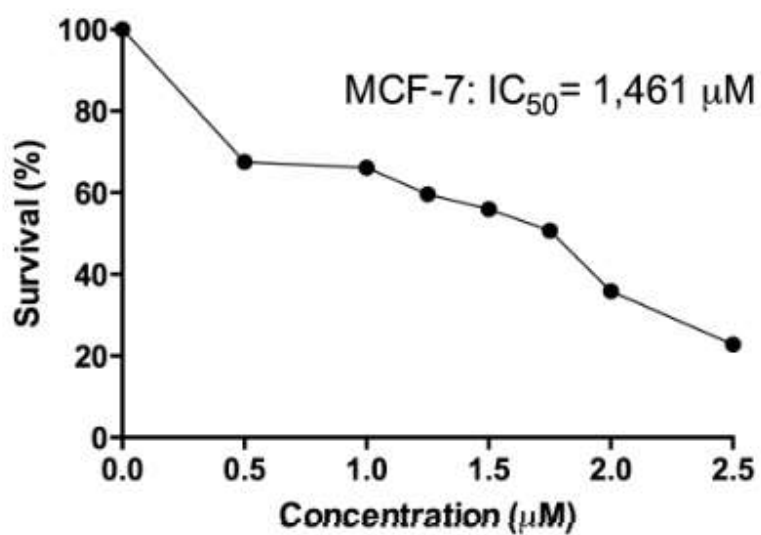


Figura 6.12 - Sobrevivência celular da linhagem de câncer de mama (MCF-7) ao composto **10**.

Tabela 6.2 – IC₅₀ (μM) do composto **10** nas linhagens de câncer de pulmão A549, câncer de próstata PC-3 e câncer de mama MCF-7, baseado num ensaio de redução de MTT de 24 h

Linhagem celular	IC ₅₀ (μM)	
	Composto 10	cisplatina
A549 (câncer de pulmão)	1,3 ± 0,34	135,1 ± 8,2
PC3 (câncer de próstata)	1,8 ± 0,04	> 200,0
MCF-7 (câncer de mama)	1,4 ± 0,03	117,4 ± 6,9

Cabe destacar que o complexo **10** se mostrou quase cem vezes mais ativos que a própria cisplatina nas linhagens A549 e MCF-7, o que não deixa de ser um dado impressionante levando-se em consideração que se trata de um complexo a base de cobre(II), cuja toxicidade em células normais do organismo espera-se seja bem mais baixa do que aquela apresentada pelas drogas a base de platina. Por outro lado, apesar de ainda não dispormos de dados mais acurados sobre a atividade de **9**, pudemos constatar que **10** mostrou um perfil extremamente promissor, com um IC₅₀ avaliado em 1,8 ± 0,04 μM numa linhagem em que a cisplatina é virtualmente inativa (PC3). Novos testes encontram-se em andamento, com o objetivo de aprimorar o estudo da potencialidade antitumoral destes complexos.

6.2

Potencial aplicação tecnológica para o ligante simétrico H₃L1

Diversas investigações a respeito das propriedades e aplicações das hidrazonas vêm sendo alvo de inúmeras pesquisas. O grande interesse nesta classe de compostos se justifica pela imensa versatilidade dos mesmos, e que pode ser atribuída à facilidade de preparação, à modularidade e às suas características estruturais únicas.

Nesta importante família de compostos, muitas hidrazonas têm se mostrado biologicamente ativas tanto contra células tumorais, como foi o caso do ligante H₃L2, quanto contra bactérias. É importante destacar ainda que as hidrazonas apresentam

grande habilidade de coordenação frente a diferentes metais. Alguns complexos de metais de transição e de íons lantanídeos têm sido usados como novos materiais para o desenvolvimento de quimiossensores, bem como para aplicações optoeletrônicas. Outra propriedade bastante interessante das hidrazonas e muitos de seus complexos de coordenação é a fluorescência que eles apresentam, tornando-os potenciais candidatos para aplicações em OLEDs (do inglês, Organic Light Emitting Diodes).

No contexto acima citado, foi desenvolvido, em parceria com o Laboratório de Optoeletrônica Molecular (LOEM) do Departamento de Física da PUC-Rio, coordenado pelo Prof. Dr. Marco Cremona, um estudo sobre a aplicação dos compostos sintetizados neste trabalho na fabricação de OLEDs. Inicialmente, a fluorescência de todos os compostos sintetizados neste trabalho foi testada, sendo que o ligante H_3L1 apresentou os resultados mais promissores. Assim, os estudos subsequentes foram centralizados na fabricação de OLEDs utilizando H_3L1 como componente emissor. Especificamente, H_3L1 foi usado como dopante da camada de emissão, cujo principal constituinte é a matriz orgânica BSBF, que promove a transferência de energia a partir de H_3L1 .

6.2.1

Estudo das concentrações de dopante nos dispositivos

Para tentar otimizar a emissão de H_3L1 no OLED, foram fabricados dispositivos com diferentes concentrações do ligante: 0% (Dispositivo 1), 25% (Dispositivo 2), 35% (Dispositivo 3) e 50% (Dispositivo 4). A Tabela 6.3 apresenta as arquiteturas dos diferentes Dispositivos fabricados no LOEM:

Tabela 6.3 - Arquiteturas dos Dispositivos testados

Dispositivo 1 – 0%	ITO / β -NPB(25nm) / BSBF(35nm) / BCP(15nm) / Alq3(10nm) / LiF(0,5nm) / Al(120nm)
Dispositivo 2 – 25%	ITO / β -NPB(25nm) / BSBF: H_3L1 25%(35nm) / BCP(15nm) / Alq3(10nm) / LiF(0.5nm) / Al(120nm)
Dispositivo 3 – 35%	ITO / β -NPB(25nm) / BSBF: H_3L1 35%(35nm) / BCP(15nm) / Alq3(10nm) / LiF(0.5nm) / Al(120nm)
Dispositivo 4 – 50%	ITO / β -NPB(25nm) / BSBF: H_3L1 50%(35nm) / BCP(15nm) / Alq3(10nm) / LiF(0.5nm) / Al(120nm)

O espectro de eletroluminescência (EL) do Dispositivo 1 não dopado (Figura 6.13a) mostra uma intensa emissão no azul (ver inset), em 415 nm, proveniente do β -NPB e um pequeno ombro em 373 nm proveniente da matriz BSBF.

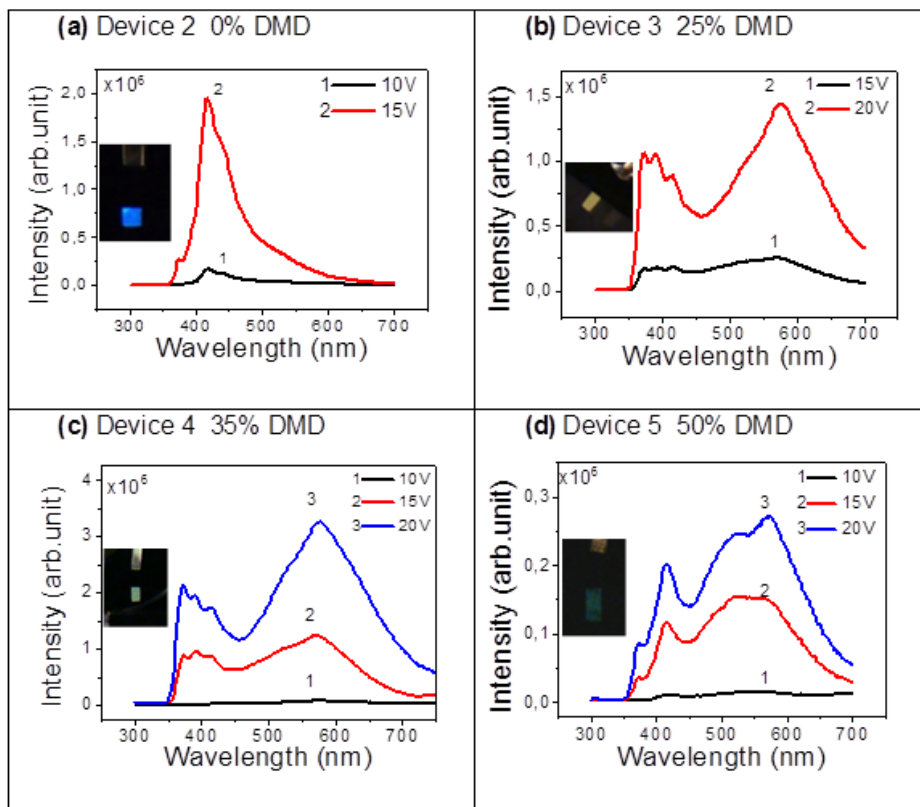


Figura 6.13 - Espectro de eletroluminescência (EL) dos Dispositivos testados.

Na Figura 6.13b, é apresentado o espectro de EL do Dispositivo 2, com uma concentração de 25% de dopante, onde identifica-se facilmente a emissão da matriz e do dopante na tensão de 20 V. Acima dessa tensão, o dispositivo começa a se degradar.

Na Figura 6.13c, podemos observar que o espectro de EL do Dispositivo 3, com 35% de dopante, foi bastante similar ao do 2 (25% H_3L1). No Dispositivo 3 se observa uma emissão de H_3L1 mais pronunciada, à medida que se aumenta a tensão. A emissão começou a ser observada a partir de 10 V, atingindo um máximo a 20 V.

Por fim, a Figura 6.13d apresenta o espectro de EL para uma concentração de 50% da matriz BSBF e do dopante H_3L1 (Dispositivo 4). Neste espectro, podemos observar a diminuição da intensidade em relação aos dispositivos co-depositados em 25% (Dispositivo 2) e 35% (Dispositivo 3). O aumento da concentração do dopante levou a um perfil de emissão diferente, modificando a dinâmica do transporte bem como

a recombinação de cargas. A identificação da emissão de H_3L1 foi feita a partir de 15 V, tornando-se mais pronunciada à medida em que a tensão aumenta.

Nestes experimentos, foi possível verificar que OLEDs fabricados com H_3L1 como camada emissora não apresentaram emissão devido à sua baixa condutividade elétrica. No entanto, a co-deposição do ligante com uma matriz possuindo maior condutividade possibilitou a transferência de energia. O melhor desempenho na emissão luminosa é obtido utilizando-se uma concentração de H_3L1 na matriz BSBF igual a 35%. Nestas condições, obteve-se uma luminância máxima de 35 cd m^{-2} . Os resultados apresentados neste item fazem parte de um artigo publicado na Optical Materials.